



# DOPING Assetto normativo

L. 1099/71

Istituisce l'**illecito-doping** ed i **controlli antidoping**.  
Determina le modalità e le competenze istituzionali di controllo. D.M. 5/7/75

L. 833/78

Attribuisce alle **Regioni** la tutela delle attività sportive e dei controlli antidoping

L. 401/89

Introduce **sanzioni penali** per chi altera i risultati delle gare oggetto di scommesse.

L. 522/95

Ratifica della Convezione di Strasburgo sul Doping.  
Obbliga gli Stati aderenti ad osservare la stessa tabella di *Dopanti* (**LISTA CIO**). Emendamento 20/5/99 n.116



**L. 14/12/2000 n. 376**  
***Disciplina della tutela sanitaria delle attività sportive e della lotta contro il doping***

# Legge 14 dicembre 2000, n. 376

- Art. 1** *Tutela sanitaria delle attività sportive  
Divieto di doping*
- Art. 2** *Classi delle sostanze dopanti*
- Art. 3** *Commissione per la vigilanza ed il controllo sul doping e per la tutela della salute nelle attività sportive*
- Art. 4** *Laboratori per il controllo sanitario sull'attività sportiva*
- Art. 7** *Farmaci contenenti sostanze dopanti*
- Art. 9** *Disposizioni penali*



# Legge 376/2000 - art.1

## Doping è



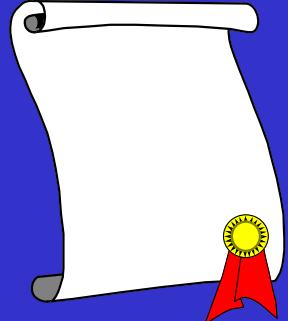
- **Somministrazione di farmaci o di sostanze** biologicamente o farmacologicamente attive e l'adozione o la **sottoposizione a pratiche mediche** non giustificate da condizioni psicofisiche o biologiche dell'organismo al fine di **alterare le prestazioni** agonistiche degli atleti
- **Somministrazione di farmaci o sostanze** biologicamente o farmacologicamente attive e l'adozione di pratiche mediche non giustificate da condizioni patologiche, finalizzate e comunque **idonee a modificare i risultati dei controlli** antidoping



# Legge 376/2000 - art.2

I farmaci , le sostanze e pratiche mediche, il cui impiego è considerato doping, ***sono ripartite in classi*** con decreto del Ministero della salute di concerto con il Ministero per i beni e le attività culturali

