

Urbino, 19.05.2007

A che punto è la lotta al doping in Italia

Monica Mazzarino, Francesco Botrè

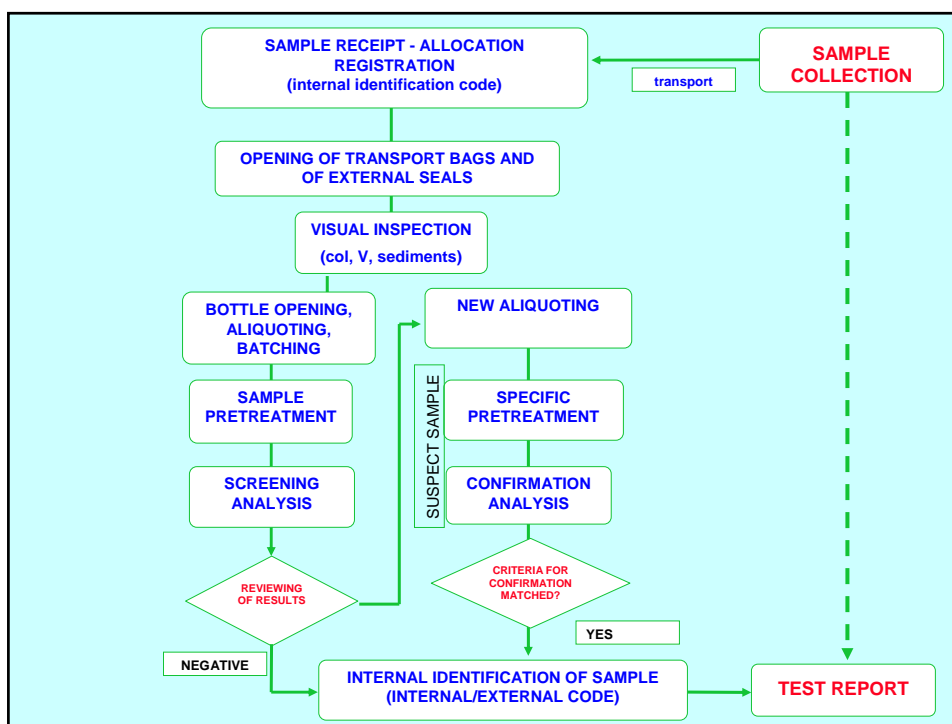
Laboratorio Antidoping, FMSI, Roma

Fasi in cui si articola l'attuale sistema dei controlli antidoping

- Selezione degli atleti
- Operazioni di prelievo
- Trasporto dei campioni
- Accettazione campioni
- Procedure preanalitiche e analitiche (sul campione "A")
- Stesura del "rapporto di prova" e trasmissione dei risultati
- Comunicazione del dato di non negatività ed eventuale controanalisi (sul campione "B")

Fasi in cui si articola l'attuale sistema dei controlli antidoping

- Selezione degli atleti
- Operazioni di prelievo
- Trasporto dei campioni
- **Accettazione campioni**
- **Procedure preanalitiche e analitiche (sul campione "A")**
- **Stesura del "rapporto di prova" e trasmissione dei risultati**
- **Comunicazione del dato di non negatività ed eventuale controanalisi (sul campione "B")**





La base dell'antidoping: la *lista*

L'attività antidoping, soprattutto quella del laboratorio, è a tutt'oggi costruita sulla *lista*

Tutte le classi di sostanze e metodi vietati sono indicate nella *lista*, che viene periodicamente aggiornata

Sostanze/metaboliti da ricercare minimo richiesto per superare i test di riaccreditamento

92 nel 2002

106 nel 2003

150 nel 2004

165 nel 2005-2006

205 nel 2007

Quali sono le sostanze e i metodi che non possono essere utilizzati?

