

Document n° :	TD2010NA-FR	Version n° :	1.0
Rédaction :	Comité Laboratoires de l'AMA	Approuvé par :	Comité exécutif de l'AMA
Date :	8 mai 2010	Date d'entrée en vigueur :	1 <sup>er</sup> septembre 2010

## HARMONISATION DE L'ANALYSE ET DES RAPPORTS AUX 19-NORSTÉROÏDES APPARENTÉS À LA NANDROLONE

### 1.0 Introduction

Le présent document a été réalisé en vue d'harmoniser l'analyse et le rapport par les Laboratoires des *Résultats d'analyse anormaux* aux 19-norstéroïdes apparentés à la nandrolone.

La détection de l'utilisation de la nandrolone et autres 19-norstéroïdes est basée principalement sur l'identification du métabolite urinaire majeur, la 19-norandrostérone (19-NA) à un niveau supérieur à 2 ng/mL. Plus d'un métabolite des norstéroïdes administrés peuvent être détectés et rapportés (par exemple, la 19-norétiocholanolone, 19-NE) mais d'effectuer seulement l'identification et la quantification de la 19-NA comme métabolite (obtenu par hydrolyse avec  $\beta$ -glucuronidase) est suffisant pour rapporter un *Résultat d'analyse anormal*.

### 2.0 Analyse

#### 2.1 Identification et Quantification

Outre la nécessité de respecter les critères d'identification décrits dans le Document technique IDCR, le Laboratoire doit démontrer que la concentration de 19-NA est supérieure à la Limite de décision (LD) définie dans le Document technique LD.

La méthode de quantification mise en œuvre pour calculer la concentration de 19-NA doit inclure ou avoir les caractéristiques suivantes :

- Un étalon interne deutérié (préférentiellement le d<sub>4</sub>-19-NA-glucuronide puisqu'il apporte une correction pour l'hydrolyse et autres étapes de l'analyse);
- Une courbe de calibration sur une gamme appropriée encadrant la concentration estimée de l'analyte;
- L'utilisation d'échantillons de contrôle de qualité appropriés. Par exemple, un contrôle négatif (sans 19-NA ou avec une concentration de 19-NA  $\leq$  1ng/mL) et un contrôle positif dans la gamme de 3 à 5 ng/mL de 19-NA peuvent être utilisés. Comme solution alternative, un matériel de référence urinaire lyophilisé contenant approximativement 2 ng/mL de 19-NA peut être utilisé (par exemple, le matériel de référence NMI numéro MX002);
- L'incertitude de mesure standard combinée établie au seuil par le Laboratoire doit être inférieure à l' $u_{c\ Max}$  spécifiée dans le Document technique LD.

#### 2.2 Tests supplémentaires obligatoires

Le Laboratoire doit également effectuer des tests de grossesse (par exemple pour l'hCG) et pour la détection de la tétrahydronoréthistérone dans les *Échantillons* d'urine provenant de femmes et contenant des concentrations de 19-NA supérieures au seuil.

Document n° :	TD2010NA-FR	Version n° :	1.0
Rédaction :	Comité Laboratoires de l'AMA	Approuvé par :	Comité exécutif de l'AMA
Date :	8 mai 2010	Date d'entrée en vigueur :	1 <sup>er</sup> septembre 2010

Dans des circonstances extrêmement rares, la 19-NE, et dans une moindre mesure la 19-NA, peuvent être formées par 19-déméthylation de stéroïdes endogènes abondants. Ces *Échantillons* « instables » contiennent des niveaux bas et comparables de 19-NA et de 19-NE avec un rapport 19-NA/19-NE inférieur au rapport A/E (androstérone/étiocholanolone).

Quand des concentrations de 19-NA inférieures à 10 ng/mL sont mesurées et l'*Échantillon* présente les signes d'instabilité ci-dessus, le Laboratoire doit effectuer un contrôle de stabilité. Le contrôle de stabilité, qui incorpore l'androstérone et l'étiocholanolone deutériées, a été décrit par Grosse et al [1].

- Si le contrôle de stabilité est positif (c'est-à-dire que l'*Échantillon* est « instable »), le résultat à la 19-NA ne doit pas être rapporté.
- Si le contrôle de stabilité est négatif, l'*Échantillon* doit être soumis à une analyse par GC/C/IRMS pour la 19-NA [2]. Le critère pour une urine instable par GC/C/IRMS doit être une différence inférieure à 3.0‰<sup>1</sup> entre les valeurs  $\delta$  mesurées pour la 19-NA et l'androstérone ( $\Delta\delta = \delta_{\text{Androstérone}} - \delta_{19\text{-NA}}$ ). L'analyse par GC/C/IRMS devrait inclure la confirmation de l'identité du pic de la 19-NA (par exemple par analyse en GC/MS).
- Si le contrôle de stabilité est négatif et l'analyse par GC/C/IRMS démontre que la 19-NA est endogène, le résultat à la 19-NA ne doit pas être rapporté.
- Si le contrôle de stabilité est négatif et l'analyse par GC/C/IRMS démontre que la 19-NA est exogène, le résultat doit être rapporté comme *Résultat d'analyse anormal*.