# Lista sostanze vietate

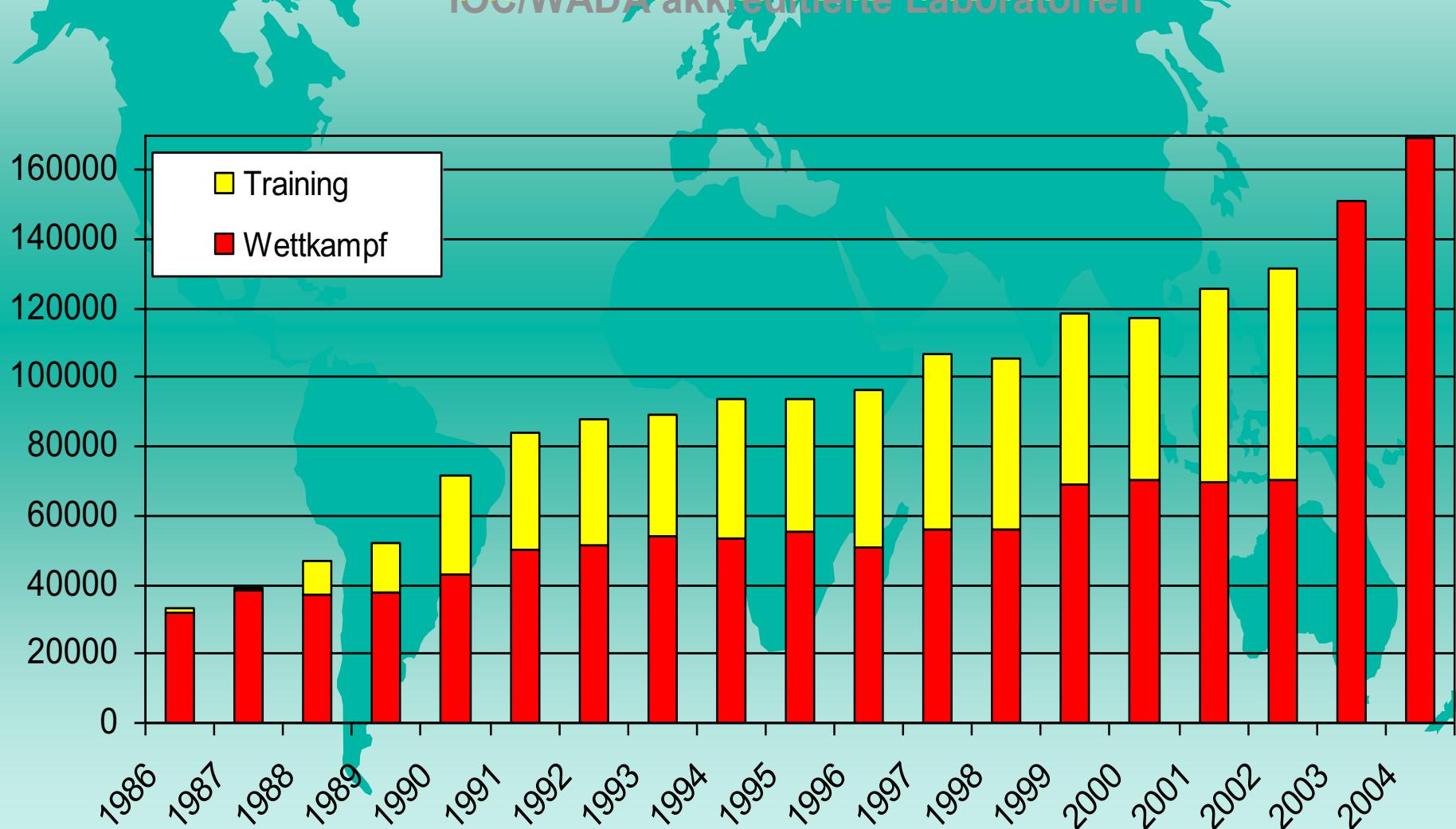


## Criteri e modalità di elaborazione

- *Garantire la certezza della conoscenza e la tutela degli atleti e di coloro che praticano sport*
- *Esaustività della lista ed aggiornabilità secondo modalità definite*

