



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 Convenzione 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

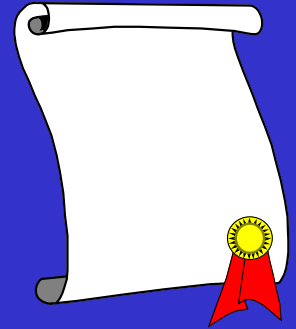


Legge 376/2000 - art.2



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



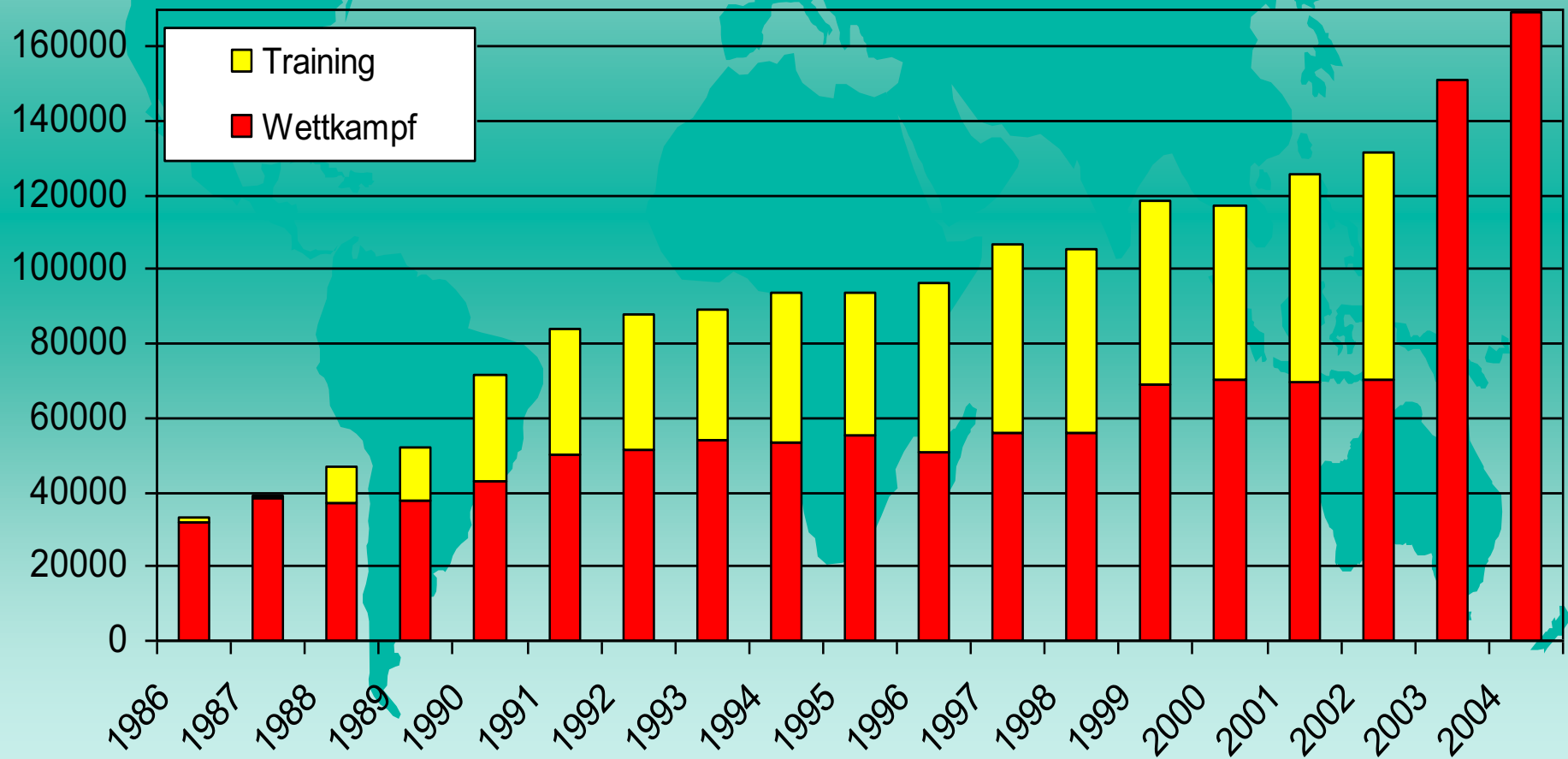
Criteri e modalità di elaborazione

