

WORLDWIDE

**Quali sono i metodi utilizzati
nei laboratori di ricerca?**

Laboratori accreditati

Ogni laboratorio accreditato WADA deve essere in grado di eseguire le analisi con tecniche di analoga sensibilità per indicare con un elevato grado di sicurezza quali atleti trasgrediscono le regole dopandosi

VERIFICA SOSTANZE VIETATE

Per verificare la presenza di sostanze vietate sono applicabili due differenti metodi di analisi

**METODO DELLO SCREENING (o iniziale)
LABORATORIO DI 1° LIVELLO**

**METODO DELL' IDENTIFICAZIONE (o
della verifica)
LABORATORIO DI 2° LIVELLO**

METODO DELLO SCREENING (o iniziale)

E' un metodo per ottenere un primo quadro di insieme con il quale si cerca di rilevare, con efficienza e su un numero molto elevato di campioni biologici (urine), l'eventuale presenza di numerose sostanze proibite.

Analisi rapide, sensibili e a prezzi contenuti

METODO DELL' IDENTIFICAZIONE (o della verifica)

E' un metodo che si effettua solo sui campioni che risultano **POSITIVI al metodo dello screening e permette di identificare una sostanza proibita con assoluta certezza
Analisi atte a fornire prove inequivocabili della presenza di una data sostanza dopante**

I metodi di identificazione richiedono più tempo ed una maggiore mole di lavoro rispetto a quelli di screening

METODO DELLO SCREENING (o iniziale)

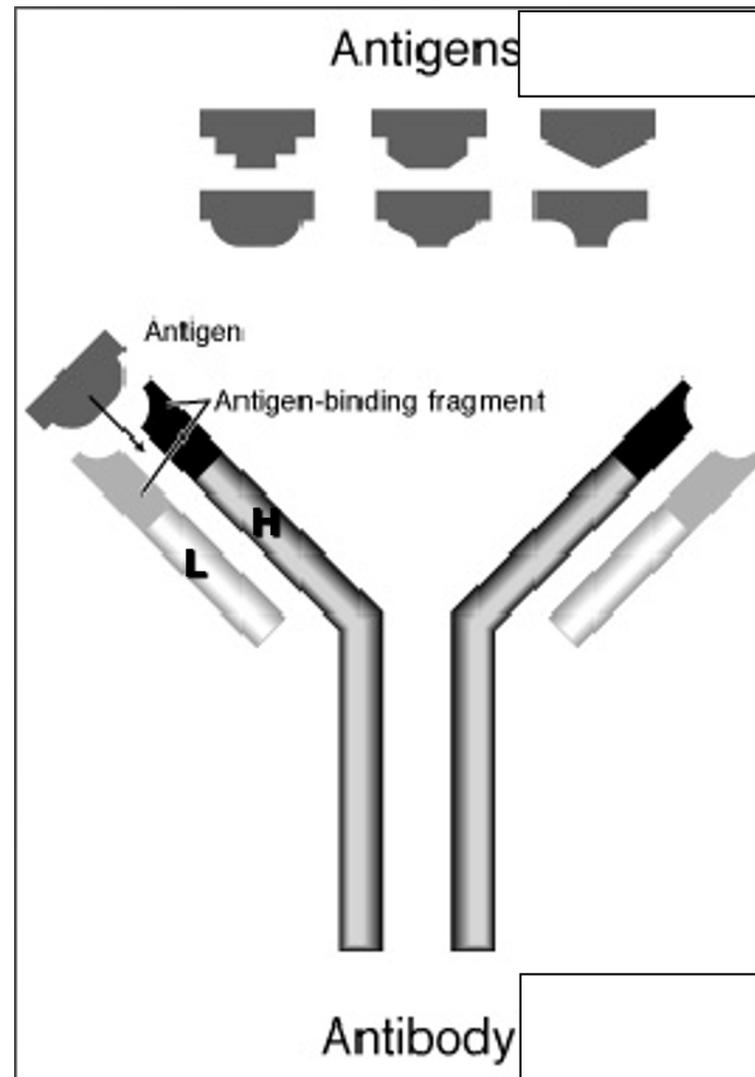
SAGGI IMMUNOLOGICI

Il principio generale che sta alla base di queste metodiche e' quello di valutare il legame competitivo di una sostanza dopante (presente nel campione biologico) verso un anticorpo rispetto ad una sostanza di Riferimento

Sono disponibili diverse metodiche immunologiche

- Tecniche radioimmunologiche (RIA)**
- Tecniche enzimatiche immunologiche (EIA)**