# Weltweite Dopingkontrollen

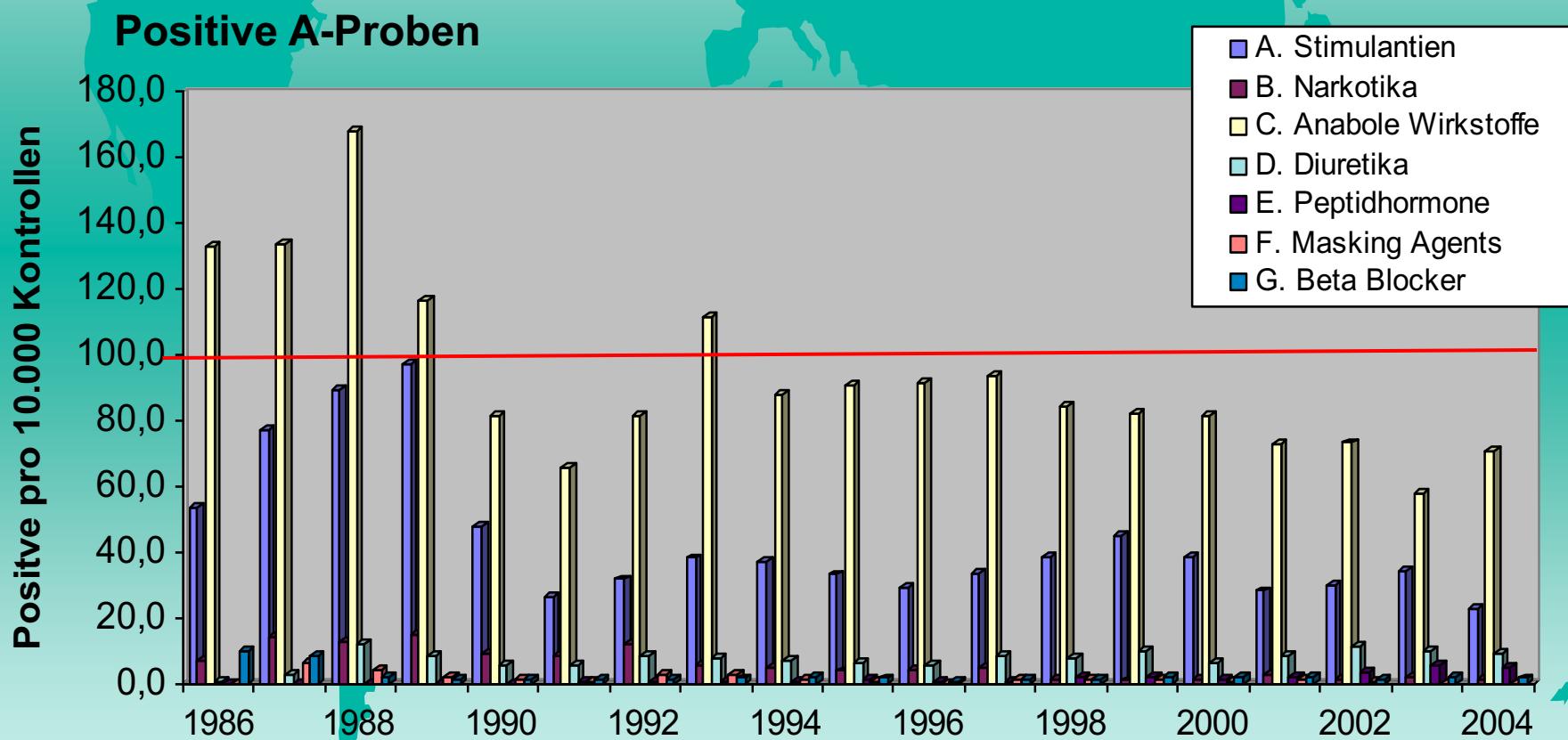
IOC/WADA akkreditierte Laboratorien



# Weltweite Dopingkontrollen

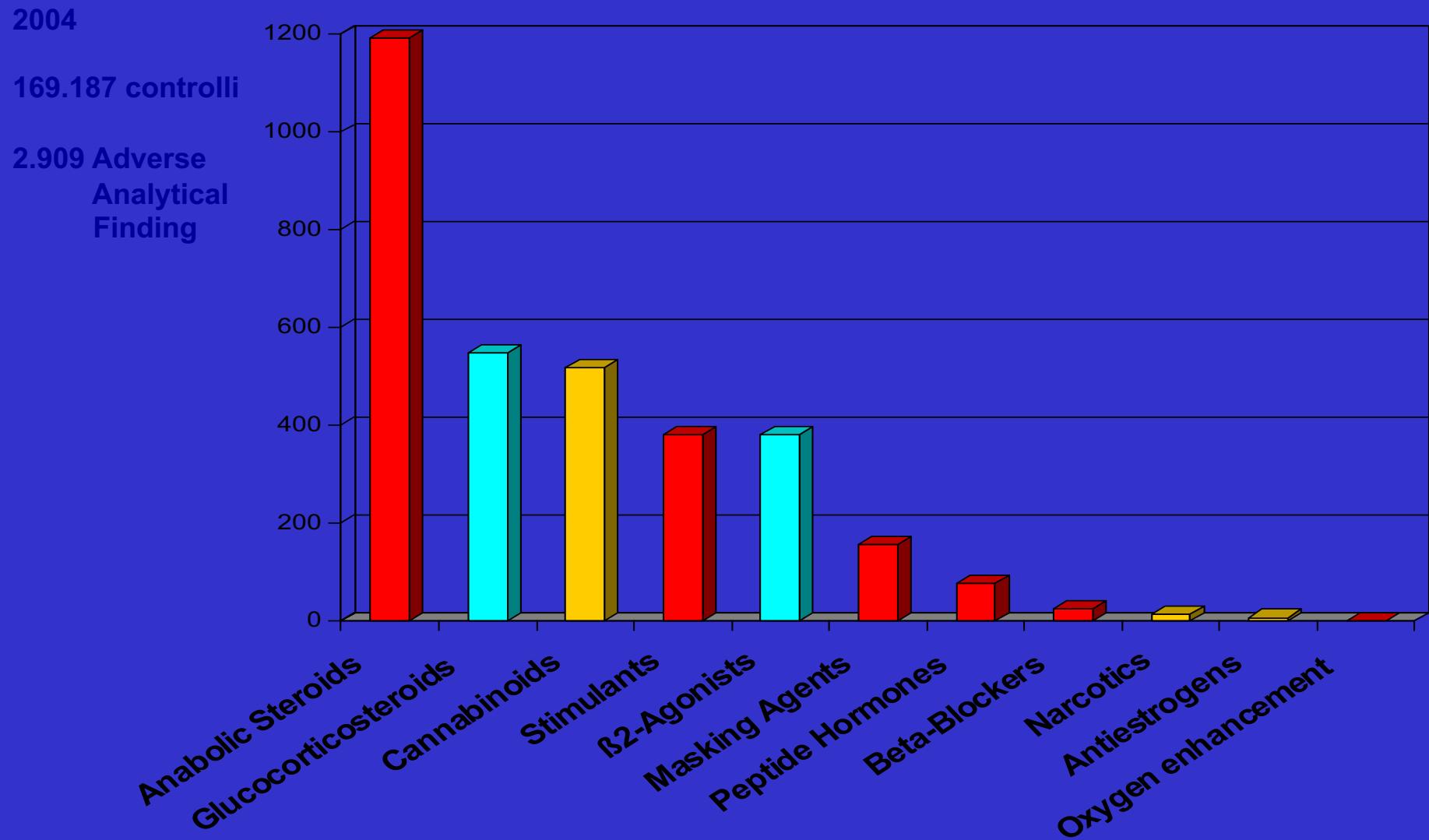
IOC/WADA akkreditierte Laboratorien

## Positive A-Proben



# Doping

2004, Statistica WADA



# Attività analitica chimico-tossicologica di farmaci, sostanze e pratiche dopanti nel LAD

- diagnosi e monitoraggio terapeutico delle patologie doping-correlate
  - tutela della salute degli sportivi
- regolarità delle competizioni agonistiche
- studi epidemiologici/informazione/formazione

supporto alla Clinica,  
alle Scienze biomediche  
e medico-legali

supporto alle Istituzioni

## Lista in vigore dal 1 Gennaio 2006

### **Classi di sostanze proibite (In gara e fuori gara In gara)**

Agenti anabolizzanti (steroidi anabolizzanti androgeni e beta-2-agonisti); Ormoni peptidici, mimetici e analoghi; Anti-estrogeni; Agenti mascheranti (compresi i diuretici); Stimolanti; Glucocorticoidi; Narcotici; Derivati della Cannabis.

### **Classi di sostanze proibite solo in alcuni sport**

Alcol, Beta-bloccanti

### **Metodi proibiti**

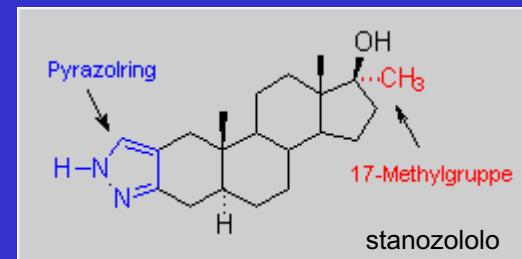
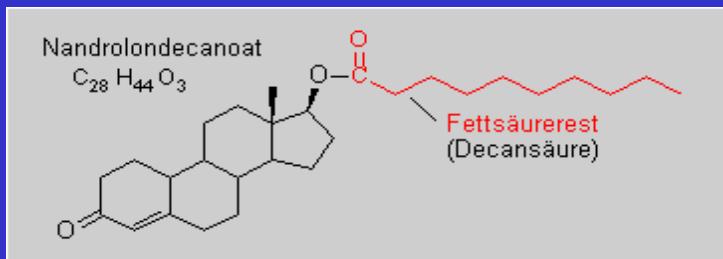
Aumento del trasporto ematico di ossigeno (Hb modificate, trasfusioni, oxygen carriers, camera iperbarica..)

