A black and white logo

Description automatically generated

***WADA* tehniskais dokuments – TD2024EPO**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Dokumenta numurs: | TD2024EPO | Versijas numurs: | 1.0 |
| Sarakstījušas:  Pārskatījusi: | *WADA* Zinātnes departaments / *EPO* darba grupa  *WADA* Laboratoriju ekspertu konsultatīvā grupa | Apstiprinājusi: | *WADA* izpildkomiteja |
| Datums: | 2024. gada 11. marts | Spēkā stāšanās datums: | 2024. gada 15. jūnijs |

**ERITROPOETĪNA (*EPO*) RECEPTORU AGONISTU (*ERA*) UN TRANSFORMĒJOŠĀ AUGŠANAS FAKTORA BĒTA (*TGF-β*) SIGNĀLINHIBITORU ANALĪŽU AR POLIAKRILAMĪDA GELA ELEKTROFORĒTISKĀS (*PAGE*) ANALĪZES METODĒM VEIKŠANAS UN ZIŅOŠANAS SASKAŅOŠANA**

# 1.0. Ievads

Šis *tehniskais dokuments* (*TD*) ir izstrādāts, lai saskaņotu laboratoriju īstenotu eritropoetīna (*EPO*) un citu *EPO* receptoru agonistu (*ERA*) noteikšanu un ziņošanu gadījumos, kad to analīze tiek veikta, izmantojot poliakrilamīda gela elektroforētiskās (*PAGE*) analīzes metodes. Ja ir pieejamas citas metodes (*piem.*, *LC-MS*), tiek sniegta atsauce arī uz piemērojamo(-ajiem) *TD*.

Visas laboratorijas piemēro šajā *TD* noteiktās prasības, ikdienā izmantojot *PAGE* analīzes metodes, lai identificētu *ERA* urīna vai asins (plazmas / seruma / izžāvēta asins piliena (*DBS*)) *paraugos*.

Šajā *TD* tiek izmantoti turpmāk minētie saīsinājumi, akronīmi un preču zīmes.

* *CERA* (*Mircera*®, *Roche*): pastāvīgs eritropoetīna receptoru aktivators, eritropoetīna analogs, kas pazīstams ar starptautisko nepatentēto nosaukumu (SNN) kā pegserpoetīns, metoksipegilēts epoetīna-β atvasinājums.
* *EPO*: eritropoetīns.
* *EPO-Fc*: *EPO* saturošs rekombinantais sapludinātais proteīns, kas saistīs ar cilvēka imūnglobulīna *Fc* apgabalu.
* *bEPO*: endogēnais eritropoetīns, kas atrodams asinīs.
* *dEPO*: darbepoetīns. Modificētas eritropoetīna formas ar papildu glikozilācijas vietām (*piem.*, darbepoetīns-α, *NESP*, *CRESP*, *Nesbell* utt.).
* *ERA*: eritropoetīna receptoru agonisti, *piem.*, eritropoetīns (*EPO*), rekombinantie eritropoetīni (*rEPO*) un *EPO* pārveidojumi (*piem*., *NESP*, *CERA*, *EPO-Fc*).
* *IEF-PAGE*: izoelektriskā fokusēšana – poliakrilamīda gela elektroforēze.
* *NESP* (*piem.*, *Aranesp*®, *Amgen*): jauns eritropoēzi stimulējošs proteīns, eritropoetīna analogs, ko pēc tā SNN pazīst kā darbepoetīnu-α.
* *SAR-PAGE*: nātrija N-lauroilsarkozināta (“sarkozil-”) poliakrilamīda gela elektroforēze.
* *SDS-PAGE*: nātrija dodecilsulfāta poliakrilamīda gela elektroforēze.
* *rEPO*: rekombinantais eritropoetīns. Šīs farmaceitiskās vielas pēc to SNN ir pazīstamas kā “epoetīns”. Dažādos preparātus apzīmē ar grieķu alfabēta burtu, *piem.*, epoetīns-α, -β, -δ, -ω. Citiem preparātiem (*piem.*, nepatentētajiem preparātiem vai kopijām), kurus kopā dēvē par “*rEPO* biolīdziniekiem”, var būt atšķirīgi izoformu profili, kas precīzi neatbilst jau norādītajiem.
* *TGF-ß*: transformējošā augšanas faktora bēta (*TGF-ß*) signālinhibitori (*piem.*, luspatercepts, sotatercepts).
* *uEPO*: endogēnais eritropoetīns, kas atrodams cilvēka urīnā.

**2.0. Analītiskā *pārbaude* *ERA* noteikšanai**

### 2.1. Pirmsanalītiskā procedūra

Laboratorija ievēro Laboratoriju *starptautiskajā standartā* (LSS) noteiktās sākotnējās uzglabāšanas un *parauga* alikvotēšanas procedūras [1]. Lai samazinātu iespējamo *ERA* sadalīšanos, laboratorija īsteno turpmāk norādītās procedūras.

2.1.1. Urīna *paraugi*

a) Urīna “A” *paraugus* un alikvotas *ERA* analīzei uzglabā sasaldētā stāvoklī, ja *ERA* analīze netiek sākta divdesmit četru (24) stundu laikā pēc parauga saņemšanas/alikvotēšanas.

b) Pēc tam, kad laboratorija ir konstatējusi varbūtēju *nelabvēlīgu analīžu rezultātu* (*PAAF*) attiecībā uz *ERA* “A” *paraugā*, laboratorija pēc iespējas ātrāk veic “A” *parauga* apstiprināšanas procedūru (*CP*).

i) Ja “A” *parauga* *CP* nevar veikt divdesmit četru (24) stundu laikā, laboratorija ievieto “A” *parauga* trauku saldētavā līdz analīzei.

ii) Laboratorija attiecīgo “B” *parauga* trauku ievieto sasaldēšanai -70 °C vai zemākā temperatūrā.

c) Ja tiek pieprasīta “B” *parauga* apstiprināšanas procedūra (*CP*) attiecībā uz *ERA*, to ieteicams veikt viena (1) mēneša laikā pēc ziņošanas par *AAF* attiecībā uz “A” *paraugu*[[1]](#footnote-2).

d) Urīna “B” *parauga* alikvotas analizē divdesmit četru (24) stundu laikā pēc atkausēšanas. Atlikušo “B” *paraugu* uzglabā -70 °C vai zemākā temperatūrā.

2.1.2. Plazmas/seruma *paraugi*

a) Ja *ERA* analīze jāveic asins *paraugu* plazmas frakcijai, gan “A”, gan “B” *paraugu* centrifugē 10–15 minūtes pie 1300–1500 g, tiklīdz ir praktiski iespējams iegūt asins plazmas frakciju. Tomēr, ja *paraugs* ir paņemts arī analītiskajai *pārbaudei* ar nesadalītām asinīm (*piem.*, *sportista bioloģiskās pases* hematoloģiskajiem *marķieriem*, homologu asiņu pārliešanai, gēnu dopingam), sagaida, kad ir pabeigta *ITP* un visas piemērojamās *CP* “A” un/vai “B” *paraugam* ar nesadalītām asinīm, un tad veic *parauga* centrifugēšanu un *ERA* analīzi.

b) Ja *ERA* analīze jāveic asins *paraugu* seruma frakcijai, *paraugus* centrifugē 10–15 minūtes pie 1300–1500 g, tiklīdz tas ir iespējams pēc saņemšanas laboratorijā.

c) Pēc sadalīšanas ar centrifugēšanu “A” *parauga* plazmas vai seruma frakciju (kas atrodas “A” *parauga* savākšanas mēģenē) un/vai “A” *parauga* plazmas vai seruma alikvotu(-as), kas ņemta(-as) atsevišķos stobriņos, var uzglabāt atdzesētā stāvoklī ne ilgāk kā divdesmit četras (24) stundas vai sasaldētā stāvoklī līdz analīzei.

d) “A” *parauga* plazmas vai seruma alikvotas, ko izmanto “A” *parauga* *CP*, analizē pēc iespējas ātrāk, bet ne vēlāk kā divdesmit četras (24) stundas pēc atkausēšanas.

e) Ieteicams pēc centrifugēšanas “B” *paraugus* nekavējoties uzglabāt sasaldētā stāvoklī noslēgtā “B” *parauga* savākšanas mēģenē saskaņā ar noteiktajiem protokoliem līdz *ERA* analīzei, ja tāda veicama.

f) Pēc tam, kad laboratorija “A” *paraugā* ir konstatējusi *PAAF* attiecībā uz *ERA*, laboratorija ievieto attiecīgo “B” *parauga* mēģeni sasaldēšanai -70 °C vai zemākā temperatūrā.

g) Ja tiek pieprasīta “B” *parauga* *CP* attiecībā uz *ERA*, to ieteicams veikt viena (1) mēneša laikā pēc ziņošanas par *AAF* attiecībā uz “A” *paraugu*1.

h) “B” *parauga* plazmas vai seruma alikvotas analizē divdesmit četru (24) stundu laikā pēc atkausēšanas. Atlikušo “B” *paraugu* uzglabā -70 °C vai zemākā temperatūrā.

2.1.3. Izžāvētu asins pilienu (*DBS*) *paraugi*

a) *DBS* *paraugu* uzglabāšanā un alikvotēšanā ievēro norādījumus, kas ietverti *WADA* *tehniskajā dokumentā* “Izžāvēti asins pilieni (*DBS*) *dopinga kontrolei*. Analītiskās *pārbaudes* un glabāšanas prasības un procedūras” (*TD DBS*) [2].

b) *ITP* gadījumā no “A” *parauga* ņem vienu (1) alikvotu, kas atbilst vienam (≥ 20 µL) vai vairākiem nesadalītiem pilieniem. Pēc piliena alikvotas paņemšanas atlikušo “A” *paraugu* uzglabā atdzesētā stāvoklī.

c) Lai veiktu “A” *parauga* *CP*, no “A” *parauga* ņem jaunu piliena alikvotu.

d) “B” *paraugu* pēc saņemšanas uzglabā sasaldēta stāvoklī. Ja ir jāveic “B” *parauga* analīze1, “B” *paraugu* atkausē istabas temperatūrā, pirms ņem piliena alikvotu “B” parauga *CP* [2]. Atlikušo “B” *paraugu* ievieto atpakaļ saldētavā.

Ja *DBS* “A” un “B” *paraugs* atrodas vienā traukā, “B” *paraugu* var glabāt atdzesētā stāvoklī, līdz ir pabeigta “A” *parauga* *ITP* un *CP* (ja piemērojams).

### 2.2. *PAGE* analīzes metožu apraksts

2.2.1. *IEF*-*PAGE* [3, 8–10]

a) *Parauga* sagatavošana

Gan *ITP*, gan *CP* gadījumā imūnafinitātes attīrīšanu veic pirms *IEF*-*PAGE* [3–10] piemērošanas.

*[Piezīme. Imūnafinitātes attīrīšanai izmanto citas antivielas, nevis tās, kuras izmanto imūnmembrānas analīzei. Laboratorija, veicot metodes validāciju, pierāda, ka izmantotā imūnafinitātes attīrīšanas metodika nemaina analizējamo endogēno EPO un ERA IEF-PAGE glikoformu profilus.]*

b) Elektroforētiska sadalīšana

*IEF*-*PAGE* veic tādā pH diapazonā, kas ir saderīgs ar analizējamo *ERA* izoelektriskajiem punktiem (*pI*). *IEF*-*PAGE* veic denaturētos apstākļos (aptuveni 7M karbamīda).

c) Imūnmembrānas analīze

i) Imūnmembrānas analīzi veic ar elektroblotēšanu, lai optimizētu *ERA* pārnesi.

ii) Pēc sadalīšanas ar *IEF*-*PAGE*, veic vienkāršu blotēšanu, izmantojot šķērsreaktivitātes minimizēšanas protokolu (*piem.*, izmantojot biotinilētu monoklonālo peles klonu AE7A5 pret cilvēka *EPO* (P&I sistēmas BAM2871)), [11, 12] vai dubulto blotēšanu.

*[Piezīme. Monoklonālais peles klons AE7A5 pret cilvēka EPO ir primārā antiviela, ko ieteicams izmantot šajā posmā, lai analizētu ERA, kas saistīti ar EPO. Tomēr pēc laboratorijas ieskatiem var izmantot arī citas, pienācīgi validētas antivielas, kas ir pret cilvēka EPO, ar līdzīgiem specifiskuma un jutības raksturlielumiem.]*

d) Noteikšana

*ERA* izoelektriskos modeļus nosaka, izmantojot piemērotu, jutīgu identifikācijas sistēmu (*piem.*, pastiprinātu hemiluminiscences sistēmu). Signālam, kas iegūts, izmantojot densitometriju, jābūt kvantificējamam (izmanto tikai 16 bitu pelēktoņu *TIFF* datnes), lai noteiktu *ERA* modeļa dažādu izoformu relatīvo intensitāti.

2.2.2. *SAR*-*PAGE* [9, 13–18] un *SDS*-*PAGE* [11, 20, 21]

a) *Parauga* sagatavošana

Gan *ITP*, gan *CP* gadījumā imūnafinitātes attīrīšanu veic pirms *SAR*-*PAGE* vai *SDS*-*PAGE* [3–10] piemērošanas.

