

Document technique de l'AMA – TD2012NA-FR

Document no :	TD2012NA-FR	Version no :	1.0
Rédaction :	Comité Laboratoires de l'AMA	Approuvé par :	Comité exécutif de l'AMA
Date :	17 septembre 2011	Date d'entrée en vigueur :	1 ^{er} Janvier 2012

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 les rapports aux 19-norstéroïdes apparentés à la nandrolone par les Laboratoires.

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 à une concentration (obtenue par hydrolyse avec β -glucuronidase) supérieure à la limite de décision (LD), telle qu'elle est établie dans le Document technique LD. 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* et de démontrer, si nécessaire, qu'elle n'est pas d'origine endogène est suffisant pour rapporter un *Résultat d'analyse anormal (RAA)*.

Dans certaines circonstances, décrites ci-après, des analyses et rapports supplémentaires peuvent être exigés.

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 LD définie dans le Document technique LD et, si nécessaire, que la 19-NA détectée n'est pas d'origine endogène (par analyse en GC/C/IRMS).

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

- Un étalon interne deutérié (par exemple le d_4 -19-NA-glucuronide) ;
- Une courbe de calibration sur une gamme appropriée encadrant la concentration estimée de l'analyte dans l'*Échantillon* (quand la concentration est inférieure à 15 ng/mL) ou une calibration à un seul point à 15 ng/mL (quand la concentration est de 15 ng/mL ou supérieure à 15 ng/mL) ;
- L'utilisation d'échantillons de contrôle de qualité négatif et positif appropriés.

La méthode GC/C/IRMS doit inclure les caractéristiques suivantes :

- Chaque lot d'*Échantillons* analysé par GC/C/IRMS doit inclure une urine témoin négative (valeurs $\delta^{13}C$ de la 19-NA et du composé endogène de référence – CER – dans l'intervalle des valeurs naturelles) et une urine témoin positive (différence entre les valeurs $\delta^{13}C$ ($\Delta\delta$) du CER et de la 19-NA

Document technique de l'AMA – TD2012NA-FR

Document no :	TD2012NA-FR	Version no :	1.0
Rédaction :	Comité Laboratoires de l'AMA	Approuvé par :	Comité exécutif de l'AMA
Date :	17 septembre 2011	Date d'entrée en vigueur :	1 ^{er} Janvier 2012

supérieure à 3‰). Ces contrôles doivent être soumis à la même procédure de préparation que la Partie aliquote de l'Échantillon. L'analyse doit inclure la confirmation de l'identité du pic de la 19-NA (par exemple par analyse en GC/MS effectuée dans des conditions comparables de chromatographie. Le but est de produire un chromatogramme ayant des profils de pics similaires afin que les spectres puissent être utilisés pour identifier le ou les pic(s) en question. Des différences mineures de TR entre les deux techniques sont attendues).

2.2 Tests supplémentaires obligatoires

La 19-NA est excrétée à de faibles concentrations comme *Métabolite* mineur de la noréthistérone, un agent progestogène dont l'usage est permis, et pendant la grossesse. De plus, la 19-NA peut être produite dans de rares Échantillons d'urine, à des niveaux similaires, par 19-déméthylation *in situ* de l'androstérone (A).

Lorsque la concentration de 19-NA mesurée dans un Échantillon d'urine provenant d'une femme est supérieure à la LD, le Laboratoire doit effectuer des tests de grossesse (par exemple basés sur la quantification de la gonadotrophine chorionique humaine (hCG) urinaire) and pour l'usage de contraceptifs basés sur la noréthistérone (par exemple détection de la tétrahydronoréthistérone).

Une analyse par GC/C/IRMS doit être effectuée dans les cas suivants¹ :

- Pour tout Échantillon d'urine dont la concentration de 19-NA mesurée est entre la LD et 10 ng/mL, sauf en cas de grossesse ou d'usage de la noréthistérone ;
- En cas de grossesse, quand la concentration de 19-NA mesurée dans l'Échantillon d'urine est supérieure à 15 ng/mL².

¹ Pour rejeter l'hypothèse d'une formation endogène de 19-NA, les critères suivants, basés sur l'application d'une analyse par GC/C/IRMS, doivent être rencontrés simultanément :

i- La valeur $\delta^{13}C$ de la 19-NA est en dehors des valeurs de référence normalement mesurées chez les humains (c'est-à-dire qu'elle est inférieure à -27‰), et

ii- La valeur $\Delta\delta$ entre le composé endogène de référence (CER) (par exemple A ou le prégnandiol [PD]) et la 19-NA, $\Delta\delta = \delta_{CER} - \delta_{19-NA}$, est supérieure à 3‰, et

iii- L'incertitude standard combinée (u_c) associée à la détermination des valeurs $\Delta\delta$, telle qu'elle a été estimée par le Laboratoire lors de la validation de la méthode GC/C/IRMS, n'est pas supérieure à 0,8‰.