Manipolazione chimica e fisica del campione biologico

Doping genetico

## S1. AGENTI ANABOLIZZANTI

1. Steroidi anabolizzanti androgeni esogeni (47 analiti e altre sostanze con una struttura chimica simile o un effetto biologico simile) ed endogeni (4 analiti e 17 metaboliti e isomeri)
2. Altri agenti anabolizzanti: 4  $\beta$ -2 agonisti



## S2. ORMONI E SOSTANZE CORRELATE

Eritropoietina, Ormone della crescita, IGF-1, Mechano Growth Factors (MGFs), Gonadotropine (LH, hCG), Insulina, Corticotropine + fattori di rilascio circa 30

## S3. BETA-2 AGONISTI

12  $\beta$ -2 agonisti + analoghi struttura/attività

## S4. AGENTI CON ATTIVITA' ANTIESTROGENICA

6 Inibitori dell'aromatasi 3 Modulatori selettivi del recettore degli estrogeni  
3 Altri agenti con attività antiestrogenica + analoghi struttura/attività

## S5. DIURETICI E ALTRI AGENTI MASCHERANTI

32 diuretici

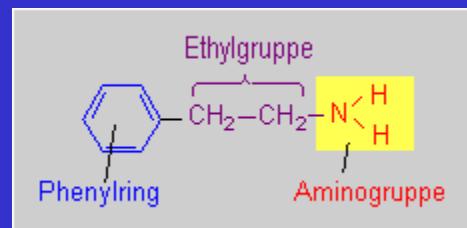
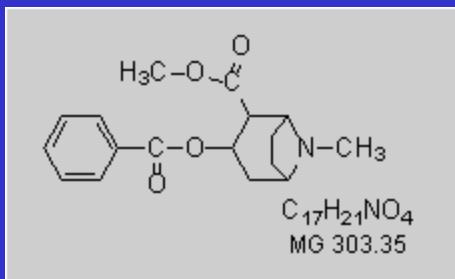
epitestosterone probenecid

plasma expanders

2 inibitori dell'alfa riduttasi

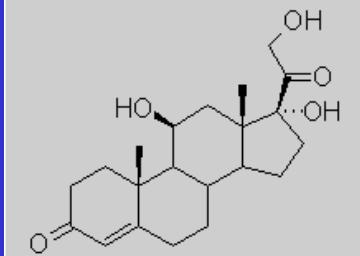
## S6. STIMOLANTI

78 sostanze più altre con una struttura chimica simile o un effetto(i) biologico(i) simile(i)



## S9. GLUCOCORTICOIDI

25 sostanze

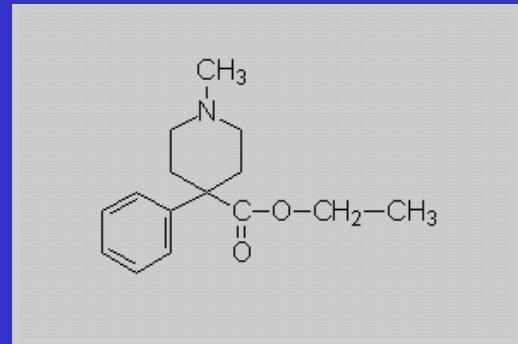


## P2. Beta bloccanti

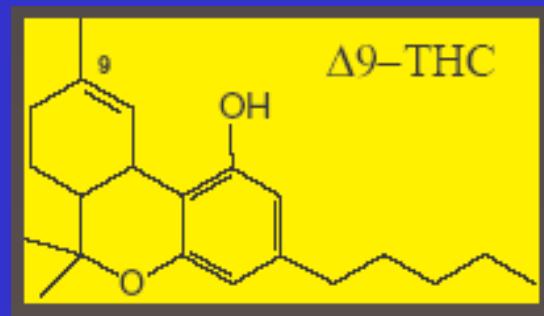
23 sostanze

## S7. NARCOTICI

Buprenorfina, destromoramide, eroina, fentanil e derivati, idromorfone, metadone, morfina, ossicodone, ossimorfone, pentazocina, petidina



## S8. DERIVATI DELLA CANNABIS



## P1. ALCOOL

# Test chimico-clinico

# Test Anti-Doping LAD

## Matrice

La matrice più adatta

Urina (sangue)

La matrice più adatta

## Finalità dell'analisi

Diagnosi

Evidenza di prova

Evidenza di prova/  
Diagnosi

## Referito

Identificazione e quantificazione di markers

Identificazione e quantificazione di sostanze

Identificazione e quantificazione di sostanze e markers

## Casi dubbi

Trattati come positivi

Trattati come negativi

Trattati come positivi

↓  
approfondimento

↓  
approfondimento

# Problemi?

- Numerosità analiti:

es. 48 AAS + loro metaboliti

- Basse concentrazione nei fluidi organici: 1 - 50 ng/mL

es. clenbuterolo 2 ng/mL      19-norandrosterone 1 ng/mL

- Metabolismo

- di fase I:

Etilamfetamina Benzfetamina Clobenzorex Mefenorex  
Fenproporex Prenilamina Amfetaminil Fenetilina  
 amfetamina

- di fase II: solfati e/o glucuronati

es. AAS

Beta-bloccanti

## Altri problemi?

- Metabolismo aspecifico:  
es. ormoni peptidici
- Identificazione di sostanze/pratiche o indicatori della loro assunzione
- Presenza/assenza o Limiti di concentrazione:  
es. catina 5 µg/mL      efedrina 10 µg/mL    T/E = 4
- Isomeri:  
5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -diolo; 5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diolo;  
5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -diolo; 5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diolo
- Standard di riferimento certificati !!

