|  |  |
| --- | --- |
|  | **PASAULES ANTIDOPINGA AĢENTŪRA**Godīga spēle |

***WADA* tehniskais dokuments – TD2019GH**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Dokumenta numurs: | TD2019GH | Versijas numurs: | 1.0 |
| Sarakstījusi: | *WADA* Laboratorijas ekspertu grupa | Apstiprinājusi: | *WADA* izpildkomiteja |
| Datums: | 2019. gada 15. maijs | Spēkā stāšanās diena: | 2019. gada 15. maijs |

**CILVĒKA AUGŠANAS HORMONA (*hGH*) IZOFORMU DIFERENCIĀLIE IMŪNTESTI *DOPINGA KONTROLES* ANALĪZĒM**

Šā tehniskā dokumenta mērķis ir nodrošināt saskaņotu pieeju, piemērojot izoformu diferenciālos imūntestus, lai noteiktu dopingu ar cilvēka augšanas hormonu (*hGH*) sportā. Šajā tehniskajā dokumentā ir sniegtas norādes par *parauga* pirmsanalīzes sagatavošanas procedūru, pārbaudes metodes(-žu) izmantošanu un pārbaudes rezultātu interpretāciju.

# 1.0. Ievads par pārbaudes metodi

Izoformu diferenciālie imūntesti dopinga ar *hGH* noteikšanai tika izstrādāti, lai nošķirtu *hGH* izoformu proporcijas, kas konstatētas normālos fizioloģiskos apstākļos, no tām, kas konstatētas pēc rekombinanta (*rec*) *hGH* injekcijas [1, 2].

Pārbaudes metode būtībā balstās uz noteikto principu, ka normāls *hGH* sastāvs asinīs ir dažādu izoformu maisījums, kuru klātbūtnei ir nemainīgas relatīvās proporcijas. Turpretī *recGH* sastāv gandrīz tikai no monomēra 22-kDa molekulārās formas. Eksogēnā *recGH* ievadīšana ne tikai palielina 22-kDa izoformas koncentrāciju, bet arī samazina koncentrācijas, kas nav 22-kDa koncentrācijas, tādējādi izmainot dabiskās attiecības, kas konstatētas starp šīm *hGH* izoformām [3].

1.1. Pārbaudes metodes princips

Lai izmantotu pārbaudes metodi(-es), katra *parauga* analīzē *hGH* izoformu mērīšanai izmanto divus atsevišķus komplektus (“1” un “2”, ko piegādā uzņēmums *CMZ-Assay GmbH*, Vācija) [4]. Katru no šiem komplektiem var izmantot sākotnējās pārbaudes procedūrā, savukārt apstiprināšanas procedūrai(-ām) izmanto gan komplektu “1”, gan komplektu “2”.

Katrā komplektā ir viens “rekombinantais” un viens “hipofīzes” tests. “Rekombinantajā” (*recGH*) testā pārklātā satveres antiviela galvenokārt saistās ar *paraugos* esošo 22-kDa *hGH* monomēru, savukārt “hipofīzes” (*pitGH*) testā izmanto satveres antivielu, kas atpazīst dažādas no hipofīzes atvasinātas *hGH* izoformas. Attiecīgie testi tiek apzīmēti kā “*rec*1”, “*pit*1”, “*rec*2” un “*pit*2” testi. Pārbaudes metodes rezultātu izsaka kā *recGH / pitGH* koncentrāciju attiecību katrā konkrētajā komplektā.

# 2.0. Prasības testiem

Pirms šīs pārbaudes metodes ieviešanas ikdienas *dopinga kontroles* analīzē laboratorijai jāizpilda turpmākie priekšnosacījumi.

* + - Jāvalidē testa veikšana uz vietas, tostarp, piemēram, testa kvantifikācijas robežas (*LOQ*), iekšējās laboratorijas atkārtojamības (*sr*) un starpposma precizitātes (*sw*) noteikšana.

