***WADA* tehniskais dokuments – TD2014EPO**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Dokumenta numurs: | TD2014EPO | Kārtas numurs: | 1.0 |
| Sarakstījusi: | *WADA EPO* darba grupa | Apstiprinājusi: | *WADA* izpildkomiteja |
| Datums: | 2014. gada 17. maijs | Spēkā stāšanās diena: | 2014. gada 1. septembris |

#### ERITROPOĒZI STIMULĒJOŠU LĪDZEKĻU (*ESA*) ANALĪŽU AR ELEKTROFORĒTISKAJĀM METODĒM VEIKŠANAS UN ZIŅOŠANAS SASKAŅOŠANA

**1.0. Ievads**

Šis dokuments ir izstrādāts, lai saskaņotu laboratoriju īstenotu rekombinanto eritropoetīnu (*t. i.*, epoetīnu) un to analogu (*piemēram*, darbepoetīna, pegserpoetīna, peginesatīda, *EPO-Fc*) noteikšanu un paziņošanu, analizējot tos ar elektroforēzes metodēm. Ikreiz, kad ir pieejamas citas metodes (*piemēram*, *ELISA*, *LC/MS*), tiek sniegta atsauce arī uz piemērojamajiem tehniskajiem dokumentiem.

Visām laboratorijām ir jāpiemēro šie kritēriji, ikdienā veicot pārbaudes, lai identificētu minētās vielas.

Šajā dokumentā tiek izmantoti turpmāk minētie saīsinājumi, akronīmi un preču zīmes.

***CERA*** (*Mircera®, Roche*)**:** pastāvīgs eritropoetīna receptoru aktivators, eritropoetīna analogs, kas pazīstams ar starptautisko nepatentēto nosaukumu (SNN) kā pegserpoetīns, pegilēts epoetīna-β atvasinājums.

***EPO*:** eritropoetīns.

***EPO-Fc*:** *EPO* sapludinātais proteīns, saplūstot ar cilvēka imūnglobulīna smagās ķēdes *Fc* (fragments, kristalizējams) apgabalu.

***bEPO*:** endogēnais eritropoetīns (ko dabiski izdala paša sportista audi), kas atrodams asinīs (serumā vai plazmā).

***rEPO*:** rekombinantais eritropoetīns. Šīs farmaceitiskās vielas pēc to SNN ir pazīstamas kā “epoetīns”. Dažādos preparātus identificē ar grieķu alfabēta burtu, piemēram, epoetīns-α, -β, -ω, -δ. Citiem preparātiem (piemēram, nepatentētajiem preparātiem vai kopijām), kurus kopā dēvē par “*rEPO* biolīdziniekiem”, var būt atšķirīgi izoformu profili, kas precīzi neatbilst jau norādītajiem.

***uEPO*:** endogēnais eritropoetīns (ko dabiski izdala paša sportista audi), kas izdalās ar urīnu.

***ESA*:** eritropoēzi stimulējoši līdzekļi, kuru struktūra vai nu ir saistīta ar *EPO* (piemēram, *NESP, CERA, EPO-Fc*), vai nav (*piemēram*, peginesatīds).

**IEF:** izoelektriskā fokusēšana.

***NESP*** (*piemēram*, *Aranesp®, Amgen*)**:** jauns eritropoēzi stimulējošs proteīns, eritropoetīna analogs, ko pēc tā SNN pazīst kā darbepoetīnu-α (*dEPO*).

**Peginesatīds** (*Omontys®, Affymax Inc.*)**:** pegilēts homodimēra peptīds bez strukturālas saistības ar *EPO*.

***SAR-PAGE*:** nātrija *N*-lauroilsarkozināta (“sarkozil-”) poliakrilamīda gela elektroforēze.

***SDS-PAGE*:** nātrija dodecilsulfāta poliakrilamīda gela elektroforēze.

## 2.0. Analīze

Laboratorija izmanto apstiprinātas un nolūkam atbilstīgas metodes, lai noteiktu *ESA* ievadīšanu urīnā vai plazmā/serumā.

### 2.1. Elektroforēzes metodes

Analītiskā stratēģija, kas jāievēro, izmantojot 1. tabulā apkopotās elektroforēzes metodes, ir aprakstīta turpmāk.

