

Catalyst® Progesterone pour le dosage en clinique de la progestérone plasmatique chez la chienne

par Graham Bilbrough, MA, VetMB, CertVA, MRCVS ; et Tiffany Glavan, PhD

Introduction

La progestérone est une hormone femelle de la reproduction. Le dosage de la progestérone dans le plasma ou le sérum chez la chienne permet de :

- Prédire et confirmer l'ovulation afin de déterminer le meilleur moment pour l'accouplement et d'optimiser la fécondité.¹
- Prédire la mise bas.²
- Explorer les anomalies de la reproduction.³

Catalyst® Progesterone est un nouveau test immuno-enzymatique développé par IDEXX sur Catalyst® One et Catalyst® Dx. Il permet un dosage rapide et fiable de la progestérone en clinique chez la chienne. La gamme dynamique est 0,6 - 63,6 nmol/l.

Dans la pratique, différentes méthodes ont été utilisées pour suivre la progestéronémie chez la chienne. Pendant plusieurs décennies, le radioimmunos dosage* (RIA) a été considéré comme le Gold Standard ; cependant, le dosage original validé a été arrêté en 2014,⁴ et la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) a été proposée pour être le nouveau Gold Standard.⁵

Comme la LC-MS n'est généralement pas disponible dans les laboratoires vétérinaires de référence, un immunodosage par chimioluminescence (CLIA) sur des analyseurs IMMULITE®[†] est plus largement utilisé.[‡] Cependant, malgré une forte corrélation entre le CLIA et les méthodes de référence,⁶ un biais cliniquement significatif entre les méthodes⁴ a été démontré. La situation est encore plus compliquée car il existe des différences de performances entre les analyseurs utilisant la technologie CLIA.⁷

Pour le dosage de progestérone utilisés sur les échantillons canins, l'exactitude et la précision sont importantes dans l'intervalle des valeurs associées à l'ovulation, soit 9,5 et 31,2 nmol/l, ou pour les valeurs inférieures.⁴ Pour cette étude, l'intervalle des valeurs d'intérêt clinique a été défini comme étant compris entre 0 et 32 nmol/l.

Les objectifs de l'étude consistaient à :

- Évaluer les performances du dosage Catalyst Progesterone par comparaison à la LC-MS (méthode de référence).[§]
- Évaluer les performances de deux analyseurs utilisant la méthode CLIA par comparaison à la LC-MS.
- Évaluer la précision du dosage Catalyst Progesterone à l'aide de solutions témoins (étude de la précision).

Équipements et méthodes

Les données ont été rassemblées dans un tableau Microsoft Office Excel 2016 avant d'être exportées dans le logiciel JMP® 14.0.0 à des fins d'analyse statistique, le cas échéant, à l'aide de la « Method Comparison Add-In » du SAS Institute.

Étude de comparaison des méthodes

Des échantillons sanguins ont été prélevés chez 60 chiennes venues en consultation dans deux hôpitaux vétérinaires pour un suivi de reproduction au cours des mois de septembre et d'octobre 2018. Tous les échantillons ont été prélevés au cours de la période péri-ovulatoire. Des échantillons ont été prélevés sur plusieurs jours chez certains animaux (nombre de ponctions veineuses compris entre 1 et 7), ce qui a permis de réaliser 101 comparaisons. Voir le tableau 1 pour les détails.

Pour chaque ponction veineuse, sur une période de 30 minutes :

1. Le sérum a été prélevé à partir du sang recueilli dans des tubes secs.
2. Le plasma recueilli sur héparinate de lithium a été séparé des globules rouges et divisé en deux aliquotes.