- **Sostanze proibite *sempre***
- **Metodi proibiti *sempre***
- **Sostanze proibite solo in particolari casi**
 - in competizione (es. stimolanti, narcotici)
 - in alcuni sport/discipline (es. beta bloccanti)
 - solo per i maschi (es. beta-hCG)
 - se la concentrazione urinaria supera un valore-soglia (es. efedrine, salbutamolo, testosterone)
 - se somministrate per via sistemica (es. glucocorticoidi)
- **Tutte il resto è, fino a prova contraria, consentito**

La lista e la legge italiana

(L. 376/2000, “Legge antidoping”, 15.12.2000)

“I farmaci (...) sono ripartiti in classi (...) approvate con decreto del Ministero della Sanità, d’intesa con il Ministero per i Beni e le Attività Culturali, su proposta della Commissione. (...)”

CLASSI DI SOSTANZE VIETATE

- S1. Agenti anabolizzanti
- S2. Ormoni e sostanze correlate
- S3. Beta 2 agonisti
- S4. Agenti con attività anti-estrogenica
- S5. Diuretici e Agenti mascheranti
- S6. Stimolanti *(solo in competizione)*
- S7. Narcotici *(solo in competizione)*
- S8. Cannabinoidi *(solo in competizione)*
- S9. Corticosteroidi *(solo in competizione)*
- P1. Alcool *(solo alcuni sports)*
- P2. Beta bloccanti *(solo alcuni sports)*

S6. STIMULANTS

All stimulants (including both their (D- & L-) optical isomers where relevant) are prohibited, except imidazole derivatives for topical use and those stimulants included in the 2007 Monitoring Program*.

Stimulants include:

Adrafinil, adrenaline^{}, amfepramone, amiphenazole, amphetamine, amphetaminil, benzphetamine, benzylpiperazine, bromantan, cathine^{***}, clobenzorex, cocaine, cropropamide, crotetamide, cyclazodone, dimethylamphetamine, ephedrine^{****}, etamivan, etilamphetamine, etilefrine, famprofazone, fenbutrazate, fencamfamin, fencamine, fenetylline, fenfluramine, fenproporex, furfenorex, heptaminol, isometheptene, levmethamfetamine, meclofenoxate, mefenorex, mephentermine, mesocarb, methamphetamine (D-), methylenedioxyamphetamine, methylenedioxymethamphetamine, p-methylamphetamine, methylephedrine^{****}, methylphenidate, modafinil, nikethamide, norfenefrine, norfenfluramine, octopamine, ortetamine, oxilofrine, parahydroxyamphetamine, pemoline, pentetrazol, phendimetrazine, phenmetrazine, phenpromethamine, phentermine, 4-phenylpiracetam (carphedon), prolintane, propylhexedrine, selegiline, sibutramine, strychnine, tuaminoheptane and other substances with a similar chemical structure or similar biological effect(s).**

S6. STIMULANTS

All stimulants (including both their (D- & L-) optical isomers where relevant) are prohibited, except imidazole derivatives for topical use and those stimulants included in the 2007 Monitoring Program*.

Stimulants include:

Adrafinil, adrenaline**, amfepramone, amiphenazole, amphetamine, amphetaminil, benzphetamine, benzylpiperazine, bromantan, cathine***, clobenzorex, cocaine, cropropamide, crotetamide, cyclazodone, dimethylamphetamine, ephedrine****, etamivan, etilamphetamine, etilefrine, famprofazone, fenbutrazate, fencamfamin, fencamine, fenetylline, fenfluramine, fenproporex, furfenorex, heptaminol, isometheptene, levmethamphetamine, meclofenoxate, mefenorex, mephentermine, mesocarb, methamphetamine (D-), methylenedioxyamphetamine, methylenedioxymethamphetamine, p-methylamphetamine, methylephedrine****, methylphenidate, modafinil, nikethamide, norfenefrine, norfenfluramine, octopamine, ortetamine, oxilofrine, parahydroxyamphetamine, pemoline, pentetrazol, phendimetrazine, phenmetrazine, phenpromethamine, phentermine, 4-phenylpiracetam (carphedon), prolintane, propylhexedrine, selegiline, sibutramine, strychnine, tuaminoheptane and other substances with a similar chemical structure or similar biological effect(s).