Minēto testu darbības parametru pieņemamās vērtības, kas piemērojamas, atsevišķi nosakot *recGH* un *pitGH* koncentrācijas (“*rec*1”, “*pit*1”, “*rec*2” un “*pit*2”), ir šādi:

* + - * *sr* (izteikta kā testa iekšējā relatīvā standartnovirze, *RSD*) ≤ 15 %;
			* *sw* (izteikta kā testa iekšējā *RSD*) ≤ 20 %;
			* *LOQ* ≤ 0,050 ng/ml[[1]](#footnote-1), noteikta kā zemākā koncentrācija ar *sr* ≤ 15 % un *sw* ≤ 20 %.
		- Turklāt laboratorijai jānosaka testa mērījumu nenoteiktība (*MU*), izmantojot laboratorijas validācijas datus. Kombinētā standarta nenoteiktība (*uc*), ko piemēro testa *recGH / pitGH* attiecībām, nedrīkst pārsniegt *uc\_Max* maksimālos līmeņus, kas noteikti, pamatojoties uz starplaboratoriju ārējās kvalitātes novērtējuma shēmas (*EQAS*) datiem [relatīvā *uc\_Max* = 20 % abos komplektos, un to vērtības ir tuvas attiecīgajām izšķiršanas robežām (*DL*)].
		- Sekmīgi jāpiedalās vismaz vienā *WADA* organizētā *EQAS*, lai apliecinātu gatavību testa īstenošanai. Konstatējot nepilnības, jāveic atbilstoša(-as) koriģējošā(-ās) darbība(-as).
		- Jāiegūst ISO/IEC-17025 akreditācija *hGH* izoformu diferenciālā imūntesta metodei no akreditācijas struktūras, kas ir pilntiesīga Starptautiskās laboratoriju akreditācijas kooperācijas (*ILAC*) dalībniece un ir parakstījusi *ILAC* Savstarpējās atzīšanas nolīgumu (*ILAC MRA*).

2.1. Testa pirmsanalītiskā procedūra

Saņemot “A” un “B” *paraugus* laboratorijā, veic turpmākās darbības.

* + - Pārbauda, vai asins *paraugi* ir ņemti mēģenēs, kas satur inertu polimēru seruma sadalīšanas gelu un asinsreces aktivācijas faktoru (*BD Vacutainer® SSTTM-II* mēģenes, ES atsauces Nr. 367955; *BD Vacutainer® SSTTM-II Plus Advance* mēģenes, ES atsauces Nr. 367954; *BD Vacutainer® SSTTM* mēģenes, ASV atsauces Nr. 367986) saskaņā ar *WADA* vadlīnijām *Guidelines for Blood Sample Collection* [Vadlīnijas asins *paraugu* vākšanai] [5]. Šādi asins *paraugi* pēc vākšanas un transportējot tos uz laboratoriju jāuzglabā atdzesētā stāvoklī (tos nedrīkst sasaldēt).
		- Vai arī *paraugus* var pieņemt laboratorijā kā sasaldētus vai atdzesētus seruma *paraugus* pēc asins sarecēšanas un centrifugēšanas un seruma daļas sadalīšanas *paraugu* vākšanas vietā.
		- *Paraugi*, kas laboratorijā tiek piegādāti kā plazma, netiek pieņemti *hGH* analīzei ar šiem komplektiem. Līdz ar to paraugu savākšanas iestādēm ir sniegtas vadlīnijas asins *paraugu* vākšanai *hGH* analīzes nolūkiem, un tajās ir norādīts, ka analīzes matrica ir serums [5]. Laboratorija informē pārbaudes iestādi un lūdz tai padomu attiecībā uz to *paraugu* analītiskās pārbaudes noraidīšanu, kuriem ir konstatētas neatbilstības (saskaņā ar *ISL*; [6]). Kad *paraugi* ir savākti nepareizā matricā (to nosaka rezultātu pārvaldības iestāde), šādas analīzes rezultātus neņem vērā.
		- Pārbauda *parauga(-u)* statusu (piemēram, pierādījumus par hemolīzi) un paraugu ņemšanas mēģeņu viengabalainību (piemēram, sadalīšanas gela plīsuma pazīmes). Laboratorija atzīmē visus neparastos *parauga* stāvokļus, reģistrē šādus stāvokļus un norāda tos pārbaudes ziņojumā pārbaudes iestādei *ADAMS* sistēmā.
		- Attiecībā uz *paraugiem*, kas saņemti kā nesadalītas asinis *SSTTM-II* mēģenēs vai *SSTTM-II Plus Advance* mēģenēs, vai *SSTTM* mēģenēs, veic turpmāk norādītās darbības.

