***WADA* tehniskais dokuments – *TD2019NA***

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Dokumenta numurs: | TD2019NA | Versijas numurs: | 1.0 |
| Sarakstījusi: | *WADA* laboratoriju ekspertu grupa | Apstiprinājusi: | *WADA* izpildkomiteja |
| Apstiprināšanas datums: | 2018. gada 14. novembris | Spēkā stāšanās diena: | 2019. gada 1. marts |

**AR NANDROLONU SAISTĪTU 19-NORSTEROĪDU ANALĪZES UN ZIŅOŠANAS SASKAŅOŠANA**

**1.0. Ievads**

Šis dokuments ir izveidots, lai saskaņotu apstiprināšanas procedūru, ko laboratorijas piemēro, lai analizētu ar nandrolonu saistītu 19-norsteroīdu atrades un ziņotu par tām.

Nandrolona (19-nortestosterona) un citu 19-norsteroīdu (*piemēram*, 19-norandrostēndiona, 19-norandrostēndiola) *lietošanu* galvenokārt nosaka, identificējot galveno urīna *metabolītu* – 19-nortestosteronu (*19-NA*). Urīna *paraugos* var noteikt vairāk nekā vienu ievadītu 19-norsteroīdu *metabolītu* un par tiem ziņot [*piemēram*, 19-noretioholanolonu (*19-NE*)]; tomēr *19-NA* identificēšana, nepieciešamības gadījumā pierādot arī, ka *19-NA* nav endogēnas izcelsmes[[1]](#footnote-1), ir pietiekama, lai ziņotu par *nelabvēlīgu analīžu rezultātu* (*AAF*).

Īpašos apstākļos, kas izklāstīti tālāk, iespējams, būs nepieciešama papildu analītiskā pārbaude.

# 2.0. Sākotnējās pārbaudes procedūra

Lai sniegtu norādījumus apstiprināšanas procedūras veikšanai, sākotnējā pārbaudē urīna *paraugos* ir jānosaka *19-NA* klātbūtne koncentrācijā, kas augstāka par 1 ng/ml, un jānorāda aprēķinātais koncentrācijas līmenis, ja tas ir 15 ng/ml vai zemāks. Sākotnējās pārbaudes procedūrā iekļauj šādus rādītājus:

* vienu kalibrēšanas punktu 15 ng/ml līmenī;
* piemērotu, ar deitēriju iezīmētu iekšējo standartu;
* negatīvu un pozitīvu kvalitātes kontroles (*QC*) paraugu izmantošanu.

# 3.0. Apstiprināšanas procedūras

Papildus tehniskajā dokumentā *IDCR* [1] aprakstīto identifikācijas kritēriju izpildei laboratorija apstiprina aprēķināto *19-NA* koncentrāciju un/vai veic *GC/C/IRMS* analīzi, lai noteiktu konstatētā *19-NA* izcelsmi (endogēna**1** vai eksogēna).

3.1. Koncentrācijas noteikšana un aprēķināšana

Apstiprināšanas procedūrā, ko veic, lai aprēķinātu *19-NA* koncentrāciju *paraugā*, iekļauj šādus raksturlielumus:

* + - vienu kalibrēšanas punktu 15 ng/ml līmenī, vēlams, izmantojot *19-NA* koncentrāciju, kuras pamatā ir sertificēts atsauces materiāls vai kuru var izsekot pēc šā materiāla;
		- piemērotu, ar deitēriju iezīmētu iekšējo standartu (*piemēram*, 19-NA-d4-glikuronīdu);
		- negatīvā *QC* parauga izmantošanu (kurā koncentrācija ir zemāka par 2,5 ng/ml) un pozitīvā *QC* parauga izmantošanu (kurā koncentrācija ir augstāka par 15 ng/ml).

## 3.2. *GC/C/IRMS* analīze

Identificētā *19-NA* izcelsmes noteikšanai piemērojot *GC/C/IRMS* metodi, iekļauj tālāk uzskaitītos raksturlielumus (metodes vispārīgos raksturlielumus skat. arī *TD IRMS* [2]).

* + - Katrā *GC/C/IRMS* analīzes virknē iekļauj:
			* negatīvu urīna *QC*: *19-NA* un endogēna atsauces savienojuma (*ERC*) δ13C vērtības ir normālā endogēnā diapazonā (*t. i.*, no -16 ‰ līdz -26 ‰)[[2]](#footnote-2), kur *ERC* un *19-NA* δ13C vērtību absolūtā starpība (∆δ) nav lielāka par (≤) 3 ‰, un
			* pozitīvu urīna *QC*: *ERC* vērtība δ13C ir normālā endogēnā diapazonā (*t. i.*, no -16‰ līdz -26 ‰), kur *ERC* un *19-NA* absolūtā starpība ∆δ ir lielāka par 3 ‰.