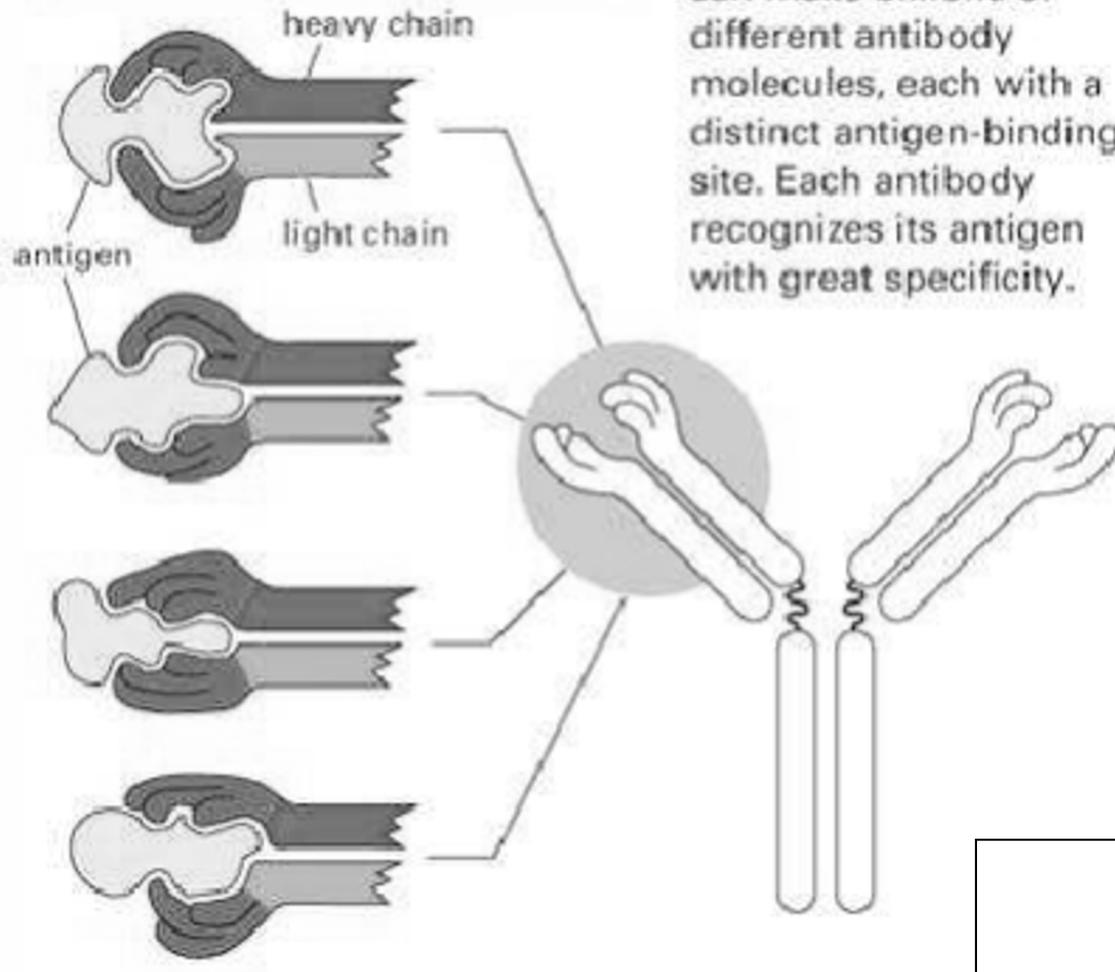
Anticorpi ed antigeni



Antibodies are proteins that bind very tightly to their targets (antigens). They are produced in vertebrates as a defense against infection. Each antibody molecule is made of two identical light chains and two identical heavy chains, so the two antigen-binding sites are identical.

Anticorpi ed antigeni

ANTIBODY SPECIFICITY



METODO DELLO SCREENING (o iniziale)

SAGGI IMMUNOLOGICI

I saggi immunologici sono usati per monitorare la presenza di ormoni e molecole estranee negli organismi viventi.

Le molecole identificate possono variare in dimensioni, proprietà chimiche e fisiche, e nell'attività biologica

Vantaggi: SELETTIVITA'

Riconoscono una sostanza specifica in una miscela altamente eterogenea

Svantaggi:

Riconoscimento di sostanze simili nella struttura

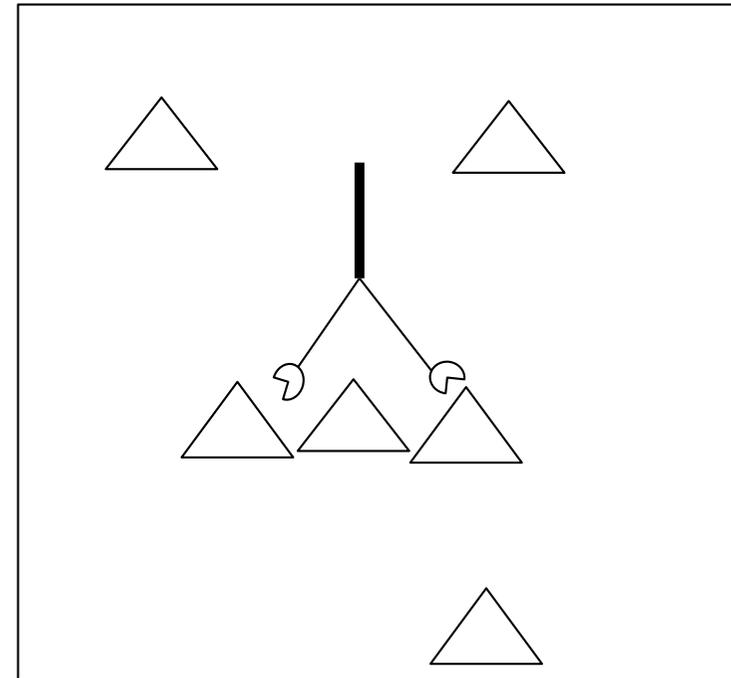
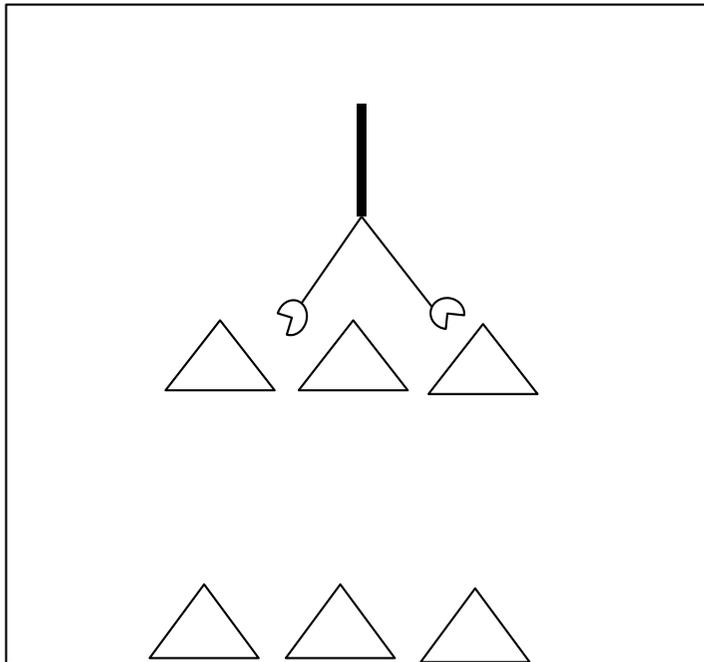
METODO DELLO SCREENING (o iniziale)

