# EVALUACIÓN DE DOS MÉTODOS DE ANÁLISIS DE PROGESTERONA EN OVEJAS (KIT DE RIA DIRECTO EN TUBO RECUBIERTO Y KIT DE FLUOROINMUNOANÁLISIS DIRECTO EN MICROPLACA) EN COMPARACIÓN CON EL RIA DE DOBLE ANTICUERPO CON EXTRACCIÓN PREVIA.

Alabart, J.L., Ruiz, J.M., Garbayo[1], J.M., Sánchez, P., Folch, J.

Unidad de Tecnología de la Producción Animal. SIA-DGA. Apdo. 727. 50080-ZARAGOZA

## INTRODUCCIÓN

La medición de la concentración de progesterona plasmática por radioinmunoanálisis (RIA) se utiliza como diagnóstico de gestación y prueba de ciclicidad en estudios de reproducción animal desde hace años. La extracción previa de la progesterona con disolventes orgánicos asegura la eliminación de las posibles interferencias, por lo que se considera al RIA con extracción como método de referencia. Sin embargo, el proceso de extracción resulta largo, tedioso y expuesto a diversos tipos de errores, lo que limita su aplicación a personal especialmente experimentado. Los procedimientos directos (sin extracción) son más rápidos y sencillos, permitiendo analizar más muestras por jornada de trabajo con menor atención y esfuerzo.

Las principales desventajas del RIA (con extracción o directo) son: la utilización de isótopos radiactivos y la necesidad de medir cada muestra al menos un minuto en un contador de radiactividad; sin embargo, su mayor ventaja es que la medida final, cuentas por minuto (CPM), no depende de factores externos. Aunque se han desarrollado kits alternativos basados en métodos inmunoenzimáticos (EIA o ELISA), éstos tienden a ser más inseguros y menos repetibles que los RIAs debido a que la medida final (absorbancia) está influida también por la actividad del enzima, el tiempo de incubación de la reacción enzimática, la temperatura y el buen estado del oxidante y del sustrato.

En los últimos años han aparecido kits para la medición de hormonas que utilizan lantánidos no radiactivos como marcadores, aprovechando la fluorescencia retardada de determinados complejos organometálicos (TR-FIA: "time-resolved fluoroimmunoassay" o fluoroinmunoanálisis de resolución temporal). Sus principales ventajas son: la inocuidad de sus componentes y la estabilidad y rapidez de la lectura final (CPS: cuentas de luz durante 1 segundo).

En este trabajo se comparan 3 métodos: RIA con extracción previa, kit de RIA directo en tubo recubierto y kit de fluoroinmunoanálisis (TR-FIA) directo en microplaca.

---

Parcialmente financiado por INIA (Proyecto 9473). El protocolo y los reactivos para el RIA con extracción previa fueron cedidos por J.F. Beckers (Universidad de Lieja).
[1]Dirección actual: Université de Liège. Faculté de Médecine Vétérinaire. B-4000 Sart-Tilman (BELGIUM)

## MATERIAL Y MÉTODOS

La concentración plasmática de progesterona se determinó en 68 ovejas Rasa Aragonesa el día 17 postcubrición, mediante tres métodos:

RIA CON EXTRACCIÓN PREVIA (Modificación de BECKERS et al., 1975)
1- Agitación de 200 µl de plasma con 3 ml de éter de petróleo en tubo de cristal (16X100 mm)-15 min. 2- Congelación de la fase acuosa, decantación y evaporación de la fase orgánica en tubo de cristal (12X75 mm). 3- Adición de 300 µl de $^{125}$I-Progesterona (~20000 CPM) y 100 µl del primer anticuerpo. 4.- Incubación a 20ºC-4h y a 4ºC toda la noche. 5- Adición de 100 µl del 2º anticuerpo insolubilizado por unión a celulosa. 6- Incubación a 20ºC-30 min. 7- Centrifugación a 3000 g-4ºC-15 min. 8- Decantación del sobrenadante. 9- Determinación de CPM en el precipitado durante 1 minuto en un contador gamma.

KIT DE RIA DIRECTO EN TUBO RECUBIERTO ($^{125}$I-PROGESTERONE COATRIA, bioMérieux)
1- Agitación de 50 µl de plasma con 500 µl de $^{125}$I-Progesterona (~30000 CPM) en tubos de poliestireno (11x70 mm) recubiertos con el anticuerpo específico. 2- Incubación a 20ºC-2h. 3- Decantación del líquido. 4- Lavado con 2 ml de agua destilada. 5- Determinación de CPM en los tubos durante 1 minuto en un contador gamma.

