

# Catalyst® Progesterone voor in-huis bepaling van progesteron in plasma van teven

Door Graham Bilbrough, MA, VetMB, CertVA, MRCVS; en Tiffany Glavan, PhD

## Inleiding

Progesteron is een vrouwelijk voortplantingshormoon. Meting van progesteron in bloedplasma (plasma) of serum van de teef is een belangrijk element voor:

- het voorspellen en bevestigen van ovulatie om de optimale dektijd te bepalen en vruchtbaarheid te maximaliseren;<sup>1</sup>
- het voorspellen van de geboorte;<sup>2</sup>
- het onderzoeken van voortplantingsproblemen.<sup>3</sup>

Catalyst® Progesterone is een nieuwe immunoassay van IDEXX, die is ontworpen voor snelle en betrouwbare progesteronbepaling bij de hond in de kliniek. De test kan gebruikt worden met zowel de IDEXX Catalyst One® als met de IDEXX Catalyst Dx® klinische chemie analyzers. Het heeft een rapporteerbaar bereik van 0,6–63,6 nmol/l.

In de praktijk zijn verschillende methoden gebruikt om progesteron te monitoren bij de teef. Gedurende vele decennia werd radioimmunoassay\* (RIA) beschouwd als een gouden standaard; de oorspronkelijk gevalideerde test werd echter in 2014 stopgezet,<sup>4</sup> liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) is voorgesteld als de gouden standaard.<sup>5</sup>

Omdat LC-MS meestal niet beschikbaar is in veterinaire referentielaboratoria, wordt een chemiluminescent immunoassay (CLIA) op IMMULITE® analyzers† vaker gebruikt.‡ Ondanks een sterke correlatie tussen CLIA en referentiemethodes,<sup>6</sup> is een klinisch significante bias tussen de methodes echter ook aangetoond.<sup>4</sup> De situatie wordt verder gecompliceerd doordat prestaties tussen iteraties van de CLIA-methodologie verschillen.<sup>7</sup>

Voor assays die gebruikt worden voor de bepaling van progesteron in hondenmonsters, is het belangrijk om nauwkeurigheid en precisie te hebben in het bereik dat geassocieerd is met de ovulatie 9,5–31,2 nmol/l of lager.<sup>4</sup> Voor dit onderzoek werd het bereik dat van klinisch belang is gedefinieerd als 0–32 nmol/l.

De doelstellingen van het onderzoek waren:

- het evalueren van de prestaties van Catalyst Progesterone door een methode vergelijking met LC-MS (referentiemethode);<sup>§</sup>
- het beoordelen van de prestaties van twee iteraties van de CLIA-methodologie door een methode vergelijking met LC-MS;
- het beoordelen van de precisie van Catalyst Progesterone door middel van controlevloeistoffen (precisie-onderzoek).

## Materialen en methodes

De gegevens werden verzameld in Microsoft Office Excel 2016 voordat ze werden geëxporteerd naar JMP® 14.0.0 voor statistische analyse, waar van toepassing, met behulp van de invoegtoepassing Method Comparison van SAS Institute.

## Methode vergelijkend onderzoek

Er werden bloedmonsters verzameld van 60 teven, die in september en oktober 2018 tweedierenziekenhuizen bezochten voor fokbegeleiding. Alle monsters werden in de periovulatoire periode afgenomen. Bij sommige patiënten werden op meerdere dagen monsters afgenomen (variërend van 1-7 venapuncties), waardoor 101 vergelijkingen konden worden gemaakt. Zie tabel 1 voor details.

Voor elke venapunctie werd binnen 30 minuten:

1. Serum gewonnen uit bloed dat werd afgenomen in buisjes zonder antistollingsmiddel.
2. Lithiumheparineplasma gescheiden van de rode bloedcellen en verdeeld in twee aliquots.

