*WADA* tehniskais dokuments – *TD2018EAAS*

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Dokumenta numurs: | TD2018EAAS | Versijas numurs: | 1.0 |
| Sarakstījusi: | *WADA* laboratoriju ekspertu grupa | Apstiprinājusi: | *WADA* izpildkomiteja |
| Datums: | 2018. gada 16. maijs | Spēkā stāšanās diena: | 2018. gada 1. septembris |

**Endogēnie anaboliskie androgēnie steroīdi**

# Mērījumi un ziņošana

**1.0. Ievads**

Šis tehniskais dokuments (*TD*) ir izveidots, lai saskaņotu pieejas endogēno anabolisko androgēno steroīdu (*EAAS*) urīna *paraugos* mērījumiem uz ziņošanai par tiem, kā arī tajā ir iekļauti dati, kas nepieciešami, lai izveidotu *sportista bioloģiskā pases* (*ABP*) steroīdu moduli (steroīdu pase).

*EAAS* koncentrācijas vērtības un to proporcijas veido urīna steroīdu profilu, kas var mainīties, ievadot *EAAS* sintētiskās formas, jo īpaši testosteronu (*T*), tā prekursorus [piemēram, (dehidroepiandrosteronu jeb *DHEA*) vai tā aktīvo metabolītu [dihidrotestosteronu (*DHT*)], kā arī epitestosteronu (*E*).

*ABP* steroīdu modulī izmanto adaptīvo moduli, lai identificētu *netipisku [bioloģiskās] pases parametru* (*ATPF*) un pēc tam savukārt veiktu apstiprināšanas procedūras. To turklāt var izmantot, lai veiktu pārdomātas *sportista* garengriezuma *mērķpārbaudes*. Turklāt pārmērīgu steroīdu profilu (kas iegūts no viena urīna *parauga*) vai netipisku steroīdu pasi (iekļaujot steroīdu profilus, kas iegūti no vairākiem *paraugiem*, kas savākti ilgākā laikposmā) var izmantot, lai izskatītu antidopinga noteikumu pārkāpumu (*ADRV*).

*EAAS* analītiskās pārbaudes un ziņošanas procedūrai ir divi posmi. Sākotnējās pārbaudes procedūru veic, lai noteiktu *sportista parauga* steroīdu profilu. Pēc tam veic apstiprināšanas procedūru, ja aprēķinātais steroīdu profils ir *ATPF*, kas noteikts, izmantojot adaptīvo modeli, vai ir “aizdomīgs steroīdu profila” (*SSP*) rezultāts vai ja to pieprasa sportista [bioloģiskās] pases pārvaldības struktūrvienība (*APMU*), pārbaudes iestāde vai *WADA*.

Apstiprināšanas procedūra ietver steroīdu profila *marķieru* kvantitatīvu noteikšanu, kā izklāstīts šajā *TD*, kā arī tajā ietilpst gāzu hromatogrāfijas – degšanas – izotopu attiecības masspektrometrijas (*GC/C/IRMS*) analīze, kas aplūkota atsevišķā *TD* (*TD IRMS*) [1].

## 1.1. Steroīdu profils

Katru urīna *paraugu* analizē, lai noteiktu tā steroīdu profilu.

Šajā *TD* pieņem, ka steroīdu profils ir veidots no šādiem *marķieriem* (kā brīvo steroīdu saturs, kas iegūts no brīvā steroīda daļas, kā arī no tiem, kas atbrīvoti no konjugētas *E. coli* daļas pēc hidrolīzes ar β-glukuronidāzi):

* + - androsterona (*A*);
    - etioholanolona (*Etio*);
    - 5α-androstān-3α,17β-diola (*5αAdiol*);
    - 5β-androstān-3α,17β-diola (*5αAdiol*);
    - testosterona (*T*);
    - epitestosterona (*E*);

un šādām proporcijām:

* + - *T*/*E*;
    - *A*/*T*;
    - *A*/*Etio*;
    - *5αAdiol*/*5βAdiol*,
    - *5αAdiol*/*E*.

Ievadot *EAAS*, var izmainīt vienu vai vairākus urīna steroīdu profila *marķierus* un/vai tā proporcijas, tādējādi palielinot vai samazinot konkrētu steroīdu *metabolītu* pāru koncentrāciju un/vai proporcijas [2–4].

Turklāt urīna steroīdu profila izmaiņas var notikt vairāku iemeslu dēļ, cita starpā tās var izraisīt arī šādi maldinoši faktori:

* + - citu anabolisko steroīdu ievadīšana (*piemēram*, stanozolols);
    - cilvēka horionu gonadotropīna (*hCG*) ievadīšana vīriešiem;
    - aromatāzes inhibitoru un antiestrogēnu ievadīšana;
    - 5α-reduktāzes inhibitoru (*piemēram*, finasterīda) ievadīšana;
    - alkohola lietošana (etanols);
    - ketokonazola vai citu līdzīgu savienojumu ievadīšana;
    - maskējošo līdzekļu (*piemēram*, probenecīda) un diurētisko līdzekļu lietošana vai
    - mikroorganismu augšana.

# 2.0. Sākotnējās pārbaudes procedūra

Laboratorija izmanto validētu sākotnējās pārbaudes procedūru, kas ir nolūkam atbilstīga, lai noteiktu urīna steroīdu profila *marķierus* attiecīgajā vīriešiem un sievietēm noteiktajā vērtību diapazonā.

Sākotnējās pārbaudes procedūru veic vienai alikvotai.