*[Piezīme. Imūnafinitātes attīrīšanai izmanto citas antivielas, nevis tās, kuras izmanto imūnmembrānas analīzei. Laboratorija, veicot metodes validāciju, pierāda, ka izmantotā imūnafinitātes attīrīšanas metodika nemaina analizējamo endogēno EPO un ERA SAR-PAGE / SDS-PAGE īpašības.]*

b) Elektroforētiska sadalīšana

i) Piemēro vertikālo elektroforēzi.

ii) Ar *EPO* saistītu *ERA* sadalīšanai ieteicams izmantot 10 % akrilamīda (%T) gelus.

iii) *SAR-PAGE* gadījumā *SDS* parauga un elektroforēzes buferšķīdumos tiek aizstāts ar nātrija N-lauroilsarkozinātu.

iv) Ja *SDS*-*PAGE* izmanto *ITP* gadījumā vai veicot *CP* attiecībā uz *CERA* un *EPO*-*Fc*, no imūnafinitātes attīrītam eluātam pirms elektroforētiskas sadalīšanas pievieno atbilstošu nesējproteīnu (*piem.*, kazeīnu, insulīnu).

v) Ja *CP* veic attiecībā uz *rEPO*, epoetīna-δ (*Dynepo*) vai rekombinantā epoetīna-α preparātu (*piem.*, *Eprex*) izmanto kā atsauci *rEPO* migrācijas robežlīnijas novietošanai (šīs prasības ievērošana *ITP* gadījumā nav obligāta).

vi) Lai noteiktu citu *ERA* elektroforētiskās īpašības, sadalīšanas procesā ir nepieciešama *dEPO* (piem., *NESP*), *CERA* un *EPO*-*Fc* klātbūtne.

c) Imūnmembrānas analīze

i) Imūnmembrānas analīzi veic ar elektroblotēšanu, lai optimizētu *ERA* pārnesi.

ii) Urīna un seruma/plazmas/*DBS* *paraugu* *ITP* un *CP* gadījumā pēc elektroforētiskas sadalīšanas var veikt vienkāršo vai dubulto blotēšanu saskaņā ar laboratorijas metožu atbilstošu validāciju. Izmantojot vienkāršu blotēšanu, piemēro šķērsreaktivitātes minimizēšanas protokolu (*piem.*, izmanto biotinilētu monoklonālo peles klonu AE7A5 pret cilvēka *EPO* (P&I sistēmas BAM2871) [11, 12).

*[Piezīme. Monoklonālais peles klons AE7A5 pret cilvēka EPO ir primārā antiviela, ko ieteicams izmantot šajā posmā, lai analizētu ERA, kas saistīti ar EPO. Tomēr pēc laboratorijas ieskatiem var izmantot arī citas, pienācīgi validētas antivielas, kas ir pret cilvēka EPO, ar līdzīgiem specifiskuma un jutības raksturlielumiem.]*

iii) Var izmantot vairākus blotēšanas buferšķīdumus (*piem.*, *Bjerrum*, *CAPS*, *Kyhse-Andersen*, *Towbin*).

iv) Ja *SDS*-*PAGE* izmanto *ITP* gadījumā vai veicot *CP* attiecībā uz *CERA* un *EPO*-*Fc*, izmanto nesaistītu bufersistēmu (*piem.*, *CAPS* buferšķīdumu) vai alternatīvu bufersistēmu, kas nodrošina šo lielo biomolekulu efektīvu pārnesi [11].

d) Noteikšana

*ERA* elektroforēzē konstatētos zīmējumus nosaka, izmantojot piemērotu, jutīgu identifikācijas sistēmu (*piem.*, pastiprinātu hemiluminiscences sistēmu): izmanto tikai 16 bitu pelēktoņu *TIFF* datnes.

2.3. Analītiskās *pārbaudes* stratēģija

2.3.1. *PAGE* analīzes metodes

*PAGE* analīzes metožu (tostarp *ERA* imūnfinitātes attīrīšanas, elektroforētiskās sadalīšanas un imūndetekcijas), ko izmanto *ITP* un *CP*, noteikšanas robeža (*LOD*), kas aplēsta analīzes matricā (maksimums 15 ml urīna vai 0,5 ml seruma vai plazmas, vai viens (1) ≥ 20 µL *DBS*) metožu validācijas laikā, nedrīkst būt lielāka par (≤) 50 % no atbilstošā minimālā vajadzīgā veiktspējas līmeņa (*MRPL*) (sk. 1. tabulu).

**1. tabula.** *MRPL* attiecībā uz *ERA*, kas analizēti ar *PAGE* metodēm (*parauga* matricā)

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Mērķa *ERA*** | **Analīzes matrica** | |
| **Urīns** | **Serums/Plazma/*DBS*** |
| *rEPO* | 1 SV/L\* | 30 SV/L \* |
| *dEPO* | 1 pg/mL | 30 pg/mL |
| *CERA* | 5 pg/mL | 150 pg/mL |
| *EPO*-*Fc* | 5 pg/mL | 150 pg/mL |

\* Noteikts, pamatojoties uz *rEPO* saturu paraugos, kas satur gan *rEPO*, gan endogēno *EPO* (jaukta tipa josla uz gela).

2.3.1.1. Sākotnējās *pārbaudes* procedūra (*ITP*)

a) Laboratorija *ITP* veikšanai var izmantot *IEF*-*PAGE* [3, 8–10] un/vai *SAR*-*PAGE* [9, 13–18], vai *SDS*-*PAGE* [19, 20] (sk. 2. tabulu).

b) *ITP* ietver *PAGE* analīzes metodi vismaz šādiem elementiem:

i) “A” *parauga* alikvotai;

ii) negatīvas kvalitātes kontroles (*NQC*) paraugam;

*[Piezīme. Kvalitātes kontroles (QC) paraugi ir paraugi, kuri sagatavoti parauga matricā un kuriem tiek veikta tā pati analītiskā procedūra, ko piemēro paraugam, kuram veic analītisko pārbaudi (piem., parauga sagatavošanas procedūra, instrumentālā analīze utt.)]*

iii) atsauces standartšķīdumiem: piemērotam(-iem) *ERA* standartu preparātam(-iem), kas pievienots(-i) parauga buferšķīdumā un izmantots(-i) kā atsauce, lai noteiktu bāziskās, skābās un endogēnās zonas (*IEF*-*PAGE*) vai šķietamo *ERA* molekulmasu (*SAR*-*PAGE* vai *SDS*-*PAGE*);

iv) turklāt laboratorija var apsvērt pārbaudes jutīguma kontroles (*TSC*) izmantošanu: *ERA* standartiem, tostarp arī endogēnajam *EPO*, kas pievienoti parauga buferšķīdumā tādā līmenī, kurš ir līdzvērtīgs (80–120 %) *PAGE* metodes *MRPL*, kā noteikts 1. tabulā;

*[Piezīme. Laboratorija izmanto TSC, lai pārbaudītu, vai elektroforētiskas sadalīšanas metode darbojas, kā paredzēts saskaņā ar validācijas rezultātiem. Tomēr nesekmīgas jutīguma pārbaudes gadījumā neuzskata, ka ir anulējama eksogēna(-u) ERA konstatēšana paraugā ITP (vai, ja nepieciešams, CP) laikā, ja gela attēls atbilst piemērojamiem pieņemšanas un identifikācijas kritērijiem, kas aprakstīti 2.4. punktā. Papildinformāciju par TSC izmantošanu skatīt arī 2.3.1.2. punkta c) apakšpunktā un 2.4.1. punktā.)*

*Ieteicams, lai TSC gadījumā rEPO saturs rEPO un endogēnā EPO proporcijā (attiecībā) būtu no 10:90 līdz 40:60.*

*Laboratorijas var apsvērt iespēju ieviest TSC līmeņos, kas ir zemāki par 80–120 % no MRPL un līdzvērtīgāki to apstiprinātajām LOD.*

*Attiecībā uz gelu, kas satur gan urīna, gan seruma/plazmas paraugus, var pietikt ar vienu TSC, kas sagatavota tādam ERA koncentrācijas līmenim, kurš ir līdzvērtīgs zemākajam matricai specifiskajam MRPL.]*

v) Laboratorija var arī apsvērt iespēju izmantot iekšējo standartu (*ISTD*, *piem.*, Vācijas uzņēmuma *Celares GmbH* izstrādāto CEPO115) [22], kas pievienots *parauga* alikvotai, *NQC* un *TSC* (ja tiek izmantots), lai pārbaudītu *parauga* sagatavošanas procedūru (piemēram, ja *paraugā* nevar noteikt ne endogēnā *EPO*, ne citu *ERA* signālus).

*[Piezīme. ISTD signāla trūkums paraugā nepadara analīzi par nederīgu, ja tiek atklāts endogēns EPO un/vai citi ERA. ISTD tiek izmantots, lai izslēgtu analītisku problēmu, ja paraugā netiek konstatēti EPO/ERA signāli. Secīgs ISTD signāla zudums paraugā liecina par sadalīšanās procesu, kas ietekmē ISTD.]*

c) Elektroforētiskas sadalīšanas procedūru, ko piemēro, ja *ITP* izmanto *SDS*-*PAGE* metodi, veic, kā aprakstīts 2.2.2. punkta b) apakšpunktā.

d) Pēc elektroforētiskas sadalīšanas laboratorijām ieteicams piemērot vienkāršu blotēšanas procedūru, izmantojot šķērsreaktivitātes protokolu (piem., biotinilētu monoklonālo peles klonu AE7A5 pret cilvēka *EPO* (P&I sistēmas BAM2871)) [11, 12].

*[Piezīme. Laboratorijas var izvēlēties piemērot alternatīvu šķērsreaktivitātes minimizēšanas protokolu, izmantojot primāro antivielu kopā ar konjugētu sekundāro antivielu.]*

e) Imūnmembrānas analīzes procedūru, ko piemēro, ja *ITP* izmanto *SDS*-*PAGE* metodi, veic, kā aprakstīts 2.2.2. punkta c) apakšpunktā.

2.3.1.2. “A” *parauga* apstiprināšanas procedūra (*CP*).

a) “A” *parauga* *CP* ir atkarīga no iespējami konstatētiem *ERA* un no *ITP* izmantotās metodikas (sk. 2. tabulu).

b) “A” *parauga* *CP* atšķiras no *ITP*. Šo atšķirību var panākt, piemēram, ar vienu (vai vairākām) turpmāk minētajām darbībām.

i) Izmanto citu *parauga* imūnafinitātes attīrīšanas procedūru (*piem.*, *MAIIA* kolonnas, *StemCell ELISA*, magnētiskās lodītes, *t. i.*, izmanto procedūru ar atšķirīgu satveres antivielu).

ii) Izmanto citas elektroforētiskas sadalīšanas metodes (*piem.*, attiecīgā gadījumā vai nu *IEF*-*PAGE*, vai *SDS*-*PAGE*, vai *SAR*-*PAGE*).

iii) Veic dubulto blotēšanu, ja attiecībā uz *ITP* piemērota vienkāršā blotēšana, izmantojot biotinilētu antivielu.

iv) Izmanto citas noteikšanas antivielas.

*[Piezīme. WADA Laboratoriju starptautiskais standarts (LSS)[1] nosaka, ka afinitātes un saistīšanās testos, ko izmanto ITP un CP, lieto afinitātes reaģentus (piem., antivielas), kas atpazīst dažādus analizētās makromolekulas epitopus, ja vien pirms afinitātes un saistīšanās testa veikšanas nav izmantota attīrīšanas (piem., imūnafinitātes attīrīšanas) vai sadalīšanas (piemēram, elektroforēzes, hromatogrāfijas) metode, lai novērstu šķērsreaktivitātes iespējamību. Šajā ziņā PAGE analīzes metožu selektivitāti nodrošina trīs (3) dažādu mērķa ERA sadalīšanas un imūnatpazīšanas fizikāli bioķīmisko principu apvienojums.*

*1. Sākotnējā imūnafinitātes attīrīšana ar antivielu, kas saista EPO.*

*2. Fiziskā sadalīšana, izmantojot elektroforēzi, kas pamatojas uz elektrisko lādiņu (IEF-PAGE) vai molekulmasu (SAR-PAGE / SDS-PAGE).*

*3. Mērķa ERA imūnatpazīšana (afinitātes saistīšana), izmantojot imūnmembrānas analīzi un antivielu, kas saista EPO, bet ir atšķirīga no tās, kura izmantota imūnafinitātes attīrīšanai.]*

c) “A” *parauga* *CP* ietver *PAGE* analīzes metodi vismaz šādiem elementiem:

i) “A” *parauga* apstiprinājuma alikvotai;

ii) *NQC* paraugam;

iii) pozitīvam(-iem) kvalitātes kontroles (*PQC*) paraugam(-iem), kas satur piemērotu(-us) *ERA* (*piem.*, *rEPO*, *NESP*, *CERA*, *EPO*-*Fc*);

*[Piezīme. PQC paraugu(-us) izvēlas, pamatojoties uz ITP rezultātiem, kas sniedz norādi par to, kurš ERA jāapstiprina, kā arī attiecīgā(-o) ERA paredzamo signāla intensitāti gelā. Laboratorija var izvēlēties vairāk nekā vienu PQC paraugu ar atšķirīgu mērķa ERA koncentrācijas līmeni (piemēram, zemu un augstu ERA koncentrāciju).*

*ERA elektroforētiskās īpašības PQC paraugā var nebūt pilnīgi atbilstošas ERA elektroforētiskajām īpašībām paraugā. Piemēram, dažādu veidu rEPO var būt atšķirīgi migrācijas modeļi gelā, vai arī var atšķirties rEPO un endogēnā EPO proporcionālā attiecība. Parauga ERA migrācija gelā var būt atkarīga arī no ievadīšanas veida 20. Dažos gadījumos var nebūt pieejams paraugā noteiktā ERA atsauces standarts.*

iv) atsauces standartšķīdumiem: piemērotam(-iem) *ERA* standartu preparātam(-iem), kas pievienots(-i) parauga buferšķīdumā un izmantots(-i) kā atsauce, lai noteiktu bāziskās, skābās un endogēnās zonas (*IEF*-*PAGE*) vai šķietamo molekulmasu (*SAR*-*PAGE*, *SDS*-*PAGE*);

v) turklāt laboratorija var arī apsvērt *TSC* izmantošanu.

*[Piezīme. TSC var būt noderīga CP tāda PAAF gadījumā, ko izraisa zems ERA saturs, kurš rada tādu vāju signālu gelā (t. i., tuvu elektroforētiskas sadalīšanas metodes LOD), ko nevar kompensēt ar lielāku alikvotas vai eluāta tilpumu vai kontrolēt, izmantojot pieejamos PQC paraugus. Šādos gadījumos jutīguma kontroles izmantošana ļauj atšķirt, vai signāla zudums radies ERA sadalīšanās dēļ paraugā vai to izraisījusi neveiksmīga elektroforēzes izpilde. Tas var būt īpaši svarīgi “B” parauga apstiprinājumiem.]*

d) Visas sloksnes *CP* gelā (attiecībā uz “A” parauga alikvotu, *NQC* paraugu, *PQC* paraugu, atsauces standartiem, *TSC*) ieskauj tukšas sloksnes.

e) Pēc elektroforētiskas sadalīšanas līdz minimumam samazina to proteīnu/peptīdu iespējamo šķērsatpazīšanu, kas nav saistīti ar apstiprināmo(-iem) *ERA*. Laboratorijas veic vienkāršu blotēšanu, izmantojot šķērsreaktivitātes minimizēšanas protokolu (piem., izmantojot biotinilētu monoklonālo peles klonu AE7A5 pret cilvēka *EPO* (P&I sistēmas BAM2871))[11, 12], vai dubulto blotēšanu.