| Ziekenhuis | Monsters                       | CLIA  | Catalyst® Progesterone   | LC-MS  |
|------------|--------------------------------|---|--|--|
| A          | 32 teven;<br>52 vergelijkingen | CLIA1 <ul style="list-style-type: none"> <li>• Serum (verpakt voor verzending volgens de richtlijnen)</li> <li>• Gelbarrièrebuisjes werden niet gebruikt, omdat de bijsluiter een tijdsafhankelijke afname in progesteronniveaus aangeeft.</li> <li>• IMMULITE®/IMMULITE 1000 Progesterone (catalogusnummer: LKPW1) door laboranten geanalyseerd op een IMMULITE 1 in IDEXX Reference Laboratories</li> <li>• Geanalyseerd binnen 24 uur na afname</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Lithiumheparine plasma</li> <li>• Gelbarrièrebuisjes werden niet gebruikt, omdat de handleiding aangeeft dat deze niet geschikt zijn</li> <li>• Catalyst Dx® klinische chemie analyzer in het ziekenhuis, bediend door veterinaire laboranten</li> <li>• Geanalyseerd binnen 4 uur na afname</li> </ul>                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Lithiumheparine-plasma</li> <li>• LC-MS® bij IDEXX R&amp;D</li> <li>• Monsters bewaard op 4°C en in batches geanalyseerd binnen 1 week na afname</li> </ul> |
| B          | 28 teven;<br>49 vergelijkingen | CLIA2000 <ul style="list-style-type: none"> <li>• Serum (verpakt voor verzending volgens de richtlijnen)</li> <li>• Gelbarrièrebuisjes werden niet gebruikt, omdat de bijsluiter een tijdsafhankelijke afname in progesteronniveaus aangeeft.</li> <li>• IMMULITE® 2000 Progesterone (catalogusnummer: L2KPW6) door laboranten geanalyseerd op een IMMULITE 2000 in IDEXX Reference Laboratories</li> <li>• Geanalyseerd binnen 24 uur na afname</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Lithiumheparine plasma</li> <li>• Gelbarrièrebuisjes werden niet gebruikt, omdat de handleiding aangeeft dat deze niet geschikt zijn</li> <li>• Catalyst Dx® klinische chemie analyzer bij IDEXX R&amp;D, bediend door laboranten</li> <li>• Monsters bewaard op 4°C en binnen 48 uur na afname geanalyseerd</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Lithiumheparine-plasma</li> <li>• LC-MS® bij IDEXX R&amp;D</li> <li>• Monsters bewaard op 4°C en in batches geanalyseerd binnen 1 week na afname</li> </ul> |

**Tabel 1.** Monstertypes en hantering voor de progesteron assays

Er werden geen monsters uitgesloten. Alle resultaten waren onder de bovenlimiet van de betreffende dynamische bereiken van de assays. Alle resultaten onder de onderlimiet van het dynamische bereik (0,6 nmol/l voor alle assays) werden op 0,6 nmol/l gezet.

Lineaire regressieanalyse volgens Passing en Bablok werd voltooid voor verschillende paren van de methodologie. Correlatiecoëfficiënten werden als volgt geïnterpreteerd:  $r = 0,90-1,0$  definieerde zeer hoge correlatie;  $0,70-0,89$ , hoge correlatie;  $0,50-0,69$ , matige correlatie;  $0,30-0,49$ , lage correlatie; en  $0-0,29$ , weinig of geen correlatie.<sup>8</sup>

De regressieanalyse werd ook gebruikt om te zoeken naar statistisch bewijs van systematische fout (constante en/of proportionele bias). Betrouwbaarheidsintervallen van 95% voor het y-snijpunt die de waarde nul niet bevatten, werden beschouwd als bewijs van constante bias. Betrouwbaarheidsintervallen van 95% voor de helling die de waarde 1.0 niet bevatte, werd beschouwd als bewijs van proportionele bias.

### Precisie-onderzoek

Precisie werd beoordeeld door herhaalde analyse van twee controlevloeistoffen in het klinisch relevante bereik. Elke vloeistof werd 8 keer per dag geanalyseerd (4 's ochtends, 4 's avonds) gedurende 10 dagen voor een totaal van 80 herhalingen. De variatiecoëfficiënt (CV) werd berekend als de verhouding van de standaarddeviatie tot het gemiddelde van de concentratie. Hoe groter de CV, hoe groter de spreiding van de resultaten rond het gemiddelde.