#### 2.1.1. Sākotnējā pārbaudes procedūra

* + - * Analizējot *ESA*, kuru struktūra ir saistīta ar *EPO* (piemēram, *rEPO*, *NESP*, *CERA*, *EPO-Fc*), laboratorija pēc *EPO* un/vai tā analogu bagātināšanas piemēro IEF [1] un/vai *SAR-PAGE* [2, 3], izmantojot nespecifiskas metodes (*piemēram*, ultrafiltrāciju [1], selektīvu proteīna izpārslošanos [4]) vai pēc imūnafinitātes attīrīšanas[[1]](#footnote-1) [5-10].
      * Laboratorija, veicot metodes validāciju, pierāda, ka izmantotā bagātināšanas metodika nemaina IEF izoformu profilus vai analizējamo endogēno *EPO* un *ESA* *SDS/SAR-PAGE* uzvedību.
      * Veicot analīzi attiecībā uz peginesatīdu, laboratorija piemēro *SDS-PAGE* vai *SAR-PAGE* [11].

#### 2.1.2. Apstiprināšanas procedūra

Apstiprināšanas procedūra ir atkarīga no iespējami konstatētā *rEPO* vai tā analoga un no sākotnējās pārbaudes procedūrā izmantotās metodikas.

* + - * Pirms *parauga* apstiprināšanas analīzes ar elektroforēzes metodēm [5–10] veic visu *parauga* alikvotu imūnafinitātes attīrīšanu1.

##### 2.1.2.1. rEPO

* + - * Neatkarīgi no izmantotās sākotnējās pārbaudes procedūras (IEF un/vai *SAR-PAGE*), *rEPO* apstiprināšanas procedūra jāveic, izmantojot *SDS-PAGE* [12, 13] vai *SAR-PAGE* [2, 3] “A” *parauga* jaunajai(-ām) alikvotai(-ām).
      * *SAR-PAGE* var piemērot gan sākotnējās pārbaudes procedūrai, gan apstiprināšanas procedūrai.

##### 2.1.2.2. NESP

* Neatkarīgi no izmantotās sākotnējās pārbaudes procedūras (IEF vai *SAR-PAGE*), *NESP* apstiprināšanas procedūrai laboratorija var izvēlēties piemērot IEF vai *SDS-PAGE*, vai *SAR-PAGE* “A” *parauga* jaunajai(-ām) alikvotai(-ām). Pēc saviem ieskatiem laboratorija var izmantot arī IEF un *SDS-PAGE* vai *SAR-PAGE* kombināciju.
* To pašu metodi (*IEF* vai *SAR-PAGE*) var piemērot gan sākotnējās pārbaudes procedūrai, gan apstiprināšanas procedūrai.

##### 2.1.2.3. CERA

* Neatkarīgi no izmantotās sākotnējās pārbaudes procedūras (IEF vai *SAR-PAGE*) *CERA* apstiprināšanas procedūrai laboratorija var izvēlēties piemērot IEF vai *SAR-PAGE*, vai pēc laboratorijas ieskatiem šo metožu kombināciju “A” *parauga* jaunajai(-ām) alikvotai(-ām).
* To pašu metodi (IEF vai *SAR-PAGE*) var piemērot gan sākotnējās pārbaudes procedūrai, gan apstiprināšanas procedūrai.

##### 2.1.2.4. EPO-Fc

* *EPO-Fc* apstiprināšanas procedūrai laboratorija var izvēlēties piemērot *SDS-PAGE* vai *SAR-PAGE* “A” *parauga* jaunajai(-ām) alikvotai(-ām).
* *SAR-PAGE* var piemērot gan sākotnējās pārbaudes procedūrai, gan apstiprināšanas procedūrai.

##### 2.1.2.5. Peginesatīds

* Neatkarīgi no izmantotās sākotnējās pārbaudes procedūras peginesatīda apstiprināšanas procedūrai laboratorija var izvēlēties piemērot *SDS-PAGE* vai *SAR-PAGE*.
* To pašu metodi (*SDS-PAGE* vai *SAR-PAGE*) var piemērot gan sākotnējās pārbaudes procedūrai, gan apstiprināšanas procedūrai.

