

Catalyst® Progesterone zur praxisinternen Messung von Progesteron im Plasma von Hündinnen

Von Graham Bilbrough, MA, VetMB, CertVA, MRCVS und Tiffany Glavan, PhD

Einführung

Progesteron ist ein weibliches Fortpflanzungshormon. Die Bestimmung von Progesteron im Blut (Plasma oder Serum) einer Hündin ist ein wichtiger Bestandteil für folgende Beurteilungen:

- Einschätzung des optimalen Deckzeitpunktes und Verbesserung der Fertilität durch die Vorhersage und die Bestätigung der Ovulation¹
- Vorhersage des Geburtstermins²
- Untersuchung von Fortpflanzungsanomalien³

Als neuer Immunoassay von IDEXX ermöglicht Catalyst® Progesterone eine schnelle und zuverlässige praxisinterne Messung von Progesteron bei Hunden. Er kann mit den Chemieanalysegeräten IDEXX Catalyst One® und IDEXX Catalyst Dx® verwendet werden. Der Messbereich liegt zwischen 0,6 und 36,6 nmol/L.

Es existieren verschiedene Nachweismethoden, die eine Messung des Progesteron-Spiegels bei Hündinnen ermöglichen. Über viele Jahrzehnte galt der Radioimmunoassay* (RIA) als Goldstandard, doch der ursprünglich validierte Assay wurde 2014 eingestellt⁴. Als neuer Goldstandard wird die Flüssigkeitschromatografie-Massenspektrometrie (LC-MS) angesehen.⁵

Die LC-MS ist in veterimärmedizinischen Laboratorien allerdings nur selten verfügbar, so dass meistens ein Chemilumineszenz-Immunoassay (CLIA) auf IMMULITE® Analysegeräten[†] durchgeführt wird.[‡] Trotz einer hohen Korrelation zwischen CLIA und den Referenzmethoden,⁶ konnte ein klinisch relevanter und signifikanter Bias zwischen verschiedenen Nachweismethoden ausgemacht werden.⁴ Die Situation wird weiterhin verkompliziert, da man vergleichend in Wiederholungsdurchläufen bei Anwendung der CLIA-Methode eine sehr unterschiedlich gute Performance beobachtet.⁷

Canine Progesteron-Assays sollten vor allem in dem Messbereich sehr genau und präzise sein, der mit dem Ovulationszeitpunkt der Hündin (9,5 – 31,2 nmol/L) assoziiert wird und im niedrigen Bereich.⁴ Für diese Studie wurde der Bereich des klinischen Interesses auf 0–32 nmol/L festgelegt.

Die Ziele der Studie waren:

- Beurteilung der Leistungsfähigkeit von Catalyst Progesterone anhand eines Methodenvergleichs mit LC-MS (Referenzmethode)[§]
- Beurteilung von zwei Wiederholungsdurchläufen der CLIA-Methode im Methodenvergleich zur LC-MS
- Beurteilung der Präzision von Catalyst Progesterone anhand von Kontrollflüssigkeiten (Präzisionsstudie)

Materialien und Methoden

Die Daten wurden in Microsoft Office Excel 2016 gebündelt, bevor sie (bei Eignung) zur statistischen Analyse mithilfe des Add-Ins für Methodenvergleich vom SAS Institute zu JMP® 14.0.0 exportiert wurden.

Methodenvergleichsstudie

Es wurden Blutproben von 60 Hündinnen entnommen, die im September und Oktober 2018 zum Zuchtmanagement in zwei verschiedenen Tierkliniken vorgestellt wurden. Alle Proben wurden in der periovulatorischen Phase entnommen. Von einigen Probanden wurden Proben an mehreren Tagen entnommen (1–7 Blutentnahmen), sodass 101 Vergleiche durchgeführt werden konnten. Details finden Sie in Tabelle 1.