**The most controversial
definition of antidoping codes**

“(...) and related substances”

Metodi vietati in e fuori competizione

AUMENTO DI TRASPORTO DI OSSIGENO

- ✓ Doping ematico: uso di sangue autologo, omologo o eterologo o prodotti contenenti globuli rossi di qualsiasi origine, al di fuori di un trattamento medico legittimo
- ✓ Uso di prodotti che aumentano l'assorbimento, il trasporto o il rilascio dell'ossigeno (es. eritropoietina), prodotti contenenti emoglobina sintetica, compresi, ma non limitati alle emoglobine basate sui sostituti del sangue, prodotti di emoglobina microincapsulata, perfluorochimici e efaproxiral (RSR13)

MANIPOLAZIONE FARMACOLOGICA, CHIMICA E FISICA

Consiste nell'uso di sostanze e metodi che possano alterare l'integrità e la conformità dei campioni raccolti nei controlli antidoping (infusioni intravenose, cateterismo e sostituzione delle urine)

DOPING GENETICO

E' l'uso non terapeutico dei geni, elementi genetici e/o cellule, che hanno la capacità di migliorare la prestazione sportiva

Dall'urina al sangue

- **Prime proposte: 1988**
- **La lunga "incubazione" è dovuta a problemi di natura tecnica, medica, giuridica ed etica**
- **Test sulla salute o test antidoping?**
- **Test "combinati" (o "incrociati") o test indipendenti?**
- **Test centralizzati (WADA) o test "federali"?**
- **Situazione attuale: lo screening ematologico non è obbligatorio per il doping da EPO; il sangue è l'unica matrice utile per il rilevamento di alcune forme di doping**

Situazione attuale

HBOCs

Metodo robusto e attendibile, seppur ancora in via di standardizzazione
Materiali di riferimento disponibili

hGH

Metodo attendibile, ma non robusto
Reagenti e materiali di riferimento disponibili su scala ridotta

Blood Transfusions

Metodo attendibile, ma non robusto
Nessuna standardizzazione Interlaboratorio

Emoglobine sintetiche (HBCOs)

Le emoglobine sintetiche (HBOCs) sono state sviluppate come alternativa alle emotrasfusioni in modo da evitare gli svantaggi, costi e complicazioni derivanti da quest'ultima. Questi prodotti derivano o da emoglobina modificata geneticamente o da emoglobina umana o bovina estratta dai globuli rossi. Le molecole utilizzate:

Confronto trasfusioni-uso HBCOs

	Hemopure	Trasfusioni
Emoglobina g/L	120-140	100-150
Half-life	1 giorno	meno di un mese
Conservazione	temp. Amb.	refrigerata
Durata	1 anno	35-42 giorni
Preparazione	pronta per uso	deve essere testata
Compatibilità	universale	gruppo

Il sistema di accreditamento dei laboratori antidoping

Accreditamento ISO
dei laboratori di prova

Accreditamento WADA
dei laboratori Antidoping

Integrazione ed armonizzazione

ISO-WADA

Mantenimento dell'accredito WADA

- **Ottemperanza norme WADA e requisiti qualità**
- **Rapporti periodici (es. statistiche)**
- **Rispetto del codice etico**
- **Programma di "proficiency testing"**
- **Controlli interlaboratorio ("ring test")**
- **Campioni "civetta"**
- **Superamento test di controllo trimestrali**
- **Ottenimento e mantenimento accredito ISO**

Accreditamento ISO dei laboratori di prova

- Sistema di certificazione ed assicurazione della qualità, “mutualmente riconosciuto” a livello internazionale
- Riferito sia ai beni materiali (es. ISO 9001), sia ai servizi (laboratori: EN 45001→ISO 17025)
- Prevede il rispetto di norme generali (ISO) e specifiche (Manuale della Qualità, SOP, PG)
- Ente italiano di accreditamento: SINAL
- Obbligatorio dal 2000 per i laboratori CIO-WADA