**1. tabula.** *Pārbaude* attiecībā uz *ESA* urīnā un asinīs (serumā/plazmā), izmantojot elektroforēzes metodes

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Sākotnējā pārbaudes procedūra** | | **Apstiprināšanas procedūra** |
| **Metode** | **Varbūtējais analīžu rezultāts** | **Metode** |
| IEF un/vai *SAR-PAGE* | *rEPO* | *SDS-PAGE* vai *SAR-PAGE* |
| *NESP* | IEF vai *SDS-PAGE*, vai *SAR-PAGE* |
| *CERA* | IEF vai *SAR-PAGE* |
| *SAR-PAGE* | *EPO-Fc* | *SDS-PAGE* vai *SAR-PAGE* |
| *SDS-PAGE* vai *SAR-PAGE* | Peginesatīds | *SDS-PAGE* vai *SAR-PAGE* |

### 2.2. Citas (ar elektroforēzi nesaistītas) metodikas

* + - *ESA* sākotnējās pārbaudes procedūrā ar struktūru, kas nav saistīta ar *EPO* (*piemēram*, peginesatīdu), laboratorija var piemērot ar vielu saistītas noteikšanas metodes (piemēram, imūntestus), ja tādas ir pieejamas [11].
    - Konkrētu *ESA* (*t. i.*, peginesatīda, *EPO-Fc*) apstiprināšanas procedūrā laboratorija pēc saviem ieskatiem var piemērot arī ar vielu saistītas noteikšanas metodes (piemēram, imūntestus) papildus šajā tehniskajā dokumentā aprakstītajām elektroforēzes metodēm, kā papildu zinātnisku pierādījumu, lai varētu izdarīt galīgo secinājumu [11, 14].
    - Visos gadījumos, kad ir pieejama uz masspektrometriju (MS) balstīta metode [15–17], to var izmantot gan sākotnējās pārbaudes procedūrā, gan apstiprināšanas procedūrā, vai abās. Tādā gadījumā jāizmanto identifikācijas kritēriji, kas aprakstīti pašreizējajā tehniskajā dokumentā par identifikācijas kritērijiem kvalitatīvajos testos (*TD IDCR*) [18].

## 3.0. Elektroforēzes metožu apraksts

### 3.1. Izoelektrofokusēšanas (IEF) pārbaude [1]

#### 3.1.1. Parauga sagatavošana

* + - Sākotnējās pārbaudes procedūrā var izmantot jebkuru validētu metodi, ar kuru iespējams koncentrēt *EPO* un/vai tā analogus (piemēram, ultrafiltrāciju [1], selektīvu proteīna izpārslošanos [4], imūnafinitātes attīrīšanu1 [5–10] utt.).
    - Apstiprināšanas procedūrās pirms IEF metodes [5–10] piemērošanas ir nepieciešams veikt *parauga* imūnafinitātes attīrīšanu1.

#### 3.1.2. Elektroforētiska sadalīšana

* + - IEF veic tādā pH diapazonā, kas ir saderīgs gan ar dabiskā *EPO*, gan tā rekombinanto analogu izoelektriskajiem punktiem (*pI*). IEF veic denaturētos apstākļos (aptuveni 7M karbamīda).

#### 3.1.3. Imūnblotings

* + - Pēc IEF sadalīšanas obligāti jāveic dubultā blotinga procedūra.
    - Monoklonālais peles klons AE7A5 pret cilvēka *EPO* ir primārā antiviela, ko ieteicams izmantot šajā posmā. Tomēr pēc laboratorijas ieskatiem var izmantot arī citas antivielas, kas ir pret cilvēka *EPO*, ar līdzīgiem specifiskuma un jutības raksturlielumiem (piemēram, monoklonālo peles klonu 9G8A pret cilvēka *EPO*).

#### 3.1.4. Noteikšana

* + - *EPO* izoelektriskos modeļus konstatē, izmantojot piemērotu, jutīgu noteikšanas sistēmu (piemēram, pastiprinātu hemiluminiscences sistēmu). Signālam, kas iegūts, izmantojot densitometriju, jābūt kvantitatīvi nosakāmam, lai noteiktu *EPO* modeļa dažādu izoformu relatīvo intensitāti.

### 3.2. *SDS-PAGE* un *SAR-PAGE* pārbaudes [2, 3, 11–14]

#### 3.2.1. Parauga sagatavošana

* + - Sākotnējās pārbaudes procedūrā var izmantot jebkuru validētu metodi, ar kuru iespējams koncentrēt *EPO* un/vai tā analogus (piemēram, imūnafinitātes attīrīšanu1 [5–9]).
    - Apstiprināšanas procedūrās pirms *SDS-PAGE* vai *SAR-PAGE* piemērošanas ir nepieciešams veikt *parauga* imūnafinitātes attīrīšanu1.

#### 3.2.2. Elektroforētiskā sadalīšana

* + - Ar *EPO* saistīto *ESA* sadalīšanai ieteicams izmantot 10 % akrilamīda (% T) gelus. Mazākām molekulām (*piemēram*, peginesatīdam) tiek sekmīgi izmantoti arī 4–12 % gradienta geli.
    - *SAR-PAGE* gadījumā *SDS* paraugos un elektroforēzes buferšķīdums tiek aizstāts ar nātrija *N*-lauroilsarkozinātu.

