

Catalyst® Progesterone per la misurazione ambulatoriale del progesterone plasmatico nelle cagne

Di Graham Bilbrough, MA, VetMB, CertVA, MRCVS, e Tiffany Glavan, PhD

Introduzione

Il progesterone è un ormone riproduttivo femminile. La misurazione del progesterone nel plasma ematico (plasma) o nel siero della cagna è un elemento importante di:

- Previsione e conferma dell'ovulazione per determinare il tempo di riproduzione ottimale e massimizzare la fertilità.¹
- Previsione del parto.²
- Indagine sulle anomalie della riproduzione.³

Catalyst® Progesterone è un nuovo test IDEXX di immunodosaggio concepito per offrire una misurazione ambulatoriale tempestiva e affidabile del progesterone plasmatico nelle cagne. Funziona con gli analizzatori biochimici IDEXX Catalyst One® e IDEXX Catalyst Dx®. Ha un intervallo di riferimento di 0,6-63,6 nmol/l.

Nella pratica clinica, sono stati utilizzati vari metodi per monitorare il progesterone. Per molti decenni, il test radioimmunoassay* (RIA) è stato considerato lo standard di riferimento; tuttavia, nel 2014 il test originariamente convalidato è uscito di produzione⁴ e quale standard di riferimento è stata proposta la cromatografia liquida-spettrometria di massa (liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS).⁵

Poiché la LC-MS di norma non è disponibile nei laboratori di riferimento veterinari, negli analizzatori IMMULITE® † viene utilizzato in misura maggiore il test con rivelazione chemiluminescente (chemiluminescent immunoassay, CLIA).[‡] Tuttavia, nonostante la forte correlazione tra il CLIA e i metodi di riferimento,⁶ è stato anche dimostrato un bias clinicamente significativo tra i metodi.⁴ La situazione è ulteriormente complicata dalla differente performance tra le iterazioni della metodologia CLIA.⁷

Per i test del progesterone utilizzati con campioni canini, è importante che vi siano accuratezza e precisione nell'intervallo associato all'ovulazione, pari o inferiore a 9,5-31,2 nmol/l. ⁴ Per questo studio, l'intervallo di interesse clinico è stato definito in 0-32 nmol/l.

Gli obiettivi dello studio erano:

- Valutare le prestazioni di Catalyst® Progesterone rispetto alla LC-MS mediante un confronto di metodi (metodo di riferimento).⁸
- Valutare le prestazioni di due iterazioni della metodologia CLIA rispetto alla LC-MS mediante un confronto di metodi.
- Valutare la precisione di Catalyst® Progesterone utilizzando fluidi di controllo (studio di precisione).

Materiali e metodi

I dati sono stati raccolti in Microsoft Office Excel 2016 prima di essere esportati in JMP® 14.0.0 per le analisi statistiche, laddove pertinente, utilizzando il componente aggiuntivo del metodo comparativo del SAS Institute.

Studio con metodo comparativo

Nei mesi di settembre e ottobre del 2018, sono stati prelevati campioni di sangue a 60 cagne seguite presso due cliniche veterinarie per la gestione della riproduzione. Tutti i campioni sono stati prelevati nel periodo periovulatorio. In alcune pazienti sono stati effettuati prelievi in più giorni (intervallo 1-7 venipunture), consentendo di effettuare 101 confronti. Per informazioni dettagliate, vedere tabella 1.

Per ciascuna venipuntura, entro 30 minuti:

1. Il siero è stato ottenuto da sangue prelevato in provette senza anticoagulante.
2. Il plasma con litio eparina è stato separato dai globuli rossi e diviso in due aliquote.