2.3.1.2.1. “A” *parauga* *CP* attiecībā uz *rEPO*

a) *CP* attiecībā uz *rEPO* veic, izmantojot *SAR*-*PAGE* vai *SDS*-*PAGE* (sk. 2. tabulu). To pašu *PAGE* analīzes metodi (*t. i.*, *SAR-PAGE* vai *SDS-PAGE*) var izmantot gan *ITP*, gan *CP* (sk. arī 2.3.1.2. punkta b) apakšpunktu).

b) Ja to pieprasa otrā atzinuma sniedzējs(-i) (sk. A pielikumu), *IEF-PAGE* var izmantot kā papildu analīzes metodi, lai iegūtu papildu pierādījumus par *rEPO* klātbūtni/neesību *paraugā[[2]](#footnote-3)*.

c) Ja nepieciešams un pamatojoties uz *ITP* rezultātiem, apstiprinājuma alikvotas un/vai *NQC* un/vai *PQC* parauga intensitātes signālus koriģē, lai nodrošinātu atbilstošus *ERA* intensitātes signālus (endogēno *EPO* ± *rEPO*) un atvieglotu rezultātu interpretēšanu.

*[Piezīme. Šo korekciju var veikt, piemēram, pielāgojot “A” parauga apstiprinājuma alikvotas tilpumu vai tilpumu eluātam, kas iegūts pēc alikvotas imūnafinitātes attīrīšanas, vai pielāgojot NQC/PQC parauga tilpumu vai EPO koncentrāciju tajā.]*

2.3.1.2.2. “A” *parauga CP* attiecībā uz *dEPO* (*piem*., *NESP*), *CERA* un *EPO*-*Fc*

a) Veicot *CP* attiecībā uz *dEPO* (*piem*., *NESP*), *CERA* un *EPO-Fc*, laboratorija var izvēlēties piemērot *IEF-PAGE*, *SAR-PAGE* vai *SDS-PAGE* metodi (sk. 2. tabulu). To pašu *PAGE* analīzes metodi (*t. i.*, *IEF-PAGE*, *SAR-PAGE* vai *SDS-PAGE*) var izmantot gan *ITP*, gan *CP* (sk. arī 2.3.1.2. punkta b) apakšpunktu).

b) Elektroforētiskas sadalīšanas un imūnmembrānas analīzes procedūras, ko piemēro, izmantojot *SDS-PAGE*, lai veiktu *CP* attiecībā uz *CERA* un *EPO-Fc*, piemēro arī *ITP* gadījumā atbilstoši norādēm (sk. arī attiecīgi 2.2.2. punkta b) apakšpunktu un 2.2.2. punkta c) apakšpunktu).

c) Ja to pieprasa otrā atzinuma sniedzējs(-i) (sk. A pielikumu), var izmantot papildu analīzes metodi (*piem*., *IEF-PAGE* pēc *SAR-PAGE* vai *SDS-PAGE*), lai iegūtu papildu pierādījumus par *dEPO*, *CERA* un *EPO-Fc* klātbūtni/neesību *paraugā*2.

2.3.1.3. “B” *parauga* apstiprināšanas procedūra (*CP*).

a) “B” *parauga* *CP* gadījumā laboratorija izmanto to pašu analītiskās *pārbaudes* procedūru(-as), ko izmantoja “A” *parauga* *CP*.

*[Piezīme. Ja laboratorija izmantojusi otru, papildu analīzes metodi kā papildu zinātnisku pierādījumu par ERA klātbūtni “A” paraugā, “B” parauga CP laikā nav nepieciešams piemērot abas (2) analīzes metodes. Jebkuras apstiprinājuma analīzes metodes izmantošana, kas dod pārliecinošus rezultātus par “A” paraugu, ir pietiekama, lai apstiprinātu ERA klātbūtni “B” paraugā.]*

b) “B” *parauga* *CP* ietver vismaz “B” *parauga* alikvotas, *ERA* standarta preparātu un *QC* (*NQC*, *PQC*) paraugu analīzi. Turklāt, ja “A” *parauga* *CP* laikā tika izmantota *TSC* attiecībā uz zemu *ERA* saturu, līdzīga *TSC* būtu jāanalizē “B” *parauga* *CP* laikā.

Visas sloksnes *CP* gelā (attiecībā uz “B” parauga alikvotu, *NQC* paraugu, *PQC* paraugu, atsauces standartiem) ieskauj tukšas sloksnes.

c) Veicot “B” *parauga* *CP* attiecībā uz *rEPO*, ja tas ir nepieciešams, pamatojoties uz “A” *parauga* *CP* rezultātiem, *parauga*, *NQC* un/vai *PQC* parauga intensitātes signālus koriģē, lai nodrošinātu atbilstošus *ERA* intensitātes signālus (endogēno *EPO* ± *rEPO*) un atvieglotu rezultātu interpretēšanu.

*[Piezīme. Šo korekciju var veikt, piemēram, pielāgojot “B” parauga apstiprinājuma alikvotas tilpumu vai tilpumu eluātam, kas iegūts pēc alikvotas imūnafinitātes attīrīšanas, vai pielāgojot NQC/PQC parauga tilpumu vai EPO koncentrāciju tajā.]*

**2. tabula.** Analītiskās *pārbaudes* stratēģija attiecībā uz *ERA* urīnā un asinīs (serums/plazma/*DBS*), izmantojot *PAGE* analīzes metodes.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| ***ERA*** | ***ITP*** | ***CP*** |
| *rEPO* | *IEF-PAGE* un/vai (*SAR-PAGE* vai *SDS-PAGE*\*\*) | *SAR-PAGE* vai *SDS-PAGE*  *IEF-PAGE*\* |
| *dEPO* (*piem*., *NESP*) | *IEF-PAGE* vai *SAR-PAGE*, vai *SDS-PAGE* |
| *CERA*\*\*\* | *IEF-PAGE* vai *SAR-PAGE*, vai *SDS-PAGE*\*\* |
| *EPO-Fc*\*\*\* | *IEF-PAGE* vai *SAR-PAGE*, vai *SDS-PAGE*\*\* |

\* Ja otrā atzinuma sniedzējs(-i) pieprasa papildu zinātniskus pierādījumus par *rEPO* klātbūtni vai neesību *paraugā*, kā otru, papildu analīzes metodi var izmantot *IEF-PAGE*, lai gan tas nav obligāti un nepieciešami visos gadījumos.

\*\* Lai *SDS-PAGE* izmantotu *ITP* gadījumā vai veicot *CP* attiecībā uz *CERA* un *EPO-Fc*, no imūnafinitātes attīrītam eluātam pirms elektroforētiskas sadalīšanas pievieno atbilstošu nesējproteīnu (*piem*., kazeīnu, insulīnu) un imūnmembrānas analīzes procedūrā izmanto atbilstošu nesaistītu blotēšanas bufersistēmu[11] (*piem.*, *CAPS* buferšķīdumu) vai alternatīvu bufersistēmu, kas nodrošina lielu biomolekulu efektīvu pārnesi.

\*\*\* Ņemot vērā *CERA* un *EPO-Fc* lielo izmēru, kas var ietekmēt nieru klīrensu un šo vielu izdalīšanos ar urīnu, *CERA* un *EPO-Fc* var daudz efektīvāk noteikt asinīs (serumā/plazmā) nekā urīnā[23–25].

2.3.2. Citas (ar elektroforēzi nesaistītas) analīzes metodes

a) Veicot *CP* attiecībā uz konkrētiem *ERA* (*piem*., *EPO-Fc*), laboratorija pēc saviem ieskatiem var piemērot arī ar vielu saistītas analīzes metodes (*piem*., imūntestus) kā papildu zinātniskus pierādījumus, lai izdarītu secinājumu [25].

b) Visos gadījumos, kad ir pieejama nolūkam atbilstīga uz masspektrometriju (MS) balstīta analīzes metode [26], to var izmantot gan *ITP*, gan *CP* vai abās. Tādā gadījumā ir jāievēro identifikācijas kritēriji, kas aprakstīti *TD IDCR* [27].

### 2.4. Rezultātu izvērtēšana un interpretācija

2.4.1. Pieņemšanas kritēriji

*IEF-PAGE* un *SAR-PAGE* vai *SDS-PAGE* procedūru pieņemšanas kritēriji nosaka prasības, kurām attēlam jāatbilst, lai varētu piemērot identifikācijas kritērijus, lai pārliecinātos par *ERA* klātbūtni.

Plankumi, pārāk stipra fona zona vai signāla neesība (*piem*., burbuļi) sloksnē būtiski traucē identifikācijas kritēriju piemērošanu un padara sloksni nederīgu.

*[Piezīme. Laboratorija izmanto TSC, lai pārbaudītu, vai elektroforētiskas sadalīšanas metode darbojas, kā paredzēts saskaņā ar validācijas rezultātiem. Ja jutīguma kontrole neizdodas un atbilstošā(-ās) ERA josla(-as) netiek noteikta(-as) arī paraugā(-os), tas var liecināt par elektroforēzes metodes piemērošanas nepilnībām, un šādos gadījumos laboratorijai būtu jāatkārto attiecīgi ITP vai CP, negatīvajam(-iem) paraugam(-iem) izmantojot jaunu TSC preparātu.*

*Tomēr, ja jutīguma pārbaudē neizdodas konstatēt ERA, neuzskata, ka ir anulējama ERA noteikšana paraugā ITP vai CP laikā, ja viena gela attēls atbilst piemērojamiem pieņemšanas un identifikācijas kritērijiem, kas aprakstīti 2.4. punktā.]*

2.4.2. Identifikācijas kritēriji

Šeit aprakstītie identifikācijas kritēriji tiek piemēroti *CP*. Tomēr kā vadlīnijas tiek sniegti ieteikumi attiecībā uz kritērijiem, kas jāpiemēro *ITP*, izvērtējot *IEF-PAGE* rezultātus attiecībā uz *rEPO*.

2.4.2.1. *IEF-PAGE*

1.a un 1.b attēlā ir parādīti *IEF-PAGE* testa rezultāti, kas iegūti ar pH gradientu attiecīgi 2-6 vai 2-8. Tiek noteikti katras elektroforētiskās sloksnes identifikācijas logi, kā arī bāziskās, endogēnās un skābās zonas. Preparātu joslas, ko izmanto kā atsauci, identificē ar cipariem un burtiem.

Bāziskās un skābās zonas nosaka tā, kā aprakstīts, pēc joslu pozīcijas atbilstoši *rEPO* atsauces preparātam vai tīriem epoetīniem-α vai -β un *NESP*; pēc izslēgšanas principa endogēno zonu nosaka pa vidu, kā to apliecina *uEPO* piemērs (starptautiskais atsauces preparāts (*IRP*), ko nodrošina Valsts bioloģisko standartu un kontroles institūts (*NIBSC*), Apvienotā Karaliste).

*[Piezīme. Preparātam, ko izmanto kā atsauci attiecībā uz rEPO, būtu jābūt preparātam, kas paredzēts lietošanai poliakrilamīda gela elektroforēzē, imūnmembrānas analīzē un citos fizikālķīmiskajos testos vai in vitro testos.]*

A diagram of dna sequence

Description automatically generated with medium confidence

**1.a attēls** Identifikācijas logu imūnmembrānas analīzes attēls pēc *rEPO*, *CERA*, *NESP* un *uEPO* analīzes (*piem*., *NIBSC* standarts), izmantojot *IEF-PAGE* (pH = 2–6).

A graph of dna sequence

Description automatically generated with medium confidence

**1.b attēls** Identifikācijas logu imūnmembrānas analīzes attēls pēc *rEPO*, *CERA*, *NESP*, *EPO-Fc* un *uEPO* analīzes (*piem*., *NIBSC* standarts), izmantojot *IEF-PAGE* (pH = 2–8).

*[Piezīme. 1.a un 1.b attēlā ir parādīti dažādu ERA atsauces standartu IEF-PAGE gela attēlu piemēri; autentiskā paraugā var noteikt arī endogēno EPO vai endogēna EPO un ERA apvienojumu.]*

*rEPO*, *uEPO* un *NESP* josla attiecīgi bāziskā, endogēnā un skābā zonā ir apzīmētas ar cipariem, grieķu burtiem un latīņu lielajiem burtiem, kā parādīts attēlos. *CERA* atbilst atšķirīgam, specifiskas joslas modelim ar dažām joslām, kas ir aptuveni lokalizētas kopā ar tām, kuras noteicis *rEPO*, un citām, kas iejauktas starp *rEPO* joslām. *EPO-Fc* identificē arī pēc specifiskā joslas modeļa, kas redzams pēc *EPO* disulfīda tiltiņu reducēšanas pirms *IEF-PAGE* piemērošanas pH 2–8 gradientam (1.b att.), turklāt joslas atrodas bāziskajā zonā virs *rEPO* un to analogu joslām [10].

*[Piezīme. Attiecībā uz dažiem ERA izoelektroforētiskais modelis var atšķirties no ERA standartiem vai PQC paraugiem (piemēram, atšķirīgs joslu skaits, nedaudz atšķirīgs fokusēšanas profils uz gela) atkarībā no konkrētā analizētā preparāta avota.]*

a) *rEPO*

Lai attiecībā uz *rEPO* ņemtu vērā *PAAF* (*ITP*) vai *AAF* (ja to izmanto kā papildu *CP*), attēlam jāatbilst šādiem identifikācijas kritērijiem:

i) *IEF-PAGE* profils atšķiras no endogēnā *EPO* profila, un/vai

ii) bāziskajā zonā (1.a un 1.b att.) jābūt vismaz trim pieņemamām secīgām joslām, un

iii) divas (2) intensīvākās joslas, ko mēra, izmantojot densitometriju, atrodas bāziskajā zonā.

b) *dEPO* (*piem*., *NESP*)

Lai attiecībā uz *NESP* klātbūtni ņemtu vērā *AAF*, attēlam jāatbilst šādiem identifikācijas kritērijiem:

i) skābajā zonā (1.a un 1.b att.) jābūt vismaz trim pieņemamām secīgām joslām, un tās apzīmē ar “A”, “B”, “C” vai “D”;

ii) ja ir endogēns signāls, tad vismaz vienai joslai “skābajā zonā” jābūt intensīvākai par pēdējo endogēnās zonas joslu (*piem*., josla ε 1.a un 1.b att.).

c) *CERA*

Bāziskajā zonā jābūt vismaz četrām secīgām joslām, kas atbilst *CERA* preparātam, kuru izmanto kā atsauci (1.a un 1.b att.).

d) *EPO-Fc*

Bāziskajā zonā jābūt vismaz četrām secīgām joslām, kas atbilst *EPO-Fc* preparātam, kuru izmanto kā atsauci (1.b att.).