Nach jeder Blutentnahme wurden innerhalb von 30 Minuten die folgenden Maßnahmen getroffen:

1. Aus dem abgenommenen Blut in Röhrchen ohne Antikoagulans wurde Serum gewonnen.
2. Das Lithiumheparinplasma wurde von den Erythrozyten getrennt und auf zwei Aliquote aufgeteilt.

Klinik	Proben	CLIA	Catalyst® Progesterone	LC-MS
A	32 Hündinnen; 52 Vergleiche	CLIA1 <ul style="list-style-type: none"> • Serum (gemäß entsprechender Packungsbeilage) • Es wurden keine Teströhrchen mit Trenngel verwendet, da in der Packungsbeilage angegeben ist, dass sich die Progesteronspiegel damit über die Zeit verringern. • IMMULITE®/IMMULITE 1000 Progesterone (Katalognummer: LKPW1) wird bei IDEXX Reference Laboratories von Fachkräften mit IMMULITE 1 verwendet. • Analyse innerhalb von 24 Stunden nach Probennahme 	<ul style="list-style-type: none"> • Lithiumheparinplasma • Entsprechend der Bedienungsanleitung wurden keine Teströhrchen mit Trenngel verwendet, da diese ungeeignet sind. • Catalyst Dx® Chemieanalysegerät in der Klinik, Durchführung von Fachkräften • Analyse innerhalb von 4 Stunden nach Probennahme 	<ul style="list-style-type: none"> • Lithiumheparinplasma • LC-MS® bei IDEXX R&D • Lagerung der Proben bei 4 °C und chargenweise Analyse innerhalb von 1 Woche nach Probenahme
B	28 Hündinnen; 49 Vergleiche	CLIA2000 <ul style="list-style-type: none"> • Serum (gemäß entsprechender Packungsbeilage) • Es wurden keine Teströhrchen mit Trenngel verwendet, da in der Packungsbeilage angegeben ist, dass sich die Progesteronspiegel damit über die Zeit verringern. • IMMULITE® 2000 Progesterone (Katalognummer: L2KPW6) wird bei IDEXX Reference Laboratories von Fachkräften mit IMMULITE 2000 verwendet. • Analyse innerhalb von 24 Stunden nach Probennahme 	<ul style="list-style-type: none"> • Lithiumheparinplasma • Entsprechend der Bedienungsanleitung wurden keine Teströhrchen mit Trenngel verwendet, da diese ungeeignet sind. • Catalyst Dx® Chemieanalysegerät bei IDEXX R&D, Durchführung von Fachkräften • Lagerung der Proben bei 4 °C und Analyse innerhalb von 48 Stunden nach Probennahme 	<ul style="list-style-type: none"> • Lithiumheparinplasma • LC-MS® bei IDEXX R&D • Lagerung der Proben bei 4 °C und chargenweise Analyse innerhalb von 1 Woche nach Probenahme

Tabelle 1. Arten der Proben und Vorbereitung für die Progesteron-Assays

Keine Proben wurden ausgeschlossen. Keines der Ergebnisse lag über dem dynamischen Messbereich. Einige Ergebnisse lagen unterhalb des dynamischen Messbereiches. Diesen wurde der untere Cut-Off (0,6 nmol/L) zugeordnet.

Für mehrere Methodenpaare wurde die lineare Regressionsanalyse nach Passing und Bablok herangezogen. Die Korrelationskoeffizienten wurden wie folgt interpretiert: $r = 0,90-1,0$ als sehr hohe Korrelation; $0,70-0,89$ als hohe Korrelation; $0,50-0,69$ als mittlere Korrelation; $0,30-0,49$ als geringe Korrelation; und $0-0,29$ als sehr geringe, falls vorhandene, Korrelation.⁸

Die Regressionsanalyse wurde weiterhin für die statistische Auswertung möglicher systematischer Fehler verwendet (konstantes und/oder proportionales Bias). 95%ige-Konfidenzintervalle für den y-Achsenabschnitt ohne Nullwert wurden als Nachweis für konstante Verzerrung betrachtet. 95%ige-Konfidenzintervalle für die Steigung ohne den Wert 1,0 wurden als Nachweis für proportionale Verzerrung betrachtet.