Clinica	Campioni	CLIA	Catalyst® Progesterone	LC-MS
A	32 cagne; 52 confronti	CLIA1 <ul style="list-style-type: none"> Siero (come da indicazioni nel relativo foglietto illustrativo) Non sono state utilizzate provette con gel separatore in quanto il foglietto illustrativo indica una riduzione dei livelli di progesterone dipendente dal tempo IMMULITE®/IMMULITE 1000 Progesterone (numero di catalogo: LKPW1) eseguito con IMMULITE 1 da tecnici di laboratorio presso gli IDEXX Reference Laboratories Analizzato entro 24 ore dal prelievo 	<ul style="list-style-type: none"> Plasma con litio eparina Non sono state utilizzate provette con gel separatore in quanto la guida per l'operatore indica che non sono adeguate Analizzatore chimico Catalyst Dx® presso la clinica, gestito da tecnici veterinari Analizzato entro 4 ore dal prelievo 	<ul style="list-style-type: none"> Plasma con litio eparina LC-MS^s presso IDEXX R&D Campioni conservati a 4 °C e analizzati in lotti entro una settimana dal prelievo
B	28 cagne; 49 confronti	CLIA2000 <ul style="list-style-type: none"> Siero (come da indicazioni nel relativo foglietto illustrativo) Non sono state utilizzate provette con gel separatore in quanto il foglietto illustrativo indica una diminuzione dei livelli di progesterone dipendente dal tempo IMMULITE® 2000 Progesterone (Numero di catalogo: L2KPW6) eseguito con IMMULITE 2000 da tecnici di laboratorio presso gli IDEXX Reference Laboratories Analizzato entro 24 ore dal prelievo 	<ul style="list-style-type: none"> Plasma con litio eparina Non sono state utilizzate provette con gel separatore in quanto la guida per l'operatore indica che non sono adeguate Analizzatore chimico Catalyst Dx® presso IDEXX R&D, gestito da tecnici veterinari Campioni conservati a 4 °C e analizzati entro 48 ore dal prelievo Analizzato entro 24 ore dal prelievo 	<ul style="list-style-type: none"> Plasma con litio eparina LC-MS^s presso IDEXX R&D Campioni conservati a 4 °C e analizzati in lotti entro una settimana dal prelievo

Tabella 1. Tipi e trattamento dei campioni per i test del progesterone

Non è stato escluso alcun campione. Tutti i risultati erano inferiori al limite superiore dei rispettivi intervalli dinamici dei test. A qualsiasi risultato al di sotto del limite inferiore dell'intervallo dinamico (0,6 nmol/l per tutti i test) è stato assegnato il valore di 0,6 nmol/l.

Per varie coppie metodologiche è stata effettuata l'analisi di regressione lineare di Passing e Bablok. I coefficienti di correlazione sono stati interpretati come segue: $r = 0,90-1,0$ indica una correlazione molto alta, $0,70-0,89$ una correlazione alta, $0,50-0,69$ una correlazione moderata, $0,30-0,49$ una correlazione bassa e $0-0,29$ indica scarsa o nessuna correlazione.⁸

L'analisi di regressione è stata utilizzata anche per individuare l'evidenza statistica di errore sistematico (bias costante e/o proporzionale). Gli intervalli di confidenza al 95 % per la pendenza y che non includevano il valore zero sono stati considerati evidenza di bias costante. Gli intervalli di confidenza al 95 % per il coefficiente angolare che non includevano il valore 1,0 sono stati considerati evidenza di bias proporzionale.

Studio di precisione

La precisione è stata valutata mediante analisi ripetute di due fluidi di controllo nell'intervallo di interesse clinico. Ogni fluido è stato analizzato 8 volte al giorno (4 al mattino, 4 alla sera) per 10 giorni, per disporre di un totale di 80 repliche. Il coefficiente di variazione (CV) della percentuale totale è stato calcolato come rapporto tra la deviazione standard e la media della concentrazione. Maggiore è il CV, maggiore è la dispersione dei risultati attorno alla media.