## Soluzioni?

---

Suddivisione delle sostanze vietate sulla base delle loro strutture molecolari, proprietà chimiche e fisiche

Determinazioni di screening sul maggior numero possibile di sostanze impiegando non più di 5-8 metodiche analitiche differenti

Integrazione in una sistematica analitica

Analisi di conferma per ogni sostanza

# Necessità analitiche LAD

- Fase Pre-strumentale:

- controllo adeguatezza campione  
(es. urina colore, volume, pH, densità, creatinina...)
  - pre-trattamento del campione
  - concentrazione/estrazione analiti
  - derivatizzazione

- Screening:

- tecniche immunocheimiche, GC, HPLC, GC-MS, LC-MS, ...

- Conferma:

- GC-MS, GC-HRMS, GC-MS/MS, GC-HRMS/MS, GC-C-IRMS,  
LC-MS/MS, LC-HRMS/MS, LC-C-IRMS, ...
  - + Eritropoietine: Isoelectrofocusing/chemiluminescenza

## Requisiti ideali di un metodo di screening

- Maggior numero possibile di sostanze
  - Nessun falso negativo
  - Falsi positivi ridotti al minimo
- Analisi su piccoli volumi di campione (0.1 - 5 mL)
- Rapidità (pre-trattamento + analisi + elaborazione dati)
  - Economicità

# Un esempio di sistematica

**Table 1** General screening strategies for sample preparation and instrumentation

Class of compound	Matrix	Chemical property exploited	Conjugation	Extraction	Derivative	Instrument used
Stimulants	Urine	Basic drug	None	Liquid–liquid extraction at high pH	None	GC/NPD; GCMS full scan
Narcotics	Urine	Basic drug	Glucuronide/sulfate	Extractive alkylation or liquid–liquid extraction	Methyl	GCMS SIM
Diuretics/ Masking agent	Urine	Acidic/basic	None	Extractive alkylation; SPE	Methyl; None	GCMS SIM; LCMSMS
Anabolic Agents	Urine	Neutral	Glucuronide	SPE or liquid–liquid extraction	Enol-TMS, TMS	GCMS SIM
Peptide hormones	Urine/blood	Large molecule	None	None/ultra-filtration	None	Immunoassay/isoelectric focusing–double blotting
Anti-oestrogenic compound	Urine	Neutral/acidic	Glucuronide	SPE	TMS	GCMS SIM

Trout and Kazlauskas

Chem. Soc. Rev., 2004, 33, 1–13

# Un secondo esempio di sistematica

CLASSI DI SOSTANZE CONSIDERATE	PREPARAZIONE DEL CAMPIONE				TECNICHE ANALITICHE SCREENING
	Idr	L/L	SPE	Der	
1 COMPOSTI VOLATILI CONTENENTI AZOTO ESCRETI LIBERI (STIMOLANTI, ALCUNI NARCOTICI, E ANESTETICI LOCALI)		x			GC-NPD
2 COMPOSTI POCO VOLATILI CONTENENTI AZOTO E ESCRETI CONIUGATI (ALCUNI STIMOLANTI, NARCOTICI/ANALGESICI, BETA BLOCCANTI, E METABOLITI IDROSSILATI)	x	x	x		GC-MS (SCAN)
3 COMPOSTI TERMOLABILI E QUANTIFICAZIONE CAFFEINA		x			
4A STEROIDI ANABOLIZZANTI ESCRETI NON CONIUGATI	x		x		GC-MS (SIM)
4B STEROIDI ANABOLIZZANTI CONIUGATI E NON, BETA-AGONISTI	x	x	+	x	GC-MS (SIM)
5 DIURETICI E PROBENECID		x	x		GC-MS (SIM)
	x	x			LC/DAD
6 STUPEFACENTI	(x)			x	EMIT FPIA
7 ORMONI PEPTIDICI (hCG,LH,GH)					MEIA IRMA
8 ERITROPOIETINA					ELISA