SAGGI IMMUNOLOGICI

In un saggio immunologico una quantità nota di un anticorpo e' aggiunto al campione biologico (urine). Si aggiunge inoltre una sostanza di riferimento (in genere avente struttura simile alla sostanza dopante ricercata) opportunamente "marcata". Se la sostanza dopante ricercata o un suo metabolita sono presenti nel campione biologico, questa tenderà a sostituire la sostanza di riferimento nel suo legame con l' anticorpo

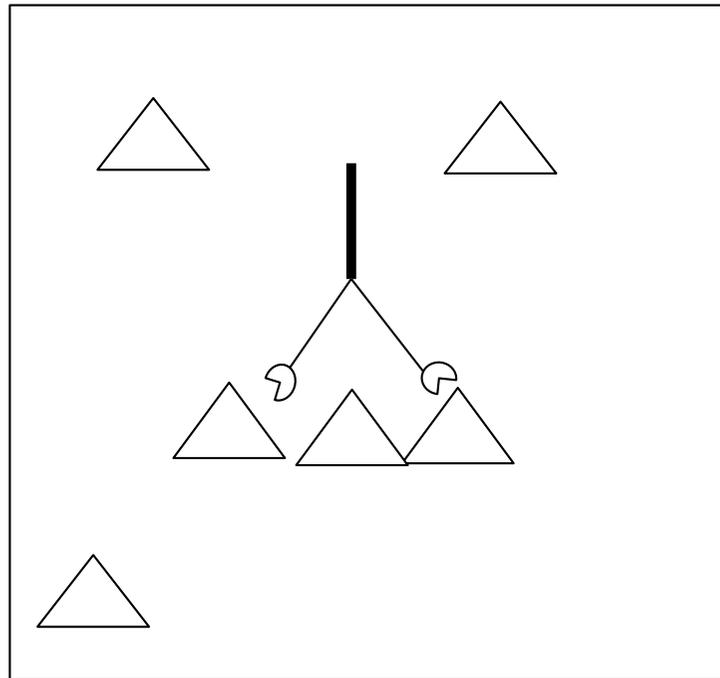
METODO DELLO SCREENING (o iniziale)

SAGGI IMMUNOLOGICI



METODO DELLO SCREENING (o iniziale

SAGGI IMMUNOLOGICI



La quantità di sostanza di riferimento che viene “ spiazzata ” dalla sostanza dopante e’ un indice della quantità di sostanza dopante presente nel campione biologico.

E’ possibile quantificare la quantità di sostanza di riferimento mediante saggi spettrofotometrici, a fluorescenza.

METODO DELLO SCREENING (o iniziale)

SAGGI IMMUNOLOGICI

Se il metodo dello screening risulta positivo sia da un punto di vista QUALITATIVO che QUANTITATIVO si procede al metodo dell'identificazione

Laboratorio di 1° livello

- **Tipo di analisi: qualitativa e/o semiquantitativa**
- **Matrice biologica: urina**
- **Sostanze ricercate: sostanze appartenenti alle droghe di maggiore rilevanza sociale e pericolosità**
- **Metodiche: saggi immunologici**
- **Cut-off: quelli validati dai produttori dei kit commerciali utilizzati**

METODO DELL' IDENTIFICAZIONE

Questo saggio deve essere effettuato su una seconda aliquota del campione biologico al fine di assicurare che il risultato sia relativo allo stesso prelievo

Il metodo prevede che la sostanza dopante e/o i suoi metaboliti siano estratti selettivamente dalla miscela eterogenea del campione biologico iniziale al fine di isolarli da altre sostanze che possono interferire nell' analisi

METODO DELL' IDENTIFICAZIONE (GC-MS)

**La procedura sperimentale per eccellenza
nel metodo dell' identificazione si basa
sull' accoppiamento di due tecniche:
Gas Cromatografia-Spettrometria di Massa
(GC-MS)**

Laboratorio di 2° livello

- **Tipo di analisi:** qualitativa e/o semiquantitativa
CON CONFERMA CROMATOGRAFICA
- **Matrici biologiche:** tutte (urina,sangue,capelli)
- **Sostanze ricercate:** come il 1° livello con conferma a livello molecolare ed eventuale quantificazione
- **Metodiche:** Gas cromatografia- spettrometria di massa
GC-MS

