

# Sapin et al. (2000) - De la prudence lors de l'utilisation des dosages directs de progestérone [Caution when using direct progesterone assays]

## Citation

- Sapin, R., Neamtu, D., Gasser, F., Ohl, J., Grunenberger, F., & Grucker, D. (2000). De la prudence lors de l'utilisation des dosages directs de progestérone. [Caution when using direct progesterone assays.] *Immuno-analyse et Biologie Spécialisée*, 3(15), 203–204. [DOI:[10.1016/S0923-2532\(00\)80010-1](https://doi.org/10.1016/S0923-2532(00)80010-1)]

## English Translated

### *Caution when using direct progesterone assays*

R Sapin<sup>\*1</sup>, D Neamtu<sup>1</sup>, F Gasser<sup>1</sup>, J Ohl<sup>2</sup>, F Grunenberger<sup>3</sup>, D Grucker<sup>1</sup>

### **Progesterone and its measurement**

Progesterone (P), one of the main steroid hormones, is secreted in low quantities in cyclic women by the ovaries during the follicular phase. During the menstrual cycle, its secretion rate increases very significantly after ovulation in the luteal phase during which it is essential for the nesting of the embryo. In the blood, its half-life is short and it is metabolized by the liver in the form of the dihydrogenated derivatives 5 $\alpha$ -dihydroprogesterone (5 $\alpha$ -DHP), 5 $\beta$ -dihydroprogesterone (5 $\beta$ -DHP), and 20 $\alpha$ -dihydroprogesterone (20 $\alpha$ -DHP) as well as in form of tetra- and hexahydrogenated derivatives [1]. Under usual conditions, the circulating concentrations of these metabolites are negligible compared to that of P. P is eliminated in the urine in the form of free or conjugated pregnanediol, mainly glucuronide.

In the luteal phase, the measurement of P between D20 and D23 of the menstrual cycle provides evidence of post-ovulatory luteinization. After fertilization, it is an indicator of the progress of a pregnancy or an ectopic pregnancy [2]. In recent years, the value of follicular phase P assay during in vitro fertilization and embryo transfer (Fivete) cycles has appeared in the context of medically assisted procreation [3]. To provide the services expected by the clinician, the biologist often opts for a direct assay, sometimes automated, allowing rapid rendering of the result. Compared with the reference technique, the kits currently available still appear to be perfectible, especially in the low values [2].

For substitution treatments, synthetic derivatives, although active, have a large number of disadvantages [4]. This is why the use of P in micronized form, effective orally, is more widespread. Micronization protects P from gastric and duodenal degradation but does not protect it from the metabolization that occurs during intestinal absorption and passage through the liver. This intestinal absorption and this first hepatic passage before reaching the target organs are specific to this route of administration and induce an increase in the circulating concentration of the 5 $\alpha$ -DHP, 5 $\beta$ -DHP, and 20 $\alpha$ -DHP metabolites. Among these, 5 $\alpha$ -DHP would be the most important [5]. In this particular circumstance, the result of the P assay may be greatly overestimated [6, 7] and inter-method discrepancies may appear. The following presentation of results of P assays carried out in 4 patients treated with micronized P illustrates this

interference which has been known for a long time [5] but which is particularly marked with recently marketed kits.

## Observations

P assays were performed in the serum of four patients treated with Utrogestan® (micronized P): three patients before starting a new Fivete cycle with the aim of improving endometrial receptivity and one patient substituted within the framework of a global anterior pituitary insufficiency. The P assays were carried out with the Coatria bioMérieux direct radioimmunological kit, which has been routinely used in the laboratory for many years, as well as with more recent direct methods: Immunotech radioimmunological and automated non-isotopic methods on Advia Centaur from Bayer Diagnostics and on Elecsys (Progesterone now replaced by Progesterone II) from Roche Diagnostics. In addition, some Coatria bioMérieux, Progesterone II Elecsys and Advia Centaur assays could be performed after extraction with hexane: extraction of one volume of serum with 10 volumes of hexane followed by dry evaporation of the hexane and the recovery of the dry residue with a volume of serum of very low concentration (<0.3 nmol L<sup>-1</sup>) before assay (Table I).