The 34 ISO-WADA laboratories

- **Africa:** South Africa (*Bloemfontein*), Tunisia (*Tunis*)
- **Americas:** Brazil (*Rio de Janeiro*), Canada (*Montreal*), Colombia (*Bogota*), Cuba (*La Habana*), United States (*Los Angeles, Salt Lake City*)
- **Asia:** China (*Beijing*), S. Corea (*Seoul*), Japan (*Tokyo*), Malaysia (*Penang*), Thailand (*Bangkok*)
- **Europa:** Austria (*Seibersdorf*), Belgium (*Ghent*), Czech Republic (*Prague*), Finland (*Helsinki*), France (*Paris*), Germany (*Cologne, Kreischa*), Greece (*Athens*), Italy (*Rome*), Norway (*Oslo*), Poland (*Warsaw*), Portugal (*Lisbon*), Russian Federation (*Moscow*), Spain (*Barcelona, Madrid*), Sweden (*Stockholm*), Switzerland (*Lausanne*), Turkey (*Ankara*), United Kingdom (*Cambridge, London*)
- **Oceania:** Australia (*Sydney*)\

“Laboratori di analisi”

- **Chimica clinica (es. tossicologia d’urgenza):**
 - Finalità: test diagnostici
 - Matrice: quella più adatta
 - Certificato di analisi basato su:
 - Identificazione e quantificazione di markers specifici
 - Profili multiparametrici
 - dubbio=positivo (ulteriori approfondimenti)
- **Tossicologia forense (es. analisi antidoping):**
 - Finalità: fornire una prova (“to supply evidence”)
 - Matrice: esclusivamente urina (in particolari casi sangue)
 - Rapporto di prova basato su:
 - Identificazione di specifiche sostanze (farmaci/metaboliti/markers di abuso)
 - dubbio=negativo (nessun ulteriore approfondimento)

Analisi antidoping: 3 stadi

- **Stadio pre-strumentale:** pretrattamento campioni e determinazioni preliminari (Vol, colore, sedimenti, pH, sg)
 - **Screening** (GC-NPD, GC-MS, HPLC, LC-MS, immunometodi...)
 - **Conferma** (GC-MS, GC-HRMS, GC-MS-MS, GC-HRMS-MS, GC-C-IRMS, LC-MS-MS...)
- + **EPO/NESP, altri ormoni peptidici**

Comlessità crescente
(↑↑ tempo e costo per campione)

Requisiti ideali di un metodo di screening

- Massimo spettro di sostanze rilevabili
- Nessun falso negativo
- Falsi positivi ridotti al minimo
- Analisi su piccoli volumi di campione (0.1-5 mL)
- Rapidità (pretrattamento+analisi+elaborazione dati)
- Economicità

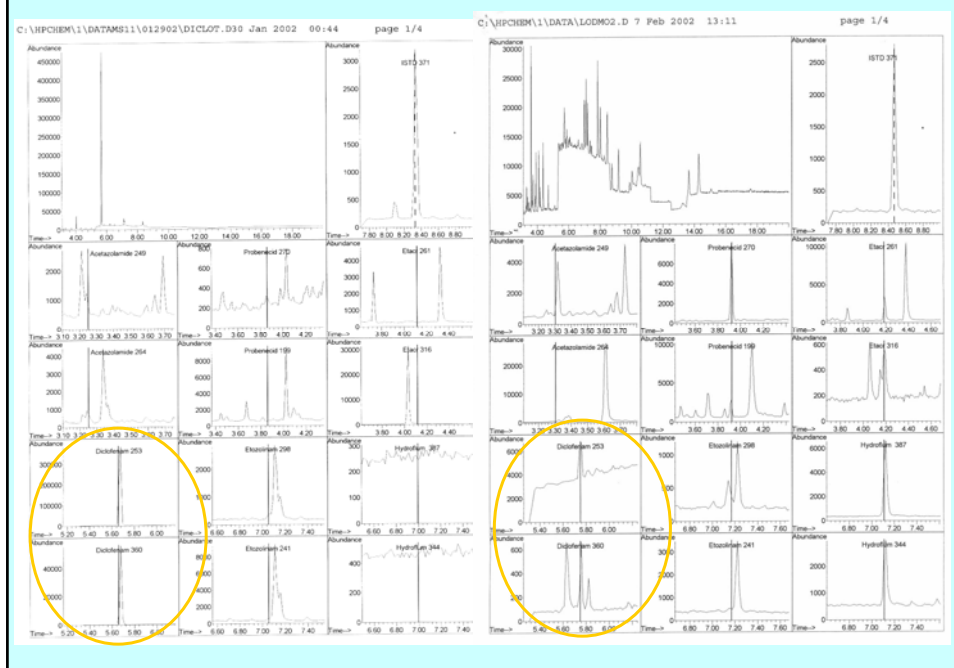
Requisiti ideali di un metodo di conferma