Präzisionsstudie

Die Präzision wurde anhand wiederholter Analysen zweier Kontrollflüssigkeiten im Bereich des klinischen Interesses beurteilt: Jede Flüssigkeit wurde 8-mal täglich (4-mal morgens, 4-mal abends) über 10 Tage analysiert, was insgesamt 80 Durchläufe ergab. Der prozentuale Gesamt-Variationskoeffizient (VK) wurde als das Verhältnis der Standardabweichung zur mittleren Konzentration berechnet. Je größer der VK ist, desto größer ist die Streuung der Ergebnisse um den Mittelwert.

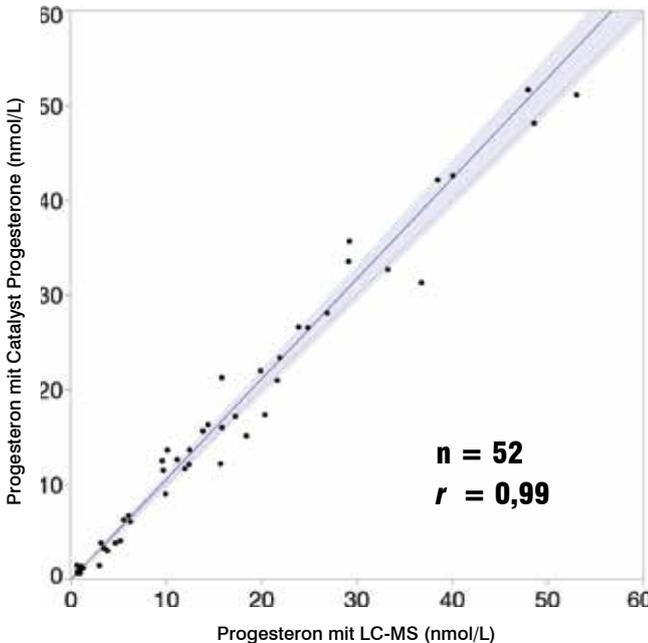
Ergebnisse

Methodenvergleichsstudie

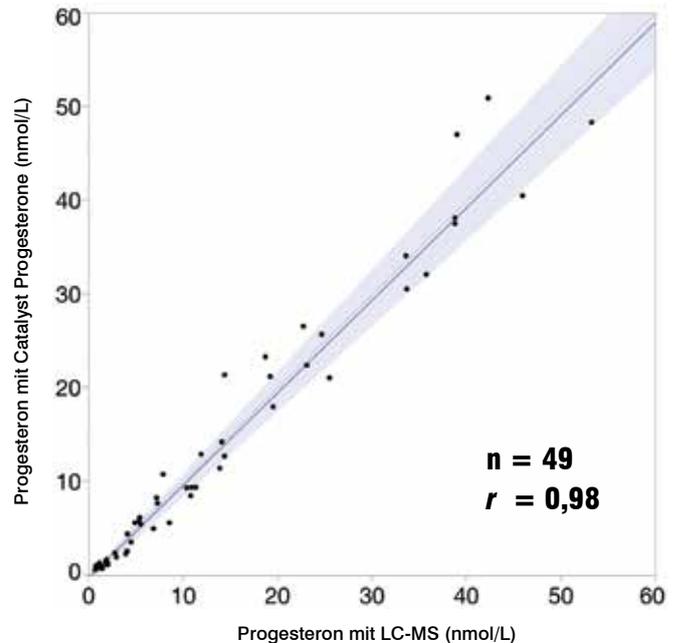
Die Ergebnisse sind in Abbildung 1 zusammengefasst. CLIA1, CLIA2000 und Catalyst® Progesterone wiesen alle eine sehr starke Korrelation zur Referenzmethode auf. Für Catalyst Progesterone wurde dies in beiden Probengruppen beobachtet.

