Nuove strategie nella lotta al doping.

Il ruolo del laboratorio Antidoping

Xavier de la Torre

Laboratorio Antidoping, Federazione Medico Sportiva Italiana

Sommario

- Situazione normativa
- La lista WADA e i laboratori accreditati
- Attuali metodi di indagine antidoping
- Dai marker di esposizione ai marker di effetto
- Considerazioni conclusive

Sommario

- Situazione normativa
- La lista WADA e i laboratori accreditati
- Attuali metodi di indagine antidoping
- Dai marker di esposizione ai marker di effetto
- Considerazioni conclusive

Il programma mondiale antidoping

Normativa strutturata su tre livelli

I Livello – The World Anti-Doping Code

II Livello – The International Standards

(e relativi documenti tecnici)

Lista – Prelievi – Laboratori – Esenzioni a fini terapeutici – Tutela della Privacy

III Livello – The Models of Best Practice

Il programma mondiale antidoping

Normativa strutturata su tre livelli

I Livello – The World Anti-Doping Code

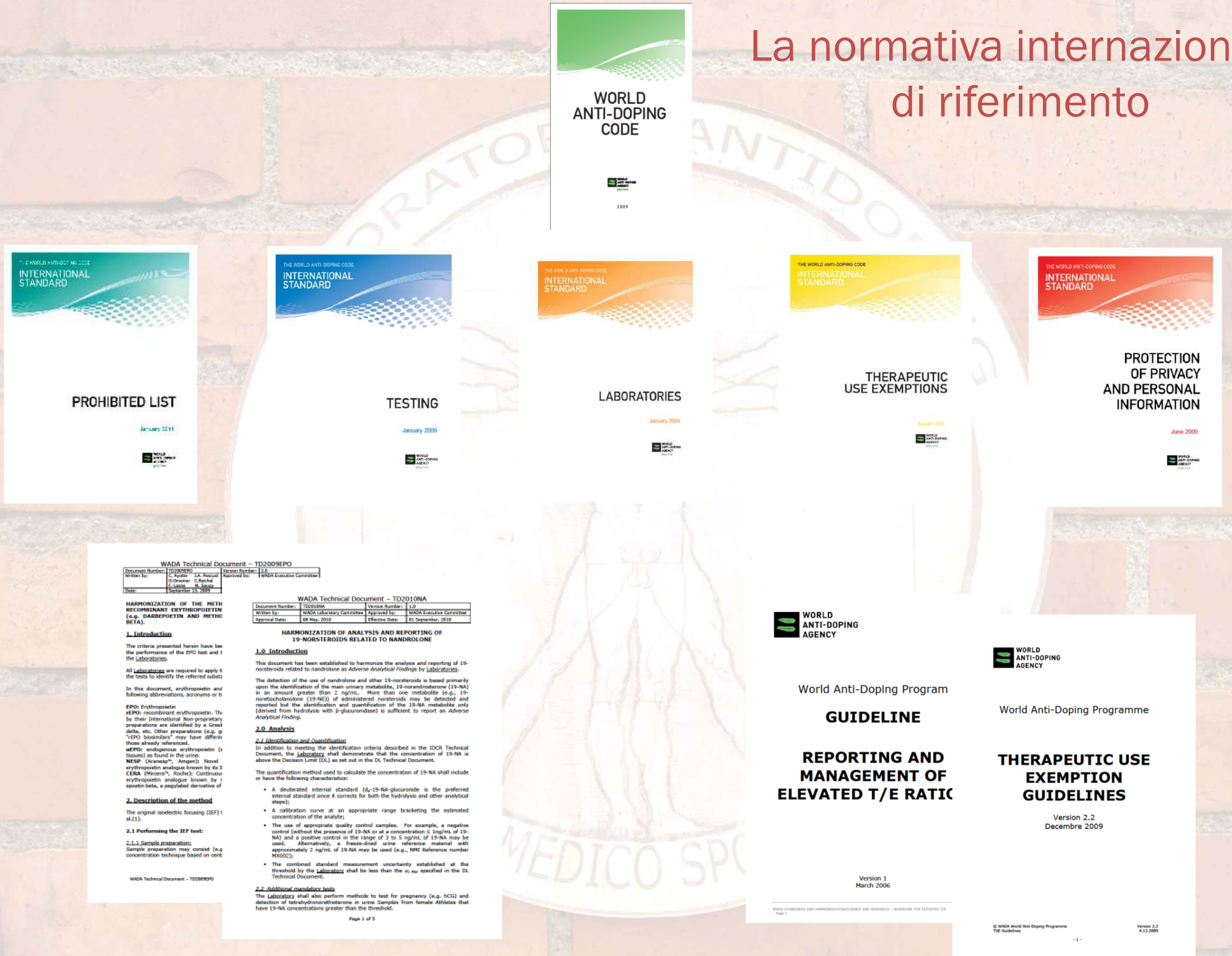
II Livello – The International Standards

(e relativi documenti tecnici)

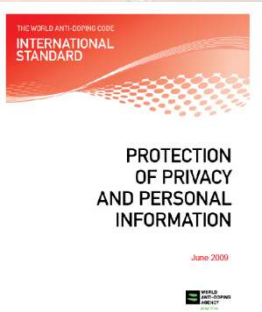
Lista – Prelievi – Laboratori – Esenzioni a fini terapeutici – Tutela della Privacy

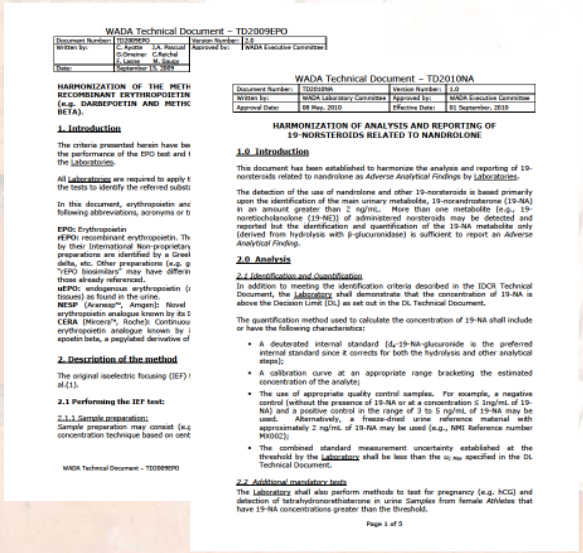
III Livello – The Models of Best Practice

La normativa internazionale di riferimento



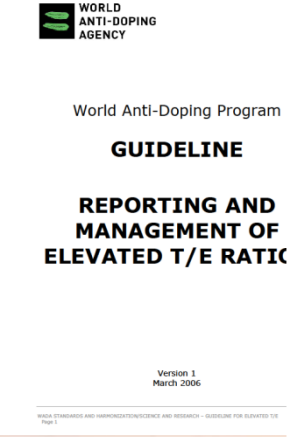
La normativa internazionale di riferimento

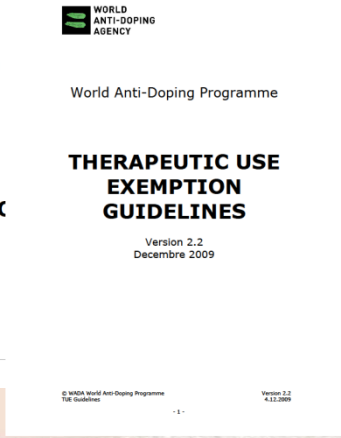



WADA Technical Document – TD2009EPO

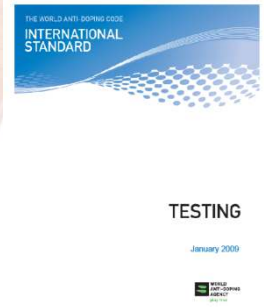
WADA Technical Document – TD2010NA

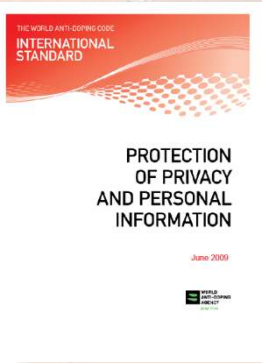
HARMONIZATION OF ANALYSIS AND REPORTING OF 19-NORSTEROIDS RELATED TO NANDROLONE

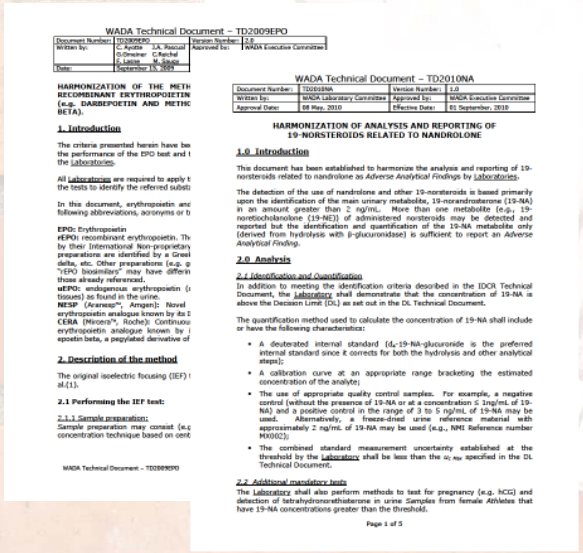




La normativa internazionale di riferimento






WADA Technical Document – TD2009EPO

HARMONIZATION OF THE METH
RECOMBINANT ERYTHROPOIETIN
(e.g. DARBEPOETIN AND METHC
BETA).