Šīm kontrolēm piemēro to pašu parauga sagatavošanas procedūru, ko piemēro *parauga* alikvotai.

* + - *GC/C/IRMS* analīzē iekļauj *19-NA* smailes identitātes apstiprinājumu[[3]](#footnote-3).

*GC/C/IRMS* analīzi veic šādos gadījumos:[[4]](#footnote-4)

* *paraugiem*, kuros *19-NA* koncentrācija ir aprēķināta diapazonā no 2,5 līdz 15 ng/ml[[5]](#footnote-5), izņemot grūtniecības vai tetrahidronoretisterona klātbūtnes gadījumus;
* grūtniecības gadījumos, ja aprēķinātā *19-NA* koncentrācija ir lielāka par 15 ng/ml.**5**, [[6]](#footnote-6)

*GC/C/IRMS* analīzes var veikt arī *paraugiem*, kuros aprēķinātā *19-NA* koncentrācija nav lielāka par 2,5 ng/ml. Šādos gadījumos pozitīva *GC/C/IRMS* analīze, kas norāda uz *19-NA* eksogēno izcelsmi, ir pietiekams pierādījums, lai ziņotu par *AAF*.

Laboratorijas, kurām nav pietiekamu analītisko spēju, lai veiktu *19-NA* *GC/C/IRMS* analīzi, nosūta *paraugus* analīzei uz citu laboratoriju, kurai ir šādas analītiskās spējas.

Tā kā ir sastopami tādi 19-norsteroīdu preparāti, kuriem ir oglekļa izotopiskais sastāvs (13C/12C), kas ir gandrīz identisks endogēnajiem cilvēka urīna steroīdiem (*piemēram*, δ*19-NA* = -20 ‰ līdz -24 ‰), iegūtā *19-NA* *GC/C/IRMS* analīzes rezultāts dažām *sportistu* grupām var arī nenorādīt uz tā eksogēnu izcelsmi. Tāpēc, ja *paraugos*, kas iegūti no vīriešiem un sievietēm, kuras nav grūtnieces, aprēķinātā *19-NA* koncentrācija ir lielāka par 2,5 ng/ml un *GC/C/IRMS* analīzes rezultāts ir negatīvs (*t. i.*, neatbilst eksogēnai *19-NA* izcelsmei) vai nepārliecinošs, laboratorija nosaka *19-NA* un *19-NE* attiecību, pamatojoties uz salīdzinošajiem *GC/MS* analīzes signāliem.[[7]](#footnote-7) Šo attiecību var izmantot kā iespējamo rādītāju, kas apliecina 19-norsteroīdu ievadīšanu, izslēdzot *19-NA* *in-situ* veidošanos [3].

## 3.3. Papildu pārbaudes

3.3.1. Noretisterona un grūtniecības pārbaude

*19-NA* izdalās grūtniecības laikā un kā maznozīmīgs atļautas progestogēna aktīvās vielas noretisterona *metabolīts* [4] ir sastopams dažos orālās kontracepcijas līdzekļos. Tāpēc, ja *sportistes* urīna *paraugā* aprēķinātā *19-NA* koncentrācija pārsniedz 2,5 ng/ml, laboratorija veic:

* + analīzi, lai noteiktu kontracepcijas līdzekļu uz noretisterona bāzes lietošanu (*piemēram*, nosaka tetrahidronoretisteronu), un negatīva rezultāta gadījumā –
	+ veic analīzi, lai noteiktu grūtniecību [*piemēram*, pamatojoties uz cilvēka horionu gonadotropīna (*hCG*) mērījumu urīnā.

3.3.2. Demetilēšanas pārbaude

Turklāt retos gadījumos *19-NA* var veidoties nelielās koncentrācijās urīna *paraugos*, veicot androsterona (*A*) *in-situ* 19-demetilēšanu [5]. Tā kā reakcija ir efektīvāka, izmantojot 5β-izomēru (*t. i.*, *19-NE*), šādos *paraugos* *19-NA* un *19-NE* attiecība ir zemāka nekā parasti (*t. i.*, ≤ 3), kas ir arī mazāka nekā to attiecīgo urīna prekursoru androsterona (*A*)/etioholanolona (*Etio*) attiecība.[[8]](#footnote-8) Šo iespējamo *19-NA* *in-situ* veidošanos var pārbaudīt, veicot *GC/C/IRMS* analīzi [3, 6].