Es gab keine Nachweise für ein konstantes oder proportionales Bias für CLIA1 und Catalyst Progesterone. Für CLIA2000 wurde sowohl ein konstantes Bias (Schnittpunkt = 0,54 nmol/L; Konfidenzgrenzen von 0,38 - 0,86 nmol/L) als auch ein proportionales Bias (Steigung = 0,75; Konfidenzgrenzen von 0,70 - 0,80).

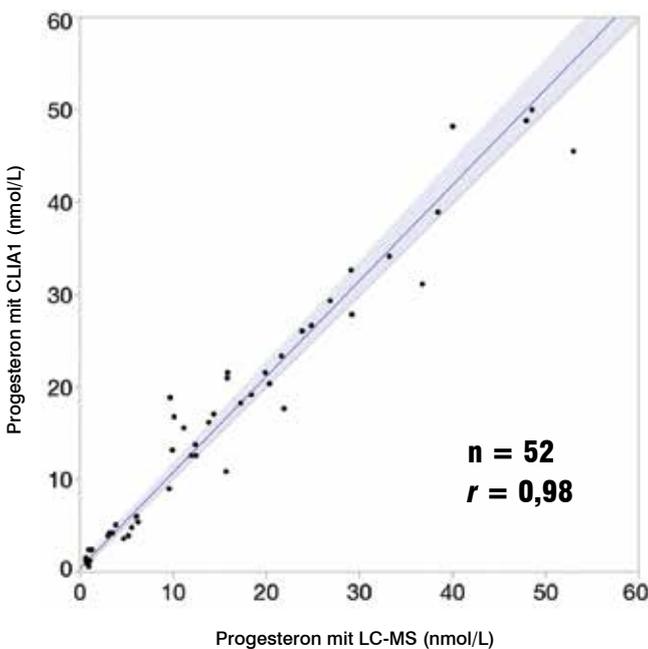
a. Klinik A: Vergleich von Catalyst Progesterone und der Referenzmethode (LC-MS)



b. Klinik B: Vergleich von Catalyst Progesterone und der Referenzmethode (LC-MS)



c. Klinik A: Vergleich von CLIA1 und der Referenzmethode (LC-MS)



d. Klinik B: Vergleich von CLIA2000 und der Referenzmethode (LC-MS)

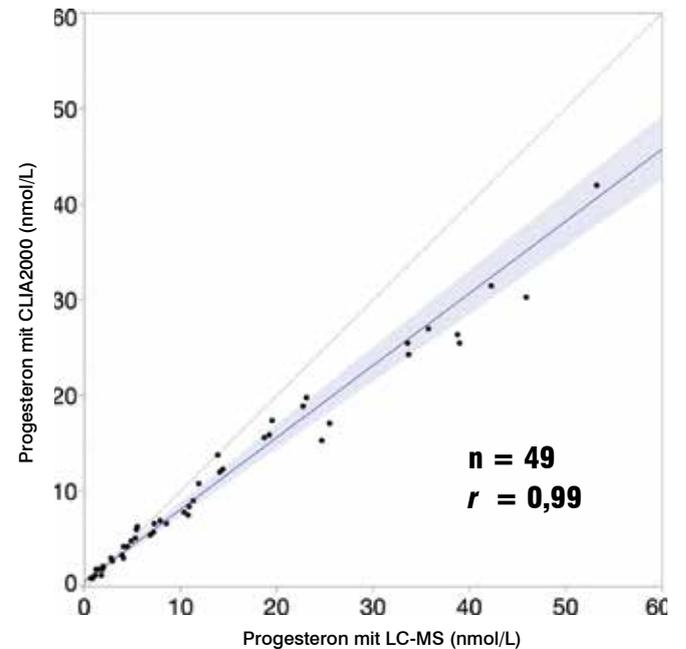


Abbildung 1. Punktdiagramm nach Passing und Bablok. Dargestellt wird die Übereinstimmung beider Nachweismethoden für Progesteronwerte aus der präovulatorischen Phase der Hündinnen. Die gestrichelte Linie entspricht der Kennlinie ($x = y$) und die durchgezogene blaue Linie der Regressionsgeraden. Der blaue Bereich entspricht dem Konfidenzintervall für die Regressionsgerade.