**Table I.** Results of progesterone (nmol L<sup>-1</sup>) assayed in the serum of four patients treated with micronized progesterone. Assays carried out with the bioMérieux Coatria and Immunotech radioimmunological kits and with the non-isotopic methods Elecsys (Progesterone and Progesterone II) and Advia Centaur. Coatria, Progesterone II Elecsys, and Advia Centaur assays with and without hexane extraction (direct).

Patient	bioMérieux Coatria		Elecsys Progesterone	Elecsys Progesterone II		Advia Centaur		Immunotech
	Direct	Extraction	Direct	Direct	Extraction	Direct	Extraction	Direct
1*	5.4	1.6	12	25	2.8	45		27
2**	6.0	2.5		57	5.0	95		39
3**	3.8	1.5	31	41	8.6	51	1.3	
4**	4.5			24				

\* patient treated for anterior pituitary insufficiency; \*\* patients treated as part of a Fivete

The results of direct assays vary greatly depending on the kit. They are between 5.4 and 45 nmol L<sup>-1</sup> for the pituitary insufficient patient and between 6 and 95 nmol L<sup>-1</sup> for a patient in preparation of Fivete for example. Each time the extraction could be carried out the result was greatly lowered. The result after extraction represents between 2.5 and 42% of the result before extraction. Moreover, after extraction, the results remain very dependent on the technique: for a patient for example, they vary from 1.3 to 8.6 nmol L<sup>-1</sup>.

## Discussion

A significant part of the interference observed in the direct assays is due to the presence of conjugates in the serum since the elimination of these during the hexane extraction always clearly lowers the result. However, this treatment is not sufficient to ensure a specific measurement of P in these treated patients. The metabolites 5 $\alpha$ -DHP, 5 $\beta$ -DHP, and 20 $\alpha$ -DHP likely interfere. Extraction does not remove these metabolites and purification of the assay medium would actually require chromatography [5].

The data available on the cross-reactions of these metabolites collected in the technical data sheets for each of the kits or reported by Patricot et al. [2] are often incomplete (Table II). For the Immunotech kits and, to a lesser degree, bioMérieux and Progesterone II Elecsys, these data make it possible to understand the interference. This is not the case for the Advia Centaur and Progesterone Elecsys assays whose data are absent or rather reassuring. The cross-reaction of the a priori most important 5 $\alpha$ -DHP metabolite [5] is only indicated for the Immunotech kit. In addition, interference from other metabolites, such as 5 $\alpha$ -pregnenolone-3 $\beta$ , is likely [5].

**Table II.** Cross-reactions in % of progesterone assays with the main metabolites of progesterone administered orally in micronized form: 5 $\alpha$  dihydroprogesterone (5 $\alpha$ -DHP), 5 $\beta$ -dihydroprogesterone (5 $\beta$ -DHP) and 20 $\alpha$ -dihydroprogesterone (20 $\alpha$ -DHP). According to the technical sheets of the measures and Patricot et al. (2).

Measure	5 $\alpha$ -DHP	5 $\beta$ -DHP	20 $\alpha$ -DHP
Coatria bioMérieux	–	0.7	2.2
Progesterone Elecsys	–	0	0
Progesterone II Elecsys	–	20.7	0.016
Advia Centaur	–	–	–
Immunotech	13.8	7.7	0.96

In our view, just as much as the never-exhaustive list of cross-reactions of the antiserum of the assay kit, the indication in a paragraph "Limits of use" of well-known circumstances, such as this (oral intake of micronized progesterone and measurement of progesterone), in which a measurement is taken in default, should appear in the technical data sheet. This information has the merit of being directly exploitable by the biologist confronted with a difficulty of interpretation.

## Conclusion

The interference of metabolites produced in large quantities in patients treated with micronized P, already sensitive in the old progesterone assays (Coatria bioMérieux) appears even more marked in the new assays recently proposed, whether they are isotopic (Immunotech) or not (Elecsys and Advia Centaur). More than ever, great caution is therefore required for the progesterone assay and its interpretation in these patients whose treatment with micronized progesterone must imperatively be brought to the attention of the biologist.

## Thanks

E. Fischbach and N. Martz are thanked for their excellent technical contribution and the University Hospitals of Strasbourg for their financial support.