## 2.1. Metodes raksturlielumi

* + - Ir jāizmanto gāzu hromatogrāfija apvienojumā ar *TMS* (keto un hidroksila grupu) atvasinājumu masspektrometriju (*GC-MS* vai *GC-MS/MS*).
    - Katrā analīzes virknē ir jāiekļauj kalibrēšanas standarts(-i) vai kalibrēšanas līkne.
    - Katrā analīzes virknē ir jāiekļauj vismaz divi urīna kvalitātes kontroles (*QC*) paraugi, kuros ir mainīga un reprezentatīva steroīdu profila *marķieru* koncentrācija.
    - Izmantojot no *E. coli* (*H. pomatia* maisījumi nav pieņemami) iegūtu attīrītu β-glukuronidāzi, veic enzimātisko hidrolīzi.
    - Glikurokonjugēto urīnā esošo steroīdu hidrolīzes pilnīgumu kontrolē, izmantojot ar izotopu marķētu A-glikuronīdu (vai līdzvērtīgu zinātniski atzītu alternatīvu).
* Atvasināšanas pilnīgumu kontrolē, uzraugot *A* *mono-O-TMS* un *di-O-TMS* atvasinājumus.
* Nepieciešamības gadījumā[[1]](#footnote-1) *parauga* alikvotas daudzumu var pielīdzināt kā tās īpatnējā svara (*SG*) un *sportista* dzimuma funkciju.
* *T*/*E* proporcijas nosaka, ņemot vērā koriģēto hromatogrāfiskās smailes laukumu vai smailes augstumu proporcijas.[[2]](#footnote-2)
  + Metodes linearitāte, kas noteikta, veicot metodes validāciju, aptver *marķieru* koncentrācijas diapazonu, kas parasti ir atrodams vīriešiem un sievietēm – *T* un *E* kvantifikācijas robeža (*LOQ*) nedrīkst būt augstāka par 2 ng/ml.[[3]](#footnote-3)
  + *A*, *Etio*, *5αAdiol*, *5βAdiol*, *T* un *E* noteikšanai nepieciešamā relatīvā kombinētā mērījuma standartnenoteiktība [*uc* (%)], kas noteikta, veicot sākotnējās pārbaudes procedūras metodes validāciju:
    - nedrīkst būt lielāka par 30 % attiecīgajā *LOQ*;
    - nedrīkst būt lielāka par 20 % (attiecībā uz *A* un *Etio*) vai 25 % (attiecībā uz adioliem) pieckārtīgā (5) *LOQ*;
    - nedrīkst būt lielāka par 20 % (attiecībā uz *T* un *E*), ja koncentrācija ir lielāka par 5 ng/ml.
  + *uc* (%), ko piemēro *T*/*E* proporciju noteikšanai un ko aprēķina no koriģētās hromatogrāfiskās smailes laukumiem vai augstumiem:
    - nedrīkst būt lielāka par 15 %, ja gan *T*, gan *E* koncentrācija ir augstāka (>) par 5 ng/ml;
    - nedrīkst būt lielāka par 30 %, ja gan *T* un/vai *E* koncentrācija ir (≤) 5 ng/ml vai zemāka.
  + Laboratorija uzrauga mikrobiālās degradācijas pierādījumus [*piemēram*, 3α-hidroksisteroīda dehidrogenāzes (*HSD*) aktivitātes rādītāju klātbūtni] un 5α-reduktāzes inhibitoru (*piemēram*, finasterīda), etanola *metabolīta(-u)* un ketokonazola (un līdzīgu vielu) klātbūtni.[[4]](#footnote-4)

2.2. Ziņošana par steroīdu profilu pēc sākotnējās pārbaudes procedūras

Pēc sākotnējās pārbaudes procedūras laboratorija ziņo *ADAMS* par katra analizētā *parauga* steroīdu profilu[[5]](#footnote-5), [[6]](#footnote-6), norādot:

* + - *parauga* *SG*;[[7]](#footnote-7)
    - *T*, *E*, *A*, *Etio*, *5αAdiol* un *5βAdiol* koncentrāciju;[[8]](#footnote-8), [[9]](#footnote-9),[[10]](#footnote-10)
  + *T*/*E* proporciju;2,[[11]](#footnote-11)
  + mikrobiālās aktivitātes pazīmes *paraugā*, *piemēram*, 5α-androstenediona (*5βAND*) un *A* proporciju un 5β-androstenediona (*5βAND*) un *Etio* proporciju;[[12]](#footnote-12)
  + tādas(-u) vielas(-u) klātbūtni vai neesību *paraugā*, kura(-as) varētu izmainīt steroīdu profilu.12

Ja *paraugs* neatbilst cilvēka urīnam (*piemēram*, *SG* ≤ 1,001, kreatinīns ≤ 5 mg/dl [5], fizioloģiskai izcelsmei neatbilstīga sāls koncentrācija, pārmērīgas pH vērtības, endogēno steroīdu, kortikosteroīdu, proteīnu neesība vai neraksturīgi zems to līmenis), laboratorija:

* + ziņo par rezultātu kā par *AAF* saistībā ar *falsifikāciju* vai *falsifikācijas mēģinājumu* (*Aizliegto vielu un metožu saraksta* M2.1. punkts), ja laboratorija spēj nepārprotami identificēt šķidruma veidu (*piemēram*, ūdens, sārms, mākslīgais urīns), kas iesniegts kā viltots *paraugs*, vai
  + ziņo par rezultātu kā par *AAF* saistībā ar *falsifikāciju* vai *falsifikācijas mēģinājumu*, ja laboratorijai ir iemesls uzskatīt, ka *paraugs* varētu būt jebkādā veidā pārveidots, ar to ir veiktas nepareizas darbības vai tas varētu būt izmantots, veicot jebkādu krāpšanu, kas varētu izmainīt analītiskās pārbaudes rezultātus, vai
  + ziņo pārbaudes iestādei par aizdomīgu atradi un lūdz papildu informāciju, ko varētu sniegt papildus, ziņojot par šo atradi kā par *AAF* saistībā ar *falsifikāciju* vai *falsifikācijas mēģinājumu* (piemēram, *sportista* “steroīdu garenprofila” datus), vai
  + ziņo par atradi kā par *ATF* saistībā ar *falsifikāciju* vai *falsifikācijas mēģinājumu* un pievieno piezīmi *ADAMS*, kurā iesaka pārbaudes iestādei veikt papildu izmeklēšanu (*piemēram*, *parauga* papildu analīzes, *sportista* *mērķpārbaudi*), lai noteiktu, vai ir notikusi *parauga* *falsifikācija* un atrade būtu jāuzskata par antidopinga noteikumu pārkāpumu.