2.4.2.2. *SAR-PAGE* vai *SDS-PAGE*

*SAR-PAGE* un *SDS-PAGE* identifikācijas kritēriji, ko piemēro, lai salīdzinātu ar atbilstošiem *ERA* standartiem un *PQC* paraugiem, ir vienādi.

A close-up of a test results

Description automatically generated

**2. attēls.** Imūnmembrānas analīzes attēls, kas iegūts pēc *SAR-PAGE* sadalīšanas un kas parāda platjoslu, kura raksturīga dažiem tirdzniecībā pieejamiem epoetīna-α un -β preparātiem (*ShanpoetinTM*, *Beijing 4 rings*, *Erypo*®, *NeoRecormon*®, *Wepox*) un *EPO-Fc* preparātiem (*Propec*, *Sino Biological*, *CellSciences*). Joslas, kas atbilst *EPO-Fc* monomēram un *EPO-Fc* dimēram, ir attiecīgi marķētas ar cipariem 1 un 2. Parādīts arī endogēnais *EPO* urīnā, kā arī *CERA*, *NESP* un epoetīna-δ (*Dynepo*) relatīvais novietojums.

*ERA* var atšķirt no endogēnā *EPO* (*uEPO*, *bEPO*), pamatojoties uz raksturīgo joslas formu un atšķirīgo šķietamo molekulmasu. Katra *ERA* migrācijas īpašības (joslu), *t. i.*, pozīciju un formu (platums, koncentrēts vai vairāk izkliedēts), var izmantot, lai apstiprinātu vielas identitāti un/vai eksogēno izcelsmi. Joslas virsotnes novietojums (ko nosaka joslas profila diagramma, kura iegūta, izmantojot attēlu apstrādes programmatūru) vai joslas platuma robežas var izmantot, lai pārliecinātos, ka tās novietojums un forma atšķiras no paralēli izmantotā endogēnā *EPO* novietojuma, kā parādīts 2. att.

*[Piezīme. Dažu ERA elektroforētiskās īpašības var atšķirties no ERA standartiem vai PQC paraugiem (piem., atšķirīgs joslu skaits, nedaudz atšķirīga migrācija uz gela) atkarībā no konkrētā analizētā preparāta avota (piem., atsevišķa monomēra EPO-Fc josla un/vai citas EPO-Fc oligomēru joslas, 2. att.; platjosla vai atšķirīgs migrācijas modelis, izmantojot SAR-PAGE / SDS-PAGE, dažiem ERA preparātiem – atkarībā no tīrības un/vai glikoformas sastāva). Var būt arī papildu joslas, kas atbilst imūnafinitātes attīrīšanai izmantoto antivielu vieglajām un smagajām ķēdēm, un tās netraucē rezultātu interpretācijai. Šādām antivielu joslām, kas rodas parauga sagatavošanas procesā, vienmēr jābūt paraugos un kvalitātes kontroles paraugos.*

*Pastāv būtiska atšķirība CERA migrācijā SAR-PAGE un SDS-PAGE gadījumā. Ja izmanto SAR-PAGE, CERA migrē virs otrās EPO-Fc joslas (EPO-Fc dimērs), bet, ja izmanto SDS-PAGE, tas migrē starp EPO-Fc monomēra un EPO-Fc dimēra joslu (sk. 2. att).]*

Turpmāk norādītie identifikācijas kritēriji nosaka prasības, kurām *CP* gadījumā jāatbilst *SAR-PAGE* vai *SDS-PAGE* attēlam, lai ņemtu vērā *AAF* attiecībā uz tādu *ERA* klātbūtni, kuru struktūra ir saistīta ar *EPO* (*rEPO*, *NESP*, *CERA*, *EPO-Fc*).

A. Noteikta(-as) atsevišķa(-s) *ERA* josla(-as)

a) *rEPO* (sk. arī C pielikumu. *EPO* c.577del variants)

i) Epoetīnam-α un -β, kā arī *rEPO* biolīdziniekiem ir raksturīgas joslu formas (“platjoslas”) un atšķirīga (parasti lielāka) šķietamā molekulmasa salīdzinājumā ar endogēno *uEPO*/*bEPO* (2. att.).

ii) *AAF* veikšanu attiecībā uz *rEPO* apsver, ja *rEPO* raksturīgās joslas formas izsmērējums sniedzas ārpus pozīcijas, ko nosaka epoetīna-δ (*Dynepo*) joslas virsotne (2. un 3. att.), vai – alternatīvi – ārpus rekombinantā epoetīna-α preparāta (*piem*., *Eprex*) joslas virsotnes.

iii) Epoetīnam-δ (*Dynepo*) ir raksturīga joslas forma (“asa josla”) un lielāka šķietamā molekulmasa nekā endogēnajam *uEPO*/*bEPO*. Asākas joslas dēļ (lai gan arī *Dynepo* standarta paraugā un paraugā, kur ievadīts *Dynepo*, var būt redzams neliels izsmērējums, ko rada lielākas masas glikoformas) epoetīns-δ var atšķirties arī no citiem *rEPO* (-α un -β, kā arī biolīdziniekiem) (2. att.). *AAF* veikšanu attiecībā uz epoetīnu-δ apsver, ja *ERA* joslas virsotnes līnija *paraugā* sakrīt ar atbilstošo virsotnes līniju epoetīna-δ atsauces preparātā (3. att.).

A comparison of a graph

Description automatically generated with medium confidence

**3. attēls.** Imūnmembrānas analīzes attēls, kas iegūts pēc *Dynepo* atsauces standarta, *Dynepo* ekskrēcijas ar urīnu (100 h pēc 50 SV/kg *Dynepo* ievadīšanas caur ādu) un urīna atsauces standarta (*uEPO*) sadalīšanas, izmantojot *SDS-PAGE*, un atbilstošie densitometriskie profili (sagatavoti, izmantojot *GASepo* v2.1).

b) *dEPO*, *CERA*, *EPO-Fc*

*NESP*, *CERA* un *EPO-Fc* (2. att.) var atšķirt no endogēniem *EPO* (*uEPO*, *bEPO*), kā arī no *rEPO*, pamatojoties uz to, ka tiem ir lielāka šķietamā molekulmasa. *AAF* veikšanu attiecībā uz jebkuru no šīm *aizliegtajām vielām* apsver, ja *ERA* joslas(-u) šķietamā molekulmasa atbilst par atsauci izmantotā *dEPO*, *CERA* vai *EPO-Fc* preparāta atbilstošās(-o) joslas(-u) šķietamajai masai (sk. arī komentāru 2.4.2.2. punktā).

B. Noteiktās jaukta tipa joslas no dažādiem *ERA*

a) Attiecībā uz *rEPO* var tikt noteikta jaukta tipa josla, kas sastāv no endogēniem *EPO* (*uEPO*, *bEPO*) un *rEPO*, kurš nav pilnīgi sadalījies, – joslas forma atgādina *rEPO PLUS* daļu formu vai *uEPO*/*bEPO* joslas kopējo formu.

b) Izkliedēta vai vāji izteikta joslas zona, kas atrodas virs atbilstošās endogēnās joslas un sniedzas ārpus epoetīna-δ (*Dynepo*) vai epoetīna-α joslas virsotnes, arī norāda uz *rEPO* klātbūtni (4. un 5. att.).

c) Jaukta tipa joslas izskats mainās atkarībā no *rEPO* un *uEPO* relatīvā daudzuma *paraugā* dažādos laikos pēc *rEPO* ievadīšanas (4. un 5. att.).

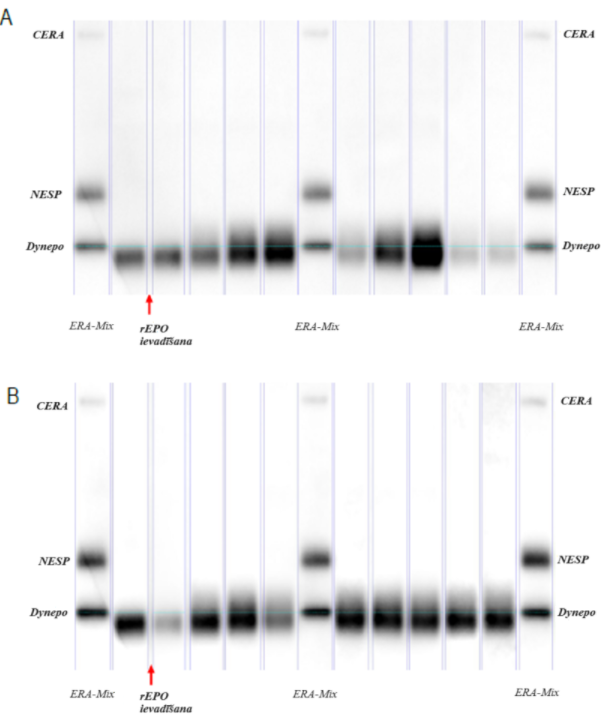
A group of black and white images

Description automatically generated

**4. attēls.** Imūnmembrānas analīzes attēls, kas iegūts pēc *Dynepo*/*NESP* atsauces standarta, negatīvas urīna sagataves, dažādos laikos pēc *Retacrit* ievadīšanas (7,5 SV/kg ķermeņa masas, *in vitro*) savāktu paraugu un *Retacrit* (epoetīns-ζ) atsauces standarta (std) sadalīšanas, izmantojot *SAR*-*PAGE*. Pēc *Retacrit* ievadīšanas var rasties vairāk vai mazāk izolētas/izplūdušas dubultas joslas (*uEPO* + *Retacrit*) [28].

C. Noteiktas vairākas atsevišķas *ERA* joslas

Vienā un tajā pašā *paraugā* tiek noteiktas vairākas joslas, kas atbilst dažādiem *ERA* (*piem.*, *u/bEPO*, *rEPO*, *NESP*, *CERA* un *EPO-Fc*) vai vienam un tam pašam *ERA* (*piem.*, *EPO-Fc*). Piemēro individuālos identifikācijas kritērijus, kas aprakstīti attiecībā uz katru *ERA*.



**5. attēls**. Imūnmembrānas analīzes attēls, kas iegūts pēc tam, kad urīna paraugi, kuri savākti dažādos laikos pēc 12,7 SV/kg *Biopoin* ievadīšanas caur ādu, sadalīti, izmantojot *SAR-PAGE*. A ir attēls, kas apstrādāts bez kontrasta uzlabošanas; B ir tas pats attēls pēc tam, kad uzlabots kontrasts, izmantojot *GASepo* programmatūras 2.1. versiju.

# 3.0. *ERA* rezultātu pārskatīšana un interpretācija

a) *CP* iegūtus *ERA* analīzes rezultātus (“A” un “B” *paraugam*, ja piemērojams) pārskata vismaz divi (2) par sertificēšanu atbildīgi zinātnieki. Katru šo pārskatu reģistrē *parauga* protokolā.

b) Ja laboratorija secina, ka *CP* rezultāti (“A” un “B” *paraugam*, ja piemērojams) norāda uz *ERA* klātbūtni *paraugā*, laboratorija lūdz *WADA* *EPO* darba grupas ekspertiem otru atzinumu, pirms tā ziņo par *AAF* vai *ATF* attiecībā uz *ERA* (sk. A pielikumu).

#### 3.1. Nelabvēlīgs analīžu rezultāts (AAF)

c) Lai secinātu, ka attiecībā uz *ERA* ir *AAF*, *CP* rezultātiem jāatbilst šajā *TD* aprakstītajiem piemērojamiem identifikācijas kritērijiem.

d) Ja atbilstoši otrā atzinuma sniedzēja(-u) pieprasījumam laboratorija piemēro otru analīzes metodi *ERA* apstiprināšanai, rezultātu uzskata par *AAF* tad, ja otrās apstiprināšanas analīzes metodes rezultāti atbilst šajā *TD* aprakstītajiem piemērojamajiem identifikācijas kritērijiem.

#### 3.2. Netipiska atrade (ATF)

Atradi uzskata par *ATF* attiecībā uz *ERA*, ja, pamatojoties uz šajā *TD* aprakstītajiem piemērojamiem identifikācijas kritērijiem, nevar pārliecinoši noteikt, ka *CP* rezultāti norāda uz *ERA* klātbūtni *paraugā*.

Tas attiecas arī uz gadījumiem, kad saskaņā ar otrā atzinuma sniedzēja(-u) pieprasījumu piemēro otru, papildus apstiprinošo analīzes metodi, lai iegūtu papildu zinātniskus pierādījumus, un šī metode neapstiprina *ERA* klātbūtni *paraugā* (piemēram, ja *IEF-PAGE* ir izmantota kā papildu analīzes metode, lai iegūtu papildu pierādījumus par *rEPO* varbūtēju klātbūtni).

### 3.3. Negatīvs rezultāts

Ja *CP* iegūtie *ERA* rezultāti neatbilst šajā *TD* aprakstītajiem piemērojamajiem identifikācijas kritērijiem, *ERA* analīzes rezultātus uzskata par negatīvu rezultātu. Tas attiecas arī uz gadījumiem, kad *parauga* gela sloksnē netiek konstatēta elektroforētiskā josla (*t. i.*, joslā nav signāla par endogēnu *EPO* un jebkuru eksogēno *ERA*).

# 4.0. Ziņošana par *ERA* rezultātiem

a) Pirms ziņošanas par *AAF* vai *ATF* attiecībā uz *ERA* laboratorija lūdz *WADA EPO* darba grupas ekspertus sniegt otru atzinumu (sk. A pielikumu).