1. Introduction

The criteria presented herein have be
the performance of the EPO test and t
the Laboratories.

All Laboratories are required to apply t
the tests to identify the referred substi

In this document, erythropoietin and
following abbreviations, acronyms or t

EPO: Erythropoietin
rEPO: recombinant erythropoietin. Th
by their International Non-proprietary
preparations are identified by a Greel
delta, etc. Other preparations (e.g. g
"rEPO biosimilars" may have differin
those already referenced.
uEPO: endogenous erythropoietin (
tissues) as found in the urine.
NESP (Aranesp™, Amgen): Novel
erythropoietin analogue known by its I
CERA (Mircera™, Roche): Continuou
erythropoietin analogue known by i
epoetin beta, a pegylated derivative of

2. Description of the method

The original isoelectric focusing (IEF)
al.(1).

2.1 Performing the IEF test:

2.1.1 Sample preparation:
Sample preparation may consist (e.g
concentration technique based on cent

WADA Technical Document – TD2009EPO

WADA Technical Document – TD2010NA

Document Number:	TD2010NA	Version Number:	1.0
Written by:	WADA Laboratory Committee	Approved by:	WADA Executive Committee
Approval Date:	08 May, 2010	Effective Date:	01 September, 2010

HARMONIZATION OF ANALYSIS AND REPORTING OF
19-NORSTEROIDS RELATED TO NANDROLONE

1.0 Introduction

This document has been established to harmonize the analysis and reporting of 19-norsteroids related to nandrolone as *Adverse Analytical Findings* by Laboratories.

The detection of the use of nandrolone and other 19-norsteroids is based primarily upon the identification of the main urinary metabolite, 19-noradrosterone (19-NA) in an amount greater than 2 ng/mL. More than one metabolite (e.g., 19-noretiocholanolone (19-NE)) of administered norsteroids may be detected and reported but the identification and quantification of the 19-NA metabolite only (derived from hydrolysis with β-glucuronidase) is sufficient to report an *Adverse Analytical Finding*.

2.0 Analysis

2.1 Identification and Quantification

In addition to meeting the identification criteria described in the IDCR Technical Document, the Laboratory shall demonstrate that the concentration of 19-NA is above the Decision Limit (DL) as set out in the DL Technical Document.

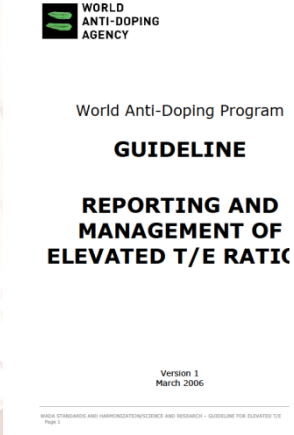
The quantification method used to calculate the concentration of 19-NA shall include or have the following characteristics:

- A deuterated internal standard (d_x-19-NA-glucuronide is the preferred internal standard since it corrects for both the hydrolysis and other analytical steps);
- A calibration curve at an appropriate range bracketing the estimated concentration of the analyte;
- The use of appropriate quality control samples. For example, a negative control (without the presence of 19-NA or at a concentration ≤ 1ng/mL of 19-NA) and a positive control in the range of 3 to 5 ng/mL of 19-NA may be used. Alternatively, a freeze-dried urine reference material with approximately 2 ng/mL of 19-NA may be used (e.g., NMI Reference number MX002);
- The combined standard measurement uncertainty established at the threshold by the Laboratory shall be less than the $u_{c\,Rep}$ specified in the DL Technical Document.

2.2 Additional mandatory tests

The Laboratory shall also perform methods to test for pregnancy (e.g. hCG) and detection of tetrahydronorethisterone in urine Samples from female Athletes that have 19-NA concentrations greater than the threshold.

Page 1 of 5

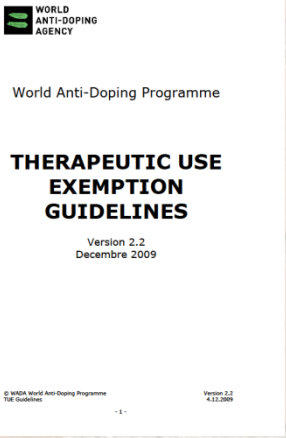

WORLD
ANTI-DOPING
AGENCY

World Anti-Doping Program

GUIDELINE

REPORTING AND
MANAGEMENT OF
ELEVATED T/E RATIC

Version 1
March 2006


WORLD
ANTI-DOPING
AGENCY

World Anti-Doping Programme

THERAPEUTIC USE
EXEMPTION
GUIDELINES

Version 2.2
Decembre 2009

© WADA World Anti-Doping Programme
TUE Guidelines

Version 2.2
4.12.2009

- 1 -

Sommario

- Situazione normativa
- La lista WADA e i laboratori accreditati
- Attuali metodi di indagine antidoping
- Dai marker di esposizione ai marker di effetto
- Considerazioni conclusive

THE WORLD ANTI-DOPING CODE

INTERNATIONAL STANDARD

PROHIBITED LIST

WORLD ANTI-DOPING AGENCY

play true

I. Prohibited Substances

S0. Non-approved substances

S1. Anabolic Agents

S2. Peptide Hormones, Growth Factors, Related Substances and Mimetics

S3. Beta-2 Agonists

S4. Hormones and metabolic modulators

S5. Diuretics and Masking Agents

S6. Stimulants

S7. Narcotics

S8. Cannabinoids

S9. Glucocorticosteroids

I. Prohibited Substances

S0. Non-approved substances

S1. Anabolic Agents

S2. Peptide Hormones, Growth Factors, Related Substances and Mimetics

S3. Beta-2 Agonists

S4. Hormones and metabolic modulators

S5. Diuretics and Masking Agents

sempre

S6. Stimulants

S7. Narcotics

S8. Cannabinoids

S9. Glucocorticosteroids

I. Prohibited Substances

S0. Non-approved substances

S1. Anabolic Agents

S2. Peptide Hormones, Growth Factors, Related Substances and Mimetics

S3. Beta-2 Agonists

S4. Hormones and metabolic modulators

S5. Diuretics and Masking Agents

S6. Stimulants

S7. Narcotics

S8. Cannabinoids

S9. Glucocorticosteroids

solo
“In competition”

II. Prohibited Methods

M1. Manipulation of blood and blood components

M2. Chemical and Physical Manipulation

M3. Gene Doping

sempre

III. Substances prohibited in particular sports

P1. Alcohol

P2. Beta blockers

solo in alcuni sport

L’evoluzione del “full menu”

10-20 sostanze negli anni ‘60

≈ 50 sostanze negli anni ‘70

≈ 100 sostanze negli anni ‘80

La lista cresce negli anni ’90 (fino a circa 200 sostanze)

Circa 300 sostanze a fine secolo/millennio

Più di 350 sostanze nel 2010

Oltre 400 sostanze oggi

(più i metodi)

(e con i controlli longitudinali e per il “passaporto biologico”)

(su campioni sia di urina sia di sangue)

(con una riduzione dei tempi di risposta medi)

(per un carico di lavoro compreso tra 10 e 500 campioni/die)

Perché la lista è così lunga?

In farmacologia, una differenza maggiore del 2% è generalmente necessaria affinché si possa parlare di “effetto rilevabile” e “statisticamente significativo”

(se un anti-ipertensivo mostra un effetto dell’1%, cioè riduce la pressure arteriosa da 200 a 199 mmHg, non è considerato “attivo”)

Nello sport, un effetto che consenta un miglioramento dello 0.1% (≈ 1 sec in una gara da 15 min) può essere sufficiente per vincere un’Olimpiade...!