“A” *paraugs*

* “A” paraugu pēc iespējas ātrāk pēc saņemšanas centrifugē 10–15 minūtes ar 1300–1500 g.
* Visa atdalītā seruma daļa no “A” *parauga* jāpārlej citā mēģenē vai jāsadala alikvotās jaunos flakonos, kas tiek atbilstoši marķēti, lai varētu aizpildīt laboratorijas iekšējās uzraudzības ķēdes dokumentāciju. Sākotnējās pārbaudes procedūrā izmanto vienu alikvotu. Atlikušo(-ās) “A” *parauga* alikvotu(-as), kas nav izmantota(-as) sākotnējās pārbaudes procedūrā, nepieciešamības gadījumā uzglabā sasaldētu(-as)[[2]](#footnote-2) līdz “A” apstiprināšanas procedūrai.
* Sākotnējās pārbaudes procedūrā “A” *parauga* alikvotas var analizēt tūlīt pēc sadalīšanas alikvotās vai uzglabājot aptuveni 4 °C temperatūrā ne ilgāk kā 24 stundas pirms analīzes (ne vēlāk kā 4 dienas pēc *parauga* savākšanas). Vai arī “A” *parauga* alikvotas līdz analīzei sasaldē.2

“B” *paraugs*

* “B” *paraugu* pēc iespējas ātrāk pēc savākšanas centrifugē 10–15 minūtes ar 1300–1500 g. Visa “B” *parauga* atdalītā seruma daļa tiek turēta *SSTTM-II* vai *SSTTM-II Plus Advance*, vai *SSTTM* *paraugu* vākšanas mēģenē un, ja nepieciešams, tiek sasaldēta saskaņā ar mēģenes ražotāja norādījumiem[[3]](#footnote-3) līdz analīzes veikšanai.
* Kad “B” *paraugs* ir atkausēts un atvērts, “B” apstiprināšanas procedūrai izmanto “B” *parauga* alikvotu. Atlikusī “B” *parauga* seruma daļa jāpārlej jaunā mēģenē/flakonā un hermētiski jānoslēdz *sportista* vai *sportista* pārstāvja, vai laboratorijas norīkota neatkarīga liecinieka klātbūtnē, izmantojot sistēmu, kas ir droša pret falsifikāciju, un jāsasaldē2 līdz papildu analīzei, ja tāda nepieciešama.
	+ - Attiecībā uz *paraugiem*, kas saņemti kā atdalīta seruma *paraugi* veicamas turpmāk norādītās darbības.

a) *Paraugi*, kas saņemti kā sasaldēta atdalīta seruma daļas

* + Šie *paraugi* paliek sasaldēti2 līdz analīzei.
	+ Pēc atkausēšanas ņem “A” *parauga* alikvotu, ko izmanto sākotnējās pārbaudes procedūrā. Šo “A” *parauga* alikvotu var uzglabāt aptuveni 4 °C temperatūrā, ja sākotnējās pārbaudes procedūra ir paredzēta 24 stundu laikā pēc atkausēšanas. Atlikušo “A” *parauga* seruma daļu, ko neizmanto sākotnējās pārbaudes procedūrā, var uzglabāt *paraugu* vākšanas mēģenē vai sadalīt alikvotās jaunos flakonos, kurus pienācīgi marķē, lai tos reģistrētu laboratorijas iekšējās uzraudzības ķēdes dokumentācijā, un uzglabā sasaldētā2 stāvoklī līdz “A” apstiprināšanas procedūrai, ja tāda nepieciešama.
	+ Kad “B” *paraugs* ir atkausēts un atvērts, “B” apstiprināšanas procedūrai izmanto “B” *parauga* alikvotu. Atlikusī “B” *parauga* seruma daļa jāglabā *paraugu* vākšanas mēģenē un hermētiski jānoslēdz *sportista* vai *sportista* pārstāvja, vai laboratorijas norīkota neatkarīga liecinieka klātbūtnē, izmantojot sistēmu, kas ir droša pret falsifikāciju, un jāsasaldē2 līdz papildu analīzei, ja tāda nepieciešama.