### **3.0 Rapports**

Le Laboratoire doit rapporter les résultats à la 19-NA dans les *Échantillons* d'urine provenant d'hommes ou de femmes contenant une concentration supérieure à la LD après avoir ajusté le seuil en fonction de la gravité spécifique (voir section 3.1 et 3.2 ci-après) et en respectant les exigences du Document technique IDCR dans les conditions ci-après:

- A. Les *Échantillons* d'hommes ou de femmes non enceintes dans lesquels les concentrations de 19-NA sont supérieures à 25 ng/mL doivent être rapportés comme *Résultat d'analyse anormal* simplement comme contenant >25 ng/ml sans qu'il soit nécessaire de rapporter la concentration.
- B. Les *Échantillons* d'hommes ou de femmes non enceintes dans lesquels les concentrations de 19-NA sont entre 10 ng/mL et 25 ng/mL doivent être rapportés comme *Résultat d'analyse anormal* avec la concentration moyenne de déterminations en triplicata, avec au plus deux chiffres

<sup>1</sup> Il n'est pas nécessaire de corriger la différence entre les valeurs  $\delta$ , quel que soit le réactif de dérivatisation, puisque l'androstérone et la norandrostérone recevraient toutes deux la même contribution de la part d'atomes de carbones supplémentaires.

Document n° :	TD2010NA-FR	Version n° :	1.0
Rédaction :	Comité Laboratoires de l'AMA	Approuvé par :	Comité exécutif de l'AMA
Date :	8 mai 2010	Date d'entrée en vigueur :	1 <sup>er</sup> septembre 2010

significatifs<sup>2</sup>, et avec l'incertitude de mesure conforme au Document technique LD. Un commentaire ou une opinion doit être ajouté et doit respecter les exigences de la section 3.3 ci-après, le cas échéant.

- C. Les *Échantillons* d'hommes ou de femmes non enceintes ne prenant pas de noréthistérone, contenant des concentrations de 19-NA entre la LD et 10 ng/mL et pour lesquels les conditions pour une urine « instable » ne sont PAS remplies doivent être rapportés comme *Résultat d'analyse anormal* à la concentration moyenne de déterminations en triplicata avec au plus deux chiffres significatifs, et avec l'incertitude de mesure conforme au Document technique LD. Un commentaire ou une opinion doit être ajouté et doit respecter les exigences de la section 3.3 et 3.4 ci-après, le cas échéant.
- D. Les *Échantillons* d'hommes ou de femmes non enceintes ne prenant pas de noréthistérone, contenant des concentrations de 19-NA entre la LD et 10 ng/mL et pour lesquels les conditions pour une urine « instable » sont remplies doivent être rapportés comme négatifs.
- E. Les *Échantillons* de femmes non enceintes qui prennent de la noréthistérone doivent être rapportés comme *Résultat d'analyse anormal* avec un commentaire ou une opinion sur la prise de noréthistérone tels qu'ils sont décrits ci-après dans la section 3.3.3. La présence de tétrahydronoréthistérone devrait être confirmée.
- F. Les *Échantillons* de femmes enceintes contenant des concentrations de 19-NA supérieures à la LD doivent être rapportés comme négatifs sauf si les résultats d'analyse par IRMS sont concordants avec une administration exogène. Le Laboratoire doit inclure, dans le rapport, un commentaire indiquant les résultats d'analyse sur lesquels est basée l'opinion que la femme est enceinte, dans les termes décrits ci-après dans la section 3.3.

### 3.1 Seuil ajusté

Si et seulement si un *Échantillon* d'urine a une gravité spécifique (mesurée au Laboratoire) supérieure à 1,020, le seuil doit être ajusté pour prendre en compte la gravité spécifique (GS) de l'*Échantillon* (puisque des concentrations plus élevées de 19-NA ont été associées avec des gravités spécifiques plus élevées (voir par exemple [3])), à l'aide de la formule suivante:

$$\text{Seuil}_{\text{ajusté}} = [( \text{Gravité spécifique de l'Échantillon} - 1 ) / ( 1,020 - 1 )] \times 2 \text{ ng/mL}$$

### 3.2 Limite de décision pour la 19-NA

La LD pour la 19-NA est établie dans le Document technique LD. Si la GS est supérieure à 1,020, la bande de garde représentée par la différence entre la valeur

<sup>2</sup> Un résultat entre 2 et 10 serait rapporté, par exemple, comme « 5,1 ng/mL ». Un résultat entre 10 et 25 serait rapporté comme « 17 ng/mL ».