THE WORLD ANTI-DOPING CODE

INTERNATIONAL STANDARD

LABORATORIES

WORLD ANTI-DOPING AGENCY

play true

I 35 laboratori accreditati dalla WADA

- **Africa:** South Africa (*Bloemfontein*)
- **Americas:** Brazil (*Rio de Janeiro*), Canada (*Montreal*), Colombia (*Bogota*), Cuba (*La Habana*), Mexico (Mexico City), United States (*Los Angeles, Salt Lake City*)
- **Asia:** China (*Beijing*), S. Corea (*Seoul*), India (*New Delhi*), Japan (*Tokyo*), Kazahstan (*Astana*), Qatar (Doha), Thailand (*Bangkok*), Turkey (Ankara)
- **Europa:** Austria (*Seibersdorf*), Belgium (*Ghent*), Finland (*Helsinki*), France (*Paris*), Germany (*Cologne*, *Kreischa*), Greece (*Athens*), Italy (*Rome*), Norway (*Oslo*), Poland (*Warsaw*), Portugal (*Lisbon*), Romania (*Bucharest*), ~~Russian Federation (*Moscow*)~~, Spain (*Barcelona*, *Madrid*), Sweden (*Stockholm*), Switzerland (*Lausanne*), United Kingdom (*London*)
- **Oceania:** Australia (*Sydney*)

Il Laboratorio Antidoping di Roma

- Riaccreditato (CIO) nel 1999
- Accredito sempre mantenuto anche sotto la WADA (unica responsabile del sistema-laboratori dal 2003 in poi)
- Operativo nella nuova sede (550 metri quadrati) dal 2007
- 24 dipendenti + 2 collaboratori (Direttore e Vice-Direttore)
- 6-8 borsisti per attività di ricerca (su fondi SVD, PCC-USA e WADA)
- Collaboratori provenienti da altri laboratori accreditati (es. Atene, Barcelona, Ghent, Londra, Parigi, Rio, Salt Lake City)
- Capacità massima 15000 campioni urina (+ sangue)
- TUTTI i metodi approvati dalla WADA disponibili e accreditati ISO 17025

Alcuni dati statistici

Year	World			Laboratorio Antidoping FMSI		
	Total	AAF+ATF	%	Total	AAF+ATF	%
2005	183.337	3.909	2,13	8.543	302	3,54
2006	198.143	3.887	1,96	8.319	222	2,67
2007	223.898	4.402	1,97	10.903	269	2,47
2008	274.615	5.061	1,84	13.342	329	2,47
2009	277.928	5.610	2,02	15.041	375	2,55
2010	258.267	4.817	1,87	10.128	333	3,29
2011	243.193	4.856	2,00	9.590	286	2,98
2012	267.645	4.723	1,76	9.656	205	2,12
2013	269.878	5.962	2,21	9.947	255	2,83
2014	283.304	3.866	1,36	9.066	174	1,92
2015	254.130	4.427	1,74	7.809	81	1,04
2016	256.879	3.617	1,40	10.701	230	2,14

AAF = Adverse analytical finding
ATF = Atypical finding

Alcuni dati statistici

Year	World			Laboratorio Antidoping FMSI		
	Total	AAF+ATF	%	Total	AAF+ATF	%
2005	183.337	3.909	**2,13**	8.543	302	**3,54**
2006	198.143	3.887	**1,96**	8.319	222	**2,67**
2007	223.898	4.402	**1,97**	10.903	269	**2,47**
2008	274.615	5.061	**1,84**	13.342	329	**2,47**
2009	277.928	5.610	**2,02**	15.041	375	**2,55**
2010	258.267	4.817	**1,87**	10.128	333	**3,29**
2011	243.193	4.856	**2,00**	9.590	286	**2,98**
2012	267.645	4.723	**1,76**	9.656	205	**2,12**
2013	269.878	5.962	**2,21**	9.947	255	**2,83**
2014	283.304	3.866	**1,36**	9.066	174	**1,92**
2015	254.130	4.427	**1,74**	7.809	81	**1,04**
2016	256.879	3.617	**1,40**	10.701	230	**2,14**

AAF = Adverse analytical finding
ATF = Atypical finding

Sommario

- Situazione normativa
- La lista WADA e i laboratori accreditati
- Attuali metodi di indagine antidoping
- Dai marker di esposizione ai marker di effetto
- Considerazioni conclusive

La rincorsa delle tecniche e metodi antidoping

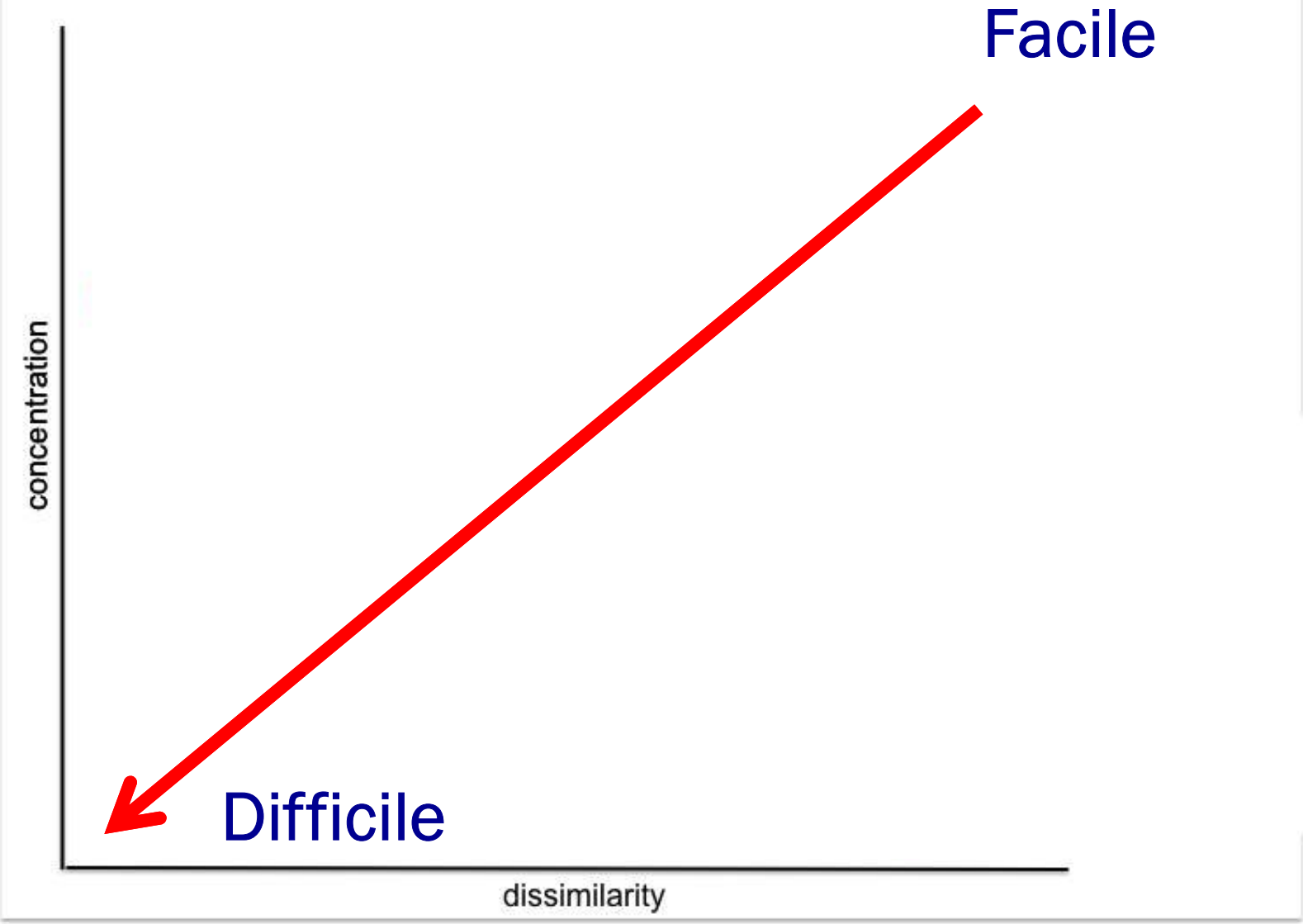
- Da xenobiotici a basso peso molecolare…
- … attivi in concentrazioni relativamente elevate…
- … scarsamente biotrasformati (in metaboliti noti)…
- … assunti al momento della competizione…
- … escreti prevalentemente in urina…
- … riconoscibili mediante tecniche cromatografico-spettrometriche…
- … con ampia disponibilità di materiali di riferimento…