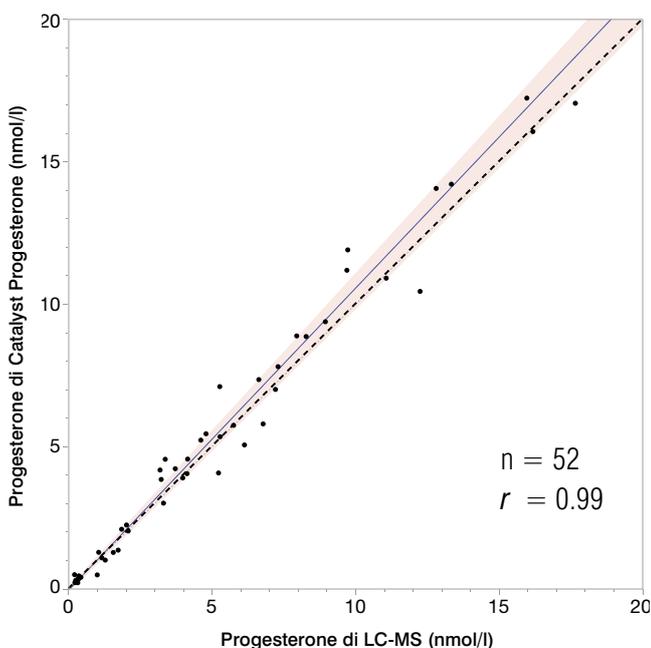
Risultati

Studio con metodo comparativo

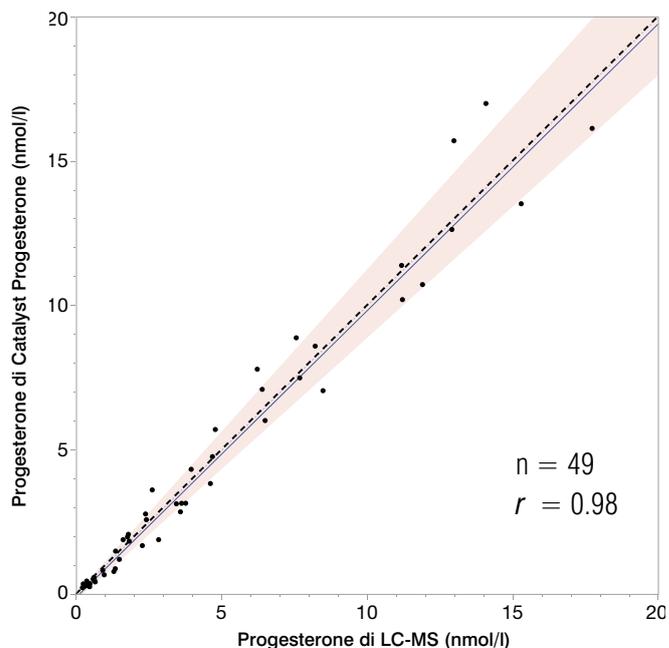
I risultati sono riassunti nella figura 1. CLIA1, CLIA2000 e Catalyst® Progesterone hanno dimostrato tutti una correlazione molto alta con il metodo di riferimento. Per Catalyst Progesterone, ciò è stato dimostrato in entrambi i gruppi di campioni.

Non vi è stata alcuna evidenza di bias costante o proporzionale per CLIA1 e Catalyst® Progesterone. Per CLIA2000, sono stati riscontrati un bias costante (pendenza = 0,54 nmol/l, con limiti di confidenza di 0,38-0,86 nmol/l) e un bias proporzionale (coefficiente angolare = 0,75, con limiti di confidenza di 0,70-0,80).

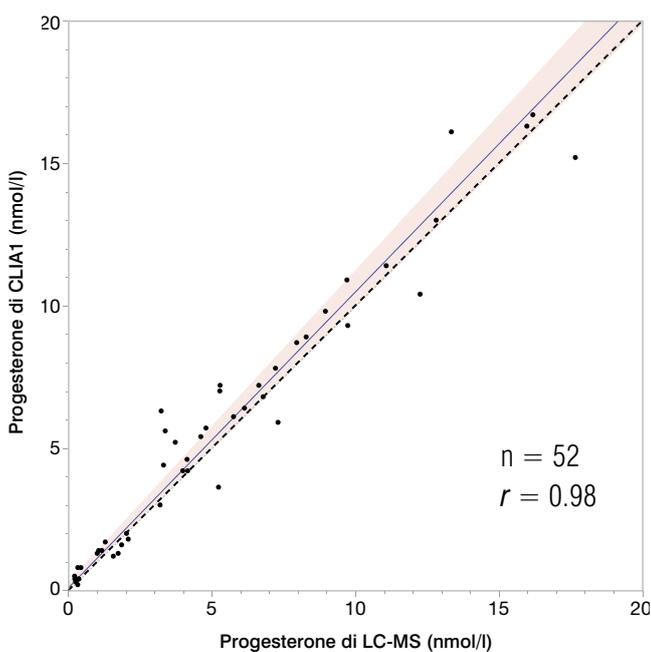
a. Clinica A: Confronto tra Catalyst Progesterone e il metodo di riferimento (LC-MS)