#### 3.2.3. Imūnblotings

* + - Urīna un seruma/plazmas *paraugu* sākotnējās pārbaudes procedūrā pēc elektroforētiskās sadalīšanas var veikt vienkāršo vai dubulto blotingu saskaņā ar atbilstošās laboratorijas metodes validāciju.
    - Urīna *paraugu* apstiprināšanas procedūrā ir ieteicams veikt dubulto blotingu. Tomēr pēc laboratorijas ieskatiem var piemērot arī vienkāršo blotingu, ņemot vērā sākotnējās pārbaudes procedūras rezultātus (*piemēram*, šķērsreaktivitātes klātbūtni, zemu *EPO* saturu utt.) un analīzes apstākļus (piemēram, pietiekamu *parauga* tilpumu).
    - Seruma/plazmas *paraugu* apstiprināšanas procedūrā obligāti jāveic dubultais blotings.
    - Primārā antiviela, ko šajā posmā ieteicams izmantot ar *EPO* saistītiem *ESA*, ir monoklonālais peles antivielu klons AE7A5 pret cilvēku *EPO*. Tomēr pēc laboratorijas ieskatiem var izmantot arī citas antivielas, kas ir pret cilvēka *EPO*, ar līdzīgiem specifiskuma un jutības raksturlielumiem (piemēram, monoklonālo peles klonu 9G8A pret cilvēka *EPO*).
    - Peginesatīdam jāizmanto antiviela pret vielas peptīdo daļu (piemēram, klons 11F9, *Affymax Inc.*).

#### 3.2.4. Noteikšana

* *ESA* elektroforēzē konstatētos zīmējumus konstatē, izmantojot piemērotu, jutīgu noteikšanas sistēmu (piemēram, pastiprinātu hemiluminiscences sistēmu).

## 4.0. Rezultātu izvērtēšana un interpretācija

### 4.1. Pieņemšanas kritēriji

IEF un *SDS-PAGE* vai *SAR-PAGE* procedūru pieņemšanas kritēriji nosaka prasības, kurām attēlam jāatbilst, lai varētu piemērot identifikācijas kritērijus nolūkā pārliecināties par *ESA* klātbūtni.

Plankumi, traipi, pārāk stipra fona zonas vai signāla neesamība sloksnē būtiski traucē identifikācijas kritēriju piemērošanu un padara sloksni nederīgu.

### 4.2. Identifikācijas kritēriji

Šeit aprakstītie identifikācijas kritēriji tiek piemēroti apstiprināšanas procedūrām. Tomēr kā vadlīnijas tiek sniegti ieteikumi attiecībā uz kritērijiem, kas jāpiemēro sākotnējās pārbaudes procedūrā, izvērtējot IEF rezultātus attiecībā uz *rEPO*.

#### 4.2.1. IEF procedūra

**1. attēlā** ir ilustrēti IEF pārbaudes rezultāti.[[2]](#footnote-2) Tiek noteikti katras elektroforētiskās sloksnes identifikācijas logi, kā arī bāziskās, endogēnās un skābās zonas. Preparātu joslas, ko izmanto kā referenci, identificē ar cipariem un burtiem.



**1. attēls.** Slokšņu identifikācijas logu attēls, kas iegūts ar hemiluminiscences ieguves sistēmu, atbilstoši *rEPO*, *CERA*, *NESP* un *uEPO* analīzei[[3]](#footnote-3)

Bāziskās un skābās zonas nosaka tā, kā aprakstīts, pēc joslu pozīcijas atbilstoši Eiropas Farmakopejas *rEPO* bioloģiskajam references preparātam (*BRP*) (ekvimolārs epoetīna-α un -β maisījums) vai tīriem epoetīniem-α vai -β un *NESP*; pēc izslēgšanas principa endogēno zonu nosaka pa vidu starp bāzisko un skābo zonu. **1. attēlā** endogēnās zonas piemērs ir *uEPO* (starptautiskais references preparāts (*IRP*), ko nodrošina Valsts bioloģisko standartu un kontroles institūts (*NIBSC*), Apvienotā Karaliste3).