- Massima selettività e specificità
- Nessun falso positivo
- Minima percentuale di falsi negativi
- Analisi su piccoli volumi (1-10 mL)
- Massima solidità del dato sperimentale (preferibilmente di tipo spettrometrico, meglio se ottenuto per confronto con un campione positivo di riferimento certificato)

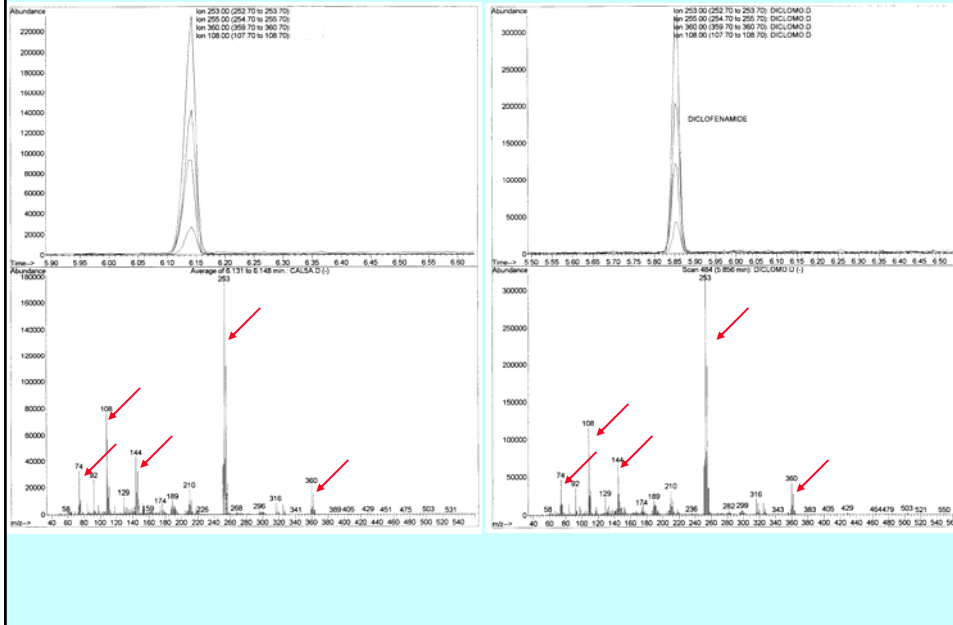
Il metodo ideale

Procedura completa (pretrattamento + screening + conferma) di riferimento (validata e riconosciuta a livello internazionale) mediante la quale sia possibile consentire, dall'analisi di un solo campione biologico, l'identificazione, in tempi ridotti e con costi contenuti, di farmaci e/o metaboliti e/o altri markers biochimici rappresentativi dell'assunzione di specifiche sostanze/classi di sostanze, la cui attendibilità sia sostenibile anche in sede di contraddittorio legale