We are grateful to Bayer Diagnostics, Immunotech Beckman Coulter and Roche Diagnostics laboratories for providing the progesterone kits free of charge and to Bayer Diagnostics laboratory for providing the Advia Centaur analyzer.

## References

1. Milgrom E Steroid hormones. In : Beaulieu EE, Kelly PA eds. Hormones From molecules to disease. Hermann, Paris ; 1990. pp 384–437
2. Patricot MC, Badonnel Y, Boudou P et al. Validité des dosages immunochimiques de la progestérone dans le sang : étude réalisée en 1998. Ann Biol Clin 1999 ; 57 : 201–10
3. Taieb J, Benattar C, Lindenbaum A, Fanchin R. Intérêt du dosage de la progestérone en phase folliculaire au cours des cycles de fécondation in vitro et transfert d'embryon (Fivete). Immunoanal Biol Spec 1997 ; 12 : 312–5
4. Maxson WS, Hargrove JT. Bioavailability of oral micronized progesterone. Fertil Steril 1985 ; 44 : 622–6
5. Nahoul K, Dehennin L, Scholler R. Radioimmunoassay of plasma progesterone after oral administration of micronized progesterone. J Steroid Biochem 1987 ; 26 : 241–9
6. Fiet J, Galons H, Villette JM et al. Problèmes particuliers posés par l'immunodosage des stéroïdes. Immunoanal Biol Spec 1990 ; 22 : 41–52
7. Nahoul K, de Ziegler D. Validity of serum progesterone levels after oral progesterone. Fertil Steril 1994 ; 61 : 790–2

## French Original

### *De la prudence lors de l'utilisation des dosages directs de progestérone*

R Sapln\*<sup>1</sup>, D Neamtu<sup>1</sup>, F Gasser<sup>1</sup>, J Ohl<sup>2</sup>, F Grunenberger<sup>3</sup>, D Grucker<sup>1</sup>

### **La progestérone et son dosage**

La progestérone (P), une des principales hormones stéroïdiennes, est sécrétée chez la femme cyclique en faible quantité par les ovaires au cours de la phase folliculaire. Au cours du cycle menstruel, son taux de sécrétion augmente de façon très importante après l'ovulation en phase lutéale pendant laquelle elle est indispensable à la nidification de l'embryon. Dans le sang sa demi-vie est brève et elle est métabolisée par le foie sous forme de dérivés dihydrogénés 5 $\alpha$ -dihydroprogestérone (5 $\alpha$ -DHP), 5 $\beta$ -dihydroprogestérone (5 $\beta$ -DHP) et 20 $\alpha$ -dihydroprogestérone (20 $\alpha$ -DHP) ainsi que sous forme de dérivés tétra et hexahydrogénés [1]. Dans les conditions habituelles les concentrations circulantes de ces métabolites sont négligeables devant celle de P. La P est éliminée dans les urines sous forme de prégnandiol libre ou conjugué, glucuronide principalement.

En phase lutéale, le dosage de P entre J20 et J23 du cycle menstruel constitue un témoin de la lutéinisation post-ovulatoire. Après la fécondation, c'est un indicateur de l'évolutivité d'une grossesse ou d'une grossesse extra-utérine [2]. Ces dernières années, l'intérêt du dosage de P en phase folliculaire au cours des cycles de fécondation in vitro et transfert d'embryon (Fivete) est apparu dans le cadre de l'assistance médicale à la procréation [3]. Pour rendre les services attendus par le clinicien, le biologiste s'oriente souvent vers un dosage direct, parfois automatisé, permettant un rendu rapide du résultat. Par comparaison avec la technique de référence, les troussees disponibles actuellement apparaissent encore perfectibles, surtout dans les valeurs basses [2].