- *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

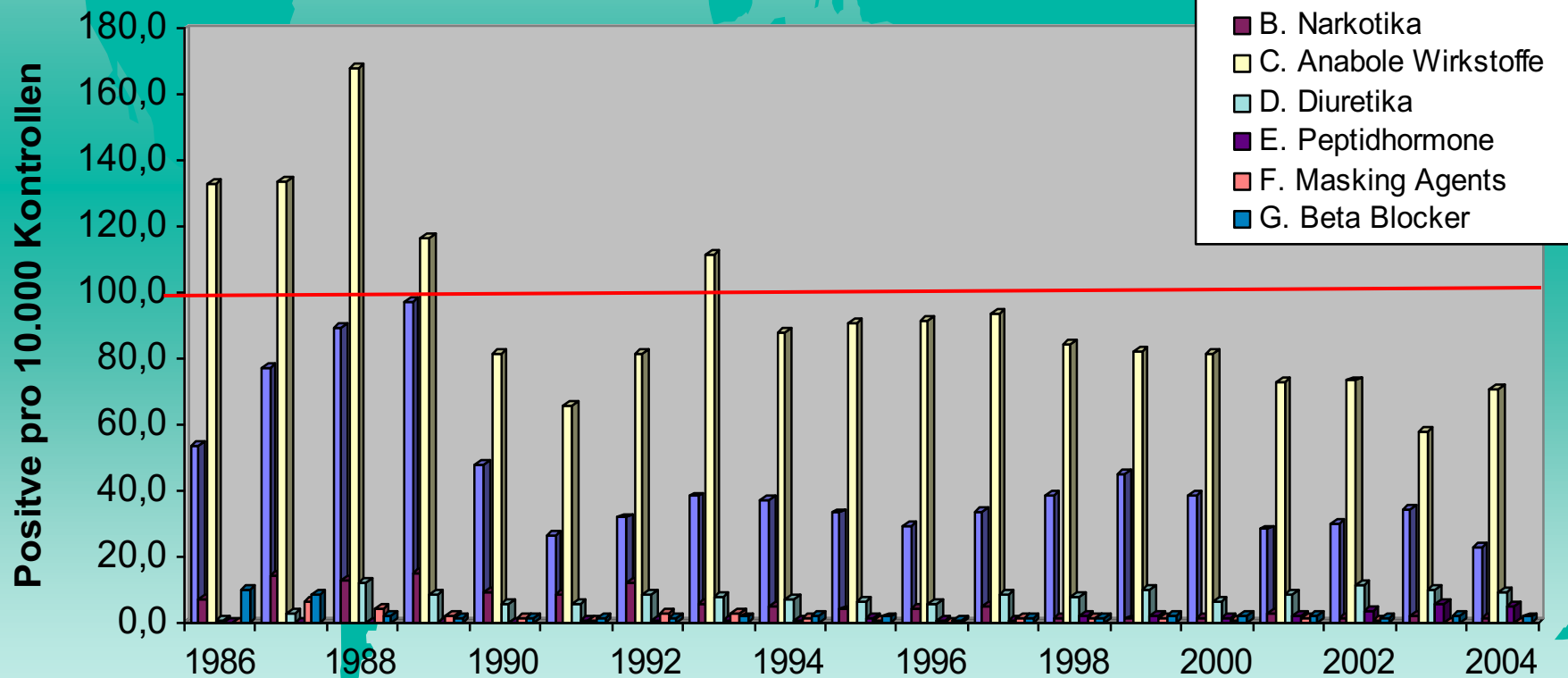
IOC/WADA akkreditierte Laboratorien



Weltweite Dopingkontrollen

IOC/WADA akkreditierte Laboratorien

Positive A-Proben



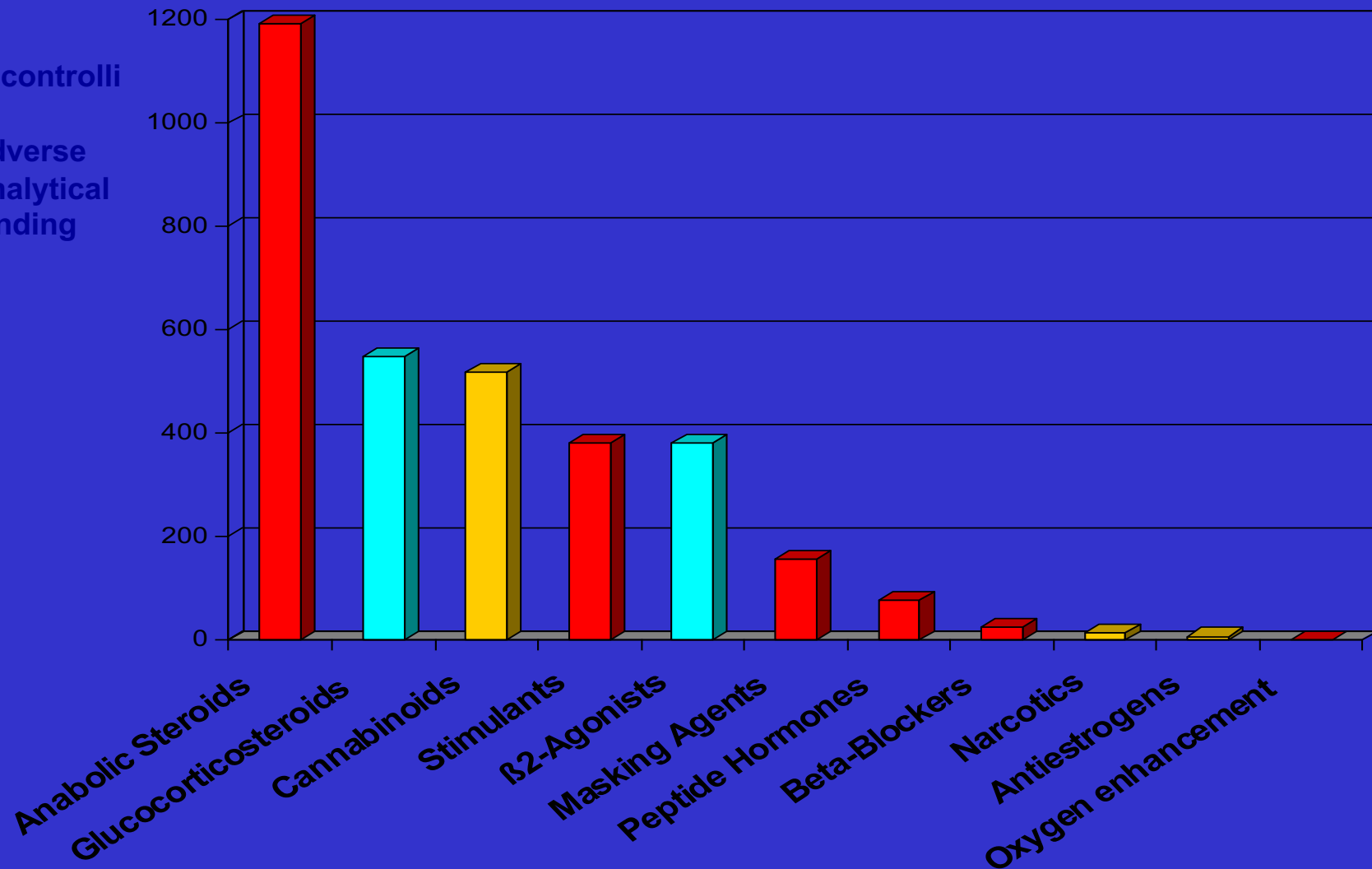
Doping

2004, Statistica WADA

2004

169.187 controlli

2.909 Adverse