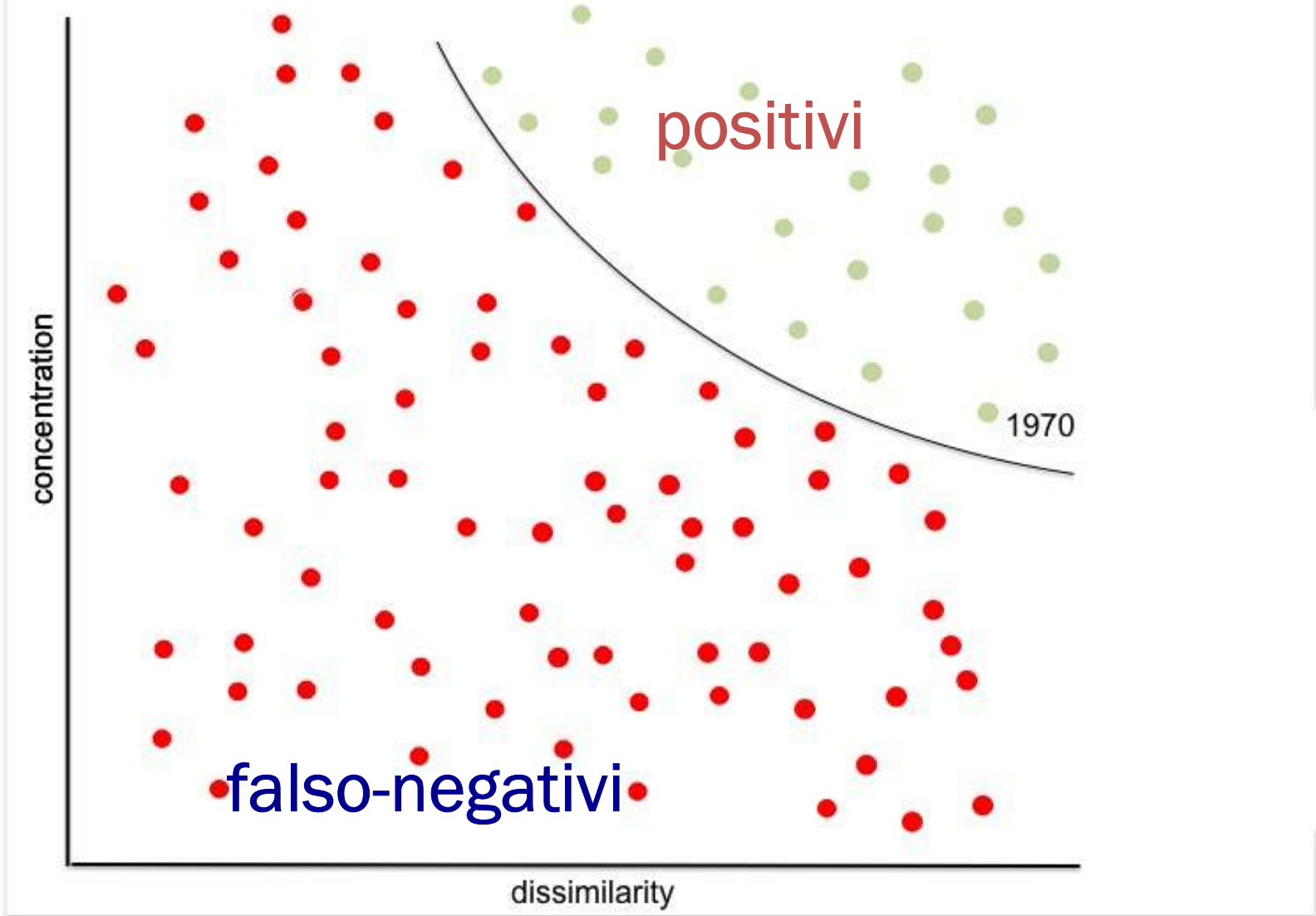
Evoluzione di tecniche e metodi antidoping

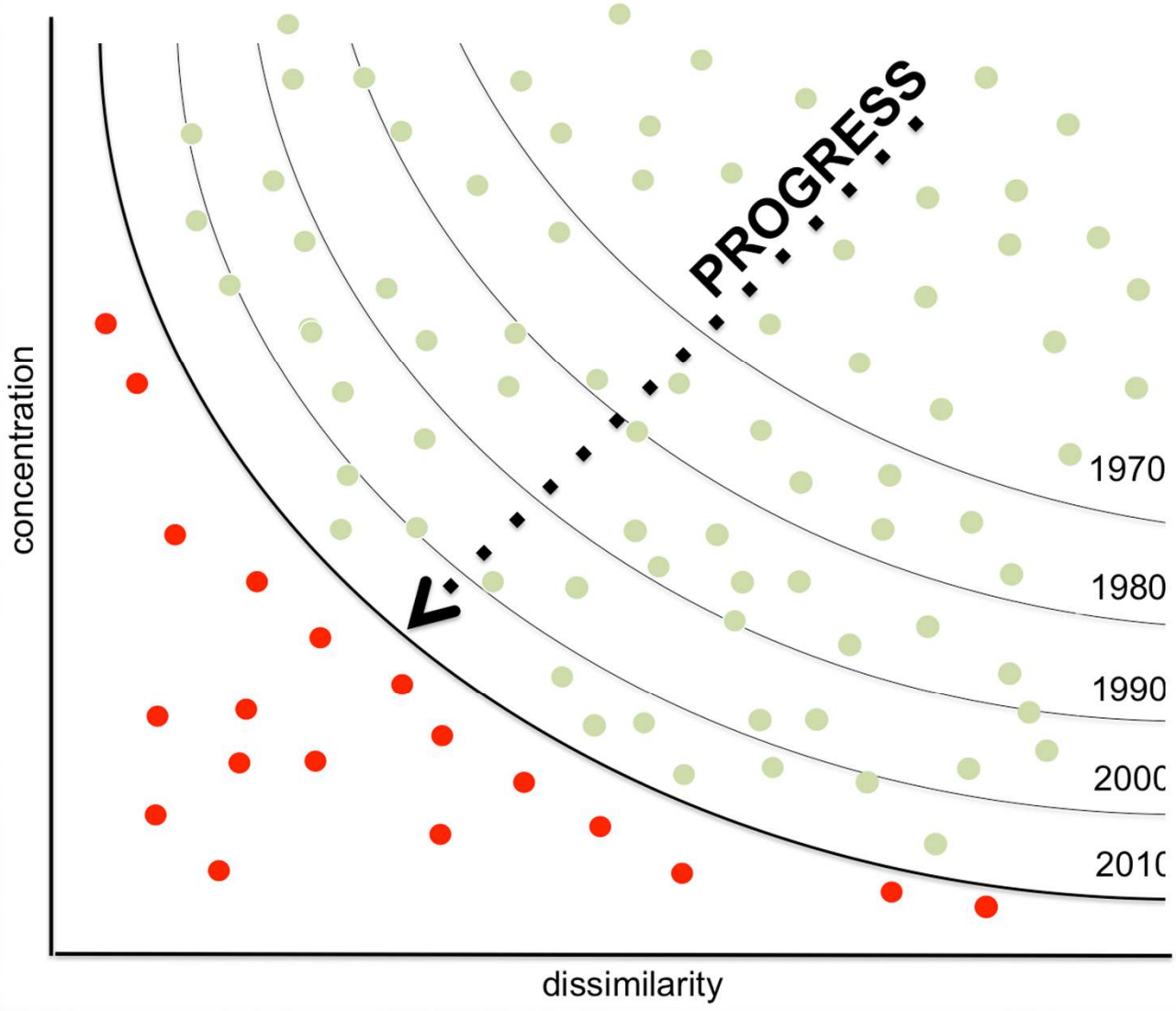
- A sostanze pseudoendogene…
- … virtualmente identiche a quelle fisiologicamente prodotte dall'organismo…
- … attive in concentrazioni ridotte…
- … caratterizzate da brevissima emivita…
- … assunte anche in periodi lontani dalla competizione…
- … escrete in quantità minime in urina…
- … difficilmente riconoscibili mediante tecniche cromatografico-spettrometriche…
- … prodotte anche clandestinamente (es. "designer steroids"), senza disponibilità di materiali di riferimento…
- … assunte spesso in associazione con altri principi attivi…

Verso la perfezione in antidoping

- “Vedo” la sostanza vietata (o il suo metabolita o marker di assunzione)
- La identifico e, se richiesto (nel caso di sostanze per le quali è fissata una soglia di positività), la determino quantitativamente
- Confermo che non è prodotta endogenamente
- La “facilità” di un’analisi è strettamente correlata alla concentrazione dell’analita e alla sua “dissimilarità” rispetto a costituenti endogeni, naturalmente presenti nella matrice prescelta


Facile
concentration
Difficile
dissimilarity


positivi
1970
concentration
dissimilarity
falso-negativi


concentration
dissimilarity
PROGRESS
1970
1980
1990
2000
2010

Il progresso scientifico e tecnologico rende possibile “tenere il passo” con la tendenza delle nuove strategie “doping” ad avvicinarsi sempre più all’origine del diagramma

Laboratorio Antidoping
Federazione Medico Sportiva Italiana (FMSI) Roma
accreditato WADA (World Anti Doping Agency) e
ISO17025

Progettazione, Sviluppo e Validazione di procedure analitiche complete

efficaci per il rilevamento del ricorso a sostanze e metodi proibiti

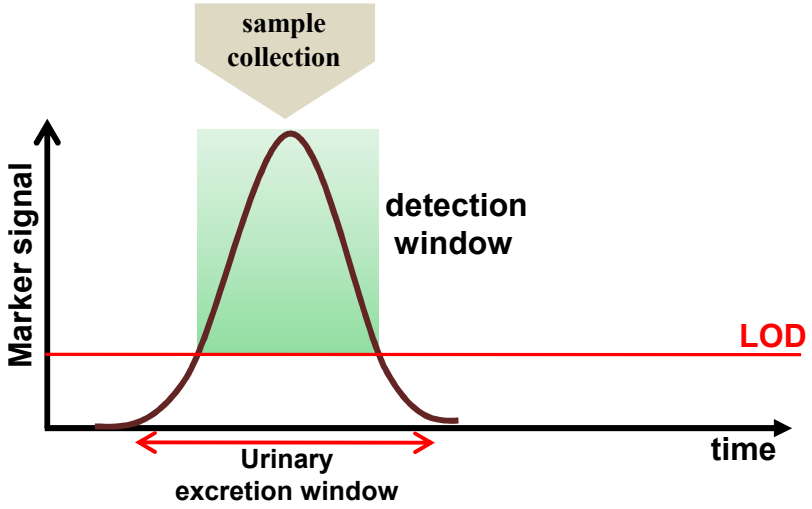
Mediante l'analisi di campioni biologici (urine e/o sangue)