b) *Paraugi*, kas saņemti kā atdzesēta atdalīta seruma daļas

* + “A” *parauga* alikvotu paņem pēc iespējas ātrāk pēc saņemšanas. Sākotnējās pārbaudes procedūrā “A” *parauga* alikvotas var analizēt tūlīt pēc sadalīšanas alikvotās vai uzglabāt aptuveni 4 °C temperatūrā ne ilgāk kā 24 stundas pirms analīzes (ne vēlāk kā 4 dienas pēc *parauga* savākšanas). Vai arī “A” *parauga* alikvotas līdz analīzei sasaldē.2
* Atlikušo “A” *paraugu*, ko neizmanto sākotnējās pārbaudes procedūrā, uzglabā *paraugu* vākšanas mēģenē vai sadala alikvotās jaunos flakonos, kurus pienācīgi marķē, lai reģistrētu laboratorijas iekšējās uzraudzības ķēdes dokumentācijā, un uzglabā sasaldētā2 stāvoklī līdz “A” apstiprināšanas procedūrai, ja tāda nepieciešama.
* “B” *paraugus* pēc iespējas ātrāk sasaldē2 uzreiz pēc saņemšanas un pirms analīzes atkausē. Kad “B” *paraugs* ir atkausēts un atvērts, “B” apstiprināšanas procedūrai izmanto tā alikvotu. Atlikušo “B” *parauga* serumu uzglabā *paraugu* vākšanas mēģenē un atkārtoti hermētiski noslēdz *sportista* vai *sportista* pārstāvja, vai laboratorijas norīkota neatkarīga liecinieka klātbūtnē, izmantojot sistēmu, kas ir droša pret falsifikāciju, un uzglabā sasaldētu2 līdz papildu analīzei, ja tāda nepieciešama.

2.2. Analītiskās pārbaudes procedūra

Lai veiktu analītiskās pārbaudes procedūru, skatiet pārbaudes procedūru, kas aprakstīta pārbaudes komplektos iekļautajos instrukciju ieliktņos, un laboratorijas standartprocedūru (*SOP*).

Konstatējot pretrunas starp komplektos iekļauto instrukciju ieliktni un laboratorijas *SOP*, vai starp instrukciju ieliktni un šo tehnisko dokumentu, noteicošais vienmēr ir otrais.

*Piezīme*. Lai nodrošinātu testa veikšanas kvalitāti, jāpievērš uzmanība laikam, kad parādās *parauga* signāls luminometrā, kas jāiestata uz 1 s.

2.2.1. Analītiskās pārbaudes stratēģija

* + - * Sākotnējās pārbaudes procedūrā var izmantot vai nu komplektu “1”, vai komplektu “2”, ja izmanto vismaz divas (2) alikvotas no oriģinālā “A” *parauga*.
			* Sākotnēja varbūtēja nelabvēlīga analīžu rezultāta gadījumā “A” *parauga* apstiprināšanas procedūrā izmanto gan komplektu “1”, gan komplektu “2”, izlietojot trīs (3) jaunas alikvotas no oriģinālā “A” *parauga*.
			* “B” apstiprināšanas procedūrā gan komplektu “1”, gan komplektu “2” izmanto trim (3) alikvotām, kas paņemtas no oriģinālā “B” *parauga*. Veicot “B” *parauga* apstiprināšanas analīzi, laboratorija ievēro *ISL* prasības [6].
			* Gan “A”, gan “B” apstiprināšanas procedūrās mēra trīs (3) *parauga* alikvotas, izņemot gadījumus, kad *parauga* tilpums ir ierobežots, un tādā gadījumā jāanalizē maksimālais alikvotu skaits, ko ir iespējams sagatavot [6].
			* Saskaņā ar *ISL* [6] laboratorijai ir jāizstrādā politika, lai noteiktu tos apstākļus, kad “A” vai “B” *parauga* apstiprināšanas procedūru var atkārtot (piemēram, nosakot testa iekšējās *RSD* vērtības > 15 %).
			* Lai izmantotu pārbaudes metodi(-es) dažādos testa apstākļos (ar dažādām komplekta partijām, dažādiem analīžu veicējiem utt.) un/vai lai pierādītu testa specifiskumu, laboratorijām ir ieteicams izveidot pietiekami raksturotu(-us) un stabilu(-us) iekšējās kvalitātes kontroles paraugu(-us) (*iQC*), kas ir laboratorijas tiešā kontrolē un ko neietekmē atšķirības komplektu partijās.