Turklāt laboratorija sagaida *WADA* norādījumus, pirms tā ziņo par *AAF* attiecībā uz *rEPO*, jo, iespējams, ir jāveic izmeklējumi, lai noskaidrotu, vai šķietamā *rEPO* klātbūtne *paraugā* nav saistīta ar *VAR-EPO* ekspresiju (sk. C pielikumu).

b) Ziņojot par rezultātiem, kas iegūti, piemērojot *IEF-PAGE* un/vai *SDS-PAGE* vai *SAR-PAGE*, laboratorija ievēro LSS[1] un ar to saistītā *TD* *LDOC*[29] prasības.

c) Ja laboratorija ziņo par *AAF* attiecībā uz *ERA*, kas noteikts(-i) “A” *paraugā*, ieteicams *parauga* pārbaudes protokolam, ko publicē Antidopinga administrēšanas un pārvaldības sistēmā (*ADAMS*), pievienot komentāru, ja ir aizdomas par mikrobiālas[30] un/vai proteolītiskas aktivitātes pazīmēm[31] (piemēram, *ITP* konstatētā signāla intensitāte ir samazinājusies *CP* laikā), kas var ietekmēt konstatētā(-o) *ERA* noturīgumu *paraugā*.

d) Ziņojot par *ATF* attiecībā uz *ERA*, laboratorija iesaka *pārbaudes* iestādei veikt *sportista* mērķpārbaudi un savākt papildu asins un urīna *paraugus* *ERA* analīzei, kā arī asins *ABP paraugus*. Turklāt laboratorija pievieno komentāru *parauga* pārbaudes protokolam *ADAMS*, ja *paraugā* ir novērotas mikrobiālas[30] un/vai proteolītiskas aktivitātes[31] pazīmes, kas varētu būt ietekmējušas konstatētā(-o) *ERA* noturīgumu.

e) Ja *parauga* gela sloksnē nav konstatēta elektroforētiska *ERA* josla (endogēna vai eksogēna) un tāpēc laboratorija ziņo par negatīvu rezultātu attiecībā uz *ERA*, tā pievieno komentāru *parauga* pārbaudes protokolam *ADAMS*, norādot, ka *paraugā* nav *ERA* signālu; norāda arī jebkādas aizdomas par to, ka *paraugā* ir mikrobiālas[30] un/vai proteolītiskas aktivitātes[31] pazīmes.

*[Piezīme. Piemēram, laboratorija var iekļaut šādu komentāru ADAMS iesniegtajā pārbaudes ziņojumā: “Paraugā nav konstatēts elektroforētiskas ERA joslas signāls” vai “Paraugā ir mikrobiālas/proteolītiskas aktivitātes pazīmes, kas var ietekmēt / ir ietekmējušas ERA noturību”.]*

f) Ja saistībā ar urīna *paraugu* ir

i) neapstiprināts *PAAF* vai

ii) *AAF* ar zemas intensitātes signāliem “A” *paraugā*, vai

iii) *ATF* attiecībā uz jebkuru *ERA*,

laboratorija iesaka *pārbaudes* iestādei veikt *ERA* analīzi iepriekš savāktajam(-iem) asins *paraugam*(-iem) (piemēram, ja saistītais asins *paraugs* ir savākts tajā pašā *paraugu* savākšanas procesā). Ja nav savākts(-i) asins *paraugs*(-i), laboratorija iesaka *pārbaudes* iestādei pēc iespējas ātrāk savākt no *sportista* papildu urīna un asins *paraugu*(-us) *ERA* analīzei.

# 5.0. Analītiskā pārbaude attiecībā uz *TGF-ß* signālinhibitoriem

a) Pirmsanalītiskās procedūras, kas aprakstītas attiecībā uz *ERA* analīzi (sk. 2.1. punktu), attiecas arī uz *TGF-ß* signālinhibitoru analīzi.

b) *SAR-PAGE* / *SDS-PAGE* un *IEF-PAGE* analīzes metodes var izmantot arī *TGF-β* signālinhibitoru (*piem.*, luspatercepta, sotatercepta) noteikšanai[32–36].

c) Turklāt šai analīzei var izmantot arī citas nolūkam atbilstīgas analīzes metodes kā papildu metodes *PAGE* metodēm vai kā atsevišķas *ITP*/*CP* (*piem.*, *LC-MS*[37], kapilārās imūnanalīzes[38]).

d) *PAGE* metodes var izmantot arī kompleksā pieejā, veicot *ITP* gan attiecībā uz *TGF-β* signālinhibitoru, gan *ERA*[10].

e) Tomēr *CP* veikšanai izmanto atsevišķas metodes, kas īpaši izstrādātas *ERA* vai *TGF-β* signālinhibitoru apstiprināšanai.

# 6.0. Atsauces

[1] The World Anti-Doping *Code International Standard* for Laboratories (ISL).

[2] *Technical Document* Dried Blood Spots (DBS) for *Doping Control* – Requirements and Procedure for Analytical *Testing* and Storage.

[3] Lasne F *et al*. Isoelectric profiles of human erythropoietin are different in serum and urine. *Int J Biol Macromol* **41**: 354-357 (2007).

[4] Mallorquí J *et al*. Recombinant erythropoietin found in seized blood bags from sportsmen. *Haematologica* **93** (2): 313-314 (2008).

[5] Dehnes Y, Lamon S, Lönnberg M. Erythropoietin (EPO) immunoaffinity columns – A powerful tool for purifying EPO and its recombinant analogous. *JPBA* **53**: 1028-1032 (2010).

[6] Lönnberg M *et al.* Rapid affinity purification of erythropoietin from biological samples using disposable monoliths. *J Chromatogr A*. **1217**(45): 7031-7037 (2010).

[7] Mallorquí J *et al*. Purification of erythropoietin from human plasma samples using an immunoaffinity well plate. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **878**(23): 2117-2122 (2010).

[8] Reihlen P *et al*. Easy-to-use IEF compatible immunoaffinity purification of Erythropoietin from urine retentates. *Drug Test Anal* **4**(11): 813-817 (2012).

[9] Dehnes Y, Shalina A, Myrvold L. Detection of recombinant EPO in blood and urine samples with EPO WGA MAIIA, IEF and SAR-PAGE after microdose injections. *Drug Test Anal* **5**(11–12): 861-869 (2013).

[10] Martin L, Audran M, Marchand A. Combined immunopurification and detection of recombinant erythropoietins and activin receptor type II-Fc fusion proteins by isoelectric focusing for application in doping control. *Drug Test Anal.* **11**: 168-72 (2019).

[11] Martin L *et al*. Improved detection methods significantly increase the detection window for EPO microdoses. *Drug Test Anal.*;1–12 (2020). doi: 10.1002/dta.2904.

[12] Reichel C *et al*. Inter-laboratory validation of biotinylated clone AE7A5 EPO-antibody for EPO detection by single blotting of urine and blood samples. Referāts nolasīts: Manfred Donike Workshop, 38th Cologne Workshop on Dope Analysis. 2020; Cologne, Germany.

[13] Heiland C E *et al*. Optimizing detection of erythropoietin receptor agonists from dried blood spots for anti-doping application. *Drug Test Anal*. **14**(8):1377-1386, 2022.

[14] Requena-Tutusaus L *et al*. "Achieving routine application of dried blood spots for erythropoietin receptor agonist analysis in doping control: low-volume single-spot detection at minimum required performance level". *Bioanalysis* **15**(20): 1235-1246, 2023.

[15] Reichel C, Abzieher F, Geisendorfer T. SARCOSYL-PAGE: a new method for the detection of MIRCERA- and EPO-doping in blood. *Drug Test Anal* **1**(11-12): 494-504 (2009).

[16] Reichel C. SARCOSYL-PAGE: A New Electrophoretic Method for the Separation and Immunological Detection of PEGylated Proteins. *Methods Mol Biol.* **869**:65-79 (2012).

[17] Reihlen P *et al*. Optimizing SAR-PAGE. *Drug Test Anal.* **7**(11-12): 1014-6 (2015).

[18] Reichel C *et al*. SARCOSYL-PAGE: Optimized Protocols for the Separation and Immunological Detection of PEGylated Proteins. *Methods Mol Biol*. **1855**:131-149 (2019).

[19] Kohler M *et al*. Discrimination of recombinant and endogenous urinary erythropoietin by calculating relative mobility values from SDS gels. *Int J Sports Med* **29**(1):1-6 (2008).

[20] Reichel C *et al*. SDS-PAGE of recombinant and endogenous erythropoietins: benefits and limitations of the method for application in doping control. *Drug Test Anal* **1**(1): 43-50 (2009).

[21] Okano M *et al*. Doping control of biosimilar epoetin kappa and other recombinant erythropoietins after intravenous application. *Drug Test. Anal.* **3**(11-12): 798–805 (2011)**.**

[22] Reihlen, P *et al*. Introduction of a PEGylated EPO conjugate as internal standard for EPO analysis in doping controls. *Drug Test Anal*. **10** (11-12): 1714-1721, 2018.

[23] Lasne F, Martin L, Martin JA, de Ceaurriz J. Detection of continuous erythropoietin receptor activator in blood and urine in anti-doping control. *Haematologica* **94**(6): 888-890 (2009).

[24] Dehnes Y, Hemmersbach P. Effect of single doses of methoxypolyethylene glycol-epoetin beta (CERA, Mircera™) and epoetin delta (Dynepo™) on isoelectric erythropoietin profiles and haematological parameters. *Drug Test Anal*. **3**(5):291-9 (2011).

[25] Reichel C, Thevis M. Detection of EPO-Fc fusion protein in human blood: Screening and confirmation protocols for sports drug testing. *Drug Test Anal* **4**(11): 818-829 (2012).

[26] Reichel C. Differences in sialic acid O-acetylation between human urinary and recombinant erythropoietins: a possible mass spectrometric marker for doping control. *Drug Test Anal*. **5**(11-12):877-889 (2013).

[27] *WADA Technical Docum*ent TD IDCR: Minimum Criteria for Chromatographic-Mass Spectrometric Confirmation of the Identity of Analytes for *Doping Control* Purposes.

[28] Reichel C *et al*. Data from a low-dosed rEPO administration study. Manfred Donike Workshop – 38th Cologne Workshop in Doping Analysis; Cologne, Germany, February 9 – February 14, (2020).

[29] *WADA Technical Document* TD LDOC: Laboratory Documentation Packages.

[30] *WADA Technical Document* TD EAAS: Measurement and Reporting of Endogenous Anabolic Androgenic Steroid (EAAS) *Markers* of the Urinary Steroid Profile.

[31] Lamon S *et al.* Possible origins of undetectable EPO in urine samples. *Clin Chim Acta* **385**(1–2): 61- 66 (2007).

[32] Marchand A *et a*l. Detection of erythropoiesis stimulating agent Luspatercept after administration to healthy volunteers for antidoping purposes. *Drug Test Anal*. **14**(11-12):1952-1961, 2022.

[33] Martin L *et al.* A validated, sensitive electrophoretic method for the detection of activin receptor type II-Fc fusion proteins in human blood. *Drug Test Anal*. 2018 Mar 2. doi: 10.1002/dta.2376. PMID: 29499588.

[34] Reichel C, Gmeiner G and Thevis M. Antibody-based strategies for the detection of Luspatercept (ACE-536) in human serum. *Drug Test Anal*. **9** (11-12): 1721-1730, 2017.

[35] Reichel C, Gmeiner G, Walpurgis K, Thevis M. Updated protocols for the detection of Sotatercept and Luspatercept in human serum. *Drug Test Anal*. **10**(11-12): 1708-1713, 2018.

[36] Reichel C, Farmer L, Gmeiner G, Walpurgis K, Thevis M. Detection of Sotatercept (ACE-011) in human serum by SAR-PAGE and Western Single Blotting. *Drug Test Anal.* **10**(6): 927-937, 2018

[37] Walpurgis, K *et al*. Combined detection of the ActRII-Fc fusion proteins Sotatercept (ActRIIA-Fc) and Luspatercept (modified ActRIIB-Fc) in serum by means of immunoaffinity purification, tryptic digestion, and LC-MS/MS. *Drug Test Anal*. **10** (11-12): 1714-1721, 2018.

[38] Desharnais P, Naud JF. Detection of activin receptor type IIA and IIB-Fc fusion proteins by automated capillary immunoassay. *Drug Test Anal*. **14**(11-12): 1938-1951, 2022.

*[Piezīme. WADA LSS un tehnisko dokumentu aktuālās redakcijas ir atrodamas tīmekļvietnē https://www.wada- ama.org/en/what-we-do/science-medical/laboratories]*

# A PIELIKUMS. *ERA* OTRĀ ATZINUMA SNIEGŠANAS KĀRTĪBA

## 1.0. Otrā atzinuma sniegšana

a) Laboratorija informē *WADA* par *ERA* atradi un augšupielādē informāciju par *paraugu* (tostarp *parauga* kodu, sporta veidu, dzimumu, *pārbaudes* iestādi, *parauga* savākšanas datumu, *parauga* analīzes datumu, analīzes matricu) un analīzes rezultātus (*.TIFF* attēlus, *GASepo* ziņojumus) *WADA* norādītajā un ierobežotas piekļuves datu pārvaldības sistēmā.

*[Piezīme. Laboratorija nodrošina atbilstošus un pietiekamus ITP un CP iegūtos analītiskos datus (piemēram, saskaņā ar TD LDOC B – ERA pielikumā noteiktajām prasībām), lai EPO darba grupas eksperti varētu sagatavot otro atzinumu. Šo datu kopsavilkumu sniedz veidnē “Otrais atzinums par ERA rezultātiem” (sk. šā dokumenta B pielikumu), tostarp neapstrādātus gela attēlus (.TIFF) un apstrādātos analītiskos datus.]*

b) *WADA* nekavējoties pēc nejaušības principa izraudzīsies divus (2) ekspertus[[3]](#footnote-4) no *WADA* *EPO* darba grupas, lai sniegtu neatkarīgu otro atzinumu par *ERA* atradi.

