

BEFORE THE COURT OF ARBITRATION FOR SPORT

BETWEEN:

MR