# 3.0. Ziņošana un rezultātu interpretācija

3.1. Pārbaudes rezultātu interpretācija

Lai noteiktu analīžu rezultāta atbilstību, laboratorija salīdzina *recGH / pitGH* attiecību (kas izteikta ar diviem cipariem aiz komata), kas iegūta no izmērīto *parauga* alikvotu atkārtojumiem un aprēķināta, izdalot “rekombinanta” testa rezultātu vidējo vērtību (*recGH* koncentrāciju ng/ml, kas izteikta ar trim cipariem aiz komata) ar “hipofīzes” testa rezultātu vidējo vērtību (*pitGH* koncentrāciju ng/ml, kas izteikta ar trim cipariem aiz komata), piemērojot atbilstošo izšķiršanas robežu (*DL*) vīriešiem un sievietēm, kāds ir noteikts izmantotajam pārbaudes komplektam [7]. Izmantojamās *DL* vērtības ir šādas[[4]](#footnote-4):

|  |
| --- |
| komplektā “1” – vīriešiem (**1,84**); sievietēm (**1,63**);komplektā “2” – vīriešiem (**1,91**); sievietēm (**1,59**). |

* + - *Paraugiem*, kuru *pitGH* koncentrācijas izmērītās vērtības ir mazākas par laboratorijas noteikto testa *LOQ*, *recGH / pitGH* attiecības aprēķināšanai izmanto atbilstošā *pitGH* testa *LOQ1* vērtības (kas izteikts ar trim cipariem aiz komata).
		- Šādos gadījumos *recGH / pitGH* attiecība *paraugam* tiek paziņota kā “lielāka par” (piemēram, ja *recGH* ir 0,200 ng/ml, bet *pitGH* ir mazāks par testa *LOQ*, un laboratorijas *LOQ* šim *pitGH* ir 0,050 ng/ml, attiecība jāpaziņo kā “lielāka par 4,00”).
		- Par visiem *paraugiem*, kuru ***recGH* vērtības ir mazākas par 0,150 ng/ml**, paziņo negatīvu rezultātu, neatkarīgi no atbilstošajām *recGH / pitGH* attiecības vērtībām.

3.1.1. Varbūtējs nelabvēlīgs analīžu rezultāts

Sākotnējās pārbaudes procedūrā iegūst varbūtēju nelabvēlīgu analīžu rezultātu “A” *paraugam*, ja *recGH* attiecība pret *pitGH* pārsniedz izmantotajam komplektam (komplektam “1” vai “2”) atbilstošo *DL*.

3.1.2. *Nelabvēlīgs analīžu rezultāts*

Apstiprināšanas procedūrā iegūst *nelabvēlīgu analīžu rezultātu*, ja analīzes rezultāti (*recGH / pitGH* attiecības) pārsniedz atbilstošā *DL* vērtības gan komplektam “1”, gan komplektam “2”.

3.1.3. *Netipiska atrade*

Apstiprināšanas procedūrā iegūst *netipisku atradi*, ja analīzes rezultāti (*recGH/pitGH* attiecības) pārsniedz atbilstošā *DL* vērtību tikai vienam no abiem izmantotajiem komplektiem (komplektam “1” vai “2”).

Testa *MU* jau ir ņemta vērā un iekļauta *DL* atsauces statistiskajā novērtējumā, kura pamatā ir populācijas dati. Tādēļ, ziņojot par *nelabvēlīgu analīžu rezultātu* vai par *netipisku atradi*, testa *MU* nepievieno.[[5]](#footnote-5)

3.2. Pārbaudes rezultātu paziņošana

Ziņojot par *nelabvēlīgu analīžu rezultātu* vai *netipisku atradi*, laboratorijas pārbaudes ziņojumā iekļauj *recGH / pitGH* attiecību, kas izteikta ar diviem cipariem aiz komata, vidējām *recGH* un *pitGH* koncentrāciju vērtībām no atkārtotiem noteikšanas rezultātiem (kas iegūti apstiprināšanas procedūras laikā), piemērojamo *DL* vērtības, kā arī *uc*, kuru vērtības ir tuvas *DL*, kā laboratorija noteikusi pārbaudes metodes validācijas laikā (izsakot tos vienībās ar diviem cipariem aiz komata).