Pour les traitements substitutifs les dérivés synthétiques, bien qu'actifs, présentent un grand nombre d'inconvénients [4]. C'est pourquoi l'emploi de P sous forme micronisée, efficace par voie orale, est plus largement répandu. La micronisation protège la P de la dégradation gastrique et duodénale mais ne la met pas à l'abri de la métabolisation qui se produit lors de l'absorption intestinale et du passage à travers

le foie. Cette absorption intestinale et ce premier passage hépatique avant d'atteindre les organes cibles, sont spécifiques de cette voie d'administration et induisent une élévation de la concentration circulante des métabolites 5 $\alpha$ -DHP, 5 $\beta$ -DHP et 20 $\alpha$ -DHP. Parmi ces derniers, la 5 $\alpha$ -DHP serait le plus important [5]. Dans cette circonstance particulière le résultat du dosage de P peut être fortement surestimé [6, 7] et des discordances inter-méthode peuvent apparaître. La présentation suivante de résultats de dosages de P réalisés chez 4 patientes traitées par P micronisée illustre cette interférence connue depuis longtemps [5] mais qui s'avère particulièrement marquée avec des trousse récemment commercialisées.

## Observation

Des dosages de P ont été réalisés dans le sérum de quatre patientes traitées par Utrogestan® (P micronisée) : trois patientes avant de débiter un nouveau cycle Fivete dans le but d'améliorer la réceptivité endométriale et une patiente substituée dans le cadre d'une insuffisance anté-hypophysaire globale. Les dosages de P ont été réalisés avec la trousse radioimmunologique directe Coatria bioMérieux utilisée en routine au laboratoire depuis de nombreuses années ainsi qu'avec des méthodes directes plus récentes : radioimmunologique Immunotech et non isotopiques automatisées sur Advia Centaur de Bayer Diagnostics et sur Elecsys (Progesterone maintenant remplacée par Progéstérone II) de Roche Diagnostics. De plus quelques dosages Coatria bioMérieux, Progéstérone II Elecsys et Advia Centaur ont pu être faits après extraction à l'hexane : extraction d'un volume de sérum par 10 volumes d'hexane suivie d'une évaporation à sec de l'hexane et de la reprise du résidu sec par un volume de sérum de concentration très basse (< 0,3 nmol L<sup>-1</sup>) avant dosage (tableau I).

**Tableau I.** Résultats de progéstérone (nmol L<sup>-1</sup>) dosée dans le sérum de quatre patientes traitées par progéstérone micronisée. Dosages réalisés avec les trousse radioimmunologiques bioMérieux Coatria et Immunotech et avec les méthodes non-isotopiques Elecsys (Progesterone et Progéstérone II) et Advia Centaur. Dosages Coatria, Progéstérone II Elecsys et Advia Centaur avec et sans extraction à l'hexane (direct).

Patiente	BioMérieux Coatria		Elecsys Progéstérone Direct	Elecsys Progesterone II		Advia Centaur		Immunotech Direct
	Direct	Extraction		Direct	Extraction	Direct	Extraction	
1*	5,4	1,6	12	25	2,8	45		27
2**	6,0	2,5		57	5,0	95		39
3**	3,8	1,5	31	41	8,6	51	1,3	
4**	4,5			24				

\* patiente traitée pour insuffisance ante-hypophysaire; \*\* patientes traitées dans le cadre d'une Fivete

Les résultats des dosages directs sont très variables suivant la trousse. Ils sont compris entre 5,4 et 45 nmol L<sup>-1</sup> pour la patiente insuffisante hypophysaire et entre 6 et 95 nmol L<sup>-1</sup> pour une patiente en préparation de Fivete par exemple. Chaque fois que l'extraction a pu être réalisée le résultat a été fortement abaissé. Le résultat après extraction représente en effet entre 2,5 à 42 % du résultat avant extraction. De plus après extraction les résultats restent très dépendants de la technique : pour une patiente par exemple, ils varient de 1,3 à 8,6 nmol L<sup>-1</sup>.

## Discussion

Une part importante de l'interférence observée dans les dosages directs est due à la présence de conjugués dans le sérum puisque l'élimination de ceux-ci lors de l'extraction à l'hexane abaisse toujours nettement le résultat. Ce traitement n'est cependant pas suffisant pour assurer un dosage spécifique de P chez ces patientes traitées. Les métabolites 5 $\alpha$ -DHP, 5 $\beta$ -DHP et 20 $\alpha$ -DHP interfèrent vraisemblablement. L'extraction n'élimine pas ces métabolites et la purification du milieu de dosage nécessiterait en fait une chromatographie [5].