Präzisionsstudie

Die Ergebnisse der Präzisionsanalyse sind in Tabelle 2 dargestellt. Die neue Methode mit Catalyst® Progesterone hatte in beiden Konzentrationsbereichen einen Gesamt-VK von < 10 %. Im Vergleich gibt die Packungsbeilage[†] für die CLIA-Methode einen Gesamt-VK von 21,7 %, 12,5 %, 10,5 % bzw. 10,6 % bei einer mittleren Konzentration von 1,5 nmol/L, 4,4 nmol/L, 12,5 nmol/L bzw. 36,9 nmol/L an.

Flüssigkeit	Catalyst Dx	Mittleres Progesteron (nmol/L)	Beobachtungen	Standard-Abweichung (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

Der durchschnittliche Gesamt-VK für Flüssigkeit A betrug 9,6 %. Der durchschnittliche Gesamt-VK für Flüssigkeit B betrug 9,1 %.

Tabelle 2. Ergebnisse der Präzisionsstudie zu Catalyst Progesterone

Schlussfolgerung

Catalyst Progesterone zeigte in der Studie eine sehr starke Korrelation ($r = 0,98$; $r = 0,99$) zur Referenzmethode LC-MS und eine hohe Präzision im Bereich des klinischen Interesses.

Beide CLIA-Iterationen wiesen eine sehr starke Korrelation zur Referenzmethode auf (CLIA1: $r = 0,98$; CLIA2000: $r = 0,99$). Bei CLIA2000 bestand jedoch eine deutliche proportionale Verzerrung (Steigung = 0,75) zur Referenzmethode. Die Multiplikation des CLIA2000-Ergebnisses mit dem Faktor 1,25 ergibt eine Schätzung des Ergebnisses der Referenzmethode, z. B.: 6,0 nmol/L x 1,25 = 7,5 nmol/L. Dies bedeutet jedoch nicht, dass CLIA2000 für den klinischen Einsatz ungeeignet ist. Es zeigt vielmehr deutlich, dass für Trendanalysen von Progesteronkonzentrationen eine einheitliche analytische Methode und Probenart erforderlich sind.

Über Catalyst Progesterone lassen sich akkurate und präzise Ergebnisse erzielen, wenn der Test für die Quantifizierung von Progesteron im Blut (Plasma oder Serum) von Hündinnen verwendet wird. Dieser neue Immunoassay ermöglicht eine zuverlässige und praktikable Messung von Progesteron bei Hunden.

Literaturverzeichnis

- 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.
- 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.
- Meyers-Wallen VN. Unusual and abnormal canine estrous cycles. *Theriogenology.* 2007;68(9):1205–1210.
- 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.
- Stanczyk FZ, Lee JS, Santen RJ. Standardization of steroid hormone assays: why, how, and when? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007;16(9):1713–1719.
- 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.
- 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.
- Zady MF. Z-12: Correlation and simple least squares regression. Westgard QC website. www.westgard.com/lesson42.htm. Accessed January 15, 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 wird bei IDEXX Reference Laboratories für Proben von Hunden verwendet.

§Die LC-Trennung wurde folgendermaßen erzielt: Acquity UPLC BEH300 C4 (1,7 µm, Säule 2,1 x 100 mm) mit Gradient in der mobilen Phase A (0,1 % Ameisensäure in Wasser) und mobilen Phase B (0,1 % Ameisensäure in Methanol). Der dreifach vierpolige Massenspektrometer API 4000 (Applied Biosystems/MDS Sciex) wurde im MRM(Multiple Reaction Monitoring)-Modus mit einer positiven Elektrospray-Schnittstelle betrieben. Die MRM-Übergänge für Progesteron wurden an folgenden Punkten beobachtet: m/z 315,2 → 109,1 (Quantifikator) und m/z 315,2 → 97,2 (Qualifikator).

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