Analytical
Finding



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 competizione 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

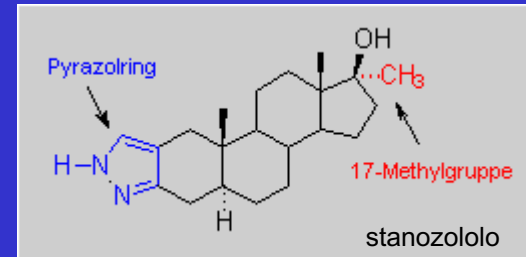
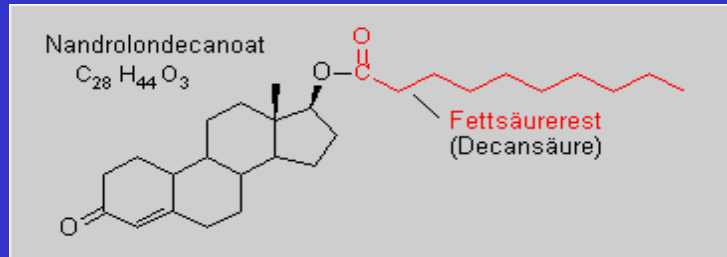
Aumento del trasporto ematico di ossigeno (Hb modificate, trasfusioni, oxygen carriers, camera iperbarica..)