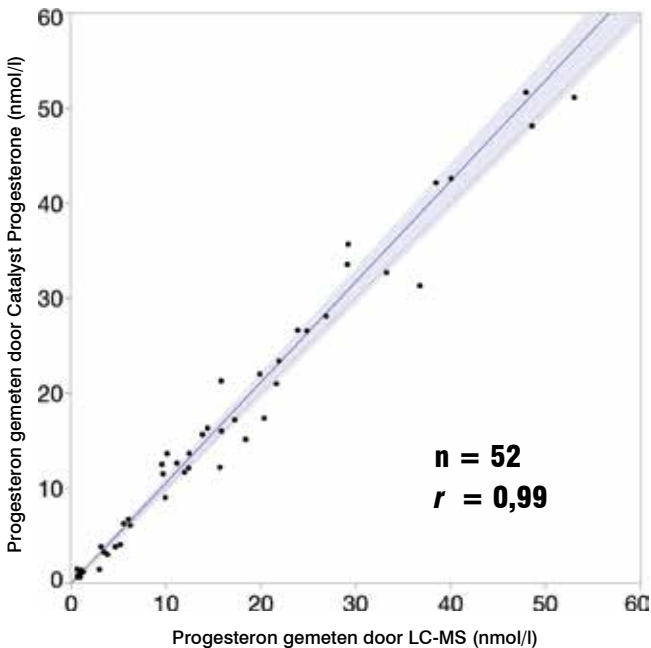
## Resultaten

### Methode vergelijkend onderzoek

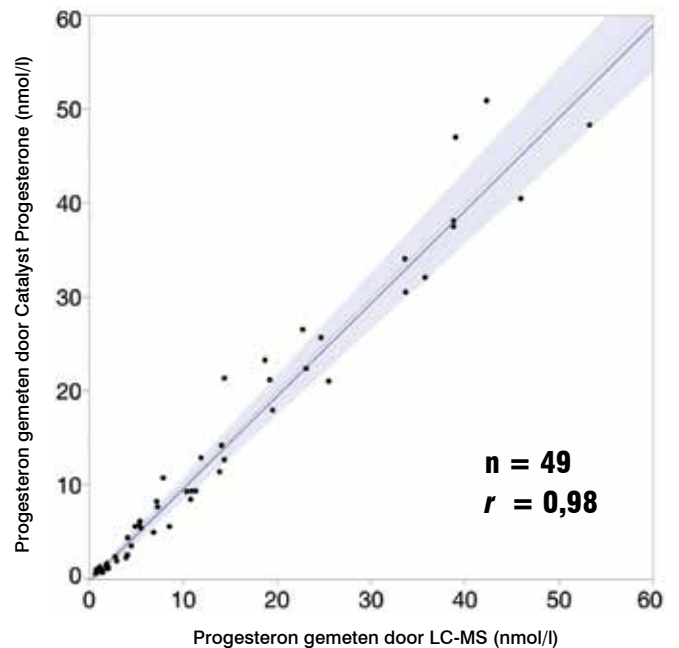
De resultaten zijn samengevat in afbeelding 1. CLIA1, CLIA2000 en Catalyst® Progesterone toonden allemaal een zeer hoge correlatie met de referentiemethode. Voor Catalyst Progesterone werd dit in beide groepen van monsters aangetoond.

Er was geen bewijs van constante of proportionele bias voor CLIA1 en Catalyst Progesterone. Voor CLIA2000 was er een constante bias (snijpunt - 0,54 nmol/l; met betrouwbaarheidsgrenzen van 0,38-0,86 nmol/l) en proportionele bias (helling = 0,75; met betrouwbaarheidsgrenzen van 0,70-0,80).

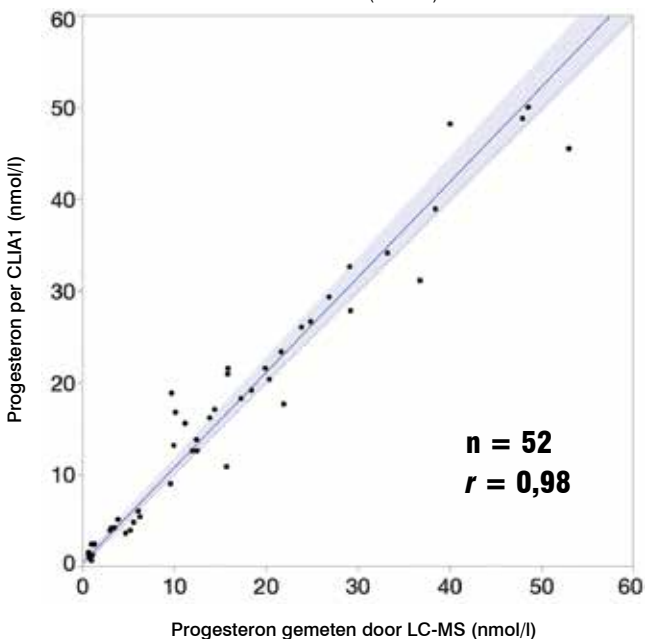
**a. Ziekenhuis A:** Vergelijking van Catalyst Progesterone met de referentiemethode (LC-MS)