Hôpital	Échantillons	CLIA	Catalyst® Progesterone	LC-MS
A	32 chiennes ; 52 comparaisons	CLIA1 <ul style="list-style-type: none"> Sérum (selon les conditions de la notice correspondante) Des tubes avec un gel séparateur n'ont pas été utilisés car la notice indique une diminution des taux de progestérone en fonction du temps. IMMULITE®/IMMULITE 1000 Progesterone (catalogue numéro : LKPW1) réalisés sur un analyseur IMMULITE 1 par IDEXX Reference Laboratories par des techniciens du laboratoire Analysé dans les 24 heures suivant le prélèvement 	<ul style="list-style-type: none"> Plasma recueilli sur héparinate de lithium Des tubes avec gel séparateur n'ont pas été utilisés car le manuel de l'opérateur indique que ces tubes ne conviennent pas. Analyseur de biochimie Catalyst Dx® à l'hôpital, utilisé par des techniciens vétérinaires Analysé dans les 4 heures suivant le prélèvement 	<ul style="list-style-type: none"> Plasma recueilli sur héparinate de lithium LC-MS® réalisés par IDEXX R&D Échantillons conservés à 4 °C et analysés par lots dans la semaine suivant le prélèvement
B	28 chiennes ; 49 comparaisons	CLIA2000 <ul style="list-style-type: none"> Sérum (selon les conditions de la notice correspondante) Des tubes avec un gel séparateur n'ont pas été utilisés car la notice indique une diminution des taux de progestérone en fonction du temps. IMMULITE® 2000 Progesterone (catalogue numéro : L2KPW6) réalisé sur un analyseur IMMULITE 2000 par IDEXX Reference Laboratories par des techniciens du laboratoire Analysé dans les 24 heures suivant le prélèvement 	<ul style="list-style-type: none"> Plasma recueilli sur héparinate de lithium Des tubes avec gel séparateur n'ont pas été utilisés car le manuel de l'opérateur indique que ces tubes ne conviennent pas. Analyseur de biochimie Catalyst Dx® par IDEXX R&D, dosage effectué par des techniciens du laboratoire Échantillons conservés à 4 °C et analysés dans les 48 heures suivant le prélèvement 	<ul style="list-style-type: none"> Plasma recueilli sur héparinate de lithium LC-MS® réalisée le département de par IDEXX R&D Échantillons conservés à 4 °C et analysés par lots dans la semaine suivant le prélèvement

Tableau 1. Types et traitement des échantillons pour les dosages de progestérone

Aucun échantillon n'a été écarté. Tous les résultats étaient inférieurs à la limite supérieure des plages dynamiques des dosages. Tout résultat en-dessous de la limite inférieure de la plage dynamique (0,6 nmol/l pour tous les dosages) a été assigné à 0,6 nmol/l.

Une analyse de régression linéaire de Passing et Bablok a été effectuée pour comparer différentes paires de méthodes. Les coefficients de corrélation ont été interprétés comme suit : $r = 0,90$ à $1,0$, défini comme une très forte corrélation ; $0,70$ à $0,89$, forte corrélation ; $0,50$ à $0,69$, corrélation modérée ; $0,30$ à $0,49$, faible corrélation ; et 0 à $0,29$, corrélation très faible, voire inexistante.⁸

L'analyse de régression a également été utilisée pour rechercher des preuves statistiques d'erreur systématique (biais constant et/ou proportionnel). Des intervalles de confiance (IC) à 95 % pour l'axe des ordonnées (y) n'incluant pas la valeur zéro ont été considérés comme une preuve de biais constant. Des intervalles de confiance à 95 % pour la pente n'incluant pas la valeur 1,0 ont été considérés comme une preuve de biais proportionnel.

Étude de la précision

La précision a été évaluée par une analyse répétée de deux solutions témoins dans l'intervalle des valeurs d'intérêt clinique. Chaque solution témoin a été analysée 8 fois par jour (4 dosages le matin, 4 dosages le soir) pendant 10 jours pour avoir au total 80 dosages. Le coefficient de variation (CV) total en pourcentage a été calculé comme le rapport de l'écart type sur la moyenne des concentrations. Plus le CV est grand, plus la dispersion des résultats par rapport à la moyenne est grande.

