

Catalyst® Progesterone para medir en la clínica el nivel de progesterona en plasma de las perras

Graham Bilbrough, MA, VetMB, CertVA, MRCVS y la Dra. Tiffany Glavan

Introducción

La progesterona es una hormona reproductora femenina. La medición de la progesterona en el plasma sanguíneo (plasma) o en el suero de las perras es un elemento importante en:

- La predicción y confirmación de la ovulación con el objetivo de determinar el momento óptimo de la reproducción y maximizar la fertilidad.¹
- Predecir el parto.²
- Investigar las anomalías en la reproducción.³

Catalyst® Progesterone es un nuevo inmunoanálisis de IDEXX diseñado para ofrecer la medición pronta y fiable de la progesterona en muestras caninas. Funciona con los analizadores bioquímicos IDEXX Catalyst One® e IDEXX Catalyst Dx®. Tiene un intervalo de medición de 0,6-63,6 nmol/l.

En la práctica clínica, se han usado diversos métodos para el seguimiento de la progesterona en las perras. Durante muchos decenios se consideró que el radioinmunoanálisis* (RIA) era el método de referencia; sin embargo, el análisis validado originalmente se suspendió en 2014,⁴ y se ha propuesto como método de referencia la cromatografía líquida-espectrometría de masas (CL-EM).⁵

Dado que los laboratorios de referencia veterinarios no suelen disponer de CL-EM, suele usarse[†] el inmunoanálisis mediante quimioluminiscencia (chemiluminescent immunoassay, CLIA) en analizadores[†] IMMULITE®. Sin embargo, a pesar de la correlación robusta entre el CLIA y los métodos de referencia,⁶ también se ha demostrado un sesgo clínicamente significativo entre los métodos.⁴ La situación se complica todavía más debido a las diferencias en el rendimiento entre las distintas iteraciones en la metodología CLIA.⁷

En el caso de los análisis de progesterona que se usan con las muestras caninas es importante tener una exactitud y precisión dentro del intervalo asociado con la ovulación de 9,5-31,2 nmol/l o inferior.⁴ Para este estudio, el intervalo de interés clínico se definió como 0-32 nmol/l.

Los objetivos del estudio eran:

- Evaluar el rendimiento de Catalyst Progesterone mediante comparación del método con la CL-EM (método de referencia).[§]
- Evaluar el rendimiento de dos iteraciones de la metodología CLIA mediante una comparación de métodos con CL-EM.
- Evaluar la precisión de Catalyst Progesterone usando líquidos de control (estudio de precisión).

Materiales y métodos

Los datos se recogieron en Microsoft Office Excel 2016 antes de su exportación a JMP® 14.0.0 para su análisis estadístico, donde procediera, usando el complemento para comparación de métodos de SAS Institute.

Estudio de comparación de métodos

Durante los meses de septiembre y octubre de 2018, se extrajeron muestras de sangre de 60 perras que acudían a dos hospitales veterinarios para la gestión de la reproducción. Todas las muestras se recogieron en el período periovulatorio. Las muestras de algunas pacientes se obtuvieron en varios días (entre 1 y 7 punciones venosas), lo cual permitió la realización de 101 comparaciones. Véase la tabla 1 para obtener los detalles.

Para cada punción venosa, en 30 minutos:

1. Se recogió el suero de la sangre obtenida en tubos sin anticoagulante.
2. Se separó el plasma en heparina de litio de los eritrocitos y se dividió en dos alícuotas.