CROMATOGRAFIA

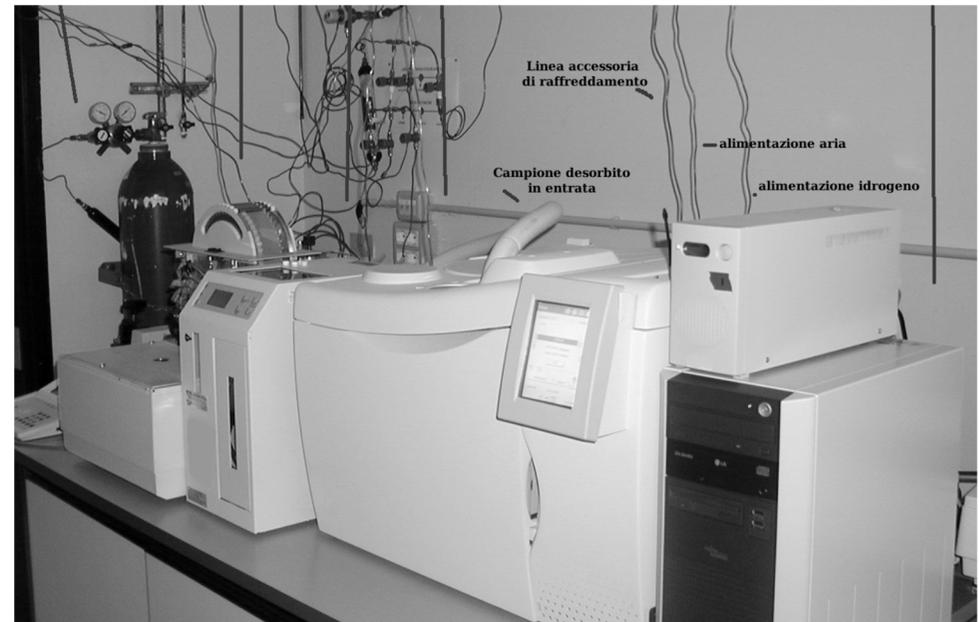
La cromatografia permette la separazione fisica delle sostanze presenti in un campione biologico attraverso il passaggio in una colonna lunga con un piccolo diametro.

All'interno della colonna si trova un materiale (fase stazionaria) che consente alle diverse sostanze di separarsi fra loro in base alle loro caratteristiche chimico-fisiche.

CROMATOGRAFIA

A seconda delle loro caratteristiche chimico-fisiche, le molecole impiegheranno velocità differenti a percorrere l'intera lunghezza della colonna e quindi verranno eluite in tempi differenti.

Le sostanze eluite sono poi analizzate da un detector



CROMATOGRAFIA

Injector Flow of Mobile Phase Detector

T=0



T=10'

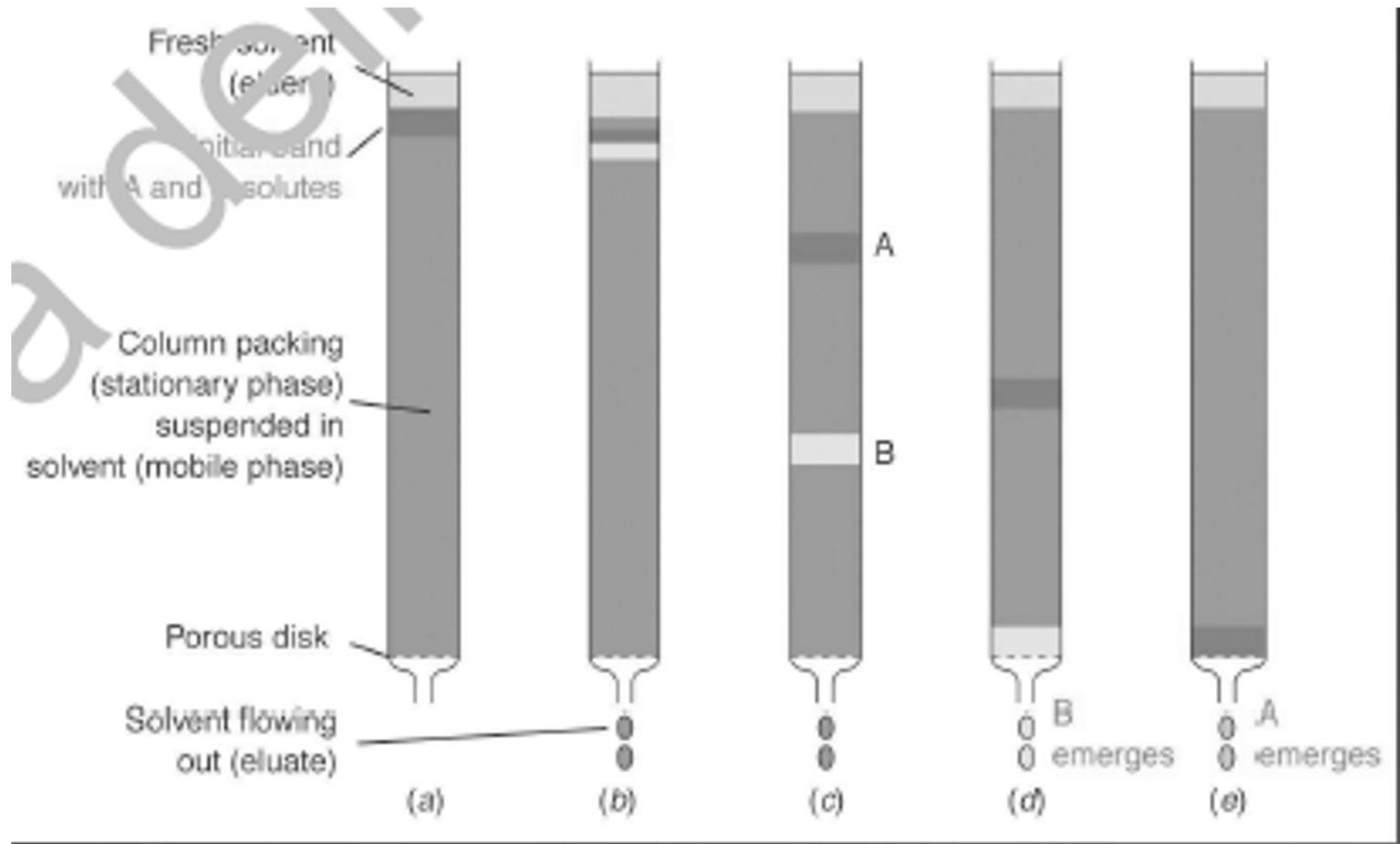


T=20'