## Requisiti ideali di un metodo di conferma

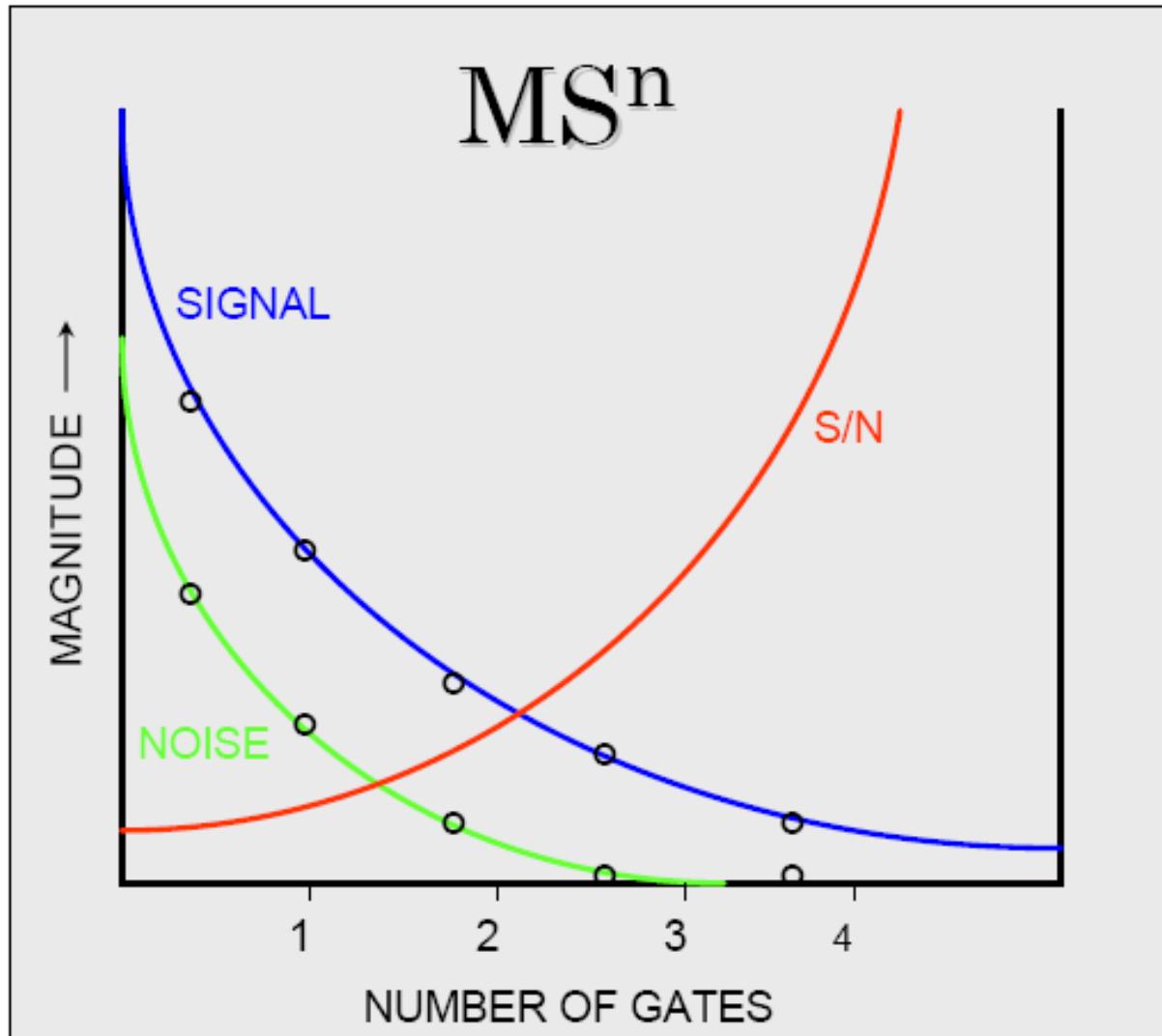
- Massima specificità/selettività
  - Nessun falso positivo
- Minima percentuale di falsi negativi
  - Analisi su piccoli volumi (1-10 mL)
- Elevata sensibilità
- Metodo preferibilmente di tipo spettrometrico  
*ad elevato potere di informazione*
- Evidenza ottenuta per confronto con un campione positivo di riferimento

# Analisi di conferma

Si conosce a priori l'analita

- però 165 Sostanze = 165 Metodi
  - Parte dei metodi in GC-MS
  - Parte dei metodi in GC-HRMS e GC-C-IRMS
  - Altri approcci strumentali di più recente sviluppo  
LC-MS LC-MS/MS e LC-HRMS
  - Utilizzo di tecniche MS combinate (hyphenated)
- Punti focali: validazione, accuratezza, incertezza di misura

# MS<sup>n</sup> AUMENTA LA SENSIBILITA'



From: Busch K.L., Cooks G. in "Tandem Mass Spectrometry"  
Ed. Mc Lafferty Wiley, N.Y. 1983, 11-39

# Un secondo esempio di sistematica

CLASSI DI SOSTANZE CONSIDERATE	PREPARAZIONE DEL CAMPIONE				TECNICHE ANALITICHE	
	Idr	L/L	SPE	Der	SCREENING	CONFERMA
1 COMPOSTI VOLATILI CONTENENTI AZOTO ESCRETI LIBERI (STIMOLANTI, ALCUNI NARCOTICI, E ANESTETICI LOCALI)			x		GC-NPD	GC-MS
2 COMPOSTI POCO VOLATILI CONTENENTI AZOTO E ESCRETI CONIUGATI (ALCUNI STIMOLANTI, NARCOTICI/ANALGESICI, BETA BLOCCANTI, E METABOLITI IDROSSILATI)		x	x	x	GC-MS (SCAN)	GC-MS (SCAN)
3 COMPOSTI TERMOLABILI E QUANTIFICAZIONE CAFFEINA		x			LC/UV LC/DAD	
4A STEROIDI ANABOLIZZANTI ESCRETI NON CONIUGATI	x		x		GC-MS (SIM) GC-MS (SIM) GC-HRMS	
4B STEROIDI ANABOLIZZANTI CONIUGATI E NON, BETA-AGONISTI	x	x	+	x	GC-MS (SIM) GC-MS/MS GC-HRMS	
5 DIURETICI E PROBENECID		x	x		GC-MS (SIM) LC/DAD LC-MS	GC-MS (SIM)
6 STUPEFACENTI	(x)			x	EMIT FPIA	GC-MS (SIM)
7 ORMONI PEPTIDICI (hCG,LH,GH)					MEIA IRMA	IRMA MEIA
8 ERITROPOIETINA					ELISA	IEF-IB-CL