3.3. “B” *parauga* apstiprināšanas procedūra

* + - Ja “A” *parauga* *AAF* ir pamatots ar *GC/C/IRMS* analīzes rezultātiem, arī “B” *parauga* apstiprināšanas procedūrā ir jāveic *GC/C/IRMS* analīze (un *19-NA* identifikācija).
		- Ja *paraugā*, kas savākts no *sportista* vai *sportistes*, kas nav grūtniece, aprēķinātā *19-NA* koncentrācija ir uzrādīta lielāka nekā 15 ng/ml, “B” *parauga* apstiprināšanas procedūrā ir jāveic tikai *19-NA* identifikācija.

**4.0. Ziņošana**

Laboratorija par *sportista* vai *sportistes paraugā* noteikto *19-NA* ziņo, kā izklāstīts tālāk.

**A. *Paraugi*, kas iegūti no *sportistēm* grūtniecēm**

**Jebkurā gadījumā par *sportistes* grūtniecības stāvokli nav jāziņo.**

* + *Nelabvēlīgs analīžu rezultāts (AAF):*
		- *paraugi*, kuru *GC/C/IRMS* analīzes rezultāti atbilst eksogēnai *19-NA* izcelsmei (skat. 3.2. punktu iepriekš).**4**

[Aprēķināto *19-NA* koncentrāciju[[9]](#footnote-9)un *GC/C/IRMS* analīzes rezultātus[[10]](#footnote-10)iekļauj pārbaudes ziņojumā.]

* + *Netipiska atrade* (*ATF*):
		- *paraugi*, kuros aprēķinātā *19-NA* koncentrācija ir lielāka par (>) 15 ng/ml**5** un obligātās *GC/C/IRMS* analīzes rezultāti ir nepārliecinoši vai atbilst endogēnai *19-NA* izcelsmei (skat. 3.2. punktu iepriekš).**4**

[Aprēķināto *19-NA* koncentrāciju**9** un *GC/C/IRMS* analīzes rezultātus**10** iekļauj pārbaudes ziņojumā.]

* + “Pārbaudes izvēlnē netika konstatēta neviena *aizliegtā viela* vai *metode*”:
		- *paraugā* netika apstiprināta neviena *aizliegtā viela* vai *aizliegtā metode* un
		- *paraugi*, kuros aprēķinātā *19-NA* koncentrācija ir (≤) 15 ng/ml vai mazāka**5** un obligātās *GC/C/IRMS* analīzes vai nu netika veiktas, vai to rezultāti ir nepārliecinoši/atbilst endogēnai *19-NA* izcelsmei (skat. 3.2. punktu iepriekš).**4**

**B. *Paraugi*, kas iegūti no *sportistēm*, kuras lieto noretisteronu**

* + *Netipiska atrade* (*ATF*):
		- *paraugi*, kuros *19-NA* koncentrācija ir aprēķināta lielāka par (>) 10 ng/ml.**5**

[Aprēķināto *19-NA* koncentrāciju**9** iekļauj pārbaudes ziņojumā. Papildus pievieno piezīmi, kurā apraksta atradi, kas pierāda noretisterona lietošanu[[11]](#footnote-11) (*piemēram*, “*paraugā* tika atrasts 19-norandrosterons (*19-NA*), kura aprēķinātā koncentrācija ir lielāka par (>) 10 ng/ml. *Paraugā* tika atrasts arī noretisterona *metabolīts* tetrahidronoretisterons.”)]

* + “Pārbaudes izvēlnē netika konstatēta neviena *aizliegtā viela* vai *metode*”:
		- *paraugā* netika apstiprināta neviena *aizliegtā viela* vai *aizliegtā metode* un
		- *paraugi*, kuros *19-NA* koncentrācija ir (≤) 10 ng/ml vai mazāka.**5**

[**Šajā gadījumā pārbaudes ziņojumā norādi uz noretisterona lietošanu neiekļauj.**]

**C. *Paraugi*, kas iegūti no *sportistēm* (kuras nav grūtnieces un nelieto noretisteronu)**

* + *Nelabvēlīgs analīžu rezultāts (AAF):*
		- *paraugi*, kuros aprēķinātā *19-NA* koncentrācija ir lielāka par (>) 15 ng/ml.**5**

[Aprēķināto *19-NA* koncentrāciju**9** iekļauj pārbaudes ziņojumā. Turklāt attiecībā uz *sportistēm* pievieno piezīmi, kurā paskaidro, ka ir izslēgta grūtniecība un noretisterona lietošana (*piemēram, “19-NA atrade neatbilst grūtniecībai vai noretisterona lietošanai”*)];

* + - *paraugi*, kuros aprēķinātā 19-NA koncentrācija ir (≤) 15 ng/ml vai mazāka**5** un *GC/C/IRMS* analīzes rezultāti ir nepārliecinoši vai atbilst eksogēnai *19-NA* izcelsmei (skat. 3.2. punktu iepriekš)**4**.