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 β -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 β -2 agonisti + analoghi struttura/attività

S4. AGENTI CON ATTIVITA' ANTIESTROGENICA

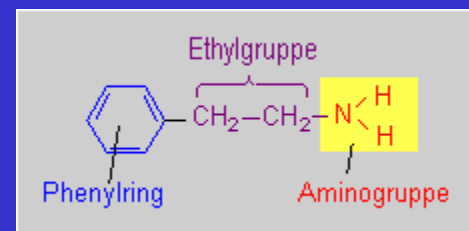
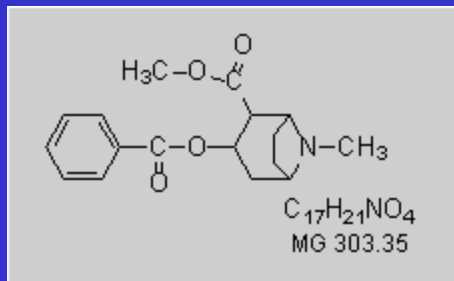
6 Inibitori dell'aromatasi 3 Modulatori selettivi del recettore degli estrogeni
3 Altri agenti con attività antiestrogenica + analoghi struttura/attività

S5. DIURETICI E ALTRI AGENTI MASCHERANTI

32 diuretici epitestosterone probenecid 2 inibitori dell'alfa riduttasi
plasma expanders

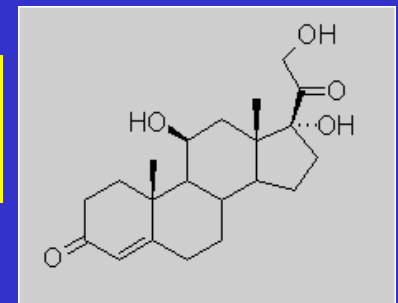
S6. STIMOLANTI

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



S9. GLUCOCORTICOIDI

25 sostanze

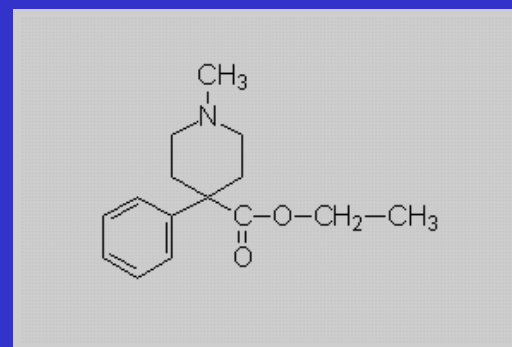


P2. Beta bloccanti

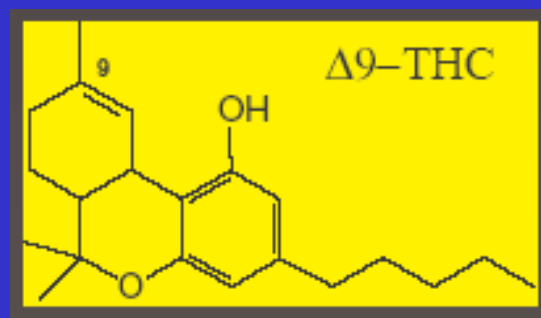
23 sostanze

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

Referto

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 $5 \mu\text{g/mL}$ efedrina $10 \mu\text{g/mL}$ T/E = 4
- **Isomeri:**
 5α -androstane- $3\alpha,17\alpha$ -diolo; 5α -androstane- $3\alpha,17\beta$ -diolo;
 5α -androstane- $3\beta,17\alpha$ -diolo; 5α -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 immunochimiche, 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
		Idr	L/L	SPE	Der	SCREENING
1	COMPOSTI VOLATILI CONTENENTI AZOTO ECRETI LIBERI (STIMOLANTI, ALCUNI NARCOTICI, E ANESTETICI LOCALI)		×			GC-NPD
2	COMPOSTI POCO VOLATILI CONTENENTI AZOTO E ECRETI CONIUGATI (ALCUNI STIMOLANTI, NARCOTICI/ANALGESICI, BETA BLOCCANTI, E METABOLITI IDROSSILATI)		×	×	×	GC-MS (SCAN)
3	COMPOSTI TERMOLABILI E QUANTIFICAZIONE CAFFEINA		×			
4A	STEROIDI ANABOLIZZANTI ECRETI NON CONIUGATI		×		×	GC-MS (SIM)
4B	STEROIDI ANABOLIZZANTI CONIUGATI E NON, BETA-AGONISTI	×	×	+	×	GC-MS (SIM)
5	DIURETICI E PROBENECID			×	×	GC-MS (SIM)
		×	×			LC/DAD
6	STUPEFACENTI	(×)			×	EMIT FPIA
7	ORMONI PEPTIDICI (hCG,LH,GH)					MEIA IRMA
8	ERITROPOIETINA					ELISA