*rEPO*, *uEPO* un *NESP* joslas attiecīgi bāziskā, endogēnā un skābā zonā tiek identificētas ar cipariem un burtiem, kā parādīts attēlā. *CERA* atbilst atšķirīgam modelim ar dažām joslām, kas ir aptuveni lokalizētas kopā ar tām, kuras noteicis *rEPO*, un citām, kas iejauktas starp *rEPO* joslām. Ar šo joslu modeli jo īpaši identificē *CERA*.

##### 4.2.1.1. rEPO

Ja *IEF* piemēro sākotnējās pārbaudes procedūrā attiecībā uz *rEPO*, ieteicams ņemt vērā turpmāk norādītos kritērijus *rEPO* varbūtējā analīžu rezultātā.

a) Urīna *paraugi*

* + Bāziskajā zonā (**1. attēls**) jābūt vismaz trim pieņemamām joslām pēc kārtas.
  + Divas intensīvākās joslas, ko mēra, izmantojot densitometriju, atrodas bāziskajā zonā.

b) Asins (seruma/plazmas) *paraugi*

* + Divu intensīvāko joslu intensitātei jābūt aptuveni divas vai vairāk reizes lielākai par jebkuru citu joslu endogēnajā zonā. Laboratorija var arī noteikt varbūtējo analīžu rezultātu attiecībā uz *rEPO*, ja pēc tās ieskatiem IEF profils atšķiras no *bEPO* profila.

##### 4.2.1.2. NESP un CERA

Attēlam jāatbilst turpmākajiem identifikācijas kritērijiem, lai ņemtu vērā *nelabvēlīgo analīžu rezultātu*, kas liecina par *NESP* vai *CERA* klātbūtni.

**NESP**

* Skābajā zonā (**1. attēls**) jābūt vismaz trim pieņemamām joslām pēc kārtas, un tās apzīmē ar “A”, “B”, “C” vai “D”.
* Vismaz vienai joslai “skābajā zonā” jābūt intensīvākai par pēdējo endogēnās zonas joslu (piemēram, josla ε **1. attēlā**).

**CERA**. Bāziskajā zonā jābūt vismaz četrām secīgām joslām, kas atbilst *CERA* preparātam, kuru izmanto kā referenci (**1. attēls**).

#### 4.2.2. *SDS-PAGE* vai *SAR-PAGE* procedūra attiecībā uz *ESA*, kuru struktūra ir saistīta ar *EPO*

*SDS-PAGE* un *SAR-PAGE* identifikācijas kritēriji ir vienādi, jo abas metodes darbojas vienādi, izņemot to, ka *SAR-PAGE* ir augstāks jutīgums pret *CERA*.

*rEPO* un to analogus var atšķirt no endogēnā *EPO* (*uEPO*, *bEPO*), pamatojoties uz raksturīgo joslas formu un atšķirīgo šķietamo molekulmasu. Katra *rEPO* vai tā analoga migrācijas uzvedību (joslu), *t. i.*, pozīciju un formu (platums, ap vienu vietu izkaisīts vai vairāk izkliedēts), var izmantot, lai apstiprinātu vielas identitāti un/vai eksogēno izcelsmi. Joslas centroīdu vai platuma robežas var izmantot, lai pārliecinātos, ka tā pozīcija un forma atšķiras no paralēli izmantotā endogēnā *EPO* pozīcijas, kā parādīts **2. attēlā** (kas ilustrē arī dažādu *rEPO*, kā arī *uEPO*/*bEPO*, *NESP* un *CERA*, *SDS-PAGE* uzvedību). Var būt arī papildu joslas, kas atbilst imūnafinitātes attīrīšanai izmantoto antivielu vieglajām un smagajām ķēdēm, un tās netraucē rezultātu interpretācijai[[4]](#footnote-4) (piemēram, turpmāk **5. attēlā**).



**2. attēls.** *SDS-PAGE* attēls, kas parāda dažu tirdzniecībā pieejamu epoetīna-α un -β preparātu raksturīgo platjoslu (*NeoRecormon®, Erypo®*, *Beijing Four Rings*, *Shanpoetin*TM). Tiek parādītas arī endogēnā urīna/ asins *EPO*, epoetīna-δ, *NESP* un *CERA* relatīvās pozīcijas.

Turpmāk norādītie identifikācijas kritēriji nosaka prasības, kurām apstiprināšanas procedūrā jāatbilst *SDS-PAGE* vai *SAR-PAGE* attēlam, lai ņemtu vērā *nelabvēlīgo analīžu rezultātu* par *rEPO, NESP, CERA* vai *EPO-Fc* klātbūtni.