*[Piezīme. To EPO darba grupas (DG) ekspertu saraksts, kuri var sniegt otro atzinumu par laboratorijas rezultātiem attiecībā uz ERA, ir publicēts WADA tīmekļvietnē, un WADA to var mainīt vai atjaunināt jebkurā laikā:*

https://www.wada-ama.org/en/epo-working-group]

c) *WADA* nekavējoties informēs abus (2) otrā atzinuma sniegšanai izraudzītos ekspertus un piešķirs tiem piekļuvi laboratorijas iesniegtajiem lietas datiem, kas ir augšupielādēti datu pārvaldības sistēmā.

i) Izraudzītajiem ekspertiem, ar kuriem *WADA* ir sazinājusies, četrdesmit astoņu (48) stundu laikā ir jāatbild *WADA* par uzdevuma pieņemšanu vai noraidīšanu.

ii) Katrs otrā atzinuma sniedzējs pirms otrā atzinuma sagatavošanas, izmantojot datu pārvaldības sistēmu, trīs (3) dienu laikā pēc izvērtēšanai iesniegto laboratorijas datu saņemšanas var pieprasīt laboratorijai veikt *parauga* papildu analīzes (piemēram, piemērot otru analīzes metodi, citu imūnafinitātes attīrīšanas vai imūnmembrānas analīzes procedūru utt.) vai sniegt papildu informāciju.

Laboratorija informē atbildīgo *pārbaudes* iestādi par papildu analīžu pieprasījumiem, kas uzskatāmi par *parauga* analītiskās *pārbaudes* procesa neatņemamu daļu. Tāpēc ar papildu analīzi saistītās izmaksas sedz *pārbaudes* iestāde, kas ir atbildīga par izmeklējamo *paraugu*.

iii) *WADA* nekavējoties informē pārējos ekspertus par to, vai ir pieprasītas papildu analīzes un/vai informācija, un nosūta laboratorijai iesniegto papildu pieprasījumu. Neviens eksperts nesniedz otro atzinumu, pirms nav izskatījis laboratorijai pieprasītās papildu analīzes un/vai informāciju.

iv) Desmit (10) dienu laikā pēc tam, kad *WADA* ir informējusi par eksperta papildu pieprasījumu(-iem), laboratorijai būtu datu pārvaldības sistēmā jāaugšupielādē papildu analīžu rezultāti un/vai pieprasītā *papildu* informācija. Laboratorija informē *WADA* par jebkādiem paredzamiem šā termiņa kavējumiem (piemēram, ja pieprasīto papildu analīžu veikšanai ir jāslēdz apakšlīgums ar citu laboratoriju).

v) *WADA* nekavējoties informēs abus (2) ekspertus un datu pārvaldības sistēmā piešķirs piekļuvi laboratorijas sniegtajiem papildu datiem/informācijai.

vi) Eksperti neatkarīgi izvērtē visus sniegtos datus/informāciju un sniedz galīgo otro atzinumu tikai pēc tam, kad viņiem ir bijusi iespēja pārskatīt jebkādu papildu analīžu rezultātus un/vai informāciju, kas attiecas uz rezultātiem. Otrais atzinums jāsniedz septiņu (7) dienu laikā pēc pilnīgas laboratorijas datu/informācijas paketes saņemšanas.

d) Eksperti augšupielādē savu otro atzinumu *WADA* norādītajā ierobežotas piekļuves datu pārvaldības sistēmā.

e) *WADA* nekavējoties piešķirs laboratorijai piekļuvi saņemtajiem otrajiem atzinumiem.

f) Pamatojoties uz sniegtajiem otrajiem atzinumiem, laboratorijai būtu jāziņo par rezultātiem kā *AAF*, *ATF* vai negatīvu rezultātu (sk. šā A pielikuma 2.0. punktu). Tomēr laboratorija ir galīgā atbildīgā par to, kā saskaņā ar savām dokumentētajām pārvaldības sistēmas procedūrām tā ziņo par rezultātiem, tostarp gadījumos, kad tā nepiekrīt ekspertu slēdzienam otrajā atzinumā.

g) Laboratorija saglabā visus sniegtos otros atzinumus un *WADA* ziņošanas norādījumus kā daļu no *parauga* protokola un iekļauj tos laboratoriskās dokumentācijas paketē (ja to pieprasa *pārbaudes* iestāde (*TA*), *rezultātu* *pārvaldības* iestāde (*RMA*) vai *WADA*).

## 2.0. Ziņošana par *ERA* atradēm

#### 2.1. Nelabvēlīgs analīžu rezultāts (AAF)

*ERA* atrade būtu jāziņo kā *AAF*, ja abi eksperti *paraugā* konstatē *ERA* klātbūtni:

a) *NESP*, *CERA* vai *EPO-Fc* – *VAR-EPO* ekspresija neietekmē *NESP*, *CERA* vai *EPO-Fc* klātbūtni. Tāpēc laboratorija saskaņā ar saņemto vienprātīgo otro atzinumu ziņo par *AAF*;

b) *rEPO* – attiecībā uz rekombinantā *EPO* (*rEPO*) atradi *WADA* noteiks, vai ir nepieciešama izmeklēšana (saskaņā ar C pielikumu), lai noteiktu, vai šķietami pozitīvā *rEPO* atrade ir saistīta ar *VAR-EPO* ekspresiju. Šādā gadījumā, kamēr izmeklēšana nav pabeigta un *WADA* nav sniegusi laboratorijai attiecīgus norādījumus, laboratorija neziņo rezultātu kā *AAF*.

*[Piezīme. Šajā posmā, kad ir saņemti ekspertu secinājumi, ka rEPO atrade uzskatāma par AAF, var veik papildu izmeklēšanu, ja nepieciešams, lai noskaidrotu, vai šķietamā rEPO klātbūtne paraugā ir saistīta ar VAR-EPO ekspresiju (sk. C pielikumu).*

*Tāpēc, ja tiek lūgts otrs atzinums un eksperti uzskata, ka CP rezultāti atbilst identifikācijas kritērijiem un tāpēc var secināt, ka paraugā ir rEPO klātbūtne, taču saistībā ar šādu secinājumu var būt nepieciešama papildu izmeklēšana, lai noteiktu, vai sportists ir VAR-EPO nesējs (sk. C pielikuma C1. tabulu), otrā atzinuma sniedzējs iekļauj atrunu, kurā norāda, ka galīgais secinājums par rEPO klātbūtni paraugā un ziņošana par atradi kā AAF ir atkarīgi no tā, vai atbilstošas izmeklēšanas rezultātā (sk. C pielikuma 3.2. punktu) konstatēts, ka atrade nav saistīta ar VAR-EPO ekspresiju.*

#### 2.2. Netipiska atrade (ATF)

Ja abi eksperti secina, ka atrade ir nepārliecinoša vai ja abu (2) ekspertu viedokļi atšķiras, par *ERA* atradi būtu jāziņo kā par *ATF*.

### 2.3. Negatīvs rezultāts

Ja abi eksperti secina, ka *CP* rezultāti nenorāda uz *ERA* klātbūtni *paraugā*, par *ERA* atradi būtu jāziņo kā par negatīvu rezultātu.

A diagram of a work flow

Description automatically generated

# B PIELIKUMS. *ERA* ANALĪZES PIEPRASĪJUMA VEIDNE SAISTĪBĀ AR OTRO ATZINUMU

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Parauga kods (savākšana): |  | Parauga matrica: |  |

Laboratorijas parauga kods:

Laboratorija, kas iesniedz pieprasījumu:

Pieprasījuma datums:

**Sākotnējās *pārbaudes* procedūra**

* *Neapstrādāta attēla datne* (.tiff):
* *Gela attēla ekspozīcijas laiks:*
* *Parauga sagatavošana*:

Izmantotais *parauga* tipums (mL):

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Imūnafinitātes attīrīšana: *StemCell ELISA* □ |  | *MAIIA* □ |  | Cits: □ |  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | Ja cits, norādiet sistēmu (*piem.*, lodītes) un antivielu(-as) (*Ab*) |  |
|  |  |  |

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| * *Elektroforēze: SAR*-*PAGE* □ |  | *IEF*-*PAGE* □ |  | *SDS*-*PAGE* □ |  |

Piezīmes:

Saskaņā ar apstrādāto attēlu:

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| * *Blotēšana:* Vienkārša □ |  | Dubulta □ |  |  |  |
| Disulfīda saišu reducēšana |  | Nē □ |  | Jā □ |  |

Slāņainības apraksts (*piem.*, *Ab*1+*Ab*2–biotīns+Strep–*HRP*+substrāts), kurā norādīti antivielas kloni un/vai reaģenta avots):

*HRP* substrāts (*piem*., *West femto*, *West pico*, *West atto*, cits):

## Apstiprināšanas procedūra

* *Neapstrādāta attēla datne* (.tiff):
* *Gela attēla ekspozīcijas laiks:*
* *Parauga sagatavošana*:

Izmantotais parauga tipums (mL);

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Imūnafinitātes attīrīšana: *StemCell ELISA* □ |  | *MAIIA* □ |  | Cits: □ |  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | Ja cits, norādiet sistēmu (*piem.*, lodītes) un antivielu(-as) (*Ab*) |  |
|  |  |  |

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| * *Elektroforēze SAR*-*PAGE* □ |  | *IEF*-*PAGE* □ |  | *SDS*-*PAGE* □ |  |

Piezīmes:

Saskaņā ar apstrādāto attēlu:

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| * *Blotēšana:* Vienkārša □ |  | Dubulta □ |  |  |  |
| Disulfīda saišu reducēšana |  | Nē □ |  | Jā □ |  |

Slāņainības apraksts (*piem.*, *Ab*1+*Ab*2–biotīns+Strep–*HRP*), kurā norādīti antivielas kloni un/vai reaģenta avots):

*HRP* substrāts (*piem*., *West femto*, *West pico*, *West atto*, cits):

# C PIELIKUMS. *EPO* c.577del variants

## 1.0. Ievads

Par Nm\_000799.4:c.577del variantu cilvēka *EPO* gēnā (dbSNP ID rs369859204), kas izraisa rāmja nobīdi (p.Arg193AspfsTer28), ir ziņots publiskās datubāzēs (*piem.*, *gnomAD*, *1000 Genomes Project*) – alēles sastopamības biežums ir aptuveni 0,5–1 % Austrumāzijas iedzīvotāju vidū. Šis variants nav novērots indivīdiem, kuriem nav Austrumāzijas izcelsmes priekšteču.

Šim *EPO* c.577del variantam ir raksturīga viena nukleotīda delēcija *EPO* gēna pēdējā (5.) eksonā (kodējošās DNS 577. pozīcijā, netālu no translāciju terminējošā kodona, kas atrodas kodējošā rajona 580. pozīcijā), izraisot rāmja nobīdi un no tā izrietošo normālā terminējošā kodona zudumu un aminoskābju pievienošanu citā nolasīšanas rāmī, tādējādi mainot nobriedušā *EPO* proteīna garumu (B1. attēls). Tas maina atsauces proteīna (NP\_000790.2) (Arg193Asp) pēdējo aminoskābi un pievieno 26 aminoskābes, iegūstot proteīnu, kas ir aptuveni par 3 kDa smagāks par prekursora proteīnu. Šā varianta klīniskā nozīme nav skaidra. Svarīgi, ka tikko pievienotās aminoskābes nerada papildu N-glikozilācijas vietas, kas nozīmē, ka gan *EPO* atsauces proteīnam (*WT-EPO*), gan varianta proteīnam (*VAR-EPO*) ir vienāds N-glikozilācijas modelis.

*EPO* prekursora proteīns (NP\_000790.2) (*WT-EPO* prekursors)

A white background with black text

Description automatically generated

Proteīns, kas prognozēts, pamatojoties uz kodējošo sekvenci variantā (*VAR-EPO* prekursors)

A group of black letters

Description automatically generated

**C1. attēls**. Aminoskābju sekvence *EPO* prekursorā un prognozētajā varianta proteīnā.

**2.0. *VAR*-*EPO* un analītiskā *pārbaude* attiecībā uz *EPO***

Tā kā *EPO* c.577del alēles translācija izraisa ekspresiju nobriedušam *EPO* proteīnam (*VAR-EPO*) ar lielāku molekulmasu (MW) – apt. + 3 kDa attiecībā pret *EPO* atsauces proteīnu (*WT-EPO*) –, tas atspoguļojas novirzītā *VAR-EPO* joslas migrācijā *SDS-PAGE* / *SAR-PAGE* gelā.

2.1. Asins *paraugu* analīze

Kad asins (*t. i.*, seruma/plazmas) *paraugus* analizē attiecībā uz *EPO*, izmantojot *SDS*-*PAGE* / *SAR*-*PAGE*, redzams, ka heterozigotiem indivīdiem, kuriem ir gan *EPO* c.577del variants, gan *EPO* atsauces alēles, endogēnā *EPO* migrācija gelā izveido labi definētas dubultas joslas, kas ir skaidri nodalītas gelā (neatkarīgi no *parauga* ņemšanas laika), – tas atspoguļo abu *EPO* proteīnu endogēno izcelsmi (sk. C2.1. attēlu). Apakšējai migrējošajai joslai ir tāda pati šķietamā molekulmasa kā endogēniem *WT-EPO* kontroles paraugiem, un augšējā josla atbilst proteīnam ar aptuveni 3 kDa lielāku molekulmasu. Tas kontrastē ar raksturīgo joslu formu (tipisks izsmērējums virs endogēna *WT-EPO*), kas novērota rekombinantajiem *EPO* (*rEPO*), kuriem *rEPO* un *WT-EPO* josla parasti nav pilnīgi sadalījusies un kuru relatīvā intensitāte mainās laika gaitā pēc *rEPO* ievadīšanas (sk. 4. un 5. attēlu *TD*).

Indivīdiem, kas ir homozigoti attiecībā uz *EPO* c.577del variantu, endogēna *EPO* migrācijai gelā raksturīgs vienas joslas modelis, kas migrē ar aptuveni 3 kDa lielāku molekulmasu, nekā ir *WT-EPO* joslai.

A close-up of a test

Description automatically generated

**C2. attēls**. *EPO* profili asinīs (C2.1.) un urīnā (C2.2.) *SDS-PAGE* / *SAR-PAGE* izmantošanas gadījumā indivīdiem, kuriem ir *WT-EPO* ekspresija (homozigota *EPO* atsauces gēna klātbūtne, 3. sloksne C2.1. attēlā un 2. sloksne C2.2. attēlā) vai *WT-EPO* un *VAR-EPO* kombinācija (heterozigotas *EPO* c.577del alēles klātbūtne (attiecīgi 5. un 4. sloksne). Lai gan *EPO* c.577del heterozigota nesēja asinīs ir redzamas divas precīzi noteiktas *EPO* joslas (*WT-EPO* un *VAR-EPO*) ar līdzīgu intensitāti, šīs personas urīna profilā augšējā *VAR-EPO* josla ir mazāk skaidri izteikta un tai ir mazāka intensitāte salīdzinājumā ar zemāko *WT-EPO* joslu. Salīdzinājumam ir parādīts arī pozitīvs kontroles paraugs, kas iegūts pēc *rEPO* ievadīšanas indivīdam, kuram nav *VAR-EPO* ekspresijas (7. sloksne C2.1. attēlā un 6. sloksne C2.2. attēlā).