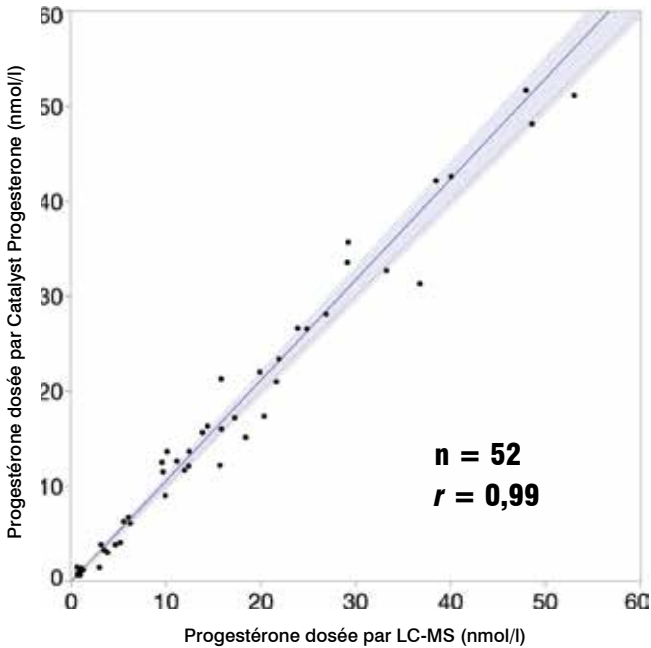
Résultats

Étude de comparaison des méthodes

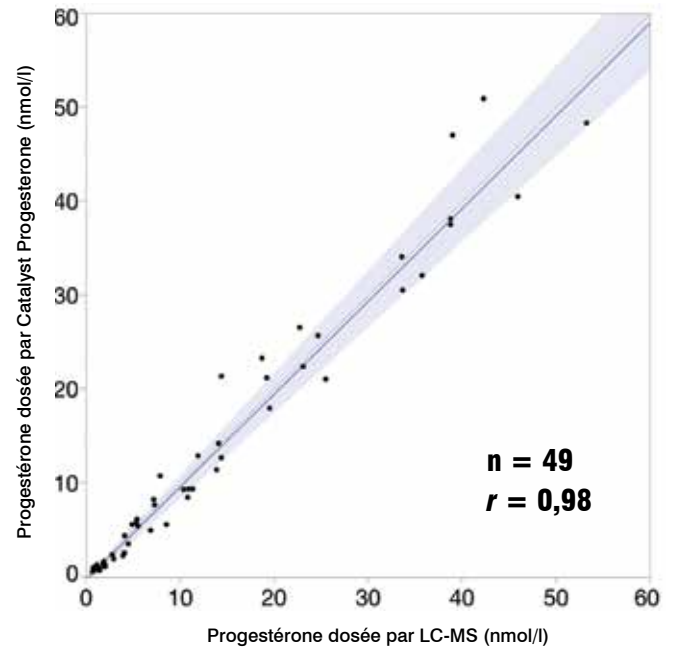
Les résultats sont résumés dans la figure 1. Une très forte corrélation avec la méthode de référence a été démontrée pour l'ensemble des méthodes, CLIA1, CLIA2000 et Catalyst® Progesterone. Pour le dosage Catalyst Progesterone, cette corrélation a été observée dans les deux groupes d'échantillons.

Aucune preuve de biais constant ou proportionnel n'a été observée pour les méthodes CLIA1 et Catalyst Progesterone. Pour la méthode CLIA2000, un biais constant (intersection = 0,54 nmol/l ; avec intervalle de confiance de 0,38 - 0,86 nmol/l) et un biais proportionnel (pente = 0,75 ; avec un intervalle de confiance de 0,70 - 0,80).

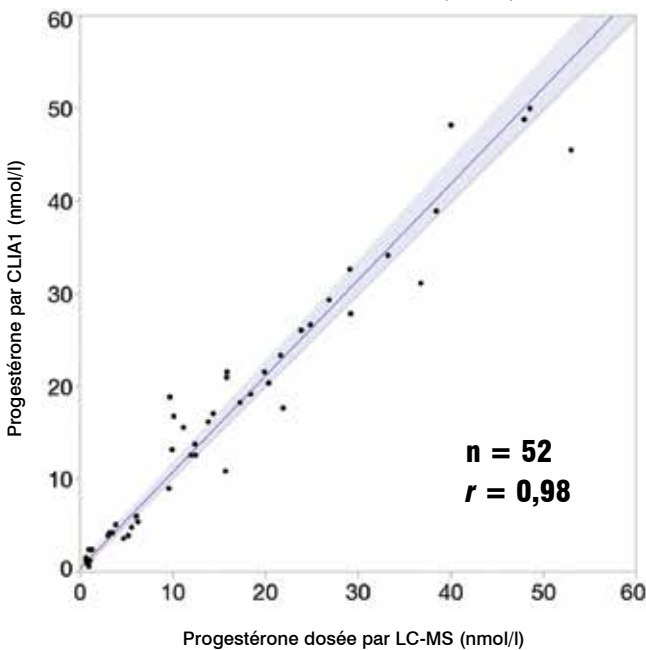
a. Hôpital A : Comparaison du dosage Catalyst Progesterone et de la méthode de référence (LC-MS)



b. Hôpital B : Comparaison du dosage Catalyst Progesterone et de la méthode de référence (LC-MS)



c. Hôpital A : Comparaison du dosage CLIA1 et de la méthode de référence (LC-MS)



d. Hôpital B : Comparaison du dosage CLIA2000 et de la méthode de référence (LC-MS)