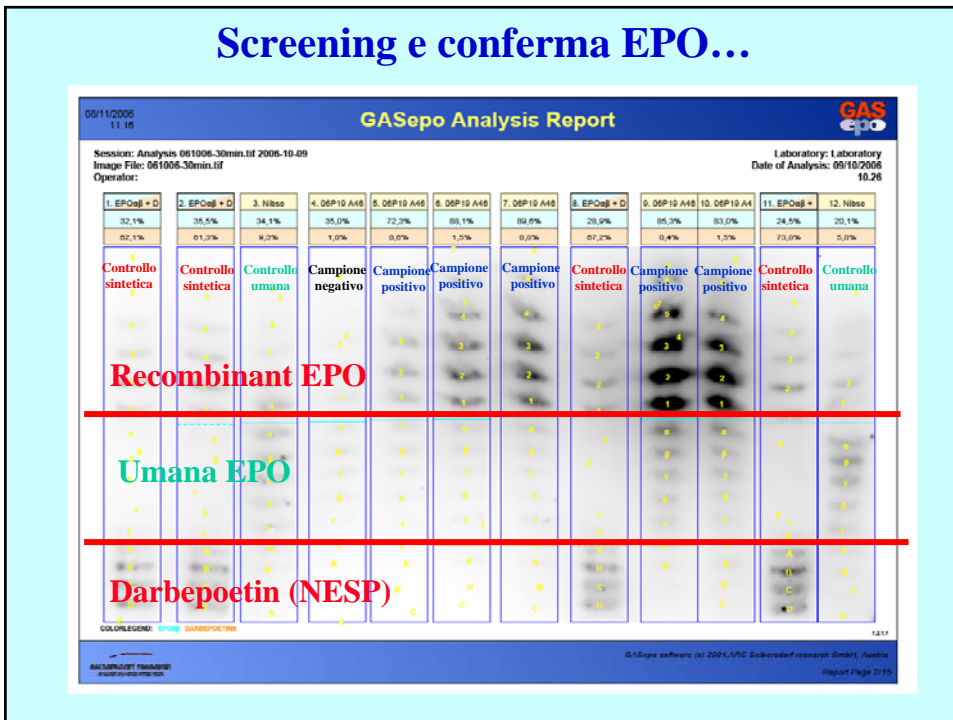
Screening analysis of a real sample (diclofenamide?)



Confirmation analysis (sample vs. positive reference urine)



Screening e conferma EPO...



Il nuovo antidoping: le sfide di oggi e di domani

Possibili tecniche e metodi doping “invisibili”

- “Doping designer drugs” (sostanze affini a quelle vietate)
- Somministrazione basata su specifici studi di escrezione/farmacocinetica applicata (es. caffeina < 4 h dal test)
- Doping da ormoni, loro frammenti e/o derivati (es. testosterone e precursori, EPO e NESP, hGH e IGFs) “identici” a quelli endogeni
- Terapia genica?

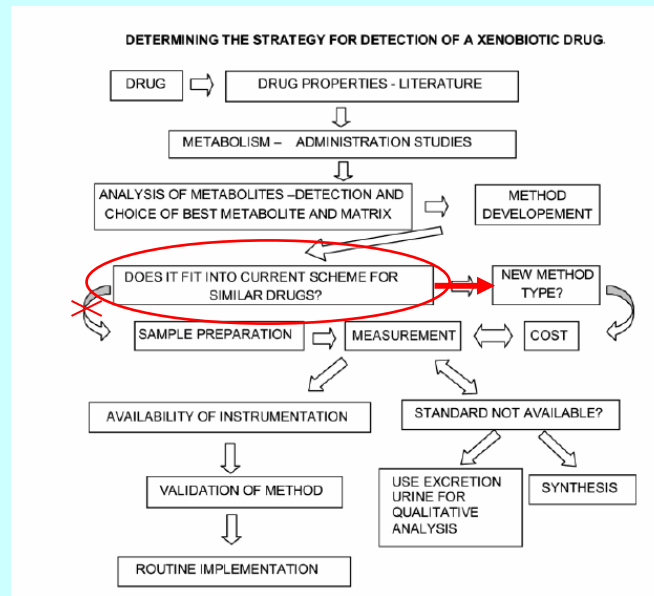
Possibili risposte dei laboratori antidoping

- Sviluppo di metodi di analisi basati sulle relazioni struttura-attività
- Impiego di matrici biologiche diverse dall’urina (sangue, capelli, saliva, aria espirata)
- Sviluppo e validazione di metodi specifici basati su tecnologie innovative (es. GC-HRMS-MS, LC-MS-MS, GC-C-IRMS, IEF/double blotting)
- Metodi di indagine propri della tossicologia “in vitro”, biopsie??

“Ridurre il divario”: il punto di vista del laboratorio

- **Ottimizzazione procedure di analisi (la lista cambia...)**
- **Massimizzare il rapporto costo/beneficio per i test di routine**
 - test più rapidi ed economici per agenti doping “tradizionali”, riducendo quelli inutili (es. anabolizzanti nel bridge, narcotici nel tennis tavolo);
 - test avanzati per i composti endogeni;
 - nuovi test specifici che facciano immediatamente fronte a nuovi farmaci e metodi doping
- **Rendere più snelle le procedure per l’approvazione di studi farmacocinetici controllati**
- **Favorire la circolazione fra i laboratori di materiali di riferimento certificati**

Ottimizzazione procedure di analisi (la lista cambia...)