Requisiti ideali di un metodo di conferma

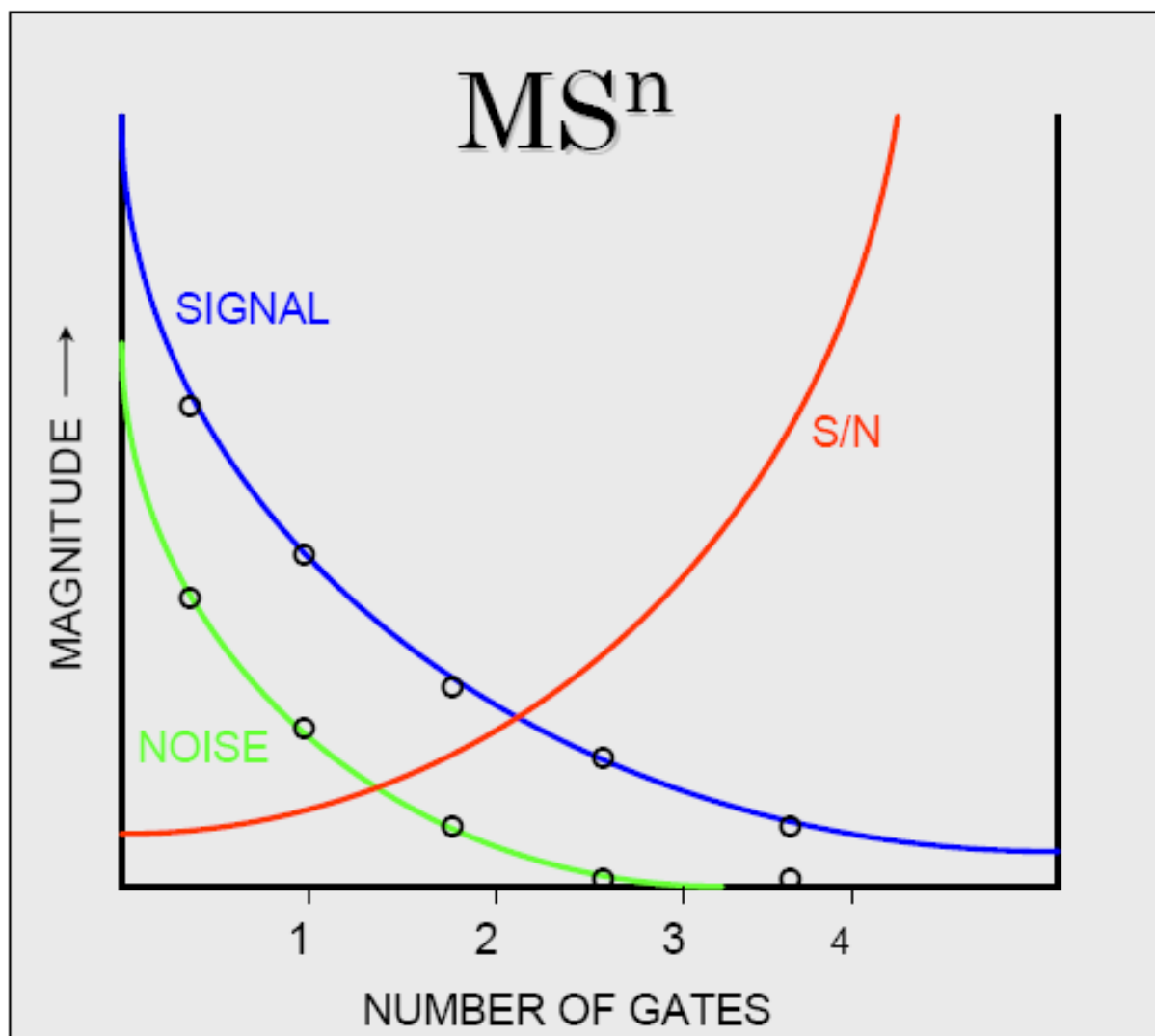
- Massima specificità/selettività
 - Nessun falso positivo
- Minima percentuale di falsi negativi
- Analisi su piccoli volumi (1-10 mL)
 - Elevata sensibilità
- Metodo preferibilmente di tipo spettrometrico
ad elevato potere di informazione
- Evidenza ottenuta per confronto con un campione positivo di 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^n 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 ECRETI LIBERI (STIMOLANTI, ALCUNI NARCOTICI, E ANESTETICI LOCALI)		×			GC-NPD	GC-MS
2	COMPOSTI POCO VOLATILI CONTENENTI AZOTO E ECRETI CONIUGATI (ALCUNI STIMOLANTI, NARCOTICI/ANALGESICI, BETA BLOCCANTI, E METABOLITI IDROSSILATI)		×	×	×	GC-MS (SCAN)	GC-MS (SCAN)
3	COMPOSTI TERMOLABILI E QUANTIFICAZIONE CAFFEINA		×				LC/UV LC/DAD
4A	STEROIDI ANABOLIZZANTI ECRETI NON CONIUGATI		×		×	GC-MS (SIM)	GC-MS (SIM) GC-HRMS
4B	STEROIDI ANABOLIZZANTI CONIUGATI E NON, BETA-AGONISTI	×	×	+	×	GC-MS (SIM)	GC-MS (SIM) GC-MS/MS GC-HRMS
5	DIURETICI E PROBENECID			×	×	GC-MS (SIM)	GC-MS (SIM)
		×	×			LC/DAD	LC-MS
6	STUPEFACENTI	(×)			×	EMIT FPIA	GC-MS (SIM)
7	ORMONI PEPTIDICI (hCG,LH,GH)					MEIA IRMA	IRMA MEIA
8	ERITROPOIETINA					ELISA	IEF-IB-CL