² En cas de grossesse, quand la concentration de 19-NA mesurée dans un Échantillon d'urine est entre la LD et 15 ng/mL, l'analyse IRMS peut également être effectuée pour vérifier l'origine endogène de la 19-NA.

Document technique de l'AMA – TD2012NA-FR

Document no :	TD2012NA-FR	Version no :	1.0
Rédaction :	Comité Laboratoires de l'AMA	Approuvé par :	Comité exécutif de l'AMA
Date :	17 septembre 2011	Date d'entrée en vigueur :	1 ^{er} Janvier 2012

Les Laboratoires qui n'ont pas la capacité analytique d'effectuer l'analyse GC/C/IRMS pour la 19-NA doivent faire analyser l'Échantillon par un autre Laboratoire ayant cette capacité.

2.3 Procédure de confirmation de l'Échantillon « B »

- Les Procédures de confirmation d'Échantillons « B » pour les Échantillons d'hommes et de femmes non enceintes nécessitent seulement l'identification et la quantification (pour les Échantillons aux concentrations de 19-NA inférieures à 15 ng/mL) de la 19-NA rapportée.
- Pour les femmes enceintes aux valeurs urinaires de 19-NA supérieures à 15 ng/mL², la Procédure de confirmation de l'Échantillon « B » nécessite l'analyse par GC/C/IRMS, y compris la confirmation de l'identité du pic de la 19-NA.

3.0 Interprétation

3.1 Seuil ajusté

Si et seulement si un Échantillon d'urine a une gravité spécifique (GS, mesurée au Laboratoire) supérieure à 1,020, le seuil (S) doit être ajusté pour prendre en compte la GS de l'Échantillon à l'aide de la formule suivante :

$$S_{\text{ajusté}} = [(GS_{\text{Échantillon}} - 1) / (1,020 - 1)] \times S$$

3.2 Limite de décision pour la 19-NA

La LD, établie pour la 19-NA, est publiée dans le Document technique LD. Si la GS est supérieure à 1,020, la LD doit être calculée pour le résultat individuel à la 19-NA à partir du S ajusté en fonction de la GS, en conformité avec le Document technique LD. Par conséquent, il faut utiliser la LD ajustée pour déterminer si un RAA va être rapporté pour l'Échantillon et il faut l'inclure dans le rapport d'analyse du Laboratoire.

Document technique de l'AMA – TD2012NA-FR

Document no :	TD2012NA-FR	Version no :	1.0
Rédaction :	Comité Laboratoires de l'AMA	Approuvé par :	Comité exécutif de l'AMA
Date :	17 septembre 2011	Date d'entrée en vigueur :	1 ^{er} Janvier 2012

4.0 Rapports

Le Laboratoire doit rapporter les résultats à la 19-NA pour les *Échantillons* d'urine provenant d'hommes ou de femmes contenant une concentration supérieure à la LD (voir sections 3.1 et 3.2 ci-dessus) dans les conditions ci-après :

A. *Échantillons* de femmes enceintes :

- Les *Échantillons* dans lesquels les concentrations de 19-NA sont supérieures à 15 ng/mL et pour lesquels les résultats de l'analyse obligatoire par GC/C/IRMS (voir section 2.2 ci-dessus) ne sont pas concordants avec une origine endogène de la 19-NA détectée doivent être rapportés comme *RAA* à la 19-NA³. Les résultats de l'analyse GC/C/IRMS doivent être inclus dans le rapport d'analyse⁴ ;
- Les *Échantillons* dans lesquels les concentrations de 19-NA sont supérieures à 15 ng/mL et pour lesquels les résultats de l'analyse obligatoire par GC/C/IRMS (voir section 2.2 ci-dessus) sont concordants avec une origine endogène de la 19-NA détectée doivent être rapportés comme « *Aucune Substance ou Méthode interdite* recherchée détectée » ;
- Les *Échantillons* dans lesquels les concentrations de 19-NA sont de 15 ng/mL ou inférieures à 15 ng/mL doivent être rapportés comme « *Aucune Substance ou Méthode interdite* recherchée détectée ». Toutefois, si une analyse GC/C/IRMS (voir section 2.2 ci-dessus) est effectuée sur un tel *Échantillon* et si ses résultats ne sont pas concordants avec une origine endogène de la 19-NA détectée, l'*Échantillon* doit être rapporté comme un *RAA* à la 19-NA³. Les résultats de l'analyse GC/C/IRMS doivent être inclus dans le rapport d'analyse⁴.

Dans ces cas, il ne faut pas faire mention de l'état de grossesse de la sportive.

³ Les concentrations de 19-NA rapportées doivent être exprimées de la façon suivante :

- Quand la concentration de 19-NA est supérieure à 15 ng/mL, aucune quantification n'est exigée lors de la Procédure de confirmation. Une calibration à un seul point à 15 ng/mL est suffisante. La concentration estimée doit être exprimée comme « >15 ng/mL » sans qu'il soit nécessaire de rapporter la valeur estimée ;

- Quand la concentration de 19-NA est entre la LD et 15 ng/mL, une quantification est exigée lors de la Procédure de confirmation. La valeur confirmée doit être exprimée comme concentration moyenne de déterminations en triplicata, avec au plus deux chiffres significatifs (Un résultat entre 2 et 10 serait rapporté, par exemple, comme « 5,1 ng/mL ». Un résultat entre 10 et 15 serait rapporté comme « 13 ng/mL »).