## Prospettive

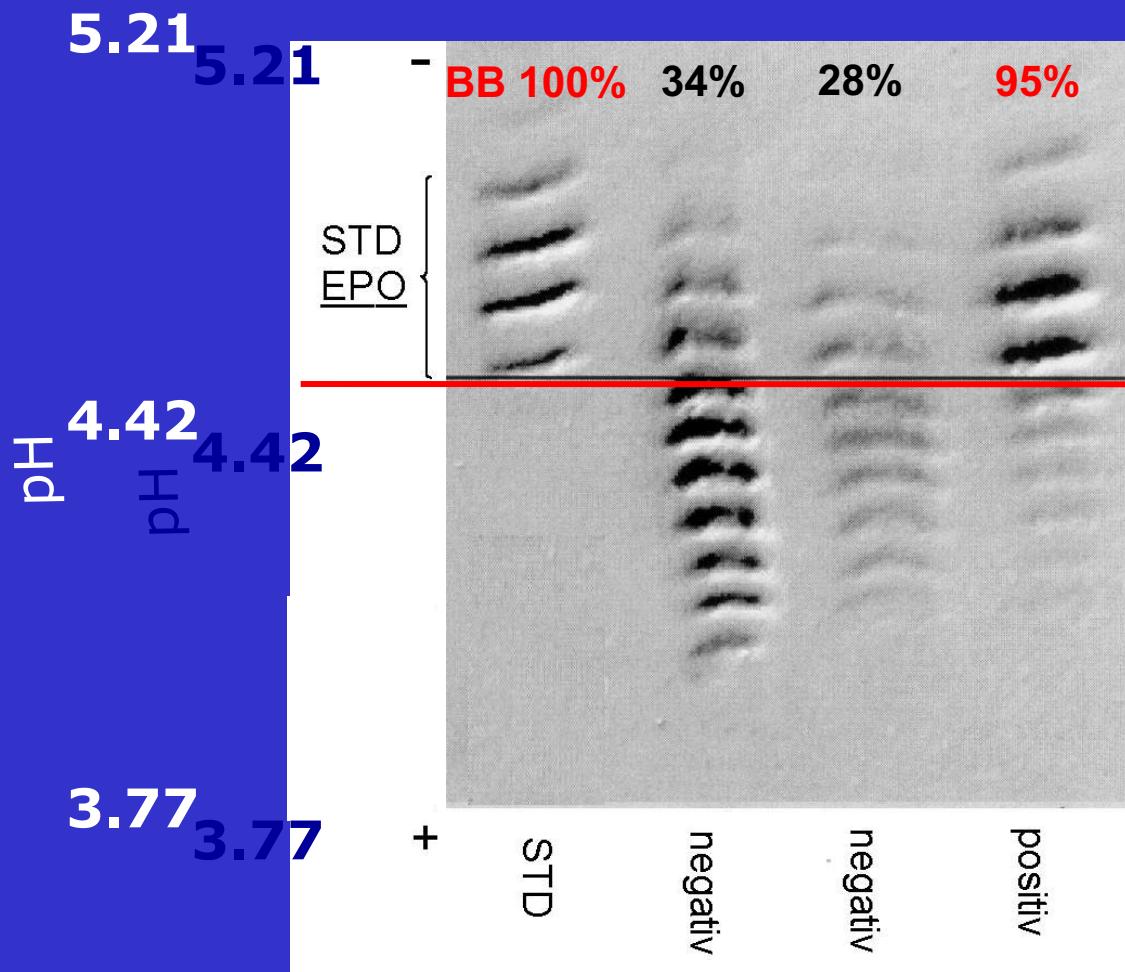
Il futuro ruolo del LAD nelle attività di  
Diagnosi  
Prevenzione  
Assistenza  
Ricerca