2.2. Urīna *paraugu* analīze

Lai gan *EPO* asins parauga modelis ar dubultām joslām ir raksturīgs heterozigota *EPO* c.577del variantam, šī konfigurācija ne vienmēr saglabājas *EPO* proteīniem, kas izdalās ar urīnu (sk. C2.2. attēlu). Šajā gadījumā indivīdiem, kas ir heterozigoti attiecībā uz *EPO* c.577del variantu, *SDS-PAGE* / *SAR-PAGE* gadījumā var parādīties *EPO* migrācijas modelis, kas var izskatīties ļoti līdzīgs tam, kurš pēc *rEPO* ievadīšanas parādās indivīdiem, kam ir tikai *WT-EPO* ekspresija (sk. arī 4. un 5. attēlu *TD*). Tāpēc *rEPO* raksturīgā joslas forma (tipisks izsmērējums virs endogēnā *WT-EPO*) nav pietiekama pazīme, lai *a priori* izslēgtu iespēju, ka *sportists* varētu būt *EPO* c.577del varianta heterozigots nesējs.

## 3.0. Pārskatītā analītiskās *pārbaudes* stratēģija attiecībā uz *rEPO*

Ņemot vērā šo situāciju, kas var ietekmēt nelielu daļu *sportistu*, kuriem ir Austrumāzijas izcelsmes priekšteči, tiek īstenota turpmāk norādītā *rEPO* analītiskās *pārbaudes* stratēģija.

### 3.1. Analītiskās *pārbaudes* iespējamie rezultāti attiecībā uz *rEPO* asins un urīna *paraugos*

Pēc *SDS-PAGE* vai *SAR-PAGE* analīzes metodes izmantošanas asins vai urīna “A” *parauga* analīzei attiecībā uz *ERA* var būt iespējami turpmāk norādītie analīžu rezultāti, kas piemērojami *rEPO* noteikšanai. Dažos gadījumos laboratorija atkarībā no analīžu rezultāta var viegli secināt, vai atrade ir *AAF* (*piem*., tipiska *rEPO* modeļa klātbūtne seruma/plazmas *paraugā*, vai *rEPO* noteikts, izmantojot pārbaudes metodi, kas ļauj noteikt *rEPO* klātbūtni *VAR-EPO paraugos*) vai negatīvs rezultāts (*piem.*, noteikta viena josla, kas atbilst *WT-EPO*).

Tomēr citos gadījumos ir nepieciešama papildu izmeklēšana vai analīzes, lai noteiktu, vai rezultāts ir saistīts ar *rEPO* ievadīšanu vai ar *VAR-EPO* endogēno ekspresiju[[4]](#footnote-5). Piemēram, nosaka, vai dubultu joslu *EPO* modelis asinīs rodas endogēna *WT-EPO* + *VAR-EPO* heterozigota fenotipa rezultātā un/vai tāpēc, ka *lietots* *rEPO* preparāts, kas kādā brīdī pēc ievadīšanas var izraisīt līdzīgu dubultu joslu modeli (*piem*., *Retacrit*, sk. *TD* 4. attēla 4. sloksni).

**C1. tabula**. Pārskatītā analītiskās *pārbaudes* stratēģija attiecībā uz *rEPO*

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| ***SDS*-*PAGE* / *SAR*-*PAGE* analīžu rezultāti** | **Asins (serums/plazma) / *DBS***  (piemērs) | **Urīns** |
| 1. Atsevišķa josla (*WT*-*EPO*) | Negatīvs rezultāts  (3. sloksne, C2.1. attēls) | Negatīvs rezultāts  (2. sloksne, C2.2. attēls) |
| 2. Atsevišķa josla (*VAR*-*EPO*; *MW* > *WT*-*EPO*)1  (homozigota *EPO* c.577del variants) | Papildu izmeklēšana/analīzes 2,3  (augšējā josla, 5. sloksne, C2.1. attēls) | N/A |
| 3. Tipiska izsmērēta josla *rEPO* (*rEPO* ± *WT*- *EPO*) | *AAF*  (7. sloksne, C2.1. attēls) | Papildu izmeklēšana/analīzes3  (4. sloksne, C2.2. attēls; *TD* 4. un 5. attēls) |
| 4. Dubulta josla (*WT*-*EPO* + *VAR*-*EPO* vai *WT*-*EPO* + *rEPO*)  (heterozigota *EPO* c.577del variants) | Papildu izmeklēšana/analīzes2,3  (5. sloksne, C2.1. attēls) | Papildu izmeklēšana/analīzes 3  (4. sloksne. C2.2. attēls; urīnā ne vienmēr ir redzama dubulta josla) |

N/A: nav attiecināms uz urīnu

1 Šis ir ārkārtīgi rets gadījums, kas tikai vienu reizi ir aprakstīts *gnomAD* v2.1.1 datubāzē, bet līdz šim nekad nav novērots antidopinga kontekstā.

2 Attiecībā uz asins *paraugiem*, kam veic izmeklēšanu, laboratorija uzglabā “A” *parauga* asins frakciju, līdz izmeklēšana ir pabeigta un rezultāts ir paziņots *ADAMS*.

3 Šajās papildu analīzēs var tikt izmantota pārbaudes metode, kas ļauj noteikt *rEPO* klātbūtni *paraugos*, kuri savākti no personām, kam ir *VAR-EPO* ekspresija.

### 3.2. Papildu izmeklēšana, lai noteiktu *rEPO* atrades cēloni

Ja saskaņā ar C1. tabulu ir nepieciešama papildu izmeklēšana/analīzes, veic turpmākās darbības (sk. arī procesa shēmas diagrammu turpmāk tekstā).

*[Piezīme. Ņemot vērā laboratorijas analīžu veikšanas kapacitāti, turpmāk 1.–6. punktā aprakstītajos izmeklēšanas posmos prioritāte ir iepriekšējo ERA rezultātu pārskatīšanai / papildu ERA analīžu veikšanai iepriekš savāktajam(-ajiem) asins/DBS paraugam(-iem), lai noteiktu, vai sportistam ir VAR-EPO ekspresija. Tomēr laboratorija saziņā ar pārbaudes iestādi jebkurā laikā (ņemot vērā analīžu veikšanas spēju un loģistikas apsvērumus) var izvēlēties veikt sportista parauga(-u) papildu analīzi, lai izmeklētu VAR-EPO ekspresiju un/vai rEPO lietošanu.]*

1. Laboratorija informē *WADA* (sk. A pielikuma 1. punkta a) apakšpunktu).

2. Atrades gadījumā tiks ievērota otrā atzinuma sniegšanas kārtība (sk. A pielikumu).

a) Ja otrā atzinuma sniedzēji konstatē, ka atrade ir *ATF* vai negatīvs rezultāts, tad laboratorija attiecīgi ziņo par atradi.

b) Ja otrā atzinuma sniedzēji secina, ka *paraugā* pastāv *AAF* varbūtība attiecībā uz *rEPO*, kas jāapstiprina, lai izslēgtu, ka iespējamā *rEPO* atrade izriet no *EPO* c.577del varianta endogēnas ekspresijas, tad rīkojas atbilstoši turpmāk noteiktajam.

3. *WADA* pārbaudīs, vai *paraugs* pieder *sportistam*, kurš jau ir identificēts kā *EPO* c.577del varianta nesējs.

a) *Sportists* nav *EPO* c.577del varianta nesējs:

ja ir jau apstiprināts, ka sportists nav *EPO* c.577del varianta nesējs (piemēram, izmantojot iepriekšējo *ERA* analīzi plazmā/serumā/DBS vai DNS analīzi), *WADA* dos norādījumu laboratorijai ziņot par izmeklējamo atradi (par kuru jau ir sniegti otrie atzinumi, kas apstiprina *rEPO* klātbūtni) kā par *AAF*.

b) *Sportists* jau ir identificēts kā *EPO* c.577del varianta nesējs:

*WADA* dos norādījumu laboratorijai apsvērt iespēju piemērot (vai saziņā ar *pārbaudes* iestādi slēgt apakšlīgumu[[5]](#footnote-6) ar citu laboratoriju) nolūkam atbilstīgu pārbaudes metodi, lai nepastarpināti noskaidrotu, vai iespējamā *rEPO* atrade izmeklējamā *paraugā* radusies tāpēc, ka *lietots* *rEPO* preparāts. Ja analīzi nevar veikt, izmeklēšanu saistībā ar iespējamu *rEPO* *lietošanu* turpina, savācot jaunu(-us) *paraugu*(-us) vai izmantojot pieejamo(-os) *sportista* *paraugu*(-us), kam var veikt šo analīzi.

*[Piezīme. Izmantoto pārbaudes metodi iepriekš ir apstiprinājusi WADA (kā WADA specifisku analītiskās pārbaudes procedūru), un tā ir iekļauta laboratorijas (vai laboratorijas, ar kuru noslēgts apakšlīgums) ISO/IEC 17025 akreditācijas darbības jomā. Pēc tam laboratorija ievēro otrā atzinuma sniegšanas kārtību, kas aprakstīta A pielikumā, un attiecīgi ziņo par atradi.*

*Šādu pārbaudes metodi izmanto arī, lai apstiprinātu rEPO PAAF paraugos, kas saņemti no sportistiem, kuri jau ir identificēti kā EPO c.577del varianta nesēji, ja pārbaudes metode ļauj noteikt rEPO klātbūtni papildus VAR-EPO ekspresijai.]*

4. *WADA* pārbaudīs, vai iepriekšējās *ERA* analīzes tika veiktas plazmā/serumā/*DBS*.

Ja nav noteikts, vai *sportists* ir *EPO* c.577del varianta nesējs, *WADA* pārbaudīs, vai no *sportista* ir paņemti (citi) asins (plazmas, seruma) *paraugi* vai *DBS* *paraugi* un analizēti attiecībā uz *ERA*.

a) Pierādījumi, ka *sportists* nav *EPO* c.577del varianta nesējs

Ja iepriekš analizētā(-o) plazmas/seruma/*DBS* *parauga*(-u) pārbaudes rezultāti liecina, ka nav dubultas joslas (kas liecina par *WT-EPO* + *VAR-EPO* heterozigotu fenotipu) vai vienas joslas, kuras molekulmasa ir lielāka par *WT-EPO* (kas liecina par iespējamo *EPO* c.577del varianta homozigotu ekspresiju), tas pierāda, ka *sportists* nav *EPO* c.577del varianta nesējs.

Tāpēc *WADA* dos norādījumu laboratorijai ziņot par izmeklējamo atradi (kurā ir apstiprināta *rEPO* klātbūtne arī saskaņā ar otro atzinumu) kā par *AAF*.

b) *VAR*-*EPO* fenotipa iespējamā ekspresija

Tomēr, ja iepriekš analizētā(-o) plazmas/seruma/*DBS* *parauga*(-u) pārbaudes rezultāts(-i) uzrāda dubultas joslas vai vienas joslas (*MW* > *WT-EPO*) klātbūtni, tad nosaka, vai izmeklējamo atradi izraisījusi *EPO* c.577del varianta endogēnā ekspresija.

*WADA* dos norādījumu laboratorijai piemērot (vai saziņā ar *pārbaudes* iestādi apsvērt apakšlīguma[[6]](#footnote-7) slēgšanu ar citu laboratoriju) pārbaudes metodi, lai nepastarpināti noskaidrotu, vai iespējamā *rEPO* atrade izmeklējamajā *paraugā* radusies tāpēc, ka *lietots* *rEPO* preparāts (sk. 3. punkta b) apakšpunktu).

Ja šādu analīzi nevar veikt, tad, izmantojot DNS analīzi, kas veikta izmeklējamajam *paraugam* vai citam paraugam, kurš savākts no *sportista*, būtu jānosaka, vai *sportists* ir *EPO* c.577del varianta nesējs (sk. 3.2.1. punktu).

5. Ja iepriekš nav veiktas *ERA* analīzes plazmas/seruma/*DBS* *paraugā*(-os), *WADA* pārbaudīs, vai ir kāds(-i) iepriekš savākts(-i) asins/*DBS* *paraugs*(-i), ko var analizēt attiecībā uz *ERA*.

a) Ja iepriekš no *sportista* savāktais(-ie) asins/*DBS* paraugs(-i) joprojām ir pieejams(-i) laboratorijā, bet nav analizēts(-i) attiecībā uz *ERA*6, *WADA* pieprasīs pēc iespējas ātrāk analizēt šādu(-us) *paraugu*(-us) attiecībā uz *ERA* un lūgs laboratorijai par to informēt *pārbaudes* iestādi. Tas var attiekties arī uz asins/*DBS* *paraugiem*, kuri iepriekš savākti un pārbaudīti, bet nav analizēti attiecībā uz *ERA* un kurus laboratorija(-as) var būt ievietojusi(-ušas) ilgstošā glabāšanā, un kuriem var veikt papildu analīzi. Pēc šāda(-u) *parauga*(-u) analīzes attiecībā uz *ERA* *WADA* ņem vērā šīs analīzes rezultātus, kā noteikts 4. punktā.

b) Ja iepriekš savāktais(-ie) asins/*DBS* *paraugs*(-i) nav pieejams(-i) *ERA* analīzei, *WADA* dos norādījumu laboratorijai piemērot (vai saziņā ar *pārbaudes* iestādi apsvērt apakšlīguma6 slēgšanu ar citu laboratoriju) pārbaudes metodi, lai nepastarpināti noskaidrotu, vai iespējamā *rEPO* atrade izmeklējamā *paraugā* radusies tāpēc, ka *lietots* *rEPO* preparāts (sk. 3. punkta b) apakšpunktu).