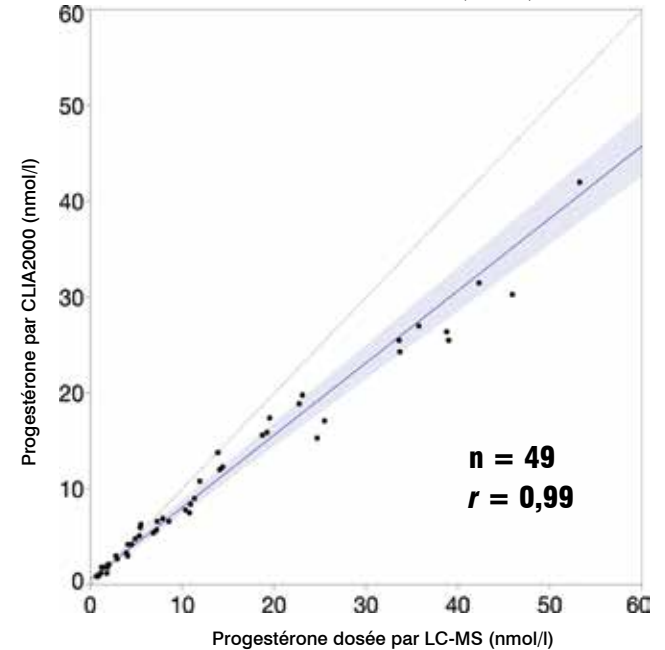


Figure 1. Courbes de Passing et Bablock pour la corrélation entre la concentration évaluée par deux méthodes dans des échantillons prélevés au cours de la période péri-ovulatoire de la chienne. La droite en pointillés représente la droite d'identité ($x = y$), la droite en traits pleins bleus représente la droite de régression, et la zone bleue représente l'intervalle de confiance pour la droite de régression.

Étude de la précision

Les résultats de l'analyse de la précision sont présentés dans le tableau 2. La nouvelle méthode Catalyst® Progesterone a un CV total < 10 % pour les deux concentrations. A titre de comparaison, dans la notice d'utilisation de la méthode CLIA, le CV total était de 21,7 %, 12,5 %, 10,5 % et 10,6 % aux concentrations moyennes respectivement de 1,5 nmol/l, 4,4 nmol/l, 12,5 nmol/l, et 36,9 nmol/l.

Solution	Catalyst Dx	Concentration moyenne (nmol/l)	Observations	Écart type (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

La moyenne du CV total pour la Solution A était de 9,6 %. La moyenne du CV total pour la Solution B était de 9,1 %.

Tableau 2. Résultats de l'étude de la précision du dosage Catalyst Progesterone

Conclusion

Le dosage Catalyst Progesterone a démontré une très bonne corrélation ($r = 0,98$; $r = 0,99$) avec la méthode de référence de l'étude, la LC-MS, et une bonne précision dans l'intervalle des valeurs d'intérêt clinique.

Les deux analyseurs utilisant la méthode CLIA ont démontré une très bonne corrélation avec la méthode de référence (CLIA1 : $r = 0,98$; CLIA2000 : $r = 0,99$). Cependant, pour la méthode CLIA2000, il existe un important biais proportionnel (pente = 0,75) avec la méthode de référence ; la multiplication du résultat de la méthode CLIA2000 par 1,25 fournit une estimation du résultat de la méthode de référence, p. ex. 6,0 nmol/l x 1,25 = 7,5 nmol/l. Ceci ne signifie pas que la méthode CLIA2000 ne convient pas à cette utilisation clinique, mais souligne plutôt la nécessité d'avoir une méthodologie analytique et des types d'échantillons uniformes lors du suivi des concentrations de la progestérone.

Le dosage Catalyst Progesterone fournit des résultats exacts et précis lorsqu'il est utilisé pour doser la progestérone dans des échantillons plasmatiques de chiennes. Ce nouvel immunodosage constitue une option fiable et pratique pour le dosage en clinique de la progestérone chez les chiennes.

Références

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. Accessed January 15, 2019.

*Radioimmunodosage à l'1125 (Coat-A-Count® radioimmunoassay ; Siemens Health Care Diagnostics Inc., Los Angeles, California, États-Unis)

†Siemens Medical Solutions Diagnostics, Los Angeles, California, États-Unis.

‡La méthode CLIA est utilisée pour les échantillons canins dans les laboratoires de référence d>IDEXX

§ La séparation par CL a été obtenue en utilisant une colonne Acquity UPLC BEH300 C4 1,7 µm, 2,1 x 100 mm avec une phase mobile A (acide formique à 0,1 % dans l'eau) et une phase mobile B (acide formique 0,1 % dans le méthanol) pour le gradient d'élution. Le spectromètre de masse triple quadripolaire API 4000™ (Applied Biosystems/MDS Sciex) a été utilisé en mode Mesure de réactions multiples (Multiple Reaction Monitoring, MRM) avec une interface à électro-nébulisation positive. Les transitions MRM pour les taux de progestérone ont été observées à m/z 315,2 → 109,1 (ion pour quantification) et m/z 315,2 → 97,2 (ion pour qualification).

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