Principio attivo

Selezione di
marker analitici
Rappresentativi del ricorso ad agenti vietati

Uno o più metaboliti

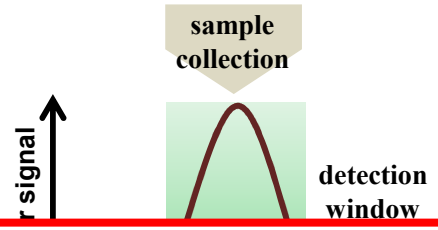
- **Sempre riscontrabili** nella matrice prescelta in seguito al loro utilizzo
- **Altamente selettivi** (=riconducibili solo a specifiche sostanze vietate)
- Presenti in **concentrazioni sufficientemente elevate**
- Presenti per **intervalli di tempo sufficientemente lunghi**
- **Non mascherati** da altri costituenti della matrice biologica



FATTORI IN GRADO DI ALTERARE IL PROFILO METABOLICO

Fattori individuali

- Polimorfismi genetici
- Età, sesso, BMI, ….
- Stati fisiopatologici specifici



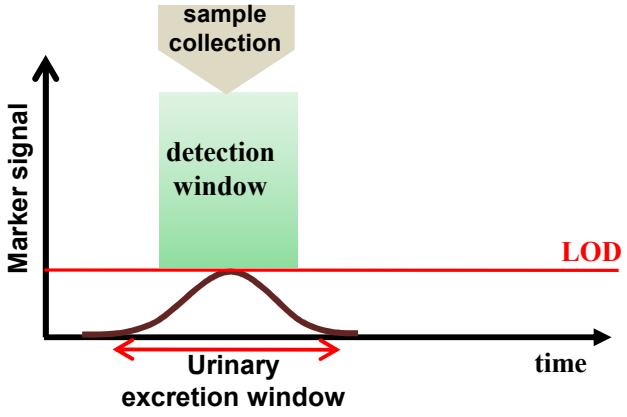
Fattori "ambientali"

- Interazioni farmaco-farmaco
  - •Inibizione metabolica
  - •Induzione metabolica

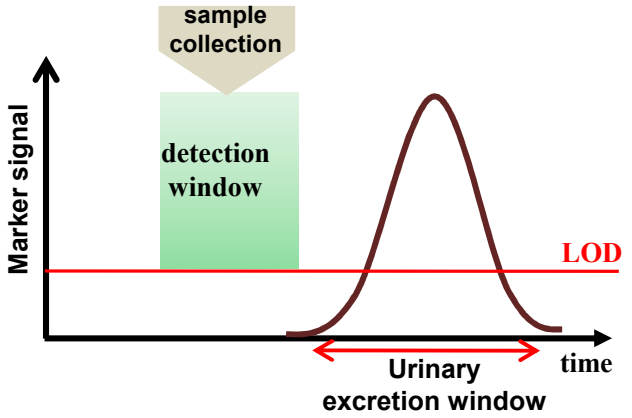
EFFETTO MASCHERANTE

AUMENTATO RISCHIO DI CASI "FALSO-NEGATIVI"

REDUCED MARKER CONCENTRATION

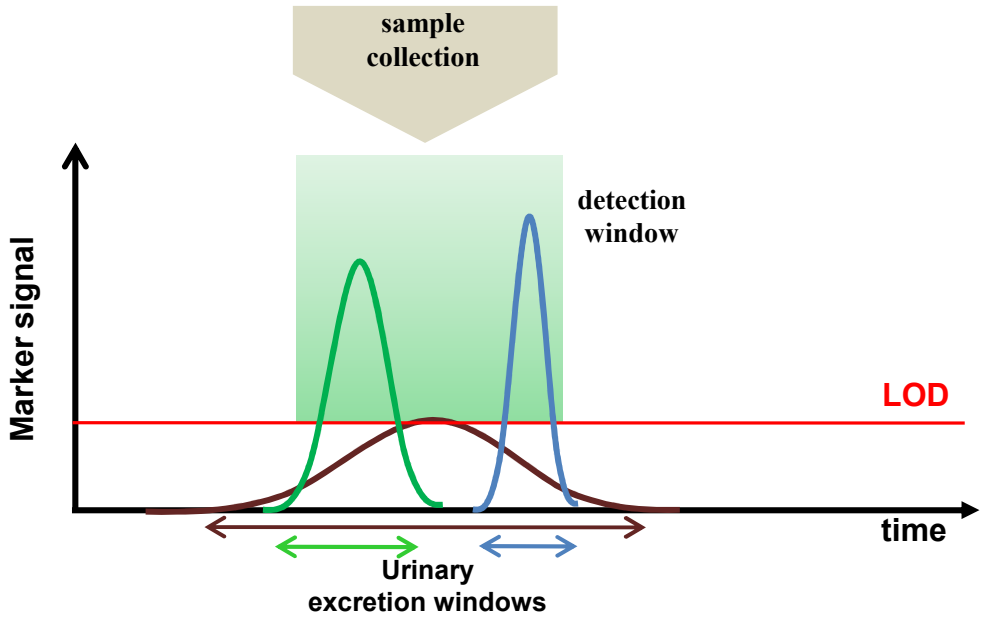


DELAYED MARKER EXCRETION



CONTROMISURE

- **Registrazione di un ventaglio il più ampio possibile di "marker bersaglio"** a livello delle analisi di screening
- Valutazione della **reale diffusione di sostanze con potenziali effetti "mascheranti"**, e loro controllo nel caso **di situazioni atipiche**



Sommario

- Situazione normativa
- La lista WADA e i laboratori accreditati
- Attuali metodi di indagine antidoping
- Dai marker di esposizione ai marker di effetto
- Considerazioni conclusive

Marker di esposizione e di effetto: l'esempio dell'ormone della crescita

Sostanza "pseudo-endogena": necessario discriminare l'origine endogena da quella biosintetica.

Metodo "diretto": differenziazione isoforme (22 KDa vs. 20 KDa)

Metodo "indiretto": determinazione livelli di due biomarker diagnostici (IGF-1 & P-III-P) che sono alterati oltre determinati livelli esclusivamente in seguito ad assunzione di hGH e/ di sostanze correlate

Marker di esposizione e di effetto: il passaporto biologico dell'atleta

Applicazione di protocolli analitici basati su dati longitudinali che consentono di definire intervalli di normalità individuali e non popolazionali

Attualmente sono già in uso due moduli del "Passaporto", quello ematologico e quello steroideo

L'ulteriore ampliamento del range di applicabilità del "Passaporto" potrebbe consentire una ulteriore riduzione dei risultati falso-negativi

APB tipologia di campione

Sangue

È una analisi «mirata»

Urina

Si fa su tutti i campioni

Passaporto Biologico dell'Atleta (ABP)

- Modulo ematologico
  - Metodo indiretto di rilievo di doping «ematico»
    - EPO, ABT,…
- Modulo Steroideo
- Modulo Endocrinologico

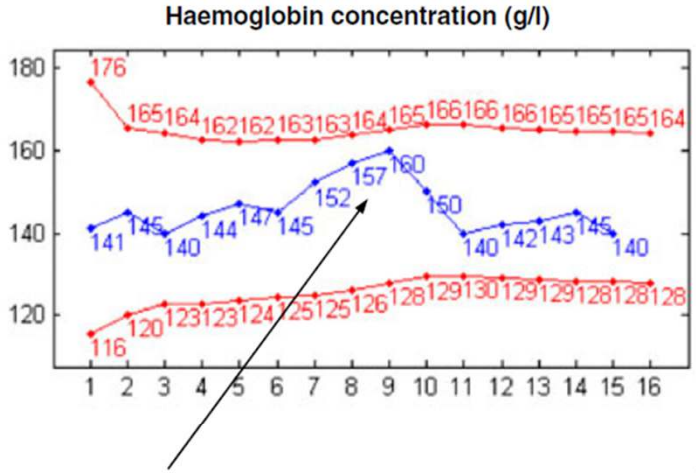
Parametri del modulo ematologico

The following *Markers* are considered within the *Athlete* Biological *Passport* haematological module:

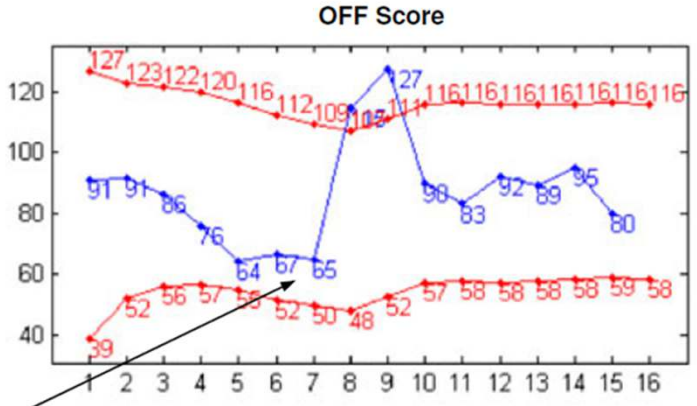
HCT:	Hematocrit
HGB:	Haemoglobin
RBC:	Red blood cells count
RET%:	The percentage of reticulocyte
RET#:	Reticulocytes count
MCV:	Mean corpuscular volume
MCH:	Mean corpuscular haemoglobin
MCHC:	Mean corpuscular haemoglobin concentration

Further calculated *Markers* specific to the haematological module include OFF-hr Score (OFFS), which is a combination of HGB and RET%[1], and Abnormal Blood Profile Score (ABPS), which is a combination of HCT, HGB, RBC, RET%, MCV, MCH, and MCHC[2].