Les données disponibles sur les réactions croisées de ces métabolites recueillies dans les fiches techniques de chacune des trousse ou rapportées par Patricot et al. [2] sont souvent incomplètes (tableau II). Pour les trousse Immunotech et, à un degré moindre, bioMérieux et Progesterone II Elecsys, ces données permettent d'appréhender l'interférence. Ce n'est pas le cas pour les dosages Advia Centaur et Progesterone Elecsys dont les données sont absentes ou plutôt rassurantes. La réaction croisée du métabolite 5 $\alpha$ -DHP a priori le plus important [5] n'est indiquée que pour la trousse Immunotech. De plus l'interférence d'autres métabolites, comme la 5 $\alpha$ -prégnénolone-3 $\beta$ , est probable [5].

**Tableau II.** Réactions croisées en % des dosages de progestérone avec les principaux métabolites de la progestérone administrée par voie orale sous forme micronisée : 5 $\alpha$  dihydroprogestérone (5 $\alpha$ -DHP), 5 $\beta$ -dihydroprogestérone (5 $\beta$ -DHP) et 20 $\alpha$ -dihydroprogestérone (20 $\alpha$ -DHP). D'après les fiches techniques des dosages et Patricot et al. (2).

Dosage	5 $\alpha$ -DHP	5 $\beta$ -DHP	20 $\alpha$ -DHP
Coatria bioMérieux	–	0,7	2,2
Progesterone Elecsys	–	0	0
Progesterone II Elecsys	–	20,7	0,016
Advia Centaur	–	–	–
Immunotech	13,8	7,7	0,96

A notre sens, tout autant que la liste, jamais exhaustive, des réactions croisées de l'antisérum de la trousse de dosage, l'indication dans un paragraphe " Limites d'utilisation " des circonstances bien connues, comme celle-ci (prise orale de progestérone micronisée et dosage de progestérone), dans lesquelles un dosage est pris en défaut, devrait figurer dans la fiche technique. Cette information a le mérite d'être directement exploitable par le biologiste confronté à une difficulté d'interprétation.

## Conclusion

L'interférence des métabolites produits en grande quantité chez les patientes traitées par P micronisée déjà sensible dans les anciens dosages de progestérone (Coatria bioMérieux) apparaît encore plus marquée dans les nouveaux dosages récemment proposés, qu'ils soient isotopiques (Immunotech) ou non (Elecsys et Advia Centaur). Plus que jamais une grande prudence s'impose donc pour le dosage de la progestérone et son interprétation chez ces patientes dont le traitement par progestérone micronisée doit impérativement être porté à la connaissance du biologiste.

## Remerciements

E. Fischbach et N. Martz sont remerciées pour leur excellente contribution technique et les Hôpitaux universitaires de Strasbourg pour leur soutien financier.

Nous sommes reconnaissants aux laboratoires Bayer Diagnostics, Immunotech Beckman Coulter et Roche Diagnostics pour la fourniture gratuite des trousse de progestérone et au laboratoire Bayer Diagnostics pour la mise à disposition de l'automate Advia Centaur.

## Références

1. Milgrom E Steroid hormones. In : Beaulieu EE, Kelly PA eds. Hormones From molecules to disease. Hermann, Paris ; 1990. pp 384–437
2. Patricot MC, Badonnel Y, Boudou P et al. Validité des dosages immunochimiques de la progestérone dans le sang : étude réalisée en 1998. Ann Biol Clin 1999 ; 57 : 201–10
3. Taieb J, Benattar C, Lindenbaum A, Fanchin R. Intérêt du dosage de la progestérone en phase folliculaire au cours des cycles de fécondation in vitro et transfert d'embryon (Fivete). Immunoanal Biol Spec 1997 ; 12 : 312–5
4. Maxson WS, Hargrove JT. Bioavailability of oral micronized progesterone. Fertil Steril 1985 ; 44 : 622–6
5. Nahoul K, Dehennin L, Scholler R. Radioimmunoassay of plasma progesterone after oral administration of micronized progesterone. J Steroid Biochem 1987 ; 26 : 241–9
6. Fiet J, Galons H, Villette JM et al. Problèmes particuliers posés par l'immunodosage des stéroïdes. Immunoanal Biol Spec 1990 ; 22 : 41–52
7. Nahoul K, de Ziegler D. Validity of serum progesterone levels after oral progesterone. Fertil Steril 1994 ; 61 : 790–2