Test più rapidi ed economici

The bienzymatic maltose electrode



“naked”



In a flow-thru cell

Test più rapidi ed economici

Applicazioni della cromatografia “FAST”

RAPID COMMUNICATIONS IN MASS SPECTROMETRY
Rapid Commun. Mass Spectrom. 2006, 20: 3465–3476
Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com) DOI: 10.1002/rcm.2729

RCM

A fast liquid chromatographic/mass spectrometric screening method for the simultaneous detection of synthetic glucocorticoids, some stimulants, anti-oestrogen drugs and synthetic anabolic steroids

Monica Mazzarino¹ and Francesco Botrè^{1,2*}

¹Laboratorio Antidoping, Federazione Medico Sportiva Italiana, Largo Giulio Onesti 1, 00197 Roma, Italy
²Dipartimento CGMIA, Università “La Sapienza”, Via del Castro Laurentino 9, 00161 Roma, Italy

Received 13 July 2006; Revised 30 August 2006; Accepted 6 September 2006

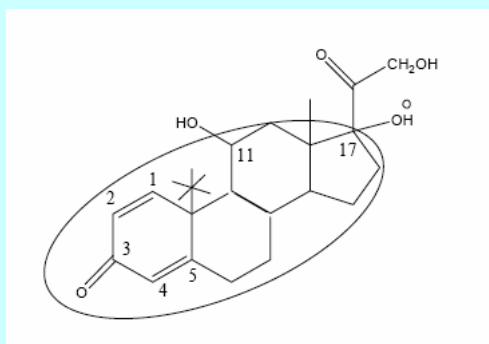
A fast liquid chromatographic/mass spectrometric (LC/MS/MS) screening method for the detection, in urine, of synthetic glucocorticoids, stimulants (formoterol, modafinil and mesocarb), anti-oestrogens (finasteride, exemestane, anastrozole, letrozole and formestane) and synthetic anabolic steroids (stanozolol, gestrinone and tetrahydrogestrinone) is described. All these drugs (and/or their urinary metabolites) can be simultaneously extracted by a single liquid/liquid extraction step, at alkaline pH, after enzymatic hydrolysis with β -glucuronidase, and assayed in 7 min by LC/MS/MS using electrospray ionization in positive ion mode and multiple reaction monitoring as the acquisition mode. All compounds show good reproducibility of both the retention times (CV% <2%) and the relative abundances (CV% <10%). The limits of detection for the anti-oestrogens, glucocorticoids and steroids are in the range of 1–30 ng/mL, and for the stimulants are in the range of 100–200 ng/mL, thus satisfying the minimum required performance limits of the World Anti-Doping Agency. Copyright © 2006 John Wiley & Sons, Ltd.

Nuovi test specifici che fanno immediatamente fronte a nuovi farmaci e metodi doping

Il problema dei “designer steroids” (e più in generale delle sostanze “affini”)

- Progettati e sintetizzati clandestinamente (es. caso BALCO)
- Di struttura e caratteristiche farmacodinamiche e farmacocinetiche non note alla farmacologia ufficiale (es. THG, DMT o “madol”)
- “Invisibili” ai controlli antidoping “tradizionali” (che prevedono la disponibilità di materiali di riferimento quale prerequisito per lo sviluppo di un metodo di analisi)
- Strategia analitica proposta: identificazione “precoce” di sostanze incognite, basata sul riconoscimento, mediante GC/MS-MS e/o LC/MS-MS, di porzioni caratteristiche della struttura molecolare comune a tutte le sostanze appartenenti alla medesima classe farmacologica
- Un approccio di questo tipo è già stato adottato con successo per la ricerca di sostanze appartenenti alle classi farmacologiche dei beta bloccanti (Roma), dei glucocorticoidi (Roma) e dei modulatori selettivi del recettore per gli androgeni (Colonia).