Modulo ematologico

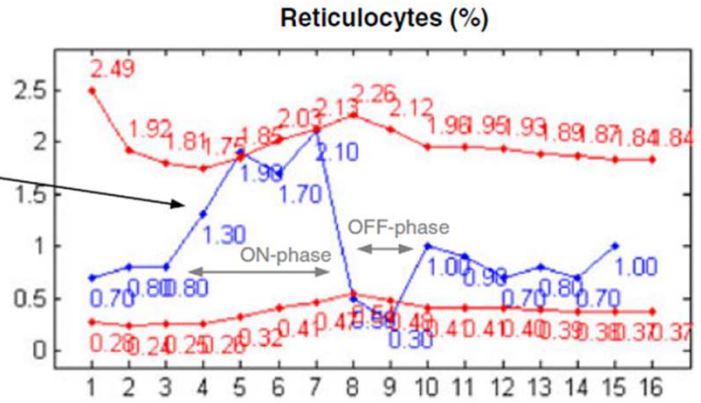


Continuous, slight increase in Haemoglobin concentration



The OFF score amplifies the changes observed in Haemoglobin and Reticulocytes.

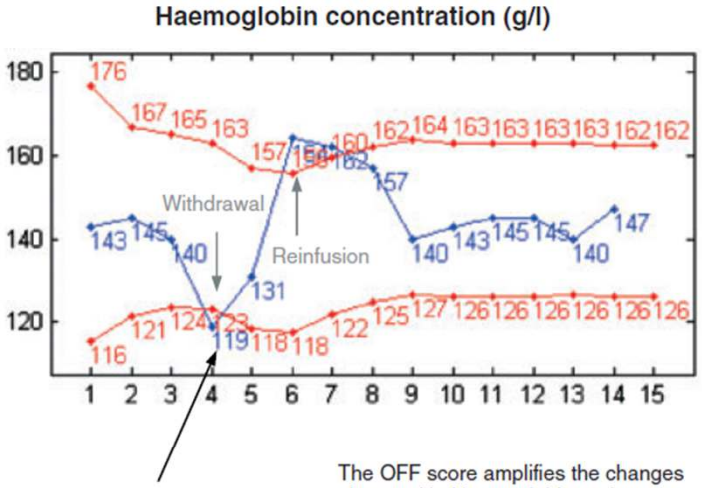
Abnormal increase in Reticulocytes (samples 3-7, „ON phase“) followed by marked drop when EPO is withdrawn and Erythropoiesis is suppressed (samples 8+9, „OFF phase“).



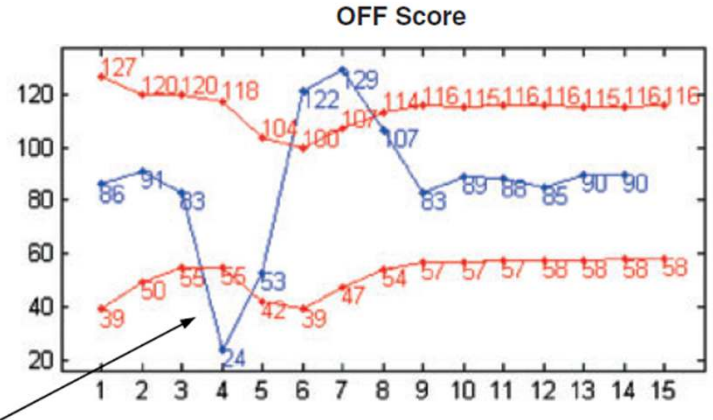
Biological passport: EPO/ ESA abuse

The samples 2-10 were taken on a regular base over a period of ~8 weeks.

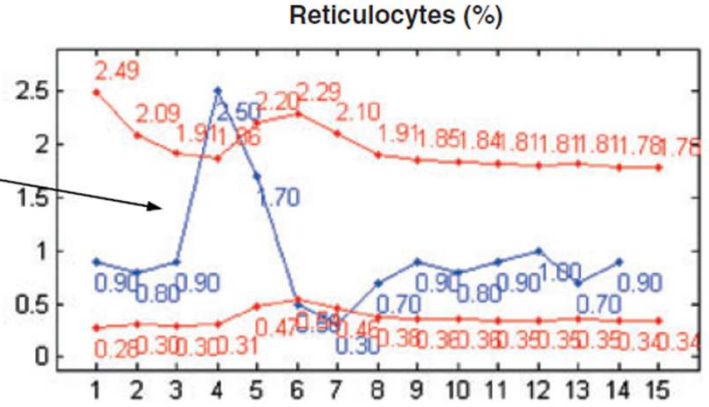
Modulo ematologico



Large variation in Haemoglobin concentration after blood withdrawal and reinfusion.



The OFF score amplifies the changes observed in Haemoglobin and Reticulocytes.



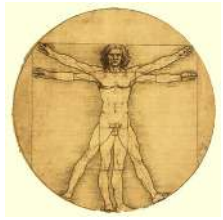
High Reticulocytes paired with low Haemoglobin concentration suggesting hyperproliferative condition after blood withdrawal (samples 4+5).
Low Reticulocytes with high Hb indicating supressed erythropoiesis after reinfusion of blood (samples 6+7).

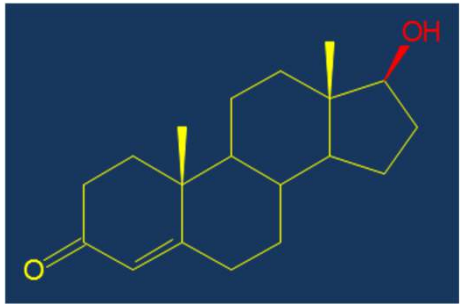
Biological passport: Blood Transfusion

The samples 2-10 were taken on a regular base over a period of ~8 weeks.

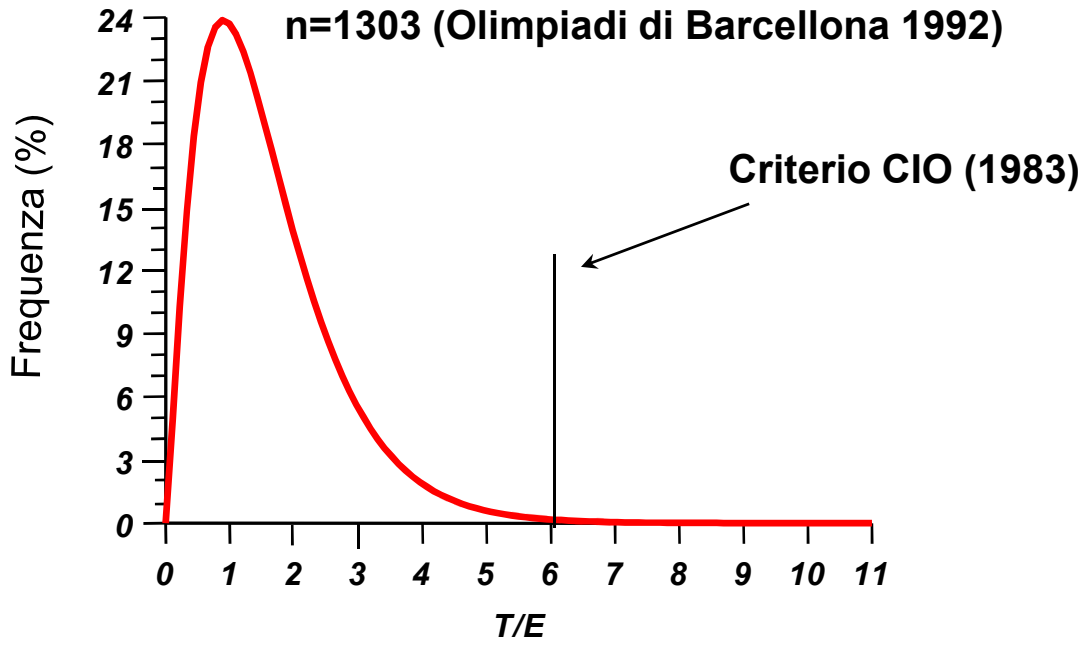
Come fare con un composto pseudo-endogeno?