Turklāt laboratoriskās dokumentācijas paketē iekļauj *recGH* un *pitGH* vidējās koncentrācijas vērtības no atkārtotiem noteikšanas rezultātiem (kas iegūti apstiprināšanas procedūras laikā, izsakot tos ar trim cipariem aiz komata) un paplašināto *MU* (*U95%*), kas līdzvērtīga 95 % aptvēruma intervāla (*k = 2*) attiecībā uz *parauga recGH/pitGH* attiecības analītisko vērtību (kas izteikta vienībās ar diviem cipariem aiz komata).

**Pārbaudes ziņojuma piemērs** (piemēram, *paraugs*, kas paņemts no *sportista* vīrieša)

*Parauga* analīze, izmantojot *hGH* diferenciālos imūntestus, ir devusi šādas testa attiecību analītiskās vērtības: 2,52 komplektam “1” un 2,40 komplektam “2”, un šīs vērtības pārsniedz atbilstošās *DL*, kas ir attiecīgi 1,84 un 1,91. Kombinētā standarta nenoteiktība (*uc*), ko aplēsusi laboratorija līmeņos, kas tuvi *DL*, ir šāda: 0,22 komplektam “1” un 0,19 komplektam “2”. Tas ir *nelabvēlīgs analīžu rezultāts* attiecībā uz *hGH*.

# 4.0. Pārbaudes mērījumu nenoteiktība

4.1. Kombinētā standarta nenoteiktība (*uc*)

* + - Lai novērtētu testa *MU*, laboratorijas parasti atsaucas uz *TD DL* [8].
		- Laboratorijas nosaka katra testa *uc*, pamatojoties uz saviem testa validācijas datiem.

*uc* ir dinamisks parametrs, kuru var samazināt, paplašinot ekspertīzi testu veikšanā. Stabilai *uc* vērtības noteikšanai jāizmanto vairāki mērījumi, kas tiek veikti ilgā laika posmā, ņemot vērā konkrētus nenoteiktības avotus (piemēram, komplekta mainīgumu, vides pārmaiņas, instrumenta veiktspēju, dažādus analīzes veicējus utt.).

* + - ISO/IEC 17025 ir ieteikts aplēst *uc*, izmantojot pieeju, kas atbilst principiem, kuri aprakstīti ISO/*IEC* dokumentā *Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement* [Norādījumi mērījumu nenoteiktības izteikšanai] (*GUM*) [9].

*hGH* testos, kuru rezultāti ir izteikti kā *recGH/pitGH* koncentrāciju vērtību attiecība, jāņem vērā *uc* vērtības, kas iegūtas abos testos ar konkrēto pārbaudes komplektu.

*uc* budžeta aprēķināšanai ir ieteicamas divas lejupvērstas pieejas.

A) Relatīvajā *uc* budžetā (%) tiks iekļauti starpposma precizitātes elementi (*sw*, kas izteikta kā *RSD*, %), kā arī nobīde (% novirze no paredzamajām vai saskaņotajām vērtībām), ko piemēro *recGH* un *pitGH* koncentrāciju noteikšanas rezultātiem ar katru konkrēto komplektu:



* + Aprēķinot *uc*, ieteicams izmantot standarta kontrolparaugus, kas sagatavoti, pievienojot *pitGH* un *recGH* cilvēka nulles līmeņa (nenosakāmu *hGH* līmeņu) serumā, lai iegūtu aptuvenu *recGH/pitGH* attiecību = 1,50 – 2,00. 5–6 dienu laikā vismaz diviem dažādiem analīžu veicējiem trīs reizes jāizmēra četri dažādi atšķaidījumi, kas satur *recGH* ~ 12,5, 2,5, 0,5 un 0,1 ng/ml vērtības. Tas nodrošinās, ka *uc* tiek aprēķināta *hGH* koncentrāciju fizioloģiskajā intervālā, kas konstatēts veselīgu cilvēku paraugos.
	+ *uc* vērtība, kas piemērojama attiecībām, izrietēs no *uc*, kas iegūta komponentu testos saskaņā ar formulu (2).