Ja šādu analīzi nevar veikt, tad, izmantojot DNS analīzi, kas veikta izmeklējamajam *paraugam* vai citam paraugam, kurš savākts no *sportista*, būtu jānosaka, vai *sportists* ir *EPO* c.577del varianta nesējs (sk. 3.2.1. punktu).

6. Jauna asins/*DBS* *parauga* savākšana

a) Ja nav pieejams(-i) iepriekš savākts(-i) asins/*DBS* *paraugs*(-i) un nav iespējams veikt DNS analīzi izmeklējamajam asins/*DBS* *paraugam* vai citiem savāktajiem *paraugiem* (piemēram, *parauga* tilpuma vai analītisko ierobežojumu dēļ), *WADA* dos norādījumu laboratorijai ziņot par izmeklējamo atradi kā par *ATF*.

b) *WADA* nekavējoties pieprasīs atbildīgajai *pārbaudes* iestādei vai citai *pārbaudes* iestādei, kuras jurisdikcijā ir *sportists*, savākt papildu asins/DBS *paraugu* (“A” un “B”) un, ja iespējams, nosūtīt tai pašai laboratorijai *ERA* analīzes veikšanai.

Atbildīgā *pārbaudes* iestāde velta visas pūles tam, lai saprātīgā termiņā (piemēram, viena (1) mēneša laikā pēc *WADA* pieprasījuma saņemšanas) savāktu papildu asins/*DBS* *paraugu*. Tomēr, ja tas nav iespējams vai ja *pārbaudes* iestāde atbilstoši nereaģē uz *WADA* pieprasījumiem, *WADA* pieprasa citai *pārbaudes* iestādei, kuras jurisdikcijā ir *sportists* (piemēram, Starptautiskajai sporta federācijai, tāda *liela sporta pasākuma* organizatoram, kurā *sportistam* ir jāpiedalās, *valsts antidopinga organizācijai* valstī, kurā *sportistam* ir paredzētas sacensības vai treniņi, utt.), savākt asins/*DBS* *paraugu*. *Pārbaudes* iestāde(-es), kuras(-u) uzdevums ir savākt papildu asins/*DBS* *paraugu*, regulāri informē *WADA* par šo darbību gaitu.

i) Pēc šāda asins/*DBS* *parauga* savākšanas un analīzes attiecībā uz *ERA* *WADA* būtu jāapsver *ERA* analīzes rezultāti un, ja nepieciešams, jebkādu papildu analīžu veikšana saskaņā ar 4. punktu.

ii) Ja papildu analīzēs (tostarp DNS analīzē, ja nepieciešams), kas veiktas papildu asins/*DBS* *paraugam*, tiks secināts, ka nav *VAR-EPO* ekspresijas, *WADA* dos norādījumu laboratorijai ziņot par izmeklējamā *parauga* rezultātu kā par *AAF*, vai, ja par atradi jau būs ziņots kā par *ATF* (sk. 6. punkta a) apakšpunktu), *WADA* dos norādījumu laboratorijai pārskatīt *ADAMS* iesniegto pārbaudes protokolu un attiecībā uz *rEPO* mainīt secinājumu, norādot *ATF* vietā *AAF*, un iekļaut komentāru, kurā paskaidrots, ka izmaiņu iemesls ir tas, ka “papildu izmeklēšanas laikā ir noskaidrots, ka *sportists* nav *EPO* c.577del varianta nesējs”.

3.2.1. DNS pārbaudes *VAR*-*EPO* nesēju identifikācijai

a) *WADA* informēs laboratoriju, ja būs jāveic DNS analīze.

DNS analīzi var veikt izmeklējamam *paraugam*, iepriekš savāktam(-iem) *paraugam*(-iem) vai, ja iespējams, no jauna savāktam(-iem) *paraugam*(-iem). Prioritāte jāpiešķir asins/*DBS* *paraugu* izmantošanai, ja tādi ir pieejami. Tomēr laboratorija saziņā ar *pārbaudes* iestādi var arī apsvērt iespēju veikt (vai slēgt apakšlīgumu 6 ar citu laboratoriju) DNS analīzi urīna vai *DBS* *paraugiem[[7]](#footnote-8)*. Laboratorija informē *WADA* par DNS analīzē izmantotajiem *paraugiem*.

b) DNS sekvencēšanas analīzi (*piem*., *Sanger*) veic ar mērķi konstatēt *EPO* gēnu (5. eksonu vai rajonu, kas ietver c.577).

c) analīzi veic laboratorija (ja metode ir iekļauta tās ISO/IEC 17025 akreditācijas darbības jomā) vai noslēdz apakšlīgumu 6 ar citu laboratoriju (kuras izmantotā metode ir iekļauta tās ISO/IEC 17025 akreditācijas darbības jomā) vai, ja nepieciešams, ar *WADA* apstiprinātu laboratoriju (kuras izmantotā metode ir iekļauta tās ISO/IEC 17025 akreditācijas darbības jomā).

d) Izmaksas, kas saistītas ar *EPO* sekvencēšanas analīzi, sedz *pārbaudes* iestāde, kas ir atbildīga par izmeklējamo *paraugu*.

e) Nosakot, vai *sportists* ir *EPO* c.577del varianta nesējs, pamatojas uz pārliecinošiem DNS analīzes rezultātiem.

f) *EPO* sekvencēšanas rezultātus laboratorija iesniedz *WADA*, lai tā novērtētu, vai *sportists* ir vai nav *EPO* c.577del varianta nesējs. Rezultātu pārsūtīšana *WADA* notiek drošā veidā, kā noteikusi *WADA*, un ievērojot analītisko datu konfidencialitāti.

A diagram of a data flow

Description automatically generated

|  |  |
| --- | --- |
| **Angļu val.** | **Latviešu val.** |
| ***Sample* under investigation – *AAF* for rEPO?** | **Izmeklējamais *paraugs* – *AAF* attiecībā uz *rEPO*?** |
| **Typical rEPO smear band**  rEPO ± WT-EPO | **Tipiska izsmērēta *rEPO* josla**  *rEPO* ± *WT-EPO* |
| **Single Band\***  VAR-EPO or rEPO; MW > WT-EPO Homozygous - *EPO* c.577del? | **Viena josla\***  *VAR-EPO* vai *rEPO*; *MW* > *WT-EPO* homozigots – *EPO* c.577del? |
| **Double-band**  WT-EPO + VAR-EPO or WT-EPO + rEPO | **Dubulta josla**  *WT-EPO* + *VAR-EPO* vai *WT-EPO* + *rEPO* |
| **Single Band**  WT-EPO | **Viena josla**  *WT*-*EPO* |
| If **Blood *Sample*** | **Asins *paraugs*** |
| If **Urine *Sample*** | **Urīna *paraugs*** |
| **Inform *WADA*** | **Jāinformē *WADA*** |
| **Negative Finding** | **Negatīvs rezultāts** |
| **Second Opinions** | **Otrie atzinumi** |
| ***AAF*** | ***AAF*** |
| ***ATF*** | ***ATF*** |
| **Inconclusive** | **Nepārliecinošs** |
| **Negative** | **Negatīvs** |
| **Positive** | **Pozitīvs** |
| ***Athlete* expresses VAR-EPO?** | ***Sportistam* ir *VAR-EPO* ekspresija?** |
| **YES** | **JĀ** |
| **NO** | **NĒ** |
| Direct Method detection VAR-EPO + rEPO? (*Sample*) | Tieša *VAR-EPO* + *rEPO* noteikšana? (*Paraugs*) |
| VAR-EPO + rEPO | *VAR-EPO* + *rEPO* |
| VAR-EPO | *VAR-EPO* |
| **Unknown** | **Nav zināms** |
| **Previous plasma/serum/DBS EPO result?** | **Iepriekšējais plazmas/seruma/*DBS* parauga *EPO* rezultāts?** |
| Double-band or single-band (MW > WT-EPO)? | Viena josla vai divas joslas (*MW* > *WT-EPO*)? |
| ERA Analysis | *ERA* analīze |
| **Other avilable blood/DBS *Sample*?** | **Pieejams cits asins/*DBS* *paraugs*?** |
| **Collect new blood/DBS *Sample*** | **Jāsavāc jauns asins/*DBS* *paraugs*** |
| DNA analysis cannot be done or inconclusive. | DNS analīzi nevar veikt vai tā ir nepārliecinoša. |
| DNA Analysis (***Sample*** or another *Sample*) | DNS analīze (***paraugs*** vai cits *paraugs*) |
| Direct detection VAR-EPO + rEPO? (***Sample***) | Tieša *VAR-EPO* + *rEPO* noteikšana? (***Paraugs***) |
| VAR-EPO? | *VAR-EPO*? |
| \*This is not applicable if the ***Sample* under investigation** is a urine Sample | \*Nav piemērojams, ja **izmeklējamais *paraugs*** ir urīna paraugs |

1. *Pārbaudes* iestāde vai *rezultātu pārvaldības* iestāde piecpadsmit (15) dienu laikā pēc tam, kad laboratorija ziņojusi par *AAF*, rakstveidā informē laboratoriju par to, vai tiks veikta “B” *parauga* *CP*. Tas ietver situācijas, kad *sportists* nepieprasa “B” *parauga* analīzi vai tieši vai netieši atsakās no savām tiesībām uz “B” *parauga* analīzi, bet *pārbaudes* iestāde vai *rezultātu pārvaldības* iestāde nolemj, ka joprojām jāveic “B” *parauga* *CP*.

   “B” *parauga* *CP* veikšanas laiks var tikt stingri noteikts ļoti īsā laikposmā (piemēram, gatavojoties lieliem *sporta pasākumiem* vai to laikā) un bez iespējas to atlikt, bet ne vēlāk kā (1) mēnesi pēc ziņošanas par *AAF* attiecībā uz “A” *paraugu*. [↑](#footnote-ref-2)
2. Laboratorija apraksta *CP* standartprocedūras attiecībā uz *ERA* un norāda tajās nosacījumus, kas var būt iemesls *CP* atkārtošanai (*piem*., *QC* vai *TSC* kļūme, traucējošas joslas, zemas intensitātes josla, *ERA* joslu neesība, aizdomas par nejaušu *parauga* samainīšanu).

   Ja *rEPO* signāls ir pārāk zems, lai nodrošinātu ticamu identifikāciju, laboratorija izmēģina dažādus pasākumus signāla uzlabošanai (*piem*., atkārto analīzi, izmantojot lielāku alikvotas tilpumu vai uzlabo signāla uztveršanu un kontrastu) un/vai pārbauda, vai *paraugā* neuzrādās mikrobioloģiskais piesārņojums[30] vai proteolītiskā aktivitāte[31]. [↑](#footnote-ref-3)
3. Lai pēc nejaušības principa izraudzītos ekspertus otrā atzinuma sniegšanai, piemēro turpmāk izklāstītos vispārīgos noteikumus.

   1. Eksperts nedrīkst sniegt otro atzinumu par rezultātiem, ja tos sagatavojusi viņa paša laboratorija vai ja viņš jebkādā veidā ir bijis iesaistīts *parauga* analītiskajā *pārbaudē* (piemēram, ja laboratorija, kas nodrošina analītiskās *pārbaudes* pakalpojumus lielos *sporta pasākumos*, viņu bija uzaicinājusi par analītiķi/ekspertu). Ja pēc nejaušības principa izraudzīts eksperts ir bijis iesaistīts minētajās situācijās, atlases process tiks nekavējoties atkārtots, līdz tiks izraudzīti divi (2) neatkarīgi eksperti.

   2. Arī tad, ja viens vai vairāki izraudzītie eksperti nebūs pieejami, lai sniegtu otro atzinumu, pēc nejaušības principa organizētais atlases process tiks atkārtots, līdz tiks izraudzīti divi (2) neatkarīgi eksperti.

   3. Lielu *sporta pasākumu* gadījumā *WADA* var jau iepriekš atlasīt divus (2) ekspertus, ja nav pietiekami daudz ekspertu, kas ir tiesīgi sniegt otro atzinumu (piemēram, tāpēc, ka viņi ir iesaistīti analītiskajās *pārbaudēs* saistībā ar lielo *sporta pasākumu*).

   4. Eksperti izstrādā savu otro atzinumu neatkarīgi viens no otra, *t. i.*, neapspriežoties savā starpā vai ar citiem *EPO* darba grupas locekļiem.

   5. Otrā atzinuma sniegšana par “A” *parauga* *ERA* rezultātu nerada ierobežojumus otrā atzinuma sniegšanai par “B” *parauga* rezultātu. Principā vieniem un tiem pašiem diviem (2) ekspertiem būtu jāsniedz otrais atzinums gan par “A”, gan “B” *parauga* rezultātiem (ja piemērojams), ja vien eksperts(-i) nav aizņemts(-i) laikā, kad sniedzams otrais atzinums par “B” *paraugu*. [↑](#footnote-ref-4)
4. Kad “A” *paraugam* (sk. 3.2. punktu) ir veiktas visas papildu izmeklēšanas, lai noteiktu *rEPO* atrades cēloni, nav nepieciešamības atkārtot šādu izmeklēšanu attiecībā uz “B” *paraugu*. [↑](#footnote-ref-5)
5. Ieteikumi apakšlīguma slēgšanai par analīžu veikšanu sniegti Laboratoriju *starptautiskajā standartā* (LSS) un *WADA* Laboratoriju vadlīnijās par tādu *dopinga kontroles* analīžu un papildu analīžu veikšanu, par kurām noslēgts apakšlīgums, un ziņošanu par tām. [↑](#footnote-ref-6)
6. Ja pieejamais asins/*DBS* *paraugs* bija iemesls tam, kāpēc iepriekš tika konstatēts *Kodeksa* 2. panta 2.1. punktā paredzētā antidopinga noteikuma pārkāpums, *WADA* rīkojas tā, it kā iepriekšējais asins *paraugs* nebūtu pieejams (sk. 3.2. punkta 6. apakšpunktu). [↑](#footnote-ref-7)
7. a) Donati *et al*. Detection of exon 5 c.577del variant of human erythropoietin gene in whole blood, dried blood spots and urine samples for doping control. *Front Anal Sci* **3**: 1–8, 2023. b) Leuenberger N *et al*. Characterization of DNA concentration in urine and dried blood samples to detect the c.577 deletion within the EPO gene. *Drug Test Anal* 2024. gada 21. janvāris, doi: 10.1002/dta.3647 [↑](#footnote-ref-8)