Ormoni steroidei





Rilievo del consumo di testosterone in urina
Riferimenti popolazionali



Valori di riferimento individuali

CV (%) < 30

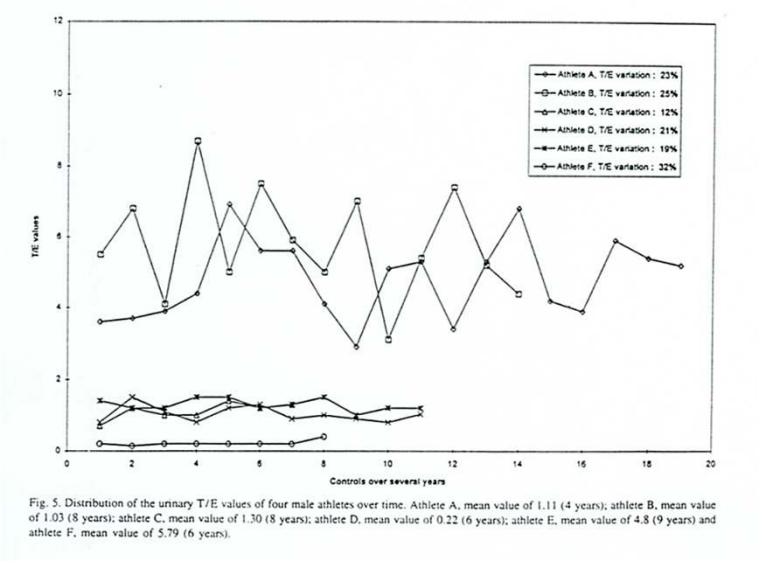


Fig. 5. Distribution of the urinary T/E values of four male athletes over time. Athlete A, mean value of 1.11 (4 years); athlete B, mean value of 1.03 (8 years); athlete C, mean value of 1.30 (8 years); athlete D, mean value of 0.22 (6 years); athlete E, mean value of 4.8 (9 years) and athlete F, mean value of 5.79 (6 years).

Ayotte C. et al. *J of Chromatogr. B*, 687 (1996) 3-25

CV (%) > 30

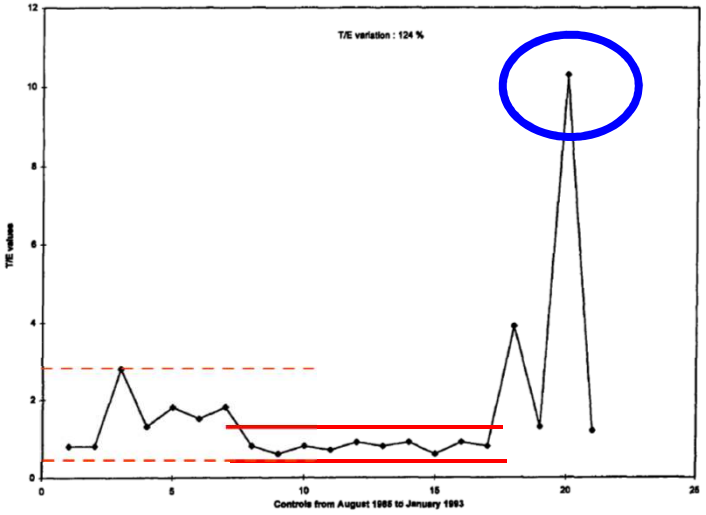


Fig. 7. Distribution of the urinary T/E values of one male athlete over 8 years. Test 20 afforded a positive T/E result of 10.3.

Variabilità accettabile:
- **30% maschi**
- **60 % femmine**

WORLD ANTI-DOPING AGENCY
play true

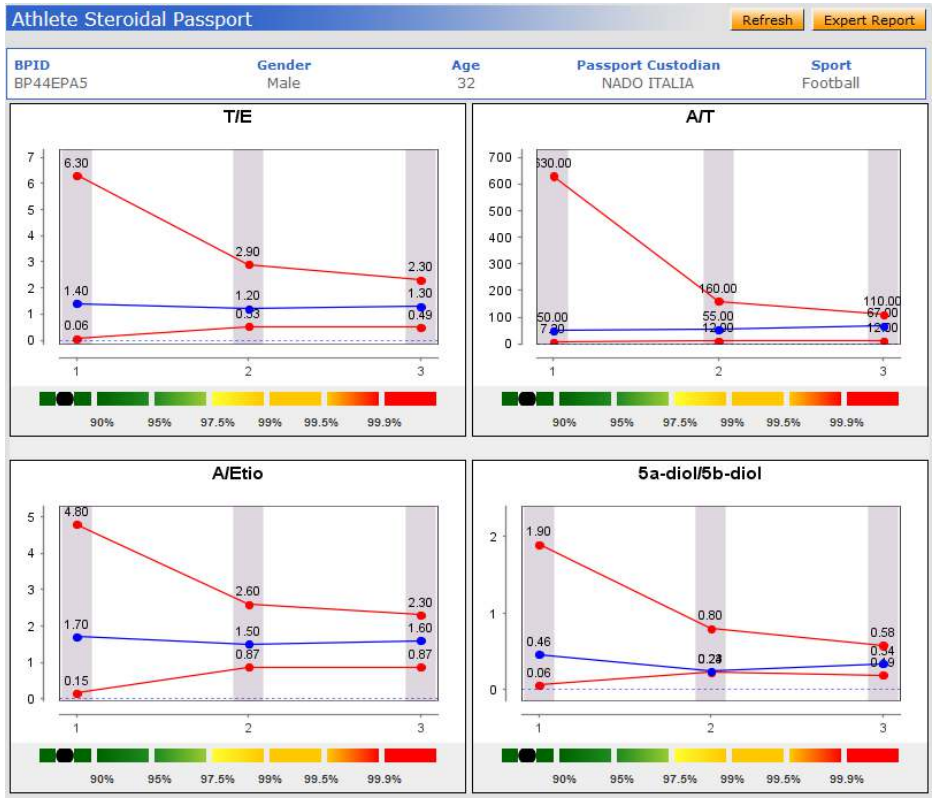
ISTI, ISL

Athlete Biological Passport Operating Guidelines

Version 6.0

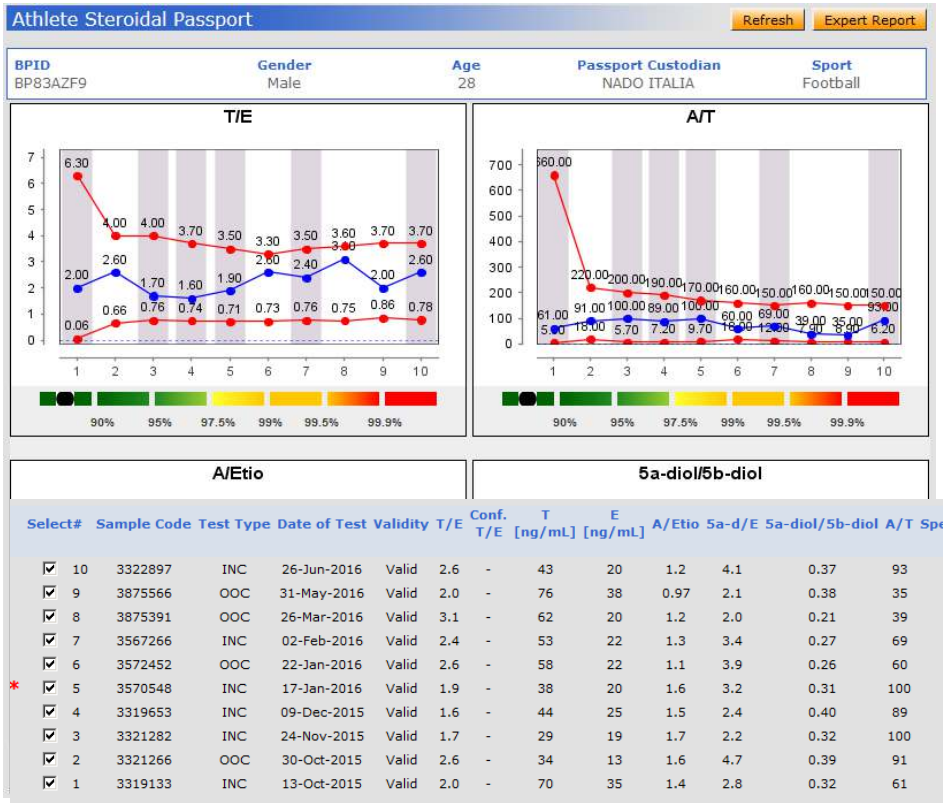
January 2017

Athlete Biological Passport – Steroid Module



UGTB2B17 *ins/ins – ins/del* individual

Athlete Biological Passport – Steroid Module



Select#	Sample Code	Test Type	Date of Test	Validity	T/E	Conf. T/E	T [ng/mL]	E [ng/mL]	A/Etio	5a-d/E	5a-diol/5b-diol	A/T	Specific Gravity	DCF TA	
10	3322897	INC	26-Jun-2016	Valid	2.6	-	43	20	1.2	4.1	0.37	93	1.016	UEFA	DCF LR
9	3875566	OOC	31-May-2016	Valid	2.0	-	76	38	0.97	2.1	0.38	35	1.025	NADOF	DCF LR
8	3875391	OOC	26-Mar-2016	Valid	3.1	-	62	20	1.2	2.0	0.21	39	1.024	NADOF	DCF LR
7	3567266	INC	02-Feb-2016	Valid	2.4	-	53	22	1.3	3.4	0.27	69	1.020	NADO ITALIA	DCF LR
6	3572452	OOC	22-Jan-2016	Valid	2.6	-	58	22	1.1	3.9	0.26	60	1.030	NADO ITALIA	DCF LR
* 5	3570548	INC	17-Jan-2016	Valid	1.9	-	38	20	1.6	3.2	0.31	100	1.016	NADO ITALIA	DCF LR
4	3319653	INC	09-Dec-2015	Valid	1.6	-	44	25	1.5	2.4	0.40	89	1.013	UEFA	DCF LR
3	3321282	INC	24-Nov-2015	Valid	1.7	-	29	19	1.7	2.2	0.32	100	1.015	UEFA	DCF LR
2	3321266	OOC	30-Oct-2015	Valid	2.6	-	34	13	1.6	4.7	0.39	91	1.031	UEFA	DCF LR
1	3319133	INC	13-Oct-2015	Valid	2.0	-	70	35	1.4	2.8	0.32	61	1.023	UEFA	DCF LR