in tema di Doping-Antidoping

richiederà il  
passaggio ad una più ampia prospettiva analitica

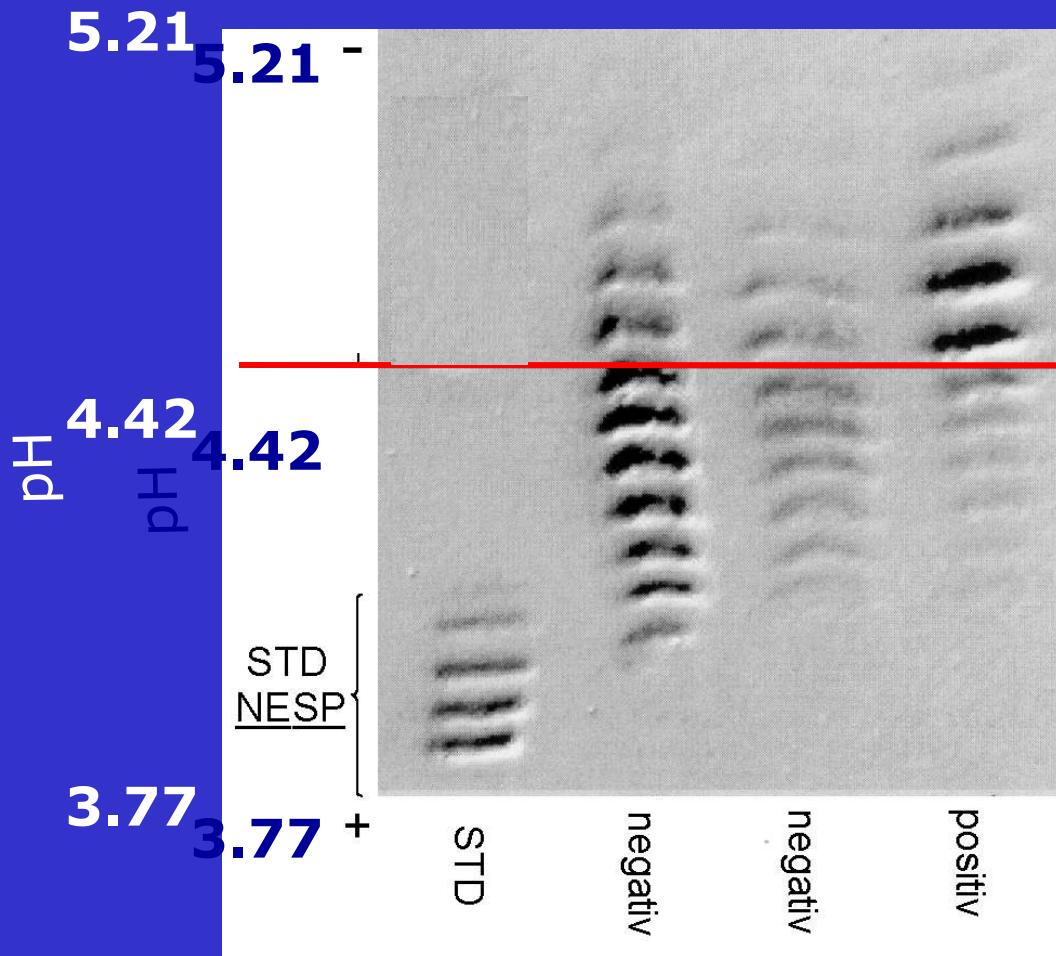
EPO Urintest  
Lasne F, de Ceaurrez J

Isoelectrofocusing  
EPO PATTERN

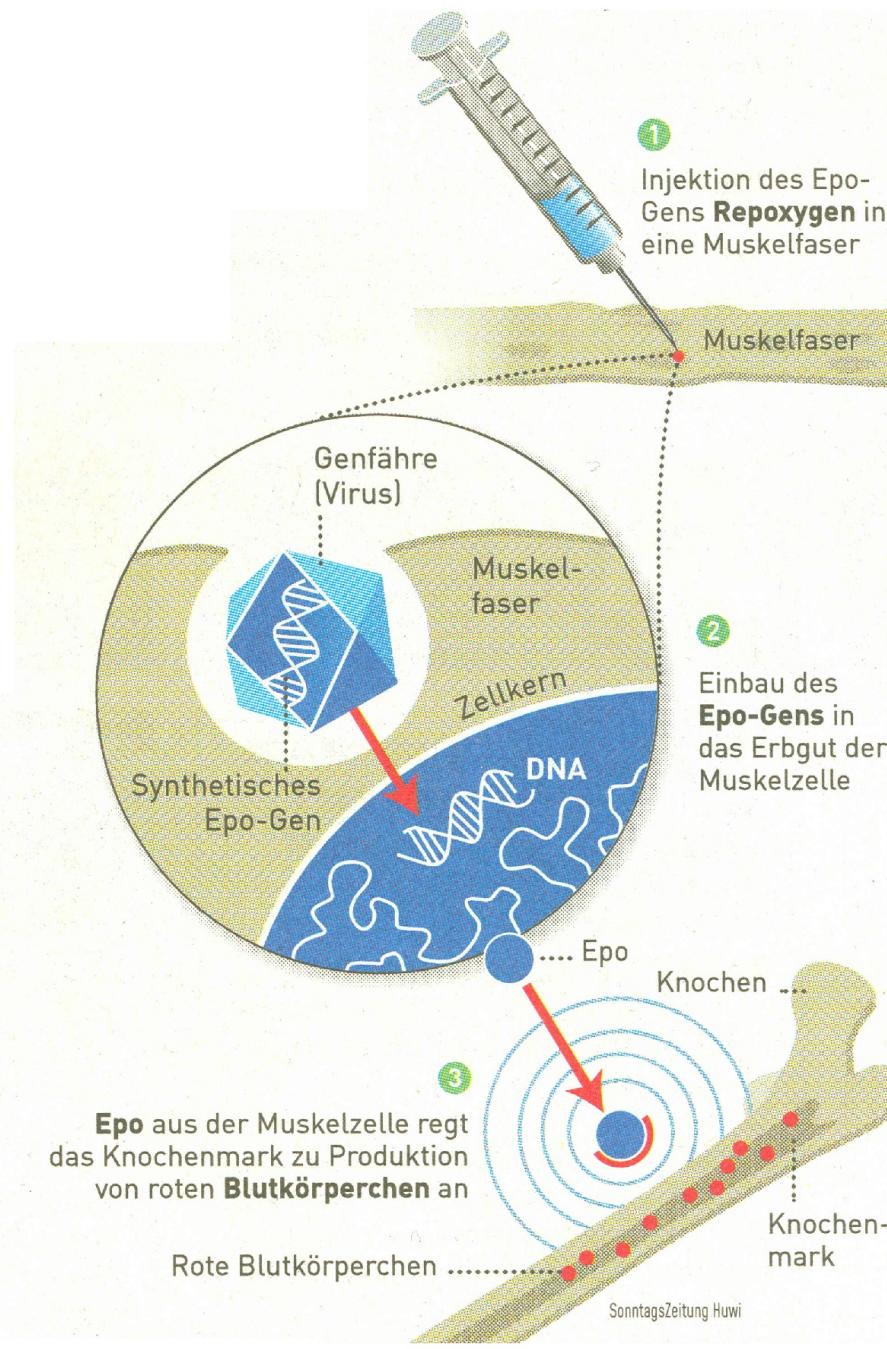


EPO Urintest  
Lasne F, de Ceaurrez J

Darbepoetina (NESP)



# Gendoping



Weiterer Einbau eines sauerstoffsensitiven Faktors, der bei ausreichender Sauerstoffkonzentration im Blut, das EPO-Gen abschaltet

# Gendoping - Nachweis

## “Genetic Doping” with erythropoietin cDNA in primate muscle is detectable

Françoise Lasne,<sup>1,\*</sup> Laurent Martin,<sup>1</sup> Jacques de Ceaurriz,<sup>1</sup> Thibaut Larcher,<sup>2</sup>  
Philippe Moullier,<sup>2,3,\*</sup> and Pierre Chenuaud<sup>2</sup>

**Fig. 1.** Isoelectric patterns of erythropoietin. (a) rhEPO from CHO cells (lane 1) and BHK cells (lane 2). (b) Physiological EPO from human urine (lane 3) and macaque serum (lanes 4 and 5). (c) EPO from macaque serum after gene transfer in skeletal muscle (lanes 6 and 7). Serum samples (5) and (6) are from the same animal before and after gene transfer, respectively. Specific detection of EPO was obtained by double-blotting following isoelectric focusing. Cathode is at the top.