[Aprēķināto *19-NA* koncentrāciju**9** un *GC/C/IRMS* analīzes rezultātus**10** iekļauj pārbaudes ziņojumā. Turklāt attiecībā uz *sportistēm* pievieno piezīmi, kurā paskaidro, ka tika izslēgta noretisterona lietošana (*piemēram, “19-NA atrade neatbilst noretisterona lietošanai”*).]

* + *Netipiska atrade* (*ATF*):
		- *paraugi*, kuros aprēķinātā *19-NA* koncentrācija ir (≤) 15 ng/ml vai mazāka**5** un *GC/C/IRMS* analīzes rezultāti ir nepārliecinoši vai atbilst endogēnai *19-NA* izcelsmei (skat. 3.2. punktu iepriekš)**4** un *19-NA* attiecība pret *19-NE* ir lielāka par (>) 3.

[Aprēķināto *19-NA* koncentrāciju**9**, *GC/C/IRMS* analīzes rezultātus**10** un *19-NA* attiecību pret *19-NE* iekļauj pārbaudes ziņojumā. Pievieno piezīmi, kurā paskaidro, ka *GC/C/IRMS* analīzes rezultāti bija nepārliecinoši (*piemēram*, traucējoša(-u) savienojuma(-u) vai jebkādu citu faktoru dēļ, kas traucē iegūt ticamu *GC/C/IRMS* mērījumu), vai bija atbilstīgi endogēnai *19-NA* izcelsmei. Turklāt attiecībā uz *sportistēm* pievieno piezīmi, kurā paskaidro, ka tika izslēgta grūtniecība (*piemēram, “19-NA atrade neatbilst grūtniecībai”*).]

* + “Pārbaudes izvēlnē netika konstatēta neviena *aizliegtā viela* vai *metode*”:
		- *paraugā* netika apstiprināta neviena *aizliegtā viela* vai *aizliegtā metode* un
		- *paraugi*, kuros aprēķinātā *19-NA* koncentrācija ir (≤) 2,5 ng/ml vai mazāka**5** (un ir pārāk zema, lai veiktu *GC/C/IRMS* analīzi);
		- *paraugi*, kuros aprēķinātā *19-NA* koncentrācija ir lielāka par (>) 2,5 ng/ml, bet nepārsniedz (≤) 15 ng/ml**5**, *19-NA* attiecība pret *19-NE* nav lielāka par (≤) 3 un *GC/C/IRMS* analīzes rezultāti atbilst endogēnai (*t. i., in-situ* veidošanās) *19-NA* izcelsmei (skat. 3.2. punktu iepriekš).**4**

# 5.0. Atsauces

1. *WADA* Technical Document TD IDCR: Minimum Criteria for Chromatographic-Mass Spectrometric Confirmation of the Identity of Analytes for Doping Control Purposes.

https://www.wada-ama.org/en/what-we-do/science-medical/laboratories

2. *WADA* Technical Document TD IRMS: Detection of synthetic forms of Endogenous Anabolic Androgenic Steroids by GC/C/IRMS.

https://www.wada-ama.org/en/what-we-do/science-medical/laboratories

3. Guay C, Goudreault D, Schänzer W, Flenker U, Ayotte C. Excretion of norsteroids’ phase II metabolites of different origin in human. *Steroids* 2009; 74: 350-8.

4. Walker CJ, Cowan DA, James VHT, Lau JCY, Kicman AT. Doping in sport—1. Excretion of 19-norandrosterone by healthy women, including those using contraceptives containing norethisterone. *Steroids* 2009; 74: 329-35.

5. Grosse J, Anielski P, Hemmersbach P, Lund H, Mueller RK, Rautenberg C, Thieme D. Formation of 19-norsteroids by *in situ* demethylations of endogenous steroids in stored urine samples. *Steroids* 2005; 70: 499.–506. lpp.