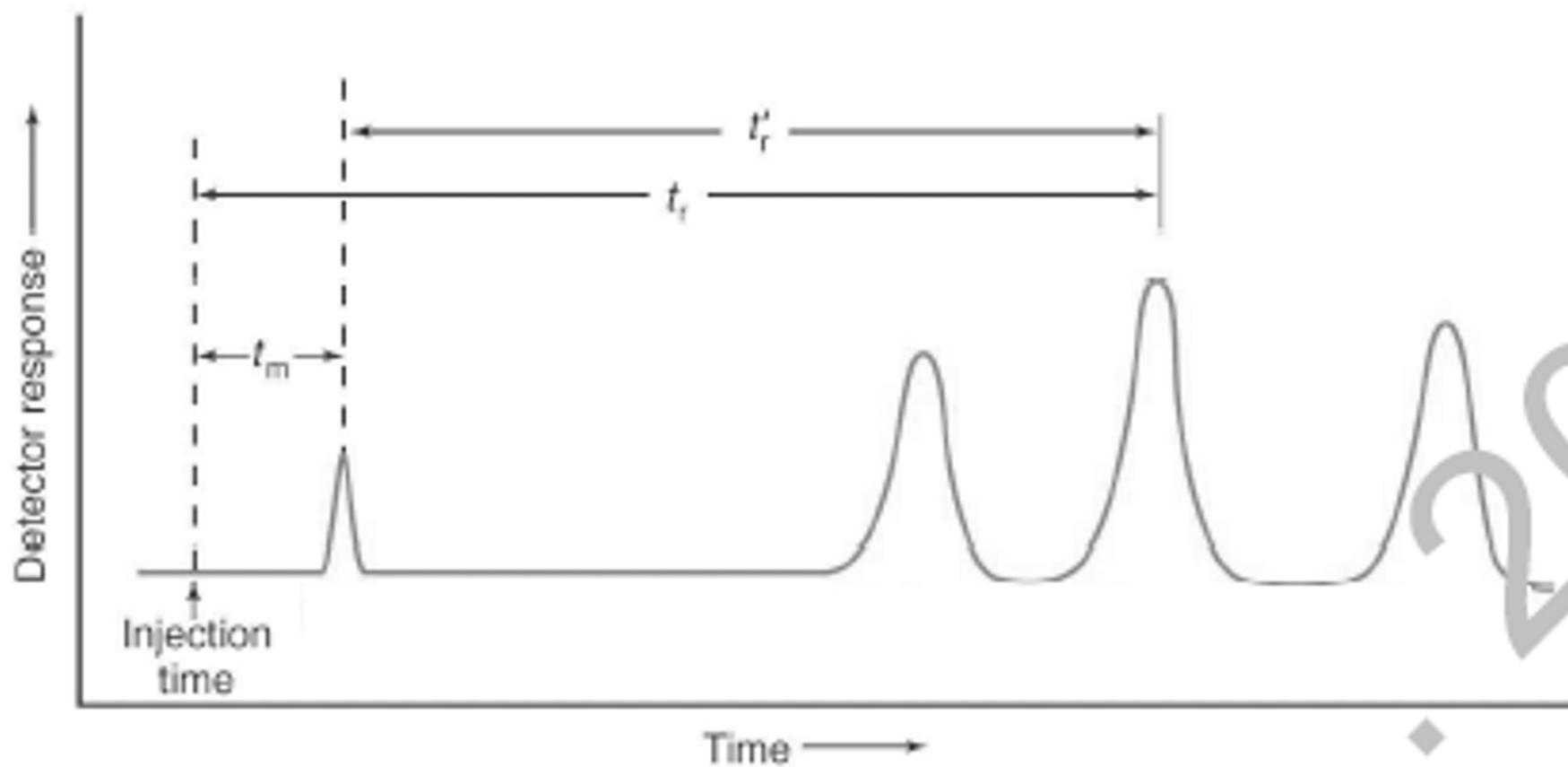


Most Interaction with Stationary Phase Least

CROMATOGRAFIA



CROMATOGRAMMA



METODO DELL' IDENTIFICAZIONE GCMS

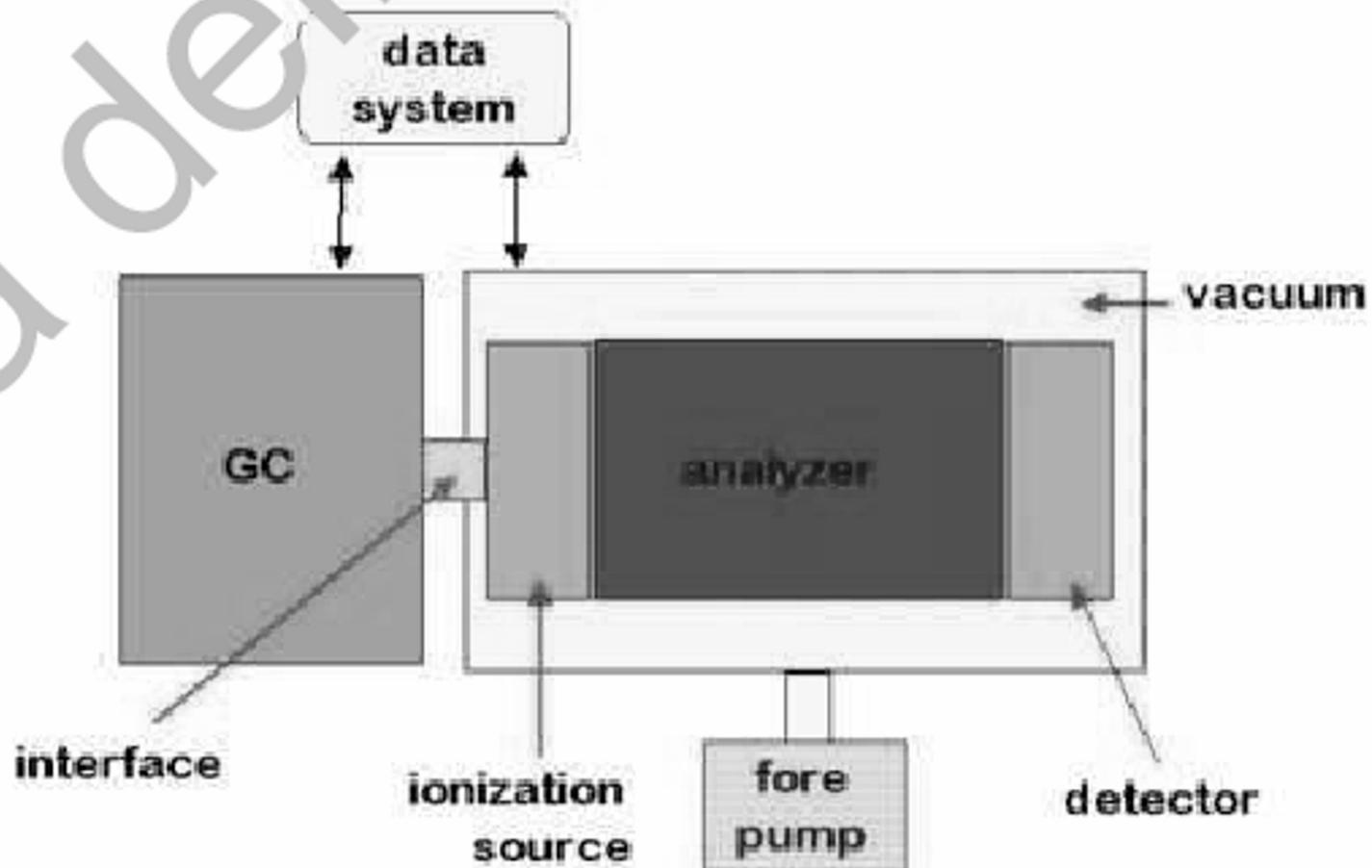
La sostanza eluita dalla gascromatografia viene trasferita alla sorgente di ionizzazione dello spettrometro