Prospettive

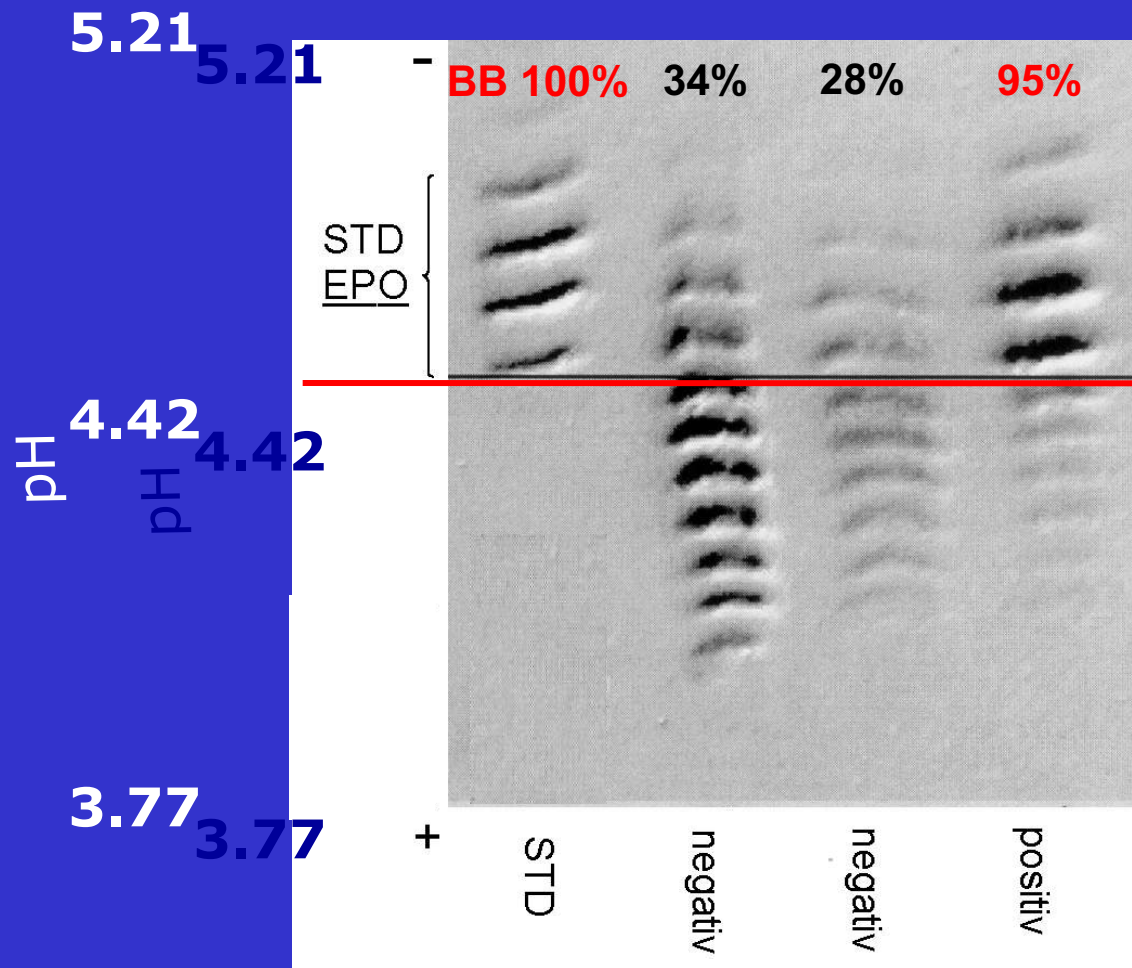
Il futuro ruolo del LAD nelle attività di
Diagnosi
Prevenzione
Assistenza
Ricerca