b. Clinica B: Confronto tra Catalyst Progesterone e il metodo di riferimento (LC-MS)



c. Clinica C: Confronto tra CLIA1 e il metodo di riferimento (LC-MS)



d. Clinica D: Confronto tra CLIA2000 e il metodo di riferimento (LC-MS)

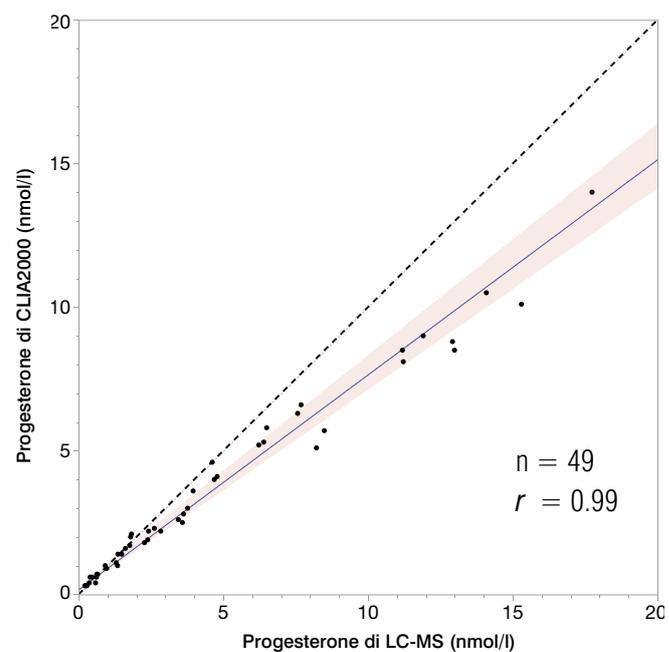


Figura 1. Diagrammi di Passing e Bablok della corrispondenza del progesterone valutato con due metodi nei campioni raccolti durante il periodo periovulatorio della cagna. La linea tratteggiata rappresenta la linea di identità ($x = y$), la linea blu continua rappresenta la linea di regressione e l'area blu rappresenta l'intervallo di confidenza per la linea di regressione.

Studio di precisione

I risultati dell'analisi di precisione vengono mostrati nella tabella 2. Il nuovo metodo di Catalyst® Progesterone ha presentato un CV totale < 10% in entrambi i livelli di concentrazione. Per confronto, l'inserimento del prodotto* per il metodo CLIA ha mostrato un CV totale pari a 21,7%, 12,5%, 10,5% e 10,6% a una concentrazione media di, rispettivamente, 1,5 nmol/l, 4,4 nmol/l, 12,5 nmol/l e 36,9 nmol/l.

Fluido	Catalyst Dx	Progesterone medio (nmol/l)	Osservazioni	Deviazione standard (nmol/l)
A	X	3,5	80	0,4
	Y	3,4	80	0,3
	Z	3,5	80	0,2
B	X	18,4	80	1,3
	Y	17,2	80	1,8
	Z	19,1	80	1,8

Il CV totale medio per il fluido A era del 9,6%. Il CV totale medio per il fluido B era del 9,1%.

Tabella 2. Risultati dello studio di precisione Catalyst Progesterone

Conclusioni

Catalyst® Progesterone ha dimostrato un'eccellente correlazione ($r = 0,98$; $r = 0,99$) con il metodo LCMS di riferimento dello studio e una buona precisione nell'intervallo di interesse clinico.