Struttura attiva: l'esempio dei glucocorticoidi



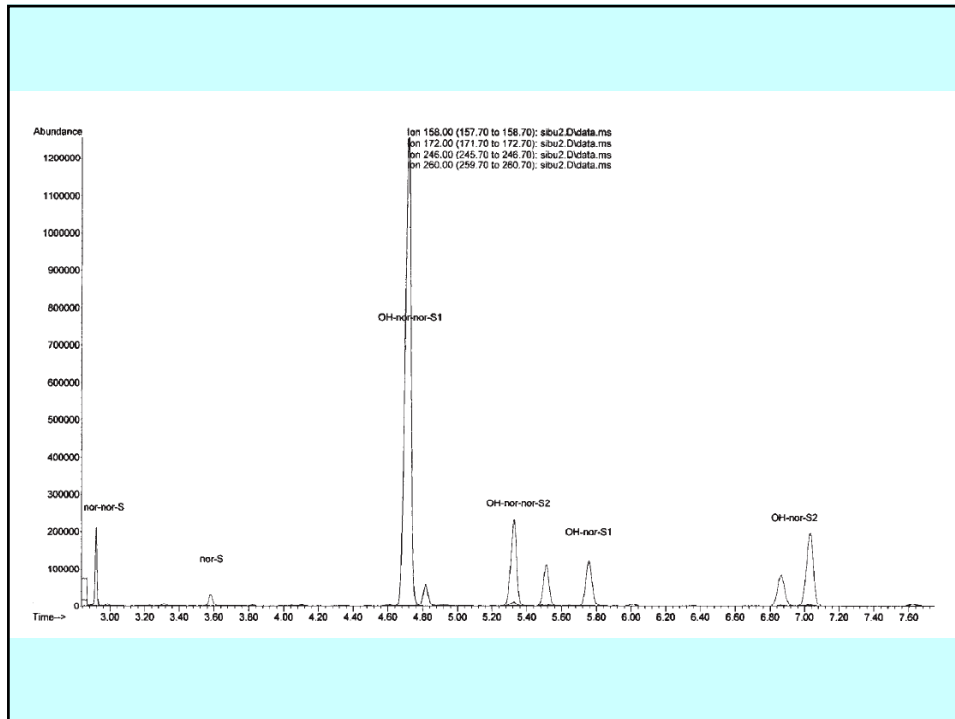
Rendere più snelle le procedure per l'approvazione di studi farmacocinetici controllati

Sibutramina

- Farmaco relativamente giovane, utilizzato per il trattamento dell'obesità
- Il meccanismo di azione si esplica a livello del re-uptake della serotonina e della noradrenalina
- Dati di letteratura dimostrano che la sibutramina viene biotrasformata in almeno 6 metaboliti

Problema: cosa ricercare in urina?

- La sibutramina?
- Uno o più metaboliti?
- Se sì, quali?



Impiego di materiali biologici alternativi (sangue, aria espirata, capello, saliva, sudore)

Possibilità di:

- Interpretare i dati analitici su basi farmacocinetiche
- Ottenere informazioni su una finestra temporale molto più estesa
- Rilevare sostanze “invisibili” in urina
- Ampliare il novero dei parametri “complementari”
- Ridurre l’efficacia di sostanze e metodi mascheranti

Favorire la circolazione fra i laboratori di materiali di riferimento certificati

WAADS

- World Association of Anti-Doping Scientists
- Formed in 2001
- All IOC accredited laboratories represented



Alcune conclusioni

- Il doping non è solo un problema di lealtà (e di frode) sportiva, ma rappresenta anche una minaccia per la salute dell'atleta
- I test antidoping tradizionali fanno già molto (“coprendo” il 96% delle sostanze vietate) e continueranno ad essere effettuati, ma non più come unico strumento di lotta al doping
- È necessario considerare la “lista” come uno strumento di attuazione pratica dell'attività di controllo, e non come “l'albero del bene e del male” dello sportivo
- Gli aspetti tossicologici della questione, ivi compresa la valutazione del rischio, dovranno diventare componenti fondamentali delle strategie antidoping
- L'obiettivo finale, sia per le sostanze identificabili sia per quelle non identificabili, dovrà essere la ricerca di “marker di effetto” e non solo di “marker di esposizione”

Grazie per l'attenzione