in tema di Doping-Antidoping

richiederà il
passaggio ad una più ampia prospettiva analitica

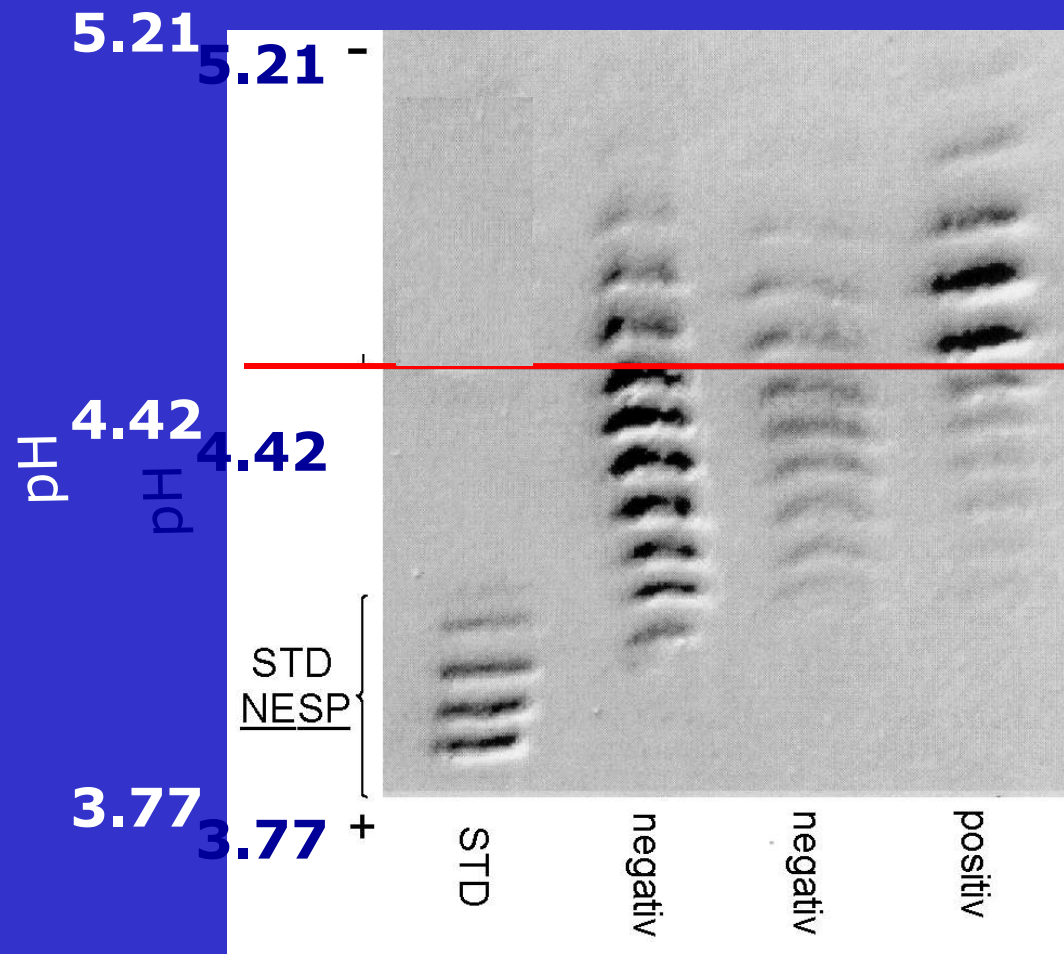
EPO Urintest Lasne F, de Ceaurriz J

Isoelectrofocusing EPO PATTERN

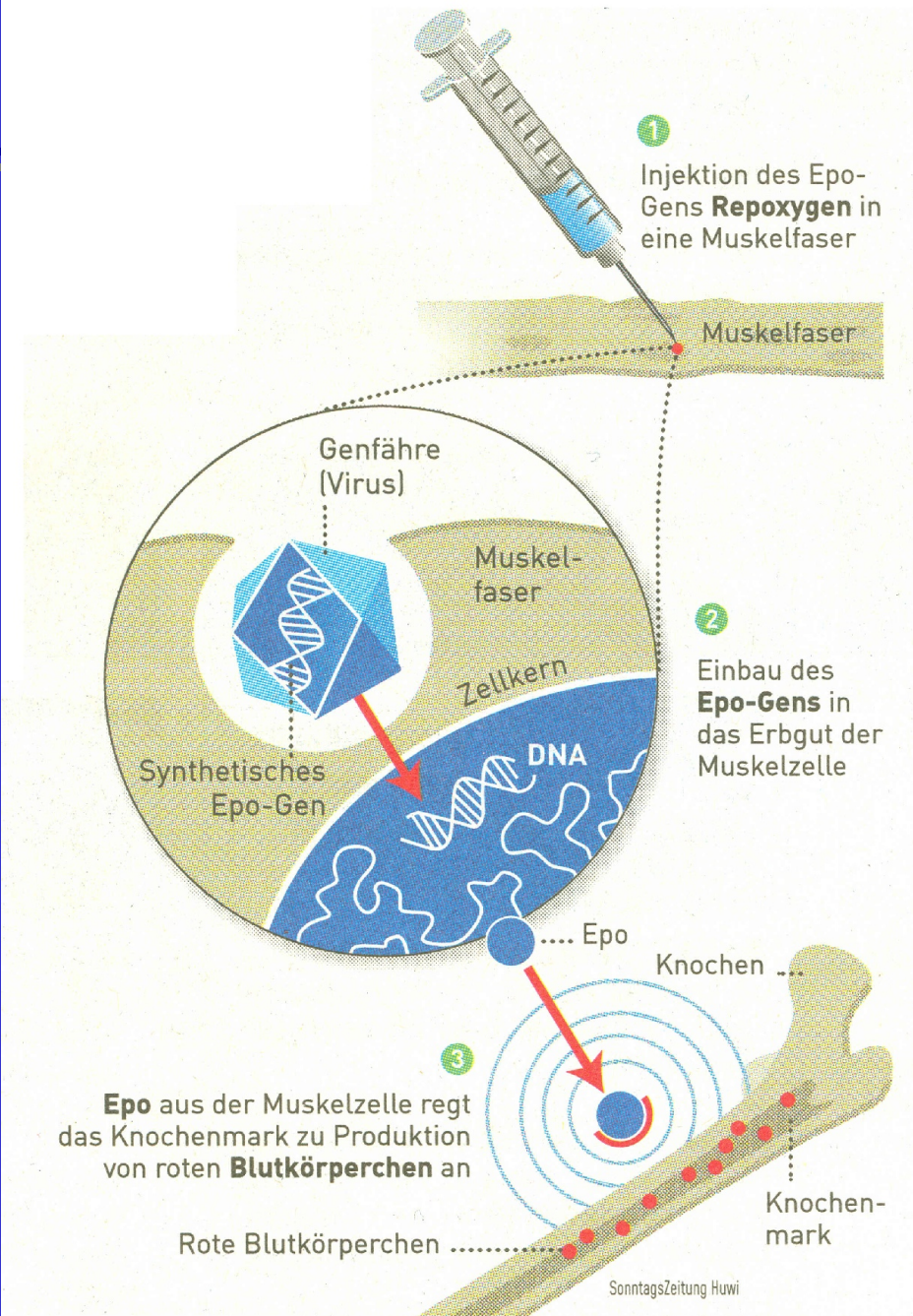


EPO Urintest Lasne F, de Ceaurriz J

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,^{1,*} Laurent Martin,¹ Jacques de Ceaurriz,¹ Thibaut Larcher,²
Philippe Moullier,^{2,3,*} and Pierre Chenuaud²

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.