di massa e qui e' bombardata da un fascio di elettroni ad alta energia

La molecola si rompe in una serie di frammenti (caratteristici per ogni data sostanza)

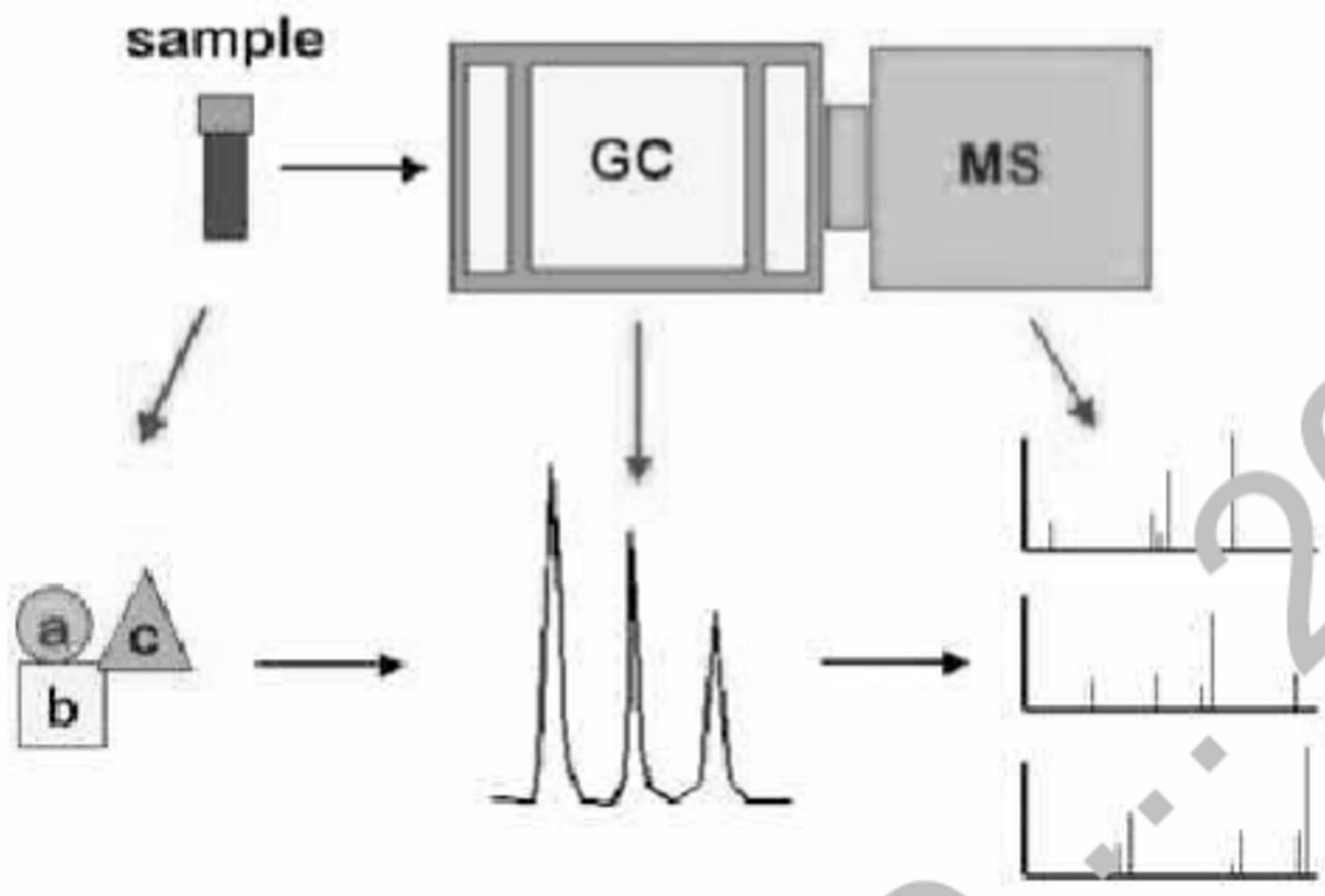
L' analizzatore dello spettrometro di massa separa i diversi frammenti in base al rapporto massa/carica