En tout cas, conformément au Document technique LD, le Laboratoire doit rapporter la LD pour la 19-NA et l'incertitude standard combinée (u_c) estimée par le Laboratoire à la limite du seuil.

⁴ Le rapport d'analyse GC/C/IRMS doit inclure les valeurs $\delta^{13}C$ de la 19-NA et du CER, la valeur $\Delta\delta$, et l'incertitude standard combinée (u_c) associée avec la détermination de la valeur $\Delta\delta$, estimée par le Laboratoire lors de la validation de la méthode GC/C/IRMS.

Document technique de l'AMA – TD2012NA-FR

Document no :	TD2012NA-FR	Version no :	1.0
Rédaction :	Comité Laboratoires de l'AMA	Approuvé par :	Comité exécutif de l'AMA
Date :	17 septembre 2011	Date d'entrée en vigueur :	1 ^{er} Janvier 2012

B. *Échantillons* de femmes qui prennent de la noréthistérone :

- Les *Échantillons* dans lesquels les concentrations de 19-NA sont supérieures à 10 ng/mL doivent être rapportés comme *Résultat atypique (RA)* à la 19-NA³. Un commentaire doit être ajouté au rapport d'analyse, décrivant le résultat à la 19-NA ainsi que le résultat qui démontre l'usage de la noréthistérone (par exemple « La 19-norandrostérone (19-NA) a été détectée dans l'*Échantillon* à la concentration X³. La tétrahydronoréthistérone, un métabolite de la noréthistérone, a également été détectée dans l'*Échantillon*) » ;
- Les *Échantillons* dans lesquels les concentrations de 19-NA sont égales ou inférieures à 10 ng/mL doivent être rapportés comme « Aucune *Substance* ou *Méthode interdite* recherchée détectée » sans plus de commentaire (il ne faut pas faire mention de l'usage de la noréthistérone).

C. *Échantillons* d'hommes ou de femmes (pas compris dans A. ou B.) :

- Les *Échantillons* dans lesquels les concentrations de 19-NA sont supérieures à 10 ng/mL doivent être rapportés comme *RAA* pour la 19-NA³. Pour les femmes, un commentaire doit être ajouté, expliquant que des tests de grossesse et pour la noréthistérone ont été effectués et que les résultats ne sont pas concordants avec l'une ou l'autre de ces conditions (*par exemple* « La détection de la 19-NA n'est pas concordante avec une grossesse ou la prise de noréthistérone »).
- Les *Échantillons* contenant des concentrations de 19-NA entre la LD et 10 ng/mL et pour lesquels les résultats de l'analyse obligatoire par GC/C/IRMS (voir section 2.2 ci-dessus) ne sont pas concordants avec une origine endogène de la 19-NA détectée doivent être rapportés comme *RAA* à la 19-NA³ et les résultats de l'analyse GC/C/IRMS doivent être inclus dans le rapport d'analyse⁴.
- Les *Échantillons* contenant des concentrations de 19-NA entre la LD et 10 ng/mL et pour lesquels les résultats de l'analyse obligatoire par GC/C/IRMS (voir section 2.2 ci-dessus) sont concordants avec une origine endogène de la 19-NA détectée doivent être rapportés comme « Aucune *Substance* ou *Méthode interdite* recherchée détectée ». Un commentaire doit être ajouté, décrivant le résultat à la 19-NA et expliquant que le résultat de l'analyse GC/C/IRMS est concordant avec la production endogène de 19-NA (*par exemple* « La 19-norandrostérone (19-NA) a été détectée dans l'*Échantillon* à la concentration X³ et les résultats de l'analyse GC/C/IRMS indiquent que le résultat à la 19-NA peut être concordant avec une production endogène ») .

Document technique de l'AMA – TD2012NA-FR

Document no :	TD2012NA-FR	Version no :	1.0
Rédaction :	Comité Laboratoires de l'AMA	Approuvé par :	Comité exécutif de l'AMA
Date :	17 septembre 2011	Date d'entrée en vigueur :	1 ^{er} Janvier 2012

5.0 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, Fusshöller 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.
4. Guay C, Goudreault D, Schänzer W, Flenker U, Ayotte C. Excretion of norsteroids' phase II metabolites of different origin in human. *Steroids* 2009, 74, 350-8.

Document technique de l'AMA – TD2012NA-FR

Document no :	TD2012NA-FR	Version no :	1.0
Rédaction :	Comité Laboratoires de l'AMA	Approuvé par :	Comité exécutif de l'AMA
Date :	17 septembre 2011	Date d'entrée en vigueur :	1 ^{er} Janvier 2012

Annexe A – Diagramme pour les résultats à la 19-NA