***4.2.2.1. Noteikta(-as) atsevišķa(-as) josla(-as)***

* Var tikt noteikta viena josla (piemēram, epoetīna-α/ -β preparāti un *uEPO/ bEPO* **2. attēlā**; citi *ESA* **3. attēlā**) vai vairākas atsevišķas joslas, kas atbilst dažādiem *ESA* (piemēram, epoetīns-δ, *NESP* un *CERA* **2. attēlā**).

#### *rEPO*

* Epoetīnam-α un -β, kā arī tā biolīdziniekiem, ir raksturīgas joslu formas (“platjoslas”) un atšķirīga (parasti lielāka) šķietamā molekulmasa, salīdzinot ar endogēno *uEPO/bEPO* (**2. attēls**).
* Epoetīnam-δ ir raksturīga joslas forma (“asa josla”) un lielāka šķietamā molekulmasa, salīdzinot ar endogēno *uEPO/bEPO*. Pamatojoties uz joslas asumu, epoetīnu-δ var arī atšķirt no citiem rekombinantiem epoetīniem (-α un -β, kā arī biolīdziniekiem) (**2., 3. attēls**).

#### *NESP, CERA, EPO-Fc*

* Joslas centroīda šķietamā molekulmasa atbilst attiecīgā *NESP*, *CERA* vai *EPO-Fc* preparāta šķietamajai masai, ko izmanto kā referenci. *NESP* (**2., 3. attēls**), *CERA* (**2., 3. attēls**) un *EPO-Fc* (**3. attēls**) var atšķirt no endogēniem *EPO* (*uEPO*, *bEPO*), kā arī no *rEPO*, pamatojoties uz to, ka tiem ir lielāka šķietamā molekulmasa [2, 3, 14].



**3. attēls.** *SAR-PAGE* attēls, kas parāda lielāku šķietamo *CERA*, *EPO-Fc*, *NESP* un epoetīna-δ molekulmasu salīdzinājumā ar endogēno *uEPO/bEPO*.

***4.2.2.2. Noteikta jaukta tipa josla***

* Tiek noteikta jaukta tipa josla, kas sastāv no endogēniem *EPO* (*uEPO*, *bEPO*) un *rEPO* – joslas forma atgādina *rEPO PLUS* daļu formu vai *uEPO/bEPO* joslas kopējo formu.
* Izkliedēta vai vāji izteikta joslas zona virs atbilstošās endogēnās joslas arī norāda uz epoetīna-α un -β klātbūtni (**4. attēls**).
* Var tikt noteikta arī jaukta tipa joslas un atsevišķas(-u) joslas(-u) kombinācija no citiem *ESA*.



**4. attēls.** *SDS-PAGE* attēls, kurā redzama endogēna *EPO* un *rEPO* jaukta tipa josla (sarkanā bultiņa). Izkliedēta joslas zona virs atbilstošās endogēnās joslas arī norāda uz epoetīna-α un -β klātbūtni.

#### 4.2.3. *SDS-PAGE* vai *SAR-PAGE* attiecībā uz peginesatīdu

Peginesatīda klātbūtni *paraugā* norāda ar joslu pozīcijā, kas atbilst šim *ESA*, kā apliecina referencei izmantotā preparāta migrācija (**5. attēls**). Var būt arī papildu joslas, kas atbilst imūnafinitātes attīrīšanai izmantoto antivielu vieglajām un smagajām ķēdēm, un tās netraucē rezultātu interpretācijai.



**5. attēls.** Peginesatīda identifikācijas attēls, izmantojot *SDS-PAGE*, *Nu-PAGE* 4–12 % *Bis Tris* gelā

## 5.0. Dokumentācija un ziņošana

Ziņojot par rezultātiem, pamatojoties uz IEF un/vai *SDS-PAGE* vai *SAR-PAGE* piemērošanu, laboratorija ievēro prasības, kas norādītas *WADA Starptautiskajā* laboratoriju *standartā* (*ISL*) un ar to saistītajā tehniskajā dokumentā par laboratoriskās dokumentācijas paketēm (*TD LDOC*) [19].

Sākotnējās pārbaudes procedūras prasības:

* *paraugs* (sākotnējās *pārbaudes* alikvota);
* negatīvs kontrolparaugs[[5]](#footnote-5);
* piemērots preparāts, ko izmanto kā referenci, lai noteiktu bāziskās, skābās un endogēnās zonas (IEF) vai šķietamo molekulmasu (*SDS-PAGE* un *SAR-PAGE*).