Hospital	Muestras	CLIA	Catalyst® Progesterone	CL-EM
A	32 perras; 52 comparaciones	CLIA1 <ul style="list-style-type: none"> • Suero (conforme a la estipulación en el prospecto relevante) • No se usaron tubos con barrera de gel, dado que el prospecto indica una reducción dependiente del tiempo en las concentraciones de progesterona • IMMULITE®/IMMULITE 1000 Progesterone (número de catálogo: LKPW1) ejecutado en un IMMULITE 1 en IDEXX Reference Laboratories por técnicos de laboratorio • Analizado en las 24 horas siguientes a su obtención 	<ul style="list-style-type: none"> • Plasma en heparina de litio • No se usaron tubos con barrera de gel, dado que la guía para el operador indica que no son adecuados • Analizador bioquímico Catalyst Dx® en el hospital, operado por técnicos veterinarios • Analizados en las 4 horas siguientes a su obtención 	<ul style="list-style-type: none"> • Plasma en heparina de litio • CL-EM® en IDEXX R&D • Las muestras se conservaron a 4 °C y se analizaron en lotes en la semana siguiente a su obtención
B	28 perras; 49 comparaciones	CLIA2000 <ul style="list-style-type: none"> • Suero (conforme a la estipulación en el prospecto relevante) • No se usaron tubos con barrera de gel, dado que el prospecto indica una reducción dependiente del tiempo en las concentraciones de progesterona • IMMULITE® 2000 Progesterone (número de catálogo: L2KPW6) ejecutado en un IMMULITE 2000 en IDEXX Reference Laboratories por técnicos de laboratorio • Analizado en las 24 horas siguientes a su obtención 	<ul style="list-style-type: none"> • Plasma en heparina de litio • No se usaron tubos con barrera de gel, dado que la guía para el operador indica que no son adecuados • Analizador bioquímico Catalyst Dx® en IDEXX R&D, operado por técnicos de laboratorio • Las muestras se conservaron a 4 °C y se analizaron en las 48 horas siguientes a su obtención 	<ul style="list-style-type: none"> • Plasma en heparina de litio • CL-EM® en IDEXX R&D • Las muestras se conservaron a 4 °C y se analizaron en lotes en la semana siguiente a su obtención

Tabla 1. Tipos y manejo de las muestras para los análisis de progesterona

No se excluyó ninguna muestra. Todos los resultados se encontraban por debajo del límite superior de los intervalos dinámicos correspondientes a cada análisis. Todo resultado por debajo del límite inferior del intervalo dinámico (0,6 nmol/l para todos los análisis) se asignó a 0,6 nmol/l.

Se realizó análisis de regresión lineal de Passing y Bablok para diversos pares de metodologías. Los coeficientes de correlación se interpretaron de la siguiente manera: $r = 0,90-1,0$ se definió como correlación muy elevada; $0,70-0,89$, como correlación elevada; $0,50-0,69$, como correlación moderada; $0,30-0,49$, se consideró correlación baja y $0-0,29$, se consideró correlación escasa, si se consideraba correlación.⁸

El análisis de regresión también se utilizó para buscar pruebas estadísticas de errores sistemáticos (sesgo constante y/o proporcional). Los intervalos de confianza del 95 % para el punto de intersección y que no incluían el valor cero se consideraron pruebas de sesgo constante. Los intervalos de confianza del 95 % para la pendiente que no incluían el valor 1,0 se consideraron pruebas que demostraban sesgo proporcional.

Estudio de precisión

La precisión se evaluó mediante el análisis repetido de dos líquidos de control en el intervalo de interés clínico. Cada líquido se analizó 8 veces al día (4 por la mañana, 4 por la tarde) durante 10 días, para obtener un total de 80 réplicas. Se calculó el coeficiente de variación (CV) porcentual total como el cociente de la desviación estándar y la media de la concentración. Cuanto mayor es el CV, mayor será la dispersión de los resultados en torno a la media.