Mass spectrometer components



GC/MS process



METODO DELL' IDENTIFICAZIONE GCMS

Per ogni specifica sostanza dopante esiste un preciso protocollo sperimentale da seguire che permette di prevedere i tempi di ritenzione cromatografica e la tipologia dello spettro di massa (numero e tipo di frammenti)

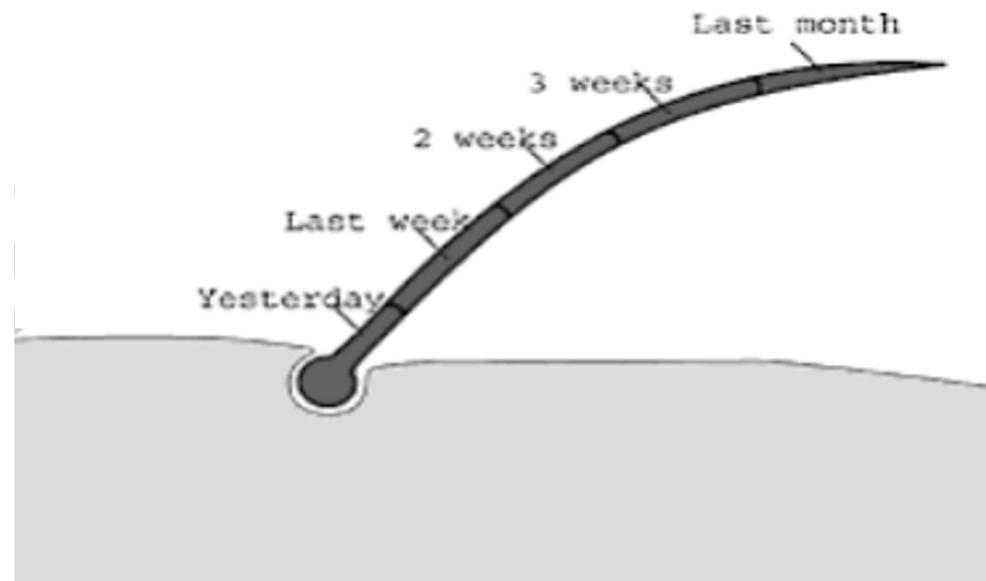
Questi dati sono confrontati con quelli di una sostanza di riferimento. Se coincidono allora si ottiene una conferma QUALITATIVA rispetto al metodo di screening

METODO DELL' IDENTIFICAZIONE GC-MS

La procedura di GC-MS permette inoltre una più accurata analisi QUANTITATIVA della sostanza dopante consentendo quindi di determinare se l' atleta verrà sanzionato o meno.

ALTERNATIVA AL PRELIEVO DI URINE

L'analisi dei capelli



E' un analisi che consente di valutare se un atleta ha sospeso un trattamento proibito con l'avvicinarsi della competizione

Infatti le sostanze che circolano nel sangue si incorporano permanentemente nella struttura del capello e un'analisi adeguata consente di stimare se e quando una sostanza proibita e' stata assunta

ANALISI DEI CAPELLI

Limitazioni

L'incorporazione di una sostanza in capelli chiari o grigi e' piu' lenta rispetto a coloro che hanno capelli scuri

Fattori critici per le analisi sono la scelta degli atleti di portare capelli molto corti e/o di sottoporsi a tagli frequenti

Altri fattori da valutare sono:

- la crescita irregolare,**
- l'effetto diluizione dovuto ai continui lavaggi con saponi aggressivi,**
- le conseguenze di colorazioni sintetiche che possono avere effetti diluenti o concentranti la sostanza in esame.**

Passaporto Biologico

Il passaporto biologico è una strategia antidoping introdotta dalla WADA che consiste nella registrazione off- e in-competizione di differenti parametri ematici ed urinari dell'atleta.

Passaporto Biologico

- ❖ Basato sul monitoraggio personalizzato di biomarcatori del doping, offre l'enorme vantaggio di essere indipendente dalle sostanze dopanti.**
- ❖ È una tecnica indiretta non rileva la presenza/assunzione diretta del farmaco dopante, ma individua gli effetti anomali che tali sostanze inducono sull'organismo smascherandone così l'assunzione sul breve, medio e lungo termine.**

Passaporto Biologico

La squalifica per doping dell'atleta incorre nel caso in cui vengano rilevati andamenti anomali e ingiustificati (rispetto alle soglie di doping) di più parametri rispetto al profilo tipico dell'atleta.