6. Hebestreit M, Flenker U, Fusshöller G, Geyer H, Güntner U, Mareck U, Piper T, Thevis M, Ayotte C, Schänzer W. Determination of the origin of urinary norandrosterone traces by gas chromatography combustion isotope ratio mass spectrometry. *Analyst* 2006; 131:1021-6.

# A pielikums. Shematiskais attēlojums *19-NA* atradēm



1. Šajā tehniskajā dokumentā pieņem, ka *19-NA* “endogēna” izcelsme ir i) zīmes, kas parasti ir atrodamas sieviešu un vīriešu *paraugos*; ii) grūtniecība; iii) androsterona (*A*) *in-situ* mikrobiālā degradācija, pārvēršoties par *19-NA*; iv) veselu, nekastrētu cūku gaļas subproduktu lietošana uzturā. [↑](#footnote-ref-1)
2. δ13C izotopiskā sastāva diapazons pasaulē; *QC* paraugi atspoguļos laboratorijas ģeogrāfisko atrašanās vietu, un tajos nav jāietver viss iespējamais δ13C vērtību diapazons. [↑](#footnote-ref-2)
3. Piemēram, apstiprinājumu, kas iegūts *GC/MS* analīzē, ko veic salīdzināmos hromatogrāfiskos apstākļos. Analīzes mērķis ir iegūt hromatogrammu ar līdzīgiem smailes profiliem, lai spektrus varētu izmantot nepieciešamās(-o) smailes(-ļu) identificēšanai. Abām metodēm var būt nedaudz atšķirīgs izdalīšanas laiks. [↑](#footnote-ref-3)
4. ##  Lai, pamatojoties uz *GC/C/IRMS* analīzes piemērošanu, noraidītu hipotēzi par endogēnu vai *in-situ* *19-NA* veidošanos, vienlaikus ir jāizpilda šādi kritēriji:

i) absolūtā Δδ vērtība diapazonā starp endogēnā atsauces savienojuma (*ERC*) vērtību [*piemēram*, *A* vai pregnanediols (*PD*)] un *19-NA,* *t. i.*, |Δδ| = |δ*ERC* - δ*19-NA*|, ir lielāka par 3 ‰, un

ii) kombinētā standartnenoteiktība (*uc*), kas saistīta ar δ13C vērtību noteikšanu, ko laboratorija aprēķinājusi, veicot *GC/C/IRMS* metodes validāciju, nav lielāka par 1,0 ‰ (*uc\_Max*). [↑](#footnote-ref-4)
5. Pēc pielīdzināšanas atbilstīgi urīna īpatnējajam svaram (*SG*), ja *SGSample*> 1,018, atbilstīgi formulai:



[Norādījumus par *SGSample\_Max* aprēķināšanu skatiet spēkā esošajā *TD DL*]. [↑](#footnote-ref-5)
6. Ja grūtniecības gadījumos aprēķinātā *19-NA* koncentrācija urīna *paraugā* ir diapazonā no 2,5 līdz 15 ng/ml, var veikt arī *GC/C/IRMS* analīzi, lai apstiprinātu *19-NA* endogēno izcelsmi. [↑](#footnote-ref-6)
7. Pieņem, ka *19-NA* un *19-NE* mērījumi ir pietiekami līdzīgi. [↑](#footnote-ref-7)
8. Ja nav 5α-reduktāzes inhibitoru (*piemēram*, finasterīda). [↑](#footnote-ref-8)
9. Veicot *19-NA* apstiprināšanas procedūru, nav jāveic stingra kvantifikācija (un tāpēc mērījuma nenoteiktība nav jāaprēķina). Viens kalibrēšanas punkts 15 ng/ml līmenī un atbilstīgi *QC* paraugi ir pietiekami, lai apstiprinātu aprēķināto *19-NA* koncentrāciju. Rezultātu izsaka kā “≤ 15 ng/ml” vai attiecīgi kā “> 15 ng/ml”. [↑](#footnote-ref-9)
10. Pārbaudes ziņojumā par *GC/C/IRMS* analīzi iekļauj piezīmi, kurā norāda, vai *GC/C/IRMS* rezultāts atbilst vai neatbilst eksogēnai *19-NA* izcelsmei, iekļauj *19-NA* un *ERC* δ13C vērtības, kā arī saistīto *uc*, kas izteikta ‰ vienībās. [↑](#footnote-ref-10)
11. Vai jebkura cita viela, kas ir pārvērsta par noretisteronu un pēc tam metabolizēta par tetrahidronoretisteronu. [↑](#footnote-ref-11)