B) Vai arī laboratorijas var aprēķināt *uc*, pamatojoties uz komplekta kontrolparaugu *QC1* un *QC2* daudzkārtējiem ilgtermiņa mērījumiem[[6]](#footnote-6).

* + Relatīvajā *uc* budžetā (%) tiks iekļauti starpposma precizitātes elementi (*sw*, kas izteikti kā *RSD*, %), kā arī nobīde, kas attiecībā uz *QC1* un *QC2* ir piemērojama *recGH* un *pitGH* koncentrāciju noteikšanas rezultātiem ar katru konkrēto komplektu [formula (1)].
	+ *sw* jānosaka, pamatojoties uz vismaz trīsdesmit (30) mērījumiem, kas veikti vismaz sešu (6) mēnešu laikā.
	+ Nobīde jānosaka, salīdzinot *recGH* un *pitGH* koncentrāciju ilgtermiņa vidējās vērtības, kas iegūtas gan *QC1*, gan *QC2*, izmantojot konkrētu komplektu, ar apstiprināto testa vērtību, ko noteicis komplektu ražotājs (atkarībā no partijas). Nobīdi izsaka kā procentuālu novizi no ražotāja noteiktās vērtības (*RMSbias*).
	+ *uc* (%), ko nosaka *recGH/pitGH* attiecība, katram *QC* var aprēķināt, kombinējot *uc* no *recGH* un *pitGH*, izmantojot vienādojumu (2).
	+ Komplekta *uc* (%) aprēķina kā vidējo vērtību no *uc* (*QC1*) un *uc* (*QC2*), ko piemēro attiecībai.

4.2. Maksimālie *uc* līmeņi

Saskaņā ar *TD DL* [8] laboratorijām ir *uc* vērtības, kas piemērojamas attiecībām, kuru vērtības ir tuvas *DL*, attiecībā uz katru pārbaudes komplektu, un tās nedrīkst pārsniegt maksimālās *uc\_Max* vērtības, kas iegūtas attiecīgās *EQAS* kārtās.

Mērķa *uc\_Max* ir minimālā prasība, kas laboratorijai jāsasniedz attiecībā uz mērījumu nenoteiktību, paziņojot rezultātu, lai varētu noteikt sliekšņa vielu.

4.3. Paplašinātā nenoteiktība *U95%*

Lai noteiktu paplašināto nenoteiktību *U95%,*, aptvēruma koeficientu *k* = 2 piemēro attiecībā uz *uc* ar 95 % ticamības pakāpi.

(3) *U95% = k⋅ uc*, kur *k* = 2

4.4. Mērījuma nenoteiktības pārbaude

Laboratorijas atsaucas uz *TD DL* [8], lai pastāvīgi pārbaudītu testa *uc* aplēses.

# 5.0. Atsauces

1. Bidlingmaier M, Wu Z, Strasburger CJ. Test method: GH. *Bailliere’s Clin Endocrinol Metab* **14**:99-109 (2000).

2. Wu Z, Bidlingmaier M, Dall R, Strasburger CJ. Detection of doping with human growth hormone. *Lancet* **353**: 895 (1999).

3. Wallace JD *et al.* Changes in non-22-kilodalton (kDa) isoforms of growth hormone (GH) after administration of 22-kDa recombinant human GH in trained adult males. *J Clin Endocrinol Metab* **86**:1731–1737 (2001).

4. Bidlingmaier M *et al*. High-Sensitivity Chemiluminescence Immunoassays for Detection of Growth Hormone Doping in Sports. *Clin Chem* **55**: 3 (2009).

5. World Anti-Doping Program. Guidelines for Blood Sample Collection.

https://www.wada-ama.org/en/resources/search?f[0]=field\_resource\_collections%3A190

6. World Anti-Doping Code International Standard for Laboratories.

https://www.wada-ama.org/en/resources/laboratories/international-standard-for-laboratories-isl

7.Hanley JA, Saarela O, Stephens DA, Thalabard JC. hGH isoforms differential immunoassays applied to blood samples from athletes: decision limits for anti-doping testing. *Growth Horm IGF Res* **24**: 205, 2014.