Apstiprināšanas procedūras prasības:

* *paraugs* (apstiprinājuma alikvota);
* negatīvs kontrolparaugs5;
* pozitīvs kontrolparaugs, kas satur piemērotu vielu (piemēram, *rEPO*, *NESP*, *CERA*)5, [[6]](#footnote-6);
* piemērots preparāts, ko izmanto kā referenci, lai noteiktu bāziskās, skābās un endogēnās zonas (IEF) vai šķietamo molekulmasu (*SDS-PAGE* un *SAR-PAGE*).

### 5.1. Otrā atzinuma sniegšana

*WADA* ir noteikusi, ka vienam no norādītajiem ekspertiem[[7]](#footnote-7) ir jāsniedz viens otrais atzinums pirms ziņojuma iesniegšanas rezultātu pārvaldības iestādei(-ēm) par jebkādu *nelabvēlīgu analīžu rezultātu* attiecībā uz *rEPO* vai tā analogiem. Visus iesniegtos otros atzinumus kā laboratorijas dokumentācijas daļu iekļauj laboratoriskās dokumentācijas paketē.

*Kodeksa* 3. panta 2. punktā un 6. panta 2. punktā izklāstītie noteikumi ļauj izmantot rezultātus, lai noteiktu *sportistu* dopinga profilus. Tādējādi, pat ja laboratorija ziņo par *EPO* analīzes rezultātiem kā par negatīviem, pamatojoties uz IEF un/vai *SDS/SAR-PAGE* analīzi, minētajā analīzē iekļautā informācija, ko papildina cita informācija (*piemēram*, asiņu mainīgie lielumi, garenprofili un liecības), var saglabāt nozīmi plašākā skatījumā, lai varētu konstatēt antidopinga noteikumu pārkāpumus.

## 6.0. Atsauces

1. Lasne F, Martin L, Crepin N, de Ceaurriz J. Detection of isoelectric profiles of erythropoietin in urine: differentiation of natural and administered recombinant hormones. *Anal Biochem* **311**: 119–126 (2002).

2. Reichel C, Abzieher F, Geisendorfer T. SARCOSYL-PAGE: a new method for the detection of MIRCERA- and EPO-doping in blood. *Drug Test Anal* **1**(11-12): 494–504 (2009).

3. Reichel C. SARCOSYL-PAGE: A New Electrophoretic Method for the Separation and Immunological Detection of PEGylated Proteins. *Methods Mol Biol.* **869**: 65–79 (2012).

4. Lasne F, Martin L, Martin JA. A fast preparative method for detection of recombinant erythropoietin in blood samples. *Drug Test Anal*. **2**: 494–495 (2010).

5. Lasne F, Martin L, Martin JA, de Ceaurriz J. Isoelectric profiles of human erythropoietin are different in serum and urine. *Int J Biol Macromol* **41**: 354–357 (2007).

6. Mallorquí J, Segura J, de Bolòs C, Gutiérrez-Gallego R, Pascual JA. Recombinant erythropoietin found in seized blood bags from sportsmen. *Haematologica* **93**(2): 313–314 (2008).

7. Dehnes Y, Lamon S, Lönnberg M. Erythropoietin (EPO) immunoaffinity columns – A powerful tool for purifying EPO and its recombinant analogous. JPBA 53: 1028–1032 (2010).

8. Lönnberg M, Dehnes Y, Drevin M *et al.* Rapid affinity purification of erythropoietin from biological samples using disposable monoliths. *J Chromatogr A*. **1217**(45): 7031–7037 (2010).

9. Mallorquí J, Llop E, de Bolòs C, Gutiérrez-Gallego R, Segura J, Pascual JA. Purification of erythropoietin from human plasma samples using an immunoaffinity well plate. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **878**(23): 2117–2122 (2010).

10. Reihlen P, Völker-Schänzer E, Majer B, Schänzer W. Easy-to-use IEF compatible immunoaffinity purification of Erythropoietin from urine retentates. *Drug Test Anal* **4**(11): 813–817 (2012).

11. Leuenberger N, Saugy J, Mortensen RB, Schatz PJ, Giraud S, Saugy M. Methods for detection and confirmation of Hematide™/peginesatide in anti- doping samples. *Forensic Sci Int* **213**(1-3): 15–9 (2011).

12. Kohler M, Ayotte C, Desharnais P *et al*. Discrimination of recombinant and endogenous urinary erythropoietin by calculating relative mobility values from SDS gels. *Int J Sports Med* **29**(1): 1–6 (2008).