Document n° :	TD2010NA-FR	Version n° :	1.0
Rédaction :	Comité Laboratoires de l'AMA	Approuvé par :	Comité exécutif de l'AMA
Date :	8 mai 2010	Date d'entrée en vigueur :	1 <sup>er</sup> septembre 2010

de la LD et la valeur du seuil, telle qu'elle est spécifiée pour la 19-NA dans le Document technique LD doit être ajoutée au seuil ajusté pour déterminer la LD pour un résultat individuel à la 19-NA<sup>3</sup>. La LD (après ajustement du seuil en fonction de la GS) doit être incluse dans le rapport d'analyse du Laboratoire. La LD doit être utilisée pour déterminer s'il y a lieu de rapporter un *Résultat d'analyse anormal* pour l'*Échantillon*.

Le résultat pour un *Échantillon* doit être rapporté comme *Résultat d'analyse anormal* si la concentration moyenne mesurée est supérieure à la LD (ajustée en fonction de la GS, si nécessaire) sauf si l'Échantillon respecte une des conditions décrites dans les sections 3.3 et 3.4 ci-après. Si l'*Échantillon* respecte effectivement une des conditions décrites dans les sections 3.3 et 3.4 ci-après, il doit être rapporté comme *Résultat atypique*, et l'Autorité de contrôle et l'AMA doivent être toutes les deux notifiées des résultats par un commentaire dans le rapport d'analyse.

### 3.3 Échantillon de femmes

Lorsque la concentration de 19-NA est supérieure à la LD dans un *Échantillon* d'urine de femme, le Laboratoire doit inclure dans le rapport d'analyse les résultats des tests visant à déterminer si la 19-NA est due à une grossesse ou à la prise d'un médicament contenant de la noréthistérone.

3.3.1 Si l'hCG est présente à une concentration inférieure à 1000 IU/L, un commentaire ou une opinion doit être ajouté(e) au rapport d'analyse indiquant que le test a été effectué et que le résultat pour la 19-NA n'était pas concordant avec une grossesse. Par exemple :

« L'Échantillon a été analysé pour l'hCG et la concentration est inférieure à 1000 mIU/mL, indiquant que le résultat à la 19-NA n'est pas dû à une grossesse. »

3.3.2 Si un autre composé, tel que le pregnanediol, est utilisé pour détecter la grossesse, un commentaire ou une opinion doit être ajouté(e) au rapport d'analyse indiquant que le test a été effectué et que le résultat n'était pas concordant avec une grossesse.

3.3.3 Si la tétrahydronoréthistérone (métabolite du contraceptif noréthistérone,) n'est pas détectée dans l'*Échantillon* d'urine, un commentaire ou une opinion doit être ajouté(e) au rapport d'analyse indiquant que le test pour la noréthistérone a été effectué et qu'elle n'était pas présente. Par exemple :

« D'après l'analyse par GC/MS, l'Échantillon ne contenait pas de tétrahydronoréthistérone ; ceci indique que le résultat n'est pas la conséquence de l'administration d'un contraceptif contenant de la noréthistérone. »

### 3.4 19-déméthylation

<sup>3</sup> Donc la Limite de décision pour le résultat à la 19-NA pour un *Échantillon* avec une gravité spécifique de 1,020 ou moins est 2,4 ng/mL. Quand la gravité spécifique d'un *Échantillon* est 1,030, par exemple, le seuil ajusté est 3,0 ng/mL et la LD doit être 3,5 ng/mL (d'après le TD2010DL-FR).

Document n° :	TD2010NA-FR	Version n° :	1.0
Rédaction :	Comité Laboratoires de l'AMA	Approuvé par :	Comité exécutif de l'AMA
Date :	8 mai 2010	Date d'entrée en vigueur :	1 <sup>er</sup> septembre 2010

Dans le rare cas où un *Échantillon* présente les signes d'une urine « instable » décrits dans la Section 2.2 ci-dessus, le Laboratoire doit inclure les résultats du ou des contrôles de stabilité dans le rapport de *Résultat d'analyse anormal* à la 19-NA. Par conséquent, un commentaire doit apparaître dans le rapport d'analyse indiquant que le contrôle de stabilité a été effectué et que l'*Échantillon* est stable. De plus, les résultats de l'analyse par GC/C/IRMS, y compris les valeurs  $\delta$  pour la 19-NA et l'androstérone, et la valeur  $\Delta\delta$  doivent être inclus dans le rapport d'analyse.

#### **4.0 Références**

1. Grosse J, Anielski P, Hemmersbach P, Lund H, Mueller RK, Rautenberg C, Thieme D. Formation of 19-norsteroids by in situ demethylations of endogenous steroids in stored urine samples. *Steroids* 2005; 70: 499-506.
2. Hebestreit M, Flenker U, Fuschöller G, Geyer H, Güntner U, Mareck U, Piper T, Thevis M, Ayotte C, Schänzer W Determination of the origin of urinary norandrosterone traces by gas chromatography combustion isotope ratio mass spectrometry. *Analyst* 2006; 131:1021-6.
3. Walker CJ, Cowan DA, James VHT, Lau JCY, Kicman AT. Doping in sport—1. Excretion of 19-norandrosterone by healthy women, including those using contraceptives containing norethisterone. *Steroids* 2009; 74: 329-35.