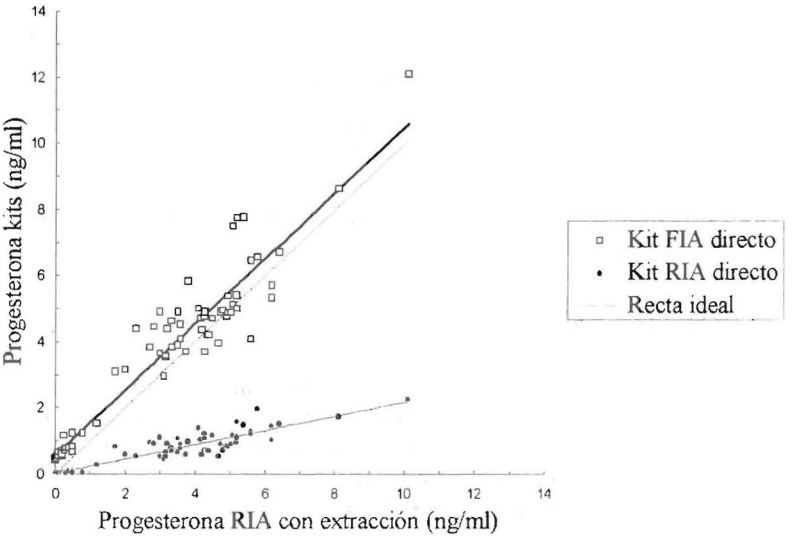
KIT DE FLUOROINMUNOANÁLISIS DIRECTO EN MICROPLACA (DELFIA-Progesterone, WALLAC, Pharmacia)
1- Agitación de 25 µl de plasma, 100 µl de progesterona marcada con un complejo de Europio (Eu; ~$10^6$ CPS) y 100 µl del primer anticuerpo en una placa de 96 pocillos recubiertos con un segundo anticuerpo. 2- Incubación a 20ºC-2h con agitación orbital. 3- Decantación o aspiración del líquido y lavado de los pocillos 6 veces. 4- Adición de 200 µl de disolución de exaltación de la fluorescencia. 5- Agitación orbital a 20ºC-5 min. 6- Determinación de CPS durante 1 sg en un fluorímetro de resolución temporal.

El análisis de las muestras se realizó por duplicado en el caso del RIA con extracción, y por simple en los otros 2 métodos. En cada uno de éstos, las 68 muestras se analizaron en un mismo día. Para estimar la repetibilidad de los análisis (coeficiente de variación intra-análisis) se realizaron 4 repeticiones en cada análisis de unas muestras de plasma de referencia de fases folicular y lútea (0.2 y 6.4 ng/ml, respectivamente, medidos por RIA con extracción).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La relación existente entre los resultados obtenidos con ambos kits y los del método de referencia se halla reflejada en las rectas de regresión de la figura 1. Así, en el rango de 0.01 a 10.1 ng/ml (medido por RIA con extracción), los resultados obtenidos por fluoroinmunoanálisis (Y) se relacionan con los obtenidos por RIA con extracción previa (X) según la recta: $Y = 0.56 + 0.99\ X$ ($r=0.95$; $P<0.001$). La pendiente (0.99) no difiere significativamente de 1, pero la ordenada en el origen difiere

Figura 1. Comparación de los dos kits con el RIA con extracción.




significativamente de cero (P<0.001) (La recta ideal sería: Y = 0.00 + 1.00 X, para una concordancia perfecta entre métodos). Esto quiere decir que los valores obtenidos por fluoroinmunoanálisis son superiores en 0.56 ng/ml a los determinados por RIA con extracción.

Sin embargo, los valores determinados por RIA directo (Z) son sensiblemente menores que los obtenidos por RIA con extracción (X): Z = 0.01 + 0.22 X (r=0.91; P<0.001). La pendiente (0.22) fue significativamente diferente de 1 (P<0.001), pero la ordenada no difirió significativamente de 0. Esto se traduce en que los valores hallados por este método son sólo el 22% de los del método de referencia.

El coeficiente de variación intra-análisis del método fluorimétrico fue menor que el del RIA directo o que el del RIA con extracción (referencia luteal: 2.4% vs. 14.1 y 14.0% respectivamente; referencia folicular: 5.3% vs. 101 y 110%).

El valor umbral de progesterona para considerar la existencia de un cuerpo lúteo activo depende, pues, del método de análisis. En nuestro laboratorio hemos utilizado el valor de 0.5 ng/ml para el kit de RIA directo, equivalente a unos 2 ng/ml en el RIA con extracción y a unos 2.5 ng/ml para el kit de fluoroinmunoanálisis directo.

Los resultados obtenidos en cuanto a repetibilidad y exactitud indican que el kit directo de fluorescencia retardada es adecuado para la medición de progesterona plasmática en ovejas.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BECKERS, J.F., BALLMAN, P., ECTORS, F., DERIVAUX, J. Le dosage radioimmunologique de la progestérone plasmatique chez la vache. C.R. Acad. Sc., Paris, 280, 335-338 (1975).