13. Reichel C, Kulovics R, Jordan V, Watzinger M, Geisendorfer T. SDS-PAGE of recombinant and endogenous erythropoietins: benefits and limitations of the method for application in doping control. *Drug Test Anal* **1**(1): 43–50 (2009).

14. Reichel C, Thevis M. Detection of EPO-Fc fusion protein in human blood: Screening and confirmation protocols for sports drug testing. *Drug Test Anal* **4**(11): 818–829 (2012).

15. Möller I, Thomas A, Geyer H, Schänzer W, Thevis M. Synthesis, characterisation, and mass spectrometric detection of a pegylated EPO-mimetic peptide for sports drug testing purposes. *Rapid Commun Mass Spectrom* **25**(15), 2115–2123 (2011).

16. Möller I, Thomas A, Delahaut P, Geyer H, Schänzer W, Thevis M. Mass spectrometric detection of peginesatide in human urine in doping control analysis. *Pharm Biomed Anal.* **70**: 512–517 (2012)

17. Reichel C. Differences in sialic acid O-acetylation between human urinary and recombinant erythropoietins: a possible mass spectrometric marker for doping control. Drug Test Anal. **5**(11-12): 877–889 (2013).

18. WADA Technical Document TD IDCR: Identification Criteria for Qualitative Assays incorporating Column Chromatography and Mass Spectrometry.

http://www.wada-ama.org/Documents/World\_Anti-Doping\_Program/WADP-IS-Laboratories/Technical\_Documents/WADA\_TD2010IDCRv1.0\_Identification%20Criteria%20for%20Qualitative%20Assays\_May%2008%202010\_EN.doc.pdf.

19. WADA Technical Document TD LDOC: Laboratory Documentation Packages.

http://www.wada-ama.org/Documents/World\_Anti-Doping\_Program/WADP-IS-Laboratories/Technical\_Documents/WADA\_TD2009\_LDOC\_Laboratory\_Documentation\_Packages\_EN.pdf.

1. Imūnafinitātes attīrīšanai izmanto citas antivielas, nevis tās, kuras izmanto imūnblotingam. [↑](#footnote-ref-1)
2. Šie ir dažādu *EPO* analogu standartu piemēri pēc IEF; reālā *paraugā* var noteikt arī endogēnā *uEPO* klātbūtni. [↑](#footnote-ref-2)
3. Citus *uEPO* vai *bEPO* preparātus var izmantot kā referenci uz endogēno *EPO*. [↑](#footnote-ref-3)
4. Šādām antivielu joslām, kas rodas parauga sagatavošanas procesā, vienmēr jābūt *paraugos* un kontrolparaugos. [↑](#footnote-ref-4)
5. Kontrolparaugi ir paraugi, kuriem veic tādu pašu analītisko procedūru kā pārbaudāmajam *paraugam* (piemēram, izmantojot tādu pašu parauga matricu, parauga sagatavošanas procesu utt.). [↑](#footnote-ref-5)
6. Pozitīvos kontrolparaugus izvēlas, pamatojoties uz sākotnējās pārbaudes procedūras rezultātiem, kas sniedz norādi par to, kura viela jāapstiprina (piemēram, *rEPO*, *NESP*, *CERA*). Tomēr pozitīvam kontrolparaugam ne vienmēr ir jāatbilst *parauga* elektroforētiskajai uzvedībai. Piemēram, dažādu veidu *rEPO* var būt atšķirīgi migrācijas modeļi gelā. [↑](#footnote-ref-6)
7. Eksperti (laboratoriju darbinieki), kuri var sniegt otros atzinumus par laboratorijas konstatējumiem attiecībā uz *EPO*:

   1. Kristiāna Ajota [*Christiane Ayotte*] (Monreāla);

   2. Iveta Dēnesa [*Yvette Dehnes*] (Oslo);

   3. Fransuāza Lana [*Françoise Lasne*] (Parīze);

   4. Nikolā Leienbergers [*Nicolas Leuenberger*] (Lozanna);

   5. Lorāns Martēns [*Laurent Martin*] (Parīze);

   6. Žans Fransuā No [*Jean-François Naud*] (Monreāla);

   7. Hosē A. Paskvāls [*José A. Pascual*] (Barselona);

   8. Kristians Reihels [*Christian Reichel*] (Zeibersdorfa);

   9. Filips Reilens [*Philipp Reihlen*] (Ķelne);

   10. Marsials Sožī [*Martial Saugy*] (Lozanna). [↑](#footnote-ref-7)