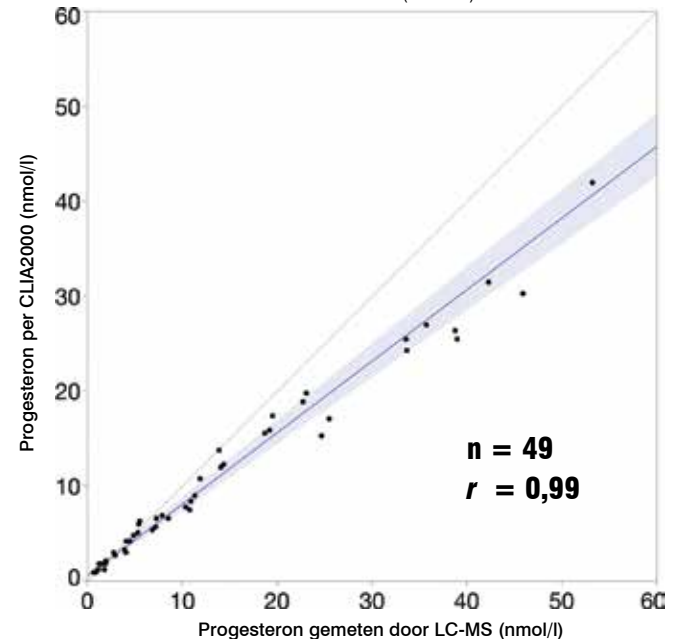
**b. Ziekenhuis B:** Vergelijking van Catalyst Progesterone met de referentiemethode (LC-MS)



**c. Ziekenhuis C:** Vergelijking van CLIA1 met de referentiemethode (LC-MS)



**d. Ziekenhuis D:** Vergelijking van CLIA2000 met de referentiemethode (LC-MS)



**Afbeelding 1.** Passing en Bablok plots voor de overeenkomst tussen progesteron beoordeeld door twee methodes in monsters die zijn afgenomen tijdens de periovulatoire periode van het teefje. De stippellijn geeft de identiteitslijn weer ( $x = y$ ), de ononderbroken blauwe lijn vertegenwoordigt de regressielijn en het blauwe gebied vertegenwoordigt het betrouwbaarheidsinterval voor de regressielijn.

## Precisie-onderzoek

De resultaten van de precisie analyse zijn weergegeven in tabel 2. De nieuwe methode van Catalyst® Progesterone had een CV van <10% op beide concentratieniveaus. Ter vergelijking: de bijsluiters van de CLIA-methode toonde een totale CV van 21,7%, 12,5%, 10,5% en 10,6% bij een gemiddelde concentratie van respectievelijk 1,5 nmol/l, 4,4 nmol/l, 12,5 nmol/l en 36,9 nmol/l.

| Vloeistof | Catalyst Dx | Gemiddeld progesteron (nmol/l) | Observaties | Standaarddeviatie (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                        |

Gemiddelde CV voor vloeistof A was 9,6%. De gemiddelde CV voor vloeistof B was 9,1%.

**Tabel 2.** Resultaten van het Catalyst Progesterone precisie-onderzoek

## Conclusie

Catalyst Progesterone toonde een zeer goede correlatie ( $r = 0,98$ ;  $r = 0,99$ ) met de referentiemethode LC-MS en goede precisie in het klinisch relevante bereik.

Beide iteraties van de CLIA toonden een zeer goede correlatie met de referentiemethode (CLIA1:  $r = 0,98$ ; CLIA2000:  $r = 0,99$ ). Voor de CLIA2000 was er echter een duidelijke proportionele bias (helling = 0,75) met de referentiemethode; vermenigvuldigen van het CLIA2000-resultaat met 1,25 geeft een schatting van het resultaat van de referentiemethode, bijv.  $6,0 \text{ nmol/l} \times 1,25 = 7,5 \text{ nmol/l}$ . Dit betekent niet dat CLIA2000 niet geschikt is voor klinisch gebruik; maar het benadrukt de noodzaak van een consistente analytische methode en monstertype bij het trenden van progesteronconcentraties.

Catalyst Progesterone produceert nauwkeurige en precieze resultaten wanneer het wordt gebruikt om progesteron te kwantificeren in plasmamonsters van teven. Deze nieuwe immunoassay levert een betrouwbare en eenvoudige mogelijkheid om in-huis progesteron te meten bij honden.

## Referenties

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](http://www.westgard.com/lesson42.htm). Accessed January 15, 2019.

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

<sup>†</sup>Siemens Medical Solutions Diagnostics, Los Angeles, California, VS.

<sup>‡</sup>CLIA wordt gebruikt voor monsters van honden in IDEXX Reference Laboratories.

<sup>§</sup>De LC-scheiding werd bereikt met behulp van een Acquity UPLC BEH300 C4 1,7 µm, 2,1 x 100 mm kolom met gradiënt mobiele fase A (0,1% mierenzuur in water) en mobiele fase B (0,1% mierenzuur in methanol). De API 4000 triple quadrupole-massaspectrometer (Applied Biosystems/MDS Sciex) werd gebruikt in multiple reaction monitoring (MRM)-modus met positieve elektrospay-interface. De MRM-transities voor progesteron werden waargenomen bij m/z 315,2 → 109,1 (quantifier) en m/z 315,2 → 97,2 (qualifier).

<sup>¶</sup>IMMULITE 2000 Progesterone (PIL2KPW-21, 2013-12-17).