Entrambe le iterazioni del CLIA hanno dimostrato un'eccellente correlazione con il metodo di riferimento (CLIA1: $r = 0,98$; CLIA2000: $r = 0,99$). Tuttavia, per CLIA2000, è stato riscontrato un marcato bias proporzionale (coefficiente angolare = 0,75) rispetto al metodo di riferimento; la moltiplicazione del risultato di CLIA2000 per 1,25 fornirà una stima del risultato dal metodo di riferimento, ad esempio $6,0 \text{ nmol/l} \times 1,25 = 7,5 \text{ nmol/l}$. Ciò non implica che CLIA2000 sia inadatto all'uso clinico, piuttosto, enfatizza la necessità di una metodologia analitica e di un tipo di campione coerenti per il monitoraggio delle concentrazioni di progesterone. Catalyst® Progesterone produce risultati accurati e precisi quando viene utilizzato per quantificare il progesterone in campioni di plasma di cagne. Questo nuovo test immunologico costituisce un'opzione affidabile e conveniente per la misurazione ambulatoriale del progesterone canino.

Bibliografia

1. Concannon P, Hansel W, McEntee K. Changes in LH, progesterone and sexual behavior associated with preovulatory luteinization in the bitch. *Biol Reprod.* 1977;17(4):604-613.
2. De Cramer KGM, Nöthling JO. The precision of peri-oestrous predictors of the date of onset of parturition in the bitch. *Theriogenology.* 2017;96:153-157.
3. Meyers-Wallen VN. Unusual and abnormal canine estrous cycles. *Theriogenology.* 2007;68(9):1205-1210.
4. Nöthling JO, De Cramer KGM. Comparing the values of progesterone in the blood of bitches as measured with a chemiluminescence immunoassay and a radioimmunoassay. *Reprod Dom Anim.* 2018;53(5):1136-1141.
5. Stanczyk FZ, Lee JS, Santen RJ. Standardization of steroid hormone assays: why, how, and when? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007;16(9):1713-1719.
6. Kutzler MA, Mohammed HO, Lamb SV, Meyers-Wallen VN. Accuracy of canine parturition date prediction from the initial rise in preovulatory progesterone concentration. *Theriogenology.* 2003;60(6):1187-1196.
7. Schmicke M, Urhausen C, Wolf K, Schmidt S, Günzel Apel AR. Evaluation of the blood progesterone concentration in the bitch measured by chemiluminescence immunoassay at the day of ovulation. *Tierärztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere.* 2016;44(5):317-322.
8. Zady MF. Z-12: Correlation and simple least squares regression. Westgard QC website. www.westgard.com/lesson42.htm. Accesso effettuato il 15 gennaio 2019.

*125-I radioimmunoassay (Coat-A-Count® radioimmunoassay; Siemens Health Care Diagnostics Inc., Los Angeles, California, USA)

†Siemens Medical Solutions Diagnostics, Los Angeles, California, USA.

‡CLIA è utilizzato per i campioni canini presso gli IDEXX Reference Laboratories.

§La separazione in LC è stata ottenuta utilizzando una colonna Acquity UPLC BEH300 C4 di 1,7 µm, 2,1 x 100 mm con gradiente di fase mobile A (acido formico allo 0,1% in acqua) e fase mobile B (acido formico allo 0,1% in metanolo). È stato utilizzato lo spettrometro di massa a triplo quadrupolo API 4000 (Applied Biosystems/MDS Sciex) in modalità monitoraggio di reazioni multiple (Multiple Reaction Monitoring, MRM) con interfaccia elettrospray positiva. Le transizioni MRM per il progesterone sono state osservate a 315,2 → 109,1 m/z (quantificatore) e 315,2 → 97,2 m/z (qualificatore).

¶IMMULITE 2000 Progesterone (PIL2KPW-21, 2013-12-17).

© 2019 IDEXX Laboratories, Inc. Tutti i diritti riservati. • 1901046-0119-EU_Progesterone_IT_S.I.
• Catalyst, Catalyst Dx e Catalyst One sono marchi commerciali o marchi commerciali registrati di IDEXX Laboratories, Inc. o delle sue affiliate negli Stati Uniti e/o in altri Paesi. Tutti gli altri prodotti, nomi aziendali e loghi sono marchi commerciali o marchi registrati dei rispettivi titolari. L'Informativa sulla privacy di IDEXX è disponibile sul sito Web idexx.com.