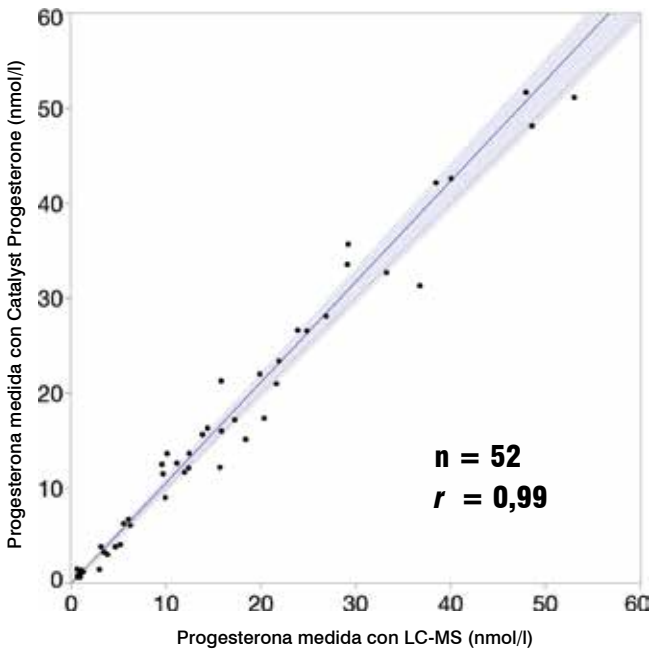
Resultados

Estudio de comparación de métodos

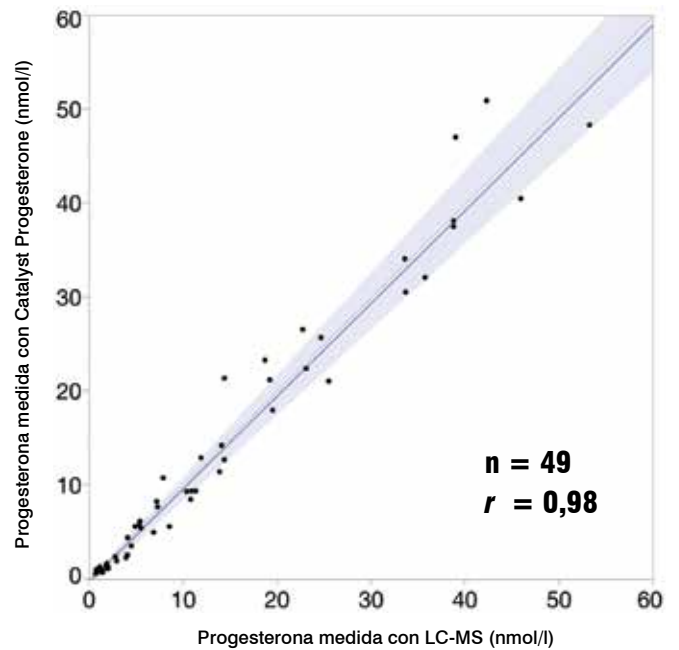
Los resultados se resumen en la figura 1. Tanto CLIA1 como CLIA2000 y Catalyst® Progesterone demostraron una correlación muy elevada con el método de referencia. En el caso de Catalyst Progesterone, esto se mostró en ambos grupos de muestras.

No se observó ninguna prueba de sesgo constante ni proporcional en el caso de CLIA1 y Catalyst Progesterone. En el caso de CLIA2000, hubo sesgo constante (intersección = 0,54 nmol/l; con límites de confianza de 0,38-0,86 nmol/l) y sesgo proporcional (pendiente = 0,75; con límites de confianza de 0,70-0,80).

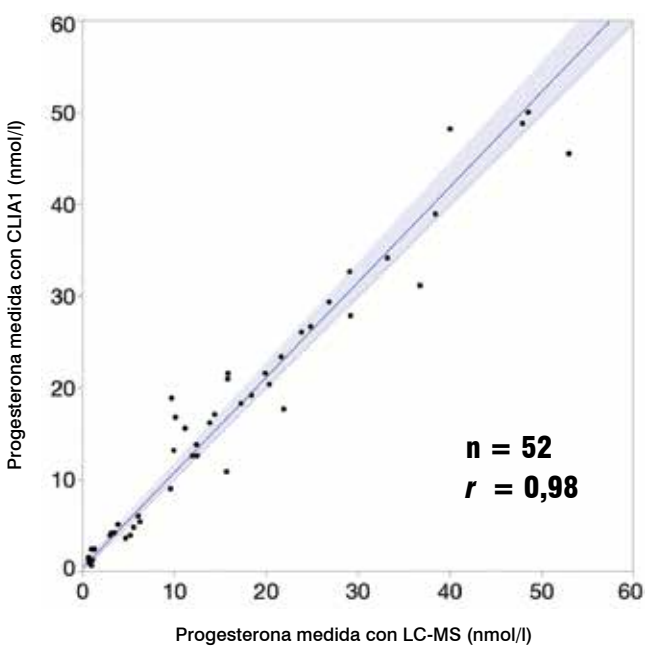
a. Hospital A: Comparación de Catalyst Progesterone y el método de referencia (CL-EM)



b. Hospital B: Comparación de Catalyst Progesterone y el método de referencia (CL-EM)



c. Hospital C: Comparación de CLIA1 y el método de referencia (CL-EM)



d. Hospital D: Comparación de CLIA2000 y el método de referencia (CL-EM)