Parametri del Passaporto Biologico

- **misura dell'ematocrito (Hct);**
- **emoglobina (Hb);**
- **conteggio dei reticolociti in % (Ret %);**

da questi due ultimi parametri viene calcolato l'indice di stimolazione (*off score*) che è un parametro di riferimento per l'individuazione di casi sospetti in base a criteri statistici.

Parametri del Passaporto Biologico

❖ parametri emocromocitometrici (MCH, MCHC, WBC, PLT, MCV) sono utilizzati dal software statistico per determinare un altro indice, denominato ABP (*Abnormal Blood Profile*).

Valutazione del Passaporto Biologico

- 1. Screening sulla base dell'analisi statistica e selezione dei casi con probabilità molto elevata di anomalie non fisiologiche;**

Valutazione del Passaporto Biologico

- 2. Valutazione approfondita, da parte di un collegio composto da tre esperti, scelti all'interno dell'apposita Commissione nominata dall'Organizzazione antidoping di riferimento, dei casi selezionati, dei relativi profili ematologici e delle probabili cause delle variazioni riscontrate;**

Valutazione del Passaporto Biologico

- 3. Notifica all'atleta di una potenziale violazione della normativa antidoping, concernente la elevata probabilità di utilizzo di un metodo proibito di potenziamento del trasporto di ossigeno. La notifica si conclude con l'invito a fornire entro un dato termine una motivata spiegazione delle anomalie riscontrate nel profilo ematologico e a sottoporsi eventualmente a test specifici.**

Applicazione dell'ABP

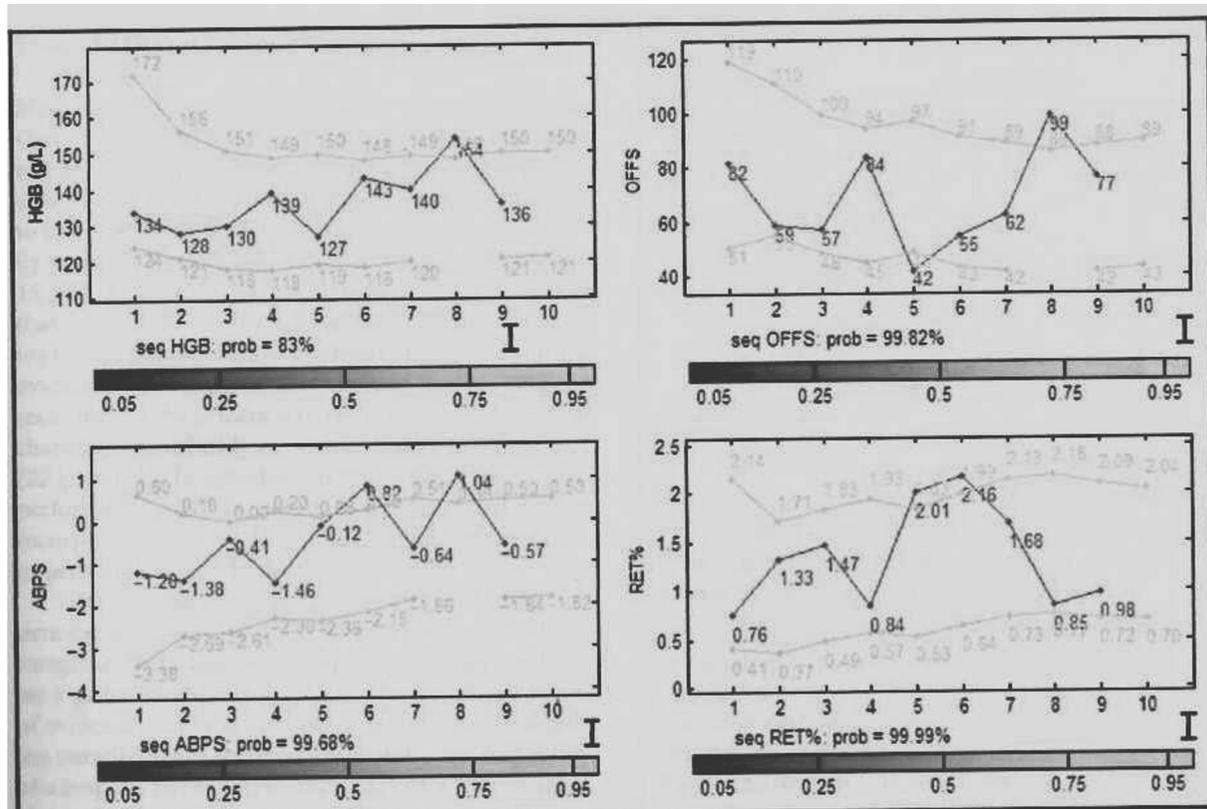


Fig. 1. Hematological passport of an elite rider tested on 9 occasions for 4 markers of blood doping: HGB, the stimulation index OFF-score (OFFS), the Abnormal Blood Profile Score (ABPS), and the percentage of reticulocytes (RET%).

Blue lines represent actual test results. Red lines indicate limits at which the test result is considered abnormal. Initial limits (e.g., 124–172 g/L for HGB) are based on population epidemiology and are adapted in the course of individual data acquisition to produce individual final limits (121–150 g/L for HGB). Color bars indicate sequence (seq) abnormality [Sottas et al. (22)]; prob, probability. The numerous abnormalities suggest that it is very unlikely that such a blood profile would not be obtained under normal physiological conditions. The rider was subsequently convicted of doping with the variant of rEPO known as CERA (continuous erythropoiesis receptor activator). How to calculate OFF-score and ABPS can be found in Gore et al. (10) and Sottas et al. (11), respectively.

Applicazione dell'ABP