8. WADA Technical Document TDDL: Decision Limits for the Confirmatory Quantification of Threshold Substances.

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

9. ISO/IEC Guide 98-3: 2008. Evaluation of Measurement Data – Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement (GUM) (2008).

# Pateicības

*WADA* laboratorijas ekspertu grupa (*LabEG*) vēlas pateikties *WADA/USADA hGH* darba grupas ekspertiem par viņu ieguldījumu šā tehniskā dokumenta izstrādē.

1. Laboratorijas *LOQ*, kas noteiktas kā ≤ 0,050 ng/ml, pamatojoties uz pārbaudes metodes veiktspējas kritērijiem (*sr*≤ 15 % un *sw*≤ 20 %), nedrīkst būt zemākas par attiecīgajām *LOQ* vērtībām, ko noteicis komplekta ražotājs. [↑](#footnote-ref-1)
2. Alikvotu uzglabāšanai sasaldētā stāvoklī jāizmanto cieši aizverami flakoni (optimālai uzglabāšanai ieteicams izmantot kriomēģenes ar “O veida gredzenu”), un ieteicami ir šādi apstākļi:

	* + īslaicīgai uzglabāšanai (līdz trim mēnešiem) aptuveni –20 °C temperatūrā;
		+ ilgākā laikposmā (vairāk nekā trīs mēnešus) jāsasaldē aptuveni –20 °C temperatūrā un jāpārnes uz vietu, kur temperatūra ir robežās no –70 °C līdz –80 °C.*Paraugu(-us)* analīzēm nedrīkst atkausēt karstā ūdenī vai izmantot citu līdzīgu procesu, kas paaugstinātu *parauga* temperatūru virs istabas temperatūras. Ieteicams atkausēt pa nakti 4 °C temperatūrā. [↑](#footnote-ref-2)
3. Mēģeni ievieto īpašā izolācijas kastē, pirms to pārvieto uz saldētavu –20 °C temperatūrā. Lai saglabātu sadalīšanas gela integritāti, pirms sasaldēto mēģeņu pārvietošanas vai pārvešanas sasaldēšanai jāilgst vismaz divas stundas. Mēģeņu pārvietošana, pirms sadalīšanas gels ir sasalis un nostabilizējies, var izraisīt seruma piesārņošanu ar šūnu materiālu. [↑](#footnote-ref-3)
4. *DL* vērtības tiek iegūtas, analizējot no *sportistiem* savāktos *paraugus*, kas tiek apstrādāti faktiskos *dopinga kontroles* apstākļos attiecībā uz *paraugu* vākšanu, transportēšanu, uzglabāšanu un analīzi (izmantojot pašlaik tirgū pieejamos *ISO* sertificētos *hGH* komplektus un standartizētus analītiskos protokolus un instrumentus). Noteiktās *DL* vērtības nosaka kombinēto pārbaudes specifiskumu (starp abiem komplektiem) ar precizitāti vismaz 99,99 % [7]. [↑](#footnote-ref-4)
5. Saskaņā ar *WADA* tehnisko dokumentu par izšķiršanas robežām apstiprinošā sliekšņa vielu daudzuma noteikšanai (*TD DL*) [8] lēmuma noteikums, ko piemēro tiem testiem, kuriem robežas vērtība(-as) ir noteikta(-as), pamatojoties uz populācijas atsauces statistiku, jau paredz aizsargjoslu, kas atbilst testā(-os) konstatētajai mērījumu nenoteiktībai. Tādēļ analītisko vērtību intervāls, kas tiek uzskatīts par atbilstīgu (negatīva atrade) vai neatbilstīgu (*nelabvēlīgs analīžu rezultāts*), saskaņā ar šo lēmuma noteikumu tiktu noteikts ar pašu robežas vērtību, kas veido *DL*. [↑](#footnote-ref-5)
6. Jāņem vērā visi *QC* paraugu mērījumi, ja vien ir izpildīts testa iekšējais pieņemamības kritērijs (*sr* ≤ 15 %), pretējā gadījumā testu atkārto (tāpat kā attiecībā uz *paraugiem*). [↑](#footnote-ref-6)