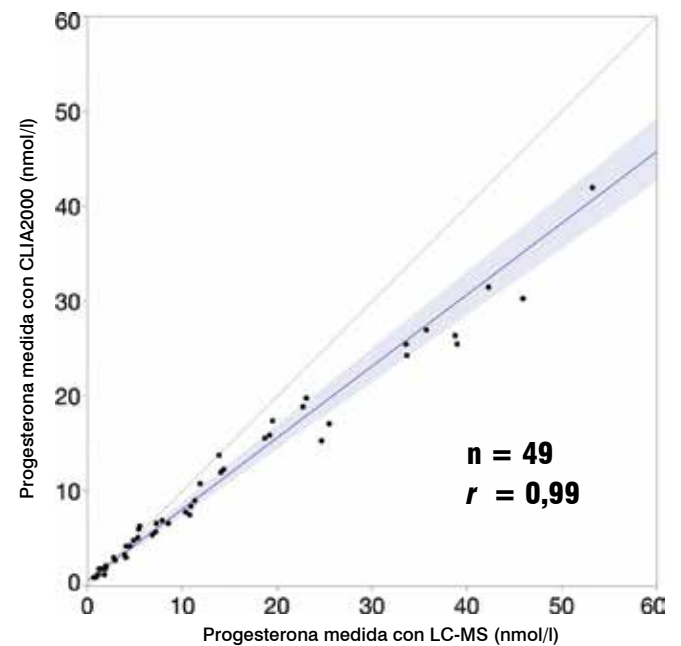


Figura 1. Gráficos de Passing y Bablok para la concordancia entre la progesterona evaluada por dos métodos en las muestras obtenidas durante el período periovulatorio de la perra. La línea discontinua constituye la línea de identidad ($x = y$), la línea continua en azul representa la línea de regresión y la zona azul representa el intervalo de confianza para la línea de regresión.

Estudio de precisión

En la tabla 2 se muestran los resultados del análisis de precisión. El nuevo método de Catalyst® Progesterone obtuvo un CV total < 10 % a ambos niveles de concentración. Para comparación, el prospecto¹ del método CLIA mostraba un CV del 21,7 %, 12,5 %, 10,5 % y 10,6 % a una concentración media de 1,5 nmol/l, 4,4 nmol/l, 12,5 nmol/l y 36,9 nmol/l, respectivamente.

Líquido	Catalyst Dx	Progesterona media (nmol/l)	Observaciones	Desviación estándar (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

El CV total promedio para el líquido A era del 9,6 %. El CV total promedio para el líquido B era del 9,1 %.

Tabla 2. Resultados del estudio de precisión de Catalyst Progesterone

Conclusión

Catalyst Progesterone demostró una correlación muy buena ($r = 0,98$; $r = 0,99$) con el método de referencia del estudio de CL-EM y buena precisión en el intervalo de interés clínico.

Ambas iteraciones de CLIA demostraron muy buena correlación con el método de referencia (CLIA1: $r = 0,98$; CLIA2000: $r = 0,99$). Sin embargo, en el caso de CLIA2000, se produjo un marcado sesgo proporcional (pendiente = 0,75) con el método de referencia; multiplicar el resultado de CLIA2000 por 1,25 proporcionará una estimación del resultado del método de referencia; por ejemplo: $6,0 \text{ nmol/l} \times 1,25 = 7,5 \text{ nmol/l}$. Esto no implica que CLIA2000 no sea adecuado para uso clínico; más bien subraya la necesidad de una metodología analítica y un tipo de muestra uniformes cuando se estudia la evolución de las concentraciones de progesterona.

Catalyst Progesterone produce unos resultados exactos y precisos cuando se usa para cuantificar la progesterona en las muestras plasmáticas de perras. Este nuevo inmunoanálisis ofrece una opción fiable y cómoda para medir la progesterona canina en la clínica.

Bibliografía

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.

*Radioinmunoanálisis 125-I (radioinmunoanálisis Coat-A-Count®; Siemens Health Care Diagnostics Inc., Los Ángeles (California, EE. UU.))

¹Siemens Medical Solutions Diagnostics, Los Ángeles (California, EE. UU.)

[†]CLIA se usa para muestras caninas en IDEXX Reference Laboratories.

[§]La separación por CL se consiguió usando Acquity UPLC BEH300 C4 1,7 µm, columna de 2,1 × 100 mm con gradiente de Fase Móvil A (0,1 % de ácido fórmico en agua) y de Fase móvil B (0,1 % de ácido fórmico en metanol). El espectrómetro de masas de triple cuadrupolo API 4000™ (Applied Biosystems/MDS Sciex) se empleó en el modo de monitoreo de reacciones múltiples (MRM) con una interfaz de electrospray positiva. Se observaron transiciones de MRM para la progesterona a m/z 315,2 → 109,1 (cuantificador) y m/z 315,2 → 97,2 (cuantificador).

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