UGTB2B17 *ins/ins* - ins/del individual

Paris

Ghent

Rome

Lausanne

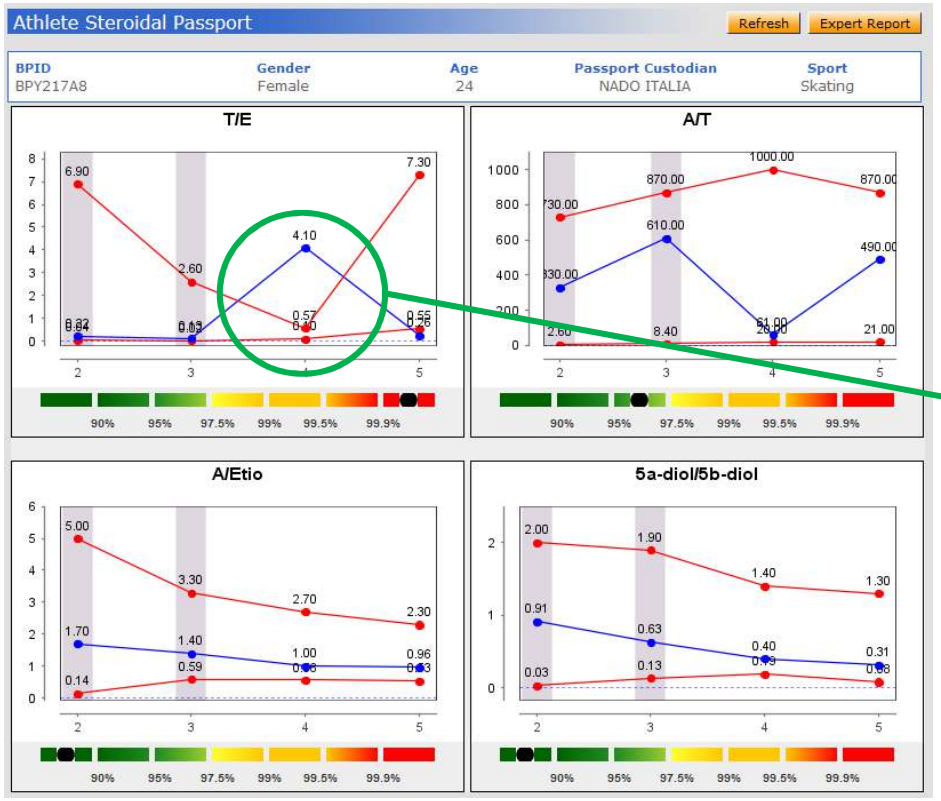
Barcelona

Seibersdorf

Ghent

Harmonization among WADA Laboratories

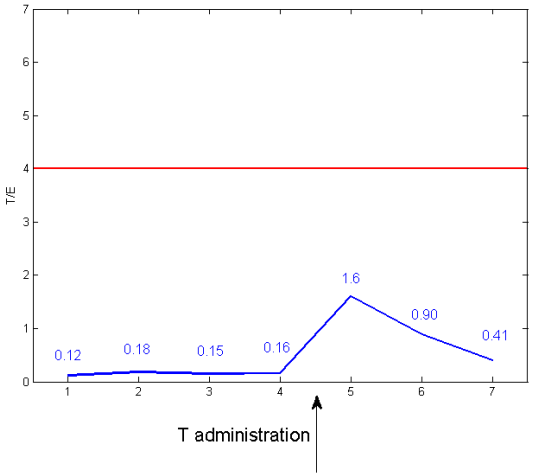
Athlete Biological Passport – Steroid Module

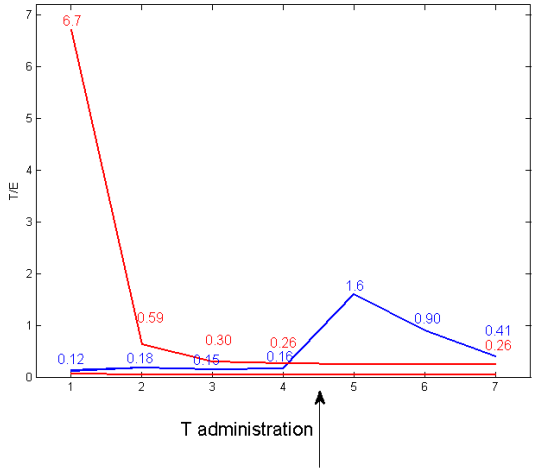


UGTB2B17 *del/del* individual

- Steroid Profile confirmation
- Isotope Ratio MS confirmation
- Request of additional sample(s)
- Storage of sample(s)
- Experts opinion request

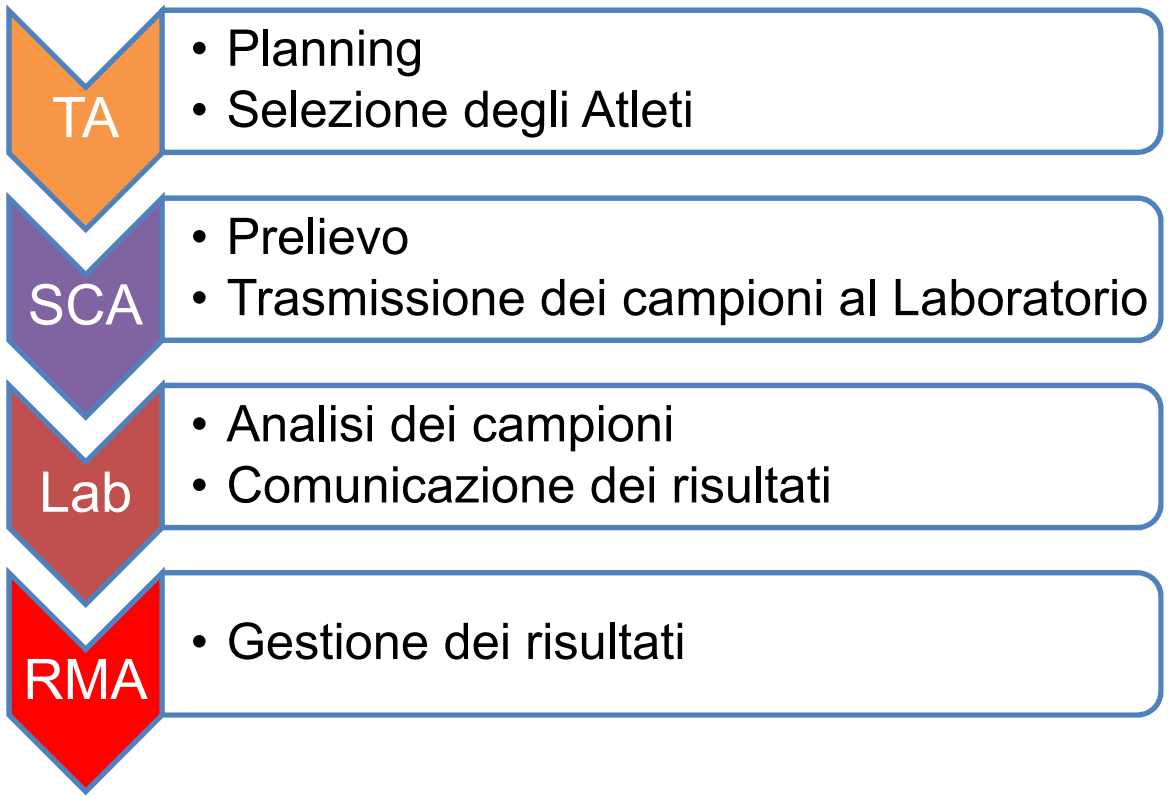
Athlete Biological Passport – Steroid Module





Caso non rilevabile senza ABP!!!

Fasi dei Controlli Antidoping



Sommario

- Situazione normativa
- La lista WADA e i laboratori accreditati
- Attuali metodi di indagine antidoping
- Dai marker di esposizione ai marker di effetto
- Considerazioni conclusive

Considerazioni conclusive

- Il controllo antidoping nasce, cresce e si sviluppa come "controllo antifrode"
- Per principio, è focalizzato sul campione biologico e non sull'atleta che lo ha prodotto (nessuna informazione "anamnestica" disponibile)
- Il progressivo "miglioramento" delle strategie doping ha imposto l'esplorazione di strategie antidoping di tipo indiretto, basate anche sulla definizione di range di normalità individuali e non popolazionali
- Chimica forense e chimica clinica sono in progressivo avvicinamento