## 2.2.1. *Parauga* (steroīdu profila) derīgums

*Parauga* derīgums pēc steroīdu profila paziņošanas *ADAMS* tiks noteikts automātiski saskaņā ar turpmāk izklāstītajiem nosacījumiem.

a) **“Nederīgs”** – **tikai tad, ja *paraugā* novēro pārmērīgas degradācijas pazīmes[[13]](#footnote-13)**, ko nosaka pēc šādiem parametriem:

* + *5αAND*/*A* ≥ 0,1 un/vai
  + *5βAND*/*Etio* ≥ 0,1.

a) “**Derīgs”** – **visos pārējos gadījumos**, tostarp tālāk uzskaitītajos gadījumos:

* *LOD* ≤ [*T* un/vai *E*] < *LOQ*.

Ja analizētajā *parauga* alikvotā *T* un/vai *E* koncentrācijas daudzumu nevar noteikt, bet tā hromatogrāfiskās smailes signāls vēl ir nosakāms (*piemēram*, *S*/*N* > 3) un *T*/*E* proporciju var noteikt no koriģētajiem hromatogrāfiskās smailes laukumiem vai smailes augstumiem2, *T*/*E* proporcijas aprēķināto vērtību ziņo *ADAMS*, ziņojot, ka attiecīgi *T* un/vai *E* koncentrācija ir “-1” (1. tabula);9

* [T] < *LOD*.

Ja *T* hromatogrāfiskās smailes signālu nav iespējams noteikt, ziņo, ka *T* koncentrācija ir “-2” un ka *T*/*E* vērtība ir “-1” (1. tabula)9, un:

i) ja [*E*] ≥ *LOQ*, *ADAMS* pievieno piezīmi, kurā norāda, ka *T*/*E* proporciju nebija iespējams izmērīt, jo *T* koncentrācija bija zemāka par pārbaudes metodes noteikšanas spēju, vai

ii) ja *LOD* ≤ [*E*] < *LOQ*, ziņo, ka *E* koncentrācija ir “-1”9, un *ADAMS* pievieno piezīmi, kurā norāda, ka *T*/*E* proporciju nebija iespējams izmērīt, jo nebija iespējams izmērīt *T* un *E* koncentrāciju;

* + [*E*] < *LOD*.

Ja *E* hromatogrāfiskās smailes signālu nav iespējams noteikt, ziņo, ka *E* koncentrācija ir “-2”9 (1. tabula), un:

i) ja [*T*] ≥ *LOQ*, *T*/*E* proporciju aprēķina, pamatojoties uz laboratorijas noteikto *E* *LOD* vērtību (*piemēram*, ja *T* koncentrācija ir 3 ng/ml un *E* nevar konstatēt un ja laboratorijas noteiktā *E* *LOD* ir 0,5 ng/ml, ziņo, ka *T*/*E* ir 6,0) (1. tabula). *ADAMS* pievieno piezīmi, kurā norāda, ka *T*/*E* proporciju nebija iespējams precīzi izmērīt, jo *E* koncentrācija bija zemāka par pārbaudes metodes noteikšanas spēju, vai

ii) ja *LOD* ≤ [T] < *LOQ*, ziņo, ka *T*/*E* proporcija un *T* koncentrācija ir “-1”9, un *ADAMS* pievieno piezīmi, kurā norāda, ka *T*/*E* proporciju nebija iespējams precīzi izmērīt, jo nebija iespējams izmērīt *T* un *E* koncentrāciju (1. tabula);

* + abi [*T* un *E*] < *LOD*.

Ja gan *T*, gan *E* hromatogrāfiskās smailes signālu nav iespējams noteikt, ziņo, ka *T* un *E* koncentrācija ir “-2” un ka *T*/*E* vērtība ir “-2” (1. tabula).9 *ADAMS* pievieno piezīmi, kurā norāda, ka *T*/*E* proporciju nebija iespējams izmērīt, jo gan *T*, gan *E* koncentrācija bija zemāka par pārbaudes metodes noteikšanas spēju;

* + ja precīzi nav iespējams izmērīt citu(-us) steroīdu profila *marķieri(-us)*, rīkojas šādi:
    - *LOD* ≤ [*marķieris*] < *LOQ*.

Ja *marķiera* koncentrācija alikvotā ir zemāka par pārbaudes metodes *LOQ*, bet tā hromatogrāfiskās smailes signāls vēl ir nosakāms (*t. i.*, virs pārbaudes metodes *LOD*), ziņo, ka *marķiera* koncentrācija ir “-1”;9

* + - [*marķieris*] < *LOD*.

Ja marķiera hromatogrāfiskās smailes signālu nav iespējams noteikt (*t. i.*, tas ir zemāks par pārbaudes metodes *LOD*), ziņo, ka koncentrācija ir “-2”9;

* + ja konstatēts ne tik pārmērīgs mikrobioloģiskais piesārņojums, par ko *ADAMS*12 ir jāziņo kā par:

*5αAND*/*A* proporciju un/vai *5βAND*/*Etio* proporciju diapazonā no 0,05 līdz 0,1;

* + ja laboratorija ziņo par *AAF* vai *ATF* saistībā ar *aizliegto vielu*, kas varētu izmainīt steroīdu profilu (*piemēram*, anaboliskais steroīds, *hCG* vīriešiem, diurētiskais līdzeklis vai maskējošais līdzeklis);12
  + ja laboratorija *paraugā* konstatē citas vielas, kas varētu izraisīt steroīdu profila izmaiņas, un ziņo par tām (skat. 1.1. punktu).12,[[14]](#footnote-14)

**1. tabula**. Nosacījumi attiecībā uz ziņošanu par *T* un *E* koncentrāciju un *T*/*E* proporciju

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| ***T* koncentrācija** | ***E* koncentrācija** | ***T*/*E* proporcija** |
| Izmērītais *T* hromatogrāfiskās smailes signāls atbilst *LOQ* vai ir augstāks.  [*T*] ≥ *LOQ*(*T*)  **Ziņo, ka *T* ir izmērīts** | Izmērītais *E* hromatogrāfiskās smailes signāls atbilst *LOQ* vai ir augstāks.  [*E*] ≥ *LOQ*(*E*)  **Ziņo, ka *E* ir izmērīts**. | **Ziņo, ka *T*/*E* ir noteikts** no koriģēta smailes augstuma/laukuma |
| *E* hromatogrāfiskās smailes signāls ir noteikts, taču tas ir zemāks par *LOQ*.  *LOD*(*E*) ≤ [*E*] < *LOQ*(*E*)  **Ziņo, ka *E* ir “-1”**9 |
| *E* hromatogrāfiskās smailes signāls nav noteikts.  [*E*] < *LOD*(*E*)  **Ziņo, ka *E* ir “-2”**9 | **Ziņo, ka *T*/*E* ir *T*/*LOD*(E)**  *Piezīme ADAMS*:  “*T*/*E* proporciju nebija iespējams precīzi izmērīt, jo *E* koncentrācija bija zemāka par pārbaudes metodes noteikšanas spēju.” |
| *T* hromatogrāfiskās smailes signāls ir noteikts, taču tas ir zemāks par *LOQ*.  *LOD*(*T*) ≤ [*T*] < *LOQ*(*T*)  **Ziņo, ka *T* ir “-1”**9 | Izmērītais *E* hromatogrāfiskās smailes signāls atbilst *LOQ* vai ir augstāks.  [*E*] ≥ *LOQ*(*E*)  **Ziņo, ka *E* ir izmērīts** | **Ziņo, ka *T*/*E* ir izmērīts** no koriģēta smailes augstuma/laukuma |
| *E* hromatogrāfiskās smailes signāls ir noteikts, taču tas ir zemāks par *LOQ*.  *LOD*(*E*) ≤ [*E*] < *LOQ*(*E*)  **Ziņo, ka *E* ir “-1”**9 |
| *E* hromatogrāfiskās smailes signāls nav noteikts.  [*E*] < *LOD*(*E*)  **Ziņo, ka *E* ir “-2”**9 | **Ziņo, ka *T*/*E* ir “-1”**  *Piezīme ADAMS*:  “*T*/*E* proporciju nebija iespējams precīzi izmērīt, jo *T* un *E* koncentrāciju nebija iespējams izmērīt.” |
| *T* hromatogrāfiskās smailes signāls nav noteikts.  [*T*] < *LOD*(*T*)  **Ziņo, ka *T* ir “-2”**9 | Izmērītais *E* hromatogrāfiskās smailes signāls atbilst *LOQ* vai ir augstāks.  [*E*] ≥ *LOQ*(*E*)  **Ziņo, ka *E* ir izmērīts** | **Ziņo, ka *T*/*E* ir “-1”**  *Piezīme ADAMS*:  “*T*/*E* proporciju nebija iespējams izmērīt, jo *T* koncentrācija bija zemāka par pārbaudes metodes noteikšanas spēju.” |
| *E* hromatogrāfiskās smailes signāls ir noteikts, taču tas ir zemāks par *LOQ*.  *LOD*(*E*) ≤ [*E*] < *LOQ*(*E*)  **Ziņo, ka *E* ir “-1”**9 | **Ziņo, ka *T*/*E* ir “-1”**  *Piezīme ADAMS*:  “*T*/*E* proporciju nebija iespējams izmērīt, jo *T* un *E* koncentrāciju nebija iespējams izmērīt.” |
| *E* hromatogrāfiskās smailes signāls nav noteikts.  [*E*] < *LOD*(*E*)  **Ziņo, ka *E* ir “-2”**9 | **Ziņo, ka *T*/*E* ir “-2”**  *Piezīme ADAMS*:  “*T*/*E* proporciju nebija iespējams izmērīt, jo gan *T*, gan *E* koncentrācija bija zemāka par pārbaudes metodes noteikšanas spēju.” |

# 3.0. Apstiprināšanas procedūras

*EAAS* eksogēnas ievadīšanas apstiprināšanas procedūras ietver *GC-MS* vai *GC-MS/MS* kvantitatīvu noteikšanu[[15]](#footnote-15) un steroīdu profila *marķiera(-u)* *GC/C/IRMS* analīzi.

Turklāt laboratorija attiecīgi apstiprina maldinošu faktoru esību vai neesību steroīdu profilā, kā aprakstīts 1.1. punktā, *t. i.*, konjugēto(-os) etanola *metabolītu(-us)* (*piemēram*, *EtG*), 5α-reduktāzes inhibitorus (*piemēram*, finasterīdu), ketokonazolu, kā arī mikrobiālās degradācijas pazīmes, cita starpā, piemēram, *T*, *5βAND* vai *5βAND* brīvo formu klātbūtni.

3.1. “*Netipisku [bioloģiskās] pases parametru* apstiprināšanas procedūras (*ATPF*-*CPR*) pieprasījums”

Pēc tam, kad laboratorija *parauga* steroīdu profilu ir paziņojusi *ADAMS*, *parauga* ierakstu salīdzina ar dopinga kontroles anketu (*DCF*), lai pēc tam *parauga* steroīdu profilu varētu iekļaut *ADAMS* *sportista* steroīdu pasē.

Adaptīvais modelis ģenerēs “*ATPF*-*CPR*” paziņojumu, ja, piemērojot adaptīvo modeli, *parauga* *T*/*E* proporcija būs pārmērīgi augsta, salīdzinot ar iepriekšējām *sportista* garengriezuma *T*/*E* vērtībām.

Saņemot par *paraugu* “*ATPF*-*CPR*” paziņojumu, laboratorija veic apstiprināšanas procedūras, izņemot tālāk uzskaitītajos gadījumos.

* + - *APMU*, minot attaisnojošu(-us) iemeslu(-us), rakstveidā iesaka laboratorijai neapstiprināt *parauga* steroīdu profilu. Pamatojumā neveikt *ATPF* apstiprināšanas procedūru var iekļaut šādus elementus:
      * *EtG* klātbūtni *sportista* *paraugā*, kura rezultāti ir līdzīgi iepriekšējiem rezultātiem viņa pasē, kurā ir negatīvi *GC/C/IRMS* rezultāti (kas norāda uz alkohola pārmērīgu lietošanu), vai
      * ja par *paraugu* ir ziņoti vēl citi *AAF*, kuru dēļ, visticamāk, būs jāpiemēro maksimālais sods.

Šādā gadījumā laboratorija atjaunina *ADAMS* ziņojumu par *paraugu*, pievienojot piezīmi, kurā norāda, ka *APMU* ir pieprasījusi neveikt apstiprināšanas procedūru(-as). Arī *APMU* atjaunina *ADAMS* *APMU* ziņojumu, paskaidrojot, kāpēc apstiprināšanas procedūru(-as) nebija nepieciešama(-as).

* Turklāt saistībā ar *ATPF* *GC/C/IRMS* apstiprināšanas procedūra nav obligāta, ja *GC-MS* vai *GC-MS/MS* kvantitatīvajā analīzē *paraugā* nav apstiprināta pārmērīgi augsta *T*/*E* proporcija (skat. 3.5. punktu tālāk). Šādos gadījumus laboratorija ziņo *ADAMS* apstiprinātās steroīdu profila *marķieru* vērtības (skat. 3.6. punktu tālāk), pievienojot piezīmi, kurā norāda, ka *GC/C/IRMS* analīze netika veikta, jo pārmērīgi augsta *T*/*E* proporcija netika apstiprināta.

Adaptīvais modelis noteiks arī citu steroīdu profila proporciju pārmērīgās vērtības (*A*/*T*, *A*/*Etio*, *5αAdiol*/*5βAdiol*, *5αAdiol*/*E*). Tomēr šādos gadījumos laboratorija ar *ADAMS* starpniecību nesaņems “*ATPF*-*CPR*” paziņojumu. Toties sportista [bioloģiskās] pases pārvaldības struktūrvienība (*APMU*) ieteiks pārbaudes iestādei, vai *paraugam* ir jāveic apstiprināšanas procedūras. Tāpēc šajos gadījumos laboratorija pārbaudes iestādes pieprasījumu saņems pirms apstiprināšanas procedūras(-u) izpildes sākuma.[[16]](#footnote-16)

## 3.2. “Aizdomīga steroīdu profila apstiprināšanas procedūras (*SSP*-*CPR*) pieprasījums”

Laboratorija ar *ADAMS* starpniecību saņems “*SSP-CPR*” paziņojumu šādos gadījumos:

1) *paraugs* atbilst *ADAMS* ievietotajai *DCF*, taču *ADAMS* nav *sportista* steroīdu pases (*t. i.*, tas ir pirmais *paraugs* *sportista* steroīdu pasē), vai

četrpadsmit (14) kalendārajās dienās pēc dienas, kad *paraugs* saņemts laboratorijā, *ADAMS* nevar atrast *parauga* atbilstību *DCF*, un tāpēc nevar apstrādāt *parauga* steroīdu profilu, izmantojot adaptīvo modeli *ADAMS*,

un

2) *parauga* steroīdu profils atbilst **jebkuram** no šiem kritērijiem:

* + *T*/*E* proporcija (kas aprēķināta no koriģētiem hromatogrāfiskās smailes laukumiem vai augstumiem) ir lielāka par 4,0;
  + *A*/*T* proporcija ir mazāka par 20;
  + *5αAdiol*/*5βAdiol* proporcija ir lielāka par 2,4;
  + *T* vai *E* koncentrācija (pielīdzināta atbilstīgi *SG*7, [[17]](#footnote-17)) ir augstāka par 200 ng/ml vīriešiem vai augstāka par 50 ng/ml sievietēm;
  + *A* vai *Etio* koncentrācija (pielīdzināta atbilstīgi *SG*7, 17) ir augstāka par 10 000 ng/ml;
  + *5αAdiol* koncentrācija (pielīdzināta atbilstīgi *SG*7, 17) ir augstāka par 250 ng/ml vīriešiem vai augstāka par 150 ng/ml sievietēm, un to apvieno ar *5αAdiol*/*E* proporciju, kas abiem dzimumiem ir lielāka par 10.
* Pēc “*SSP-CPR*” paziņojuma saņemšanas laboratorija veic apstiprināšanas procedūru(-as), izņemot gadījumus, kad pēc sazināšanās ar pārbaudes iestādi pārbaudes iestāde septiņās (7) kalendārajās dienās var pamatot, ka apstiprināšanas procedūra(-as) nav nepieciešama(-as). Pamatojumā neveikt apstiprināšanas procedūru var iekļaut, piemēram, dabiski paaugstinātu *T*/*E* proporciju, kas apstiprināta iepriekšējā analītiskajā pārbaudē, vai *T*/*E* proporciju diapazonā no 4,0 līdz 6,0, kas iegūta *sportista* pirmajā pārbaudē, vai gadījumu, kad attiecībā uz *paraugu* ir ziņots par vēl citiem *AAF*, kuru dēļ, visticamāk, būs jāpiemēro maksimālais sods.
* Ja pārbaudes iestāde pamato, ka apstiprināšana nav nepieciešama, laboratorija *ADAMS* atjaunina ziņojumu par *paraugu*, pievienojot piezīmi, kurā norāda, ka pārbaudes iestāde ir konstatējusi, ka apstiprināšanas procedūra(-as) nav nepieciešama(-as), un izklāsta pārbaudes iestādes sniegto paskaidrojumu. Ja pārbaudes iestāde nepamato, ka apstiprināšana nav nepieciešama, laboratorija veic apstiprināšanas analīzes.

Ja laboratorija saņem “*ATPF*-*CPR*” vai “*SSP-CPR*” par diviem (2) vai vairākiem *paraugiem*, kas vienā *paraugu* savākšanas procesā ir savākti no viena *sportista*, laboratorija, apspriežoties ar pārbaudes iestādi, par prioritāti nosaka tā *parauga* apstiprināšanu, kurā ir visaugstākais steroīdu profila *marķieru* koncentrācijas līmenis.

Ja laboratorija saņem “*ATPF*-*CPR*” vai “*SSP-CPR*” attiecībā uz *paraugu*, par kuru *AAF* ir ziņoti saistībā ar citu(-ām) *aizliegto(-ajām) vielu(-ām)* vai *metodi(-ēm)*, laboratorijai ir jāapspriežas ar pārbaudes iestādi par iespēju veikt steroīdu profila *marķieru* apstiprināšanas procedūras.

## 3.3. Apstiprināšanas procedūras pieprasījums no *APMU*, pārbaudes iestādes vai *WADA*

Steroīdu profila apstiprināšanas procedūras *paraugiem* var veikt arī pēc *APMU*, pārbaudes iestādes vai *WADA* pieprasījuma.

Turklāt laboratorijai var būt noslēgta līgumiska vienošanās ar pārbaudes iestādi par apstiprināšanas procedūras veikšanu gadījumos, kad *paraugs* atbilst jebkuram no “aizdomīga steroīdu profila” analītiskajiem kritērijiem vai kad laboratorija ir pieņēmusi lēmumu, pamatojoties uz savu kompetenci. Šādos apstākļos laboratorija “aizdomīga steroīdu profila” apstiprināšanu var sākt nekavējoties, negaidot līdz “*ATPF*-*CPR*” vai “*SSP-CPR*” saņemšanai ar *ADAMS* starpniecību.

## 3.4. *GC-MS* vai *GC-MS/MS* kvantitatīvās noteikšanas apstiprināšanas procedūra

Laboratorija identificē (atbilstīgi izklāstam *TD IDCR* [6]) un kvantitatīvi nosaka visus steroīdu profila *marķierus* vienā papildu *parauga* alikvotā, izmantojot validētu nolūkam atbilstīgu *GC-MS* vai *GC-MS/MS* kvantifikācijas metodi.

Pirms *GC/C/IRMS* analīzes uzsākšanas laboratorija kvantitatīvi apstiprina visus steroīdu profila *marķierus*.

3.4.1. *GC-MS* vai *GC-MS/MS* kvantitatīvās noteikšanas apstiprināšanas procedūras metodes raksturlielumi

Piemēro tās pašas analītiskās prasības, kas izklāstītas 2.1. punktā, piemērojot šādas izmaiņas:

* + - * cietās fāzes ekstrakciju (*SPE*) veic pirms *parauga* enzimātiskās hidrolīzes;
      * iekļauj kalibrēšanas standartus un urīna *QC* paraugus, kas satur reprezentatīvus steroīdu profila *marķieru* līmeņus;
      * *uc* (%) *A*, *Etio*, *5αAdiol* un *5βAdiol* noteikšanai nedrīkst būt lielāka par 15 % koncentrācijā, kas atbilst pieckārtīgai attiecīgajai *LOQ*;
      * lai noteiktu *T*, *E* un *T*/*E* proporcijas, *uc* (%) nedrīkst būt lielāka par 15 %, ja *T* un *E* koncentrācija ir augstāka par 5 ng/ml.

## 3.5. *GC/C/IRMS* apstiprināšanas procedūra

*GC/C/IRMS* apstiprināšanas procedūras tehniskās prasības un ziņošanas prasības ir izklāstītas *TD IRMS* [1].

* + - *ATPF*-*CPR* gadījumā *GC/C/IRMS* analīze nav obligāta, ja apstiprinātā *T*/*E* vērtība ir zemāka par *T*/*E* apstiprināšanas robežu, kas aprēķināta, izmantojot adaptīvo modeli, un ir norādīta *ATPF-CPR* paziņojumā, kas saņemts no *ADAMS*.
    - Citu apstiprināšanas procedūras pieprasījumu gadījumā (*t. i.*, *SSP-CPR* vai pēc *APMU*/pārbaudes iestādes/*WADA* pieprasījuma), ja kvantitatīvā *GC-MS* vai *GC-MS/MS* apstiprināšanas procedūra neapstiprina vērtības, kas paziņotas pēc sākotnējās pārbaudes procedūras (ņemot vērā mērījuma paplašināto nenoteiktību), laboratorija apspriežas ar pārbaudes iestādi, lai noteiktu, vai *GC/C/IRMS* analīze ir nepieciešama. Šādos gadījumos pārbaudes iestāde apspriežas ar organizācijas, kas atbild par pasi, *APMU*, lai novērtētu, vai *GC/C/IRMS* analīze joprojām ir nepieciešama. Ja uzskata, ka *GC/C/IRMS* analīze nav nepieciešama, laboratorija atjaunina *ADAMS* ziņojumu par *paraugu*, ievadot jaunās apstiprinātās steroīdu profila vērtības, un pievieno piezīmi, kurā norāda, ka *GC/C/IRMS* analīze nebija nepieciešama. *APMU* atjaunina arī *APMU* ziņojumu *ADAMS*, paskaidrojot, kāpēc *GC/C/IRMS* apstiprināšanas procedūra nebija nepieciešama.

## 3.6. Ziņošana par apstiprināšanas procedūras rezultātiem

Pēc “A” vai “B” *parauga[[18]](#footnote-18)* apstiprināšanas procedūras(-u) izpildes laboratorija paziņo *ADAMS*:

* + - *parauga* *SG*7 (kas noteikts attiecīgi “A” vai “B” *parauga* jaunajai alikvotai);
    - apstiprinātās steroīdu profila *marķieru* vērtības (*piemēram*, koncentrācijas vērtības, *T*/*E* proporcija), neveicot pielīdzināšanu *parauga* *SG*;8, 9, 11
    - saistīto *uc*, kas izteikta mērvienībās;
    - *GC/C/IRMS* apstiprināšanas rezultātus, ja tie ir noteikti (skat. 3.5. punktu un *TD IRMS* [1]);
    - apstiprinātos mikrobioloģiskā piesārņojuma pazīmju rezultātus (*piemēram*, *5αAND*/*A*, *5βAND*/*Etio*, *Tfree* / *Ttotal*[[19]](#footnote-19));
    - apstiprinātu etanola, 5α-reduktāzes (*piemēram*, finasterīda) inhibitoru, ketokonazola konjugētā(-o) *metabolīta(-u)* vai citu vielu esību vai neesību, kas attiecīgi varētu būt mainījušas steroīdu profilu. Laboratorija ziņo par apstiprinātajiem aprēķinātajiem līmeņiem, ja tie pārsniedz 5 μg/ml (nepaziņojot šā noteiktā rezultāta mērījuma nenoteiktību).

Pēc steroīdu profila apstiprināšanas laboratorija atjaunina *ADAMS* *parauga* pārbaudes rezultāta ierakstu (kā *AAF*, *ATF* vai “Negatīvs”), pamatojoties uz rezultātiem, kas saskaņā ar *TD IRMS* [1] iegūti *GC/C/IRMS* apstiprināšanas procedūrā, ja tā ir veikta).

3.7. Papildu analīzes: steroīdu esteris(-i) un DNS

Ja vienādi asins *paraugi* ir savākti tajā pašā paraugu savākšanas procesā, kad savākti urīna *paraugi*, kuros identificēts netipisks vai aizdomīgs steroīdu profils, laboratorijām, apspriežoties ar pārbaudes iestādi, jāapsver iespēja veikt analīzi, lai saistītajā serumā/plazmā noteiktu steroīdu estera(-u) klātbūtni.

Analīzes steroīdu estera(-u) klātbūtnes apstiprināšanai serumā/plazmā ir ieteicams veikt pirms urīna *GC/C/IRMS* analīzes. Steroīdu estera(-u) klātbūtnes noteikšana serumā/plazmā arī ir uzskatāma par nepārprotamu steroīda(-u) eksogēnas izcelsmes pierādījumu. Turpretim nosakāma steroīdu estera(-u) neesība serumā/plazmā neatceļ *AAF*, kas iegūts, veicot urīna *GC/C/IRMS* analīzi.

Var apsvērt arī iespēju veikt DNS analīzi, lai saistībā ar *sportista* “steroīdu garenprofilu” noteiktu *parauga(-u)* izcelsmi.

# 4.0. Atsauces

1. *WADA* Technical Document TD IRMS (current version): Detection of synthetic forms of Endogenous Anabolic Androgenic Steroids by GC/C/IRMS.

https://www.wada-ama.org/en/resources/search?f[0]=field\_resource\_collections%3A30

2. Mareck U, Geyer H, Opfermann G, Thevis M, Schänzer W. Factors influencing the steroid profile in doping control analysis. *J Mass Spectrom*. **43**(7):877-91, 2008.

3. Ayotte C. Detecting the administration of endogenous anabolic androgenic steroids.

*Handb Exp Pharmacol.* **195**:77-98, 2010.

4. Kuuranne T, Saugy M, Baume N. Confounding factors and genetic polymorphism in the evaluation of individual steroid profiling. *Br J Sports Med*. **48**(10):848-55, 2014.

5. J D Cook, Caplan YH, LoDico CP un Bush DM. The Characterization of Human Urine for Specimen Validity Determination in Workplace Drug Testing: A Review. *J Anal Toxicol* **24**: 579-588, 2000

6. *WADA* Technical Document TD IDCR (current version): Minimum Criteria for Chromatographic-Mass Spectrometric Confirmation of the Identity of Analytes for Doping Control Purposes.

https://www.wada-ama.org/en/resources/search?f[0]=field\_resource\_collections%3A30

1. ## *T* un *E* daudz mazākā koncentrācijā parasti ir sastopami sieviešu *paraugos* un *paraugos*, kuru *SG* ir zems; tāpēc, lai iegūtu precīzāku mērījumu, iespējams, vajadzēs lielāku alikvotas daudzumu.

   [↑](#footnote-ref-1)
2. *T* un *E* smailes augstumu vai smailes laukumus koriģē, salīdzinot ar kalibratoru vai kalibrēšanas līkni (abiem steroīdiem pārbaudē konstatēta vienāda masa vai vienāda jonu pāreja). [↑](#footnote-ref-2)
3. ## Steroīdu profila *marķieru* *LOQ* nosaka kā zemāko koncentrāciju, ko var izmērīt *uc* (%) 30 % robežās.

   *LOQ*, kas noteikta, veicot metodes validāciju attiecībā uz *T*, *E*, *A*, *Etio*, 5*αAdiol* un *5βAdiol*, laboratorija reģistrē *ADAMS*. *LOQ* vērtības *ADAMS* atjaunina vienmēr, kad analītiskajai metodei ir veiktas būtiskas izmaiņas. [↑](#footnote-ref-3)
4. Urīna *paraugu* tiešā enzimātiskā hidrolīze var palielināt mikrobioloģiskā piesārņojuma ietekmi. [↑](#footnote-ref-4)
5. ## Tas attiecas arī uz gadījumiem, kad analizē vairāk nekā vienu (1) *paraugu*, kas iegūts no viena *sportista* vienā paraugu savākšanas procesā.

   [↑](#footnote-ref-5)
6. Laboratorija ziņo *ADAMS* *parauga* steroīdu profilu, kas noteikts sākotnējās pārbaudes procedūrā, ja *paraugā* nav konstatēta *aizliegtā viela* vai *aizliegtā metode* [ziņojot, ka pārbaudes rezultāts ir negatīvs], kā arī gadījumos, kad laboratorija apstiprina *aizliegtās vielas* vai *aizliegtās metodes* klātbūtni [ziņojot, ka attiecībā uz noteikto *aizliegto vielu* vai *aizliegto metodi* rezultāts ir vai nu *nelabvēlīgs analīžu rezultāts (AAF)*, vai *netipiska atrade (ATF)*]. [↑](#footnote-ref-6)
7. ## Ko laboratorija noteikusi, izmantojot, piemēram, refraktometru.

   [↑](#footnote-ref-7)
8. Ziņojot par steroīdu profilu *ADAMS*, laboratorija paziņo *T*, *E*, *A*, *Etio*, *5αAdiol* un *5βAdiol* koncentrāciju vērtības, kā arī *T*/*E* proporciju (**neveicot pielīdzināšanu atbilstīgi urīna *SG* vai neveicot korekciju līdz noteiktam skaitam nozīmīgo skaitļu**). Paziņoto vērtību automātiska korekcija līdz 2 nozīmīgajiem skaitļiem tiks veikta *ADAMS*, piemērojot *ABP* adaptīvo modeli. [↑](#footnote-ref-8)
9. ## Ja, piemēram, atšķaidījuma, neraksturīgu matricas traucējumu, enzimātiskās hidrolīzes inhibīcijas vai nepilnīgas atvasināšanas dēļ sākotnējās pārbaudes procedūrā steroīdu profila *marķieri* nav iespējams izmērīt, laboratorijai ir jāatkārto analīze, izmantojot alternatīvu, validētu *parauga* sagatavošanas procedūru (*piemēram*, veicot *parauga* koncentrāciju vai izmantojot lielākus alikvotu tilpumus, veicot cietās fāzes ekstrakciju, ekstrakciju, izmantojot citu šķīdinātāju, vai piemērojot citu līdzvērtīgu procedūru). Tomēr, ja steroīdu profila *marķiera* daudzumu nav iespējams noteikt, ziņo, ka *marķiera* koncentrācija ir “-1”. Ja *marķiera* hromatogrāfiskās smailes signālu nav iespējams noteikt (*t. i.*, tas ir zemāks par pārbaudes metodes noteikšanas spēju), ziņo, ka *marķiera* koncentrācija ir “-2” (skat. 1. tabulu).

   [↑](#footnote-ref-9)
10. Laboratorija pēc pārbaudes iestādes, rezultātu pārvaldības iestādes vai *APMU* lūguma var sniegt arī informāciju par citiem steroīdu parametriem, piemēram, par dihidrotestosteronu (*DHEA*) un 6α-hidroksi-androstenedionu. [↑](#footnote-ref-10)
11. ## *A*/*T*, *A*/*Etio*, *5αAdiol*/*5βAdiol* un *5αAdiol*/*E* proporcijas tiek automātiski aprēķinātas *ADAMS* pēc tam, kad laboratorija ir paziņojusi steroīdu profilu.

    [↑](#footnote-ref-11)
12. *Paraugs*, kuram ir konstatētas mikrobiālās degradācijas pazīmes vai kurā ir kāda no vielām, kas var izraisīt steroīdu profila izmaiņas (skat. 1.1. punktu), nevar būt piemērots iekļaušanai “steroīdu garenprofilā”. Šos rezultātus izvērtē *APMU* rezultātu pārvaldības procesā, izvērtējot *parauga* analītiskos datus un novērtējot iespējamos patoloģiskos vai maldinošos apstākļus, kas varēja ietekmēt *parauga* steroīdu profilu. [↑](#footnote-ref-12)
13. ## Turklāt pēc tam, kad laboratorija steroīdu profilu ir paziņojusi *ADAMS*, *APMU* pēc steroīdu profila datu izvērtēšanas var novērtēt *paraugu* kā “nederīgu”, piemēram, ņemot vērā tādu vielu klātbūtni, kuras var izmainīt *parauga* steroīdu profilu.

    [↑](#footnote-ref-13)
14. ## Laboratorijai sākotnējās pārbaudes procedūrā obligāti ir jāpārbauda vismaz etanola konjugētā(-o) *metabolīta(-u)* [*piemēram*, etanola glikuronīda (*EtG*)], 5α-reduktāzes un ketokonazola inhibitoru klātbūtne un jāziņo, ja aprēķinātā *EtG* ir augstāka par 5 μg/ml (par mērījuma nenoteiktību nav jāziņo).

    [↑](#footnote-ref-14)
15. ## Attiecībā uz *T*/*E* vērtībām ir jāapstiprina tikai *T*, ja *E* koncentrācijas līmeņi vai *parauga* tilpums nav pietiekami.

    [↑](#footnote-ref-15)
16. ## Ja to paredz laboratorijas un pārbaudes iestādes vienošanās.

    [↑](#footnote-ref-16)
17. ## Koncentrācijas vērtības pielīdzina atbilstīgi urīna *SG*7 1,020, izmantojot šādu vienādojumu (brīvie un hidrolizētie glikurokonjugētie steroīdi):

    ***Conccorr* = *Concmeasured* \* (1,020 – 1)/(*SG* – 1)** [↑](#footnote-ref-17)
18. Ja, pamatojoties uz “A” *parauga* *GC/C/IRMS* analīzes rezultātiem, attiecībā uz steroīdu profila *marķieri(-iem)* ir ziņots par *AAF*, *GC/C/IRMS* analīzi atkārto tikai “B” *parauga* apstiprināšanas procedūrā, ja tādu piemēro. Skat. *TD IRMS* [1]. [↑](#footnote-ref-18)
19. Papildus *5αAND*/*A* un *5βAND*/*Etio* proporciju noteikšanai, kas apliecina mikrobioloģisko piesārņojumu, kā aprakstīts 2.2.1. punktā par sākotnējās pārbaudes procedūru, apstiprināšanas procedūrā noteikta paaugstināta brīvā testosterona attiecība pret kopējo testosterona daudzumu (*Tfree* / *Ttotal* > 0,05) arī padarīs nederīgu *paraugu* (*parauga* steroīdu profilu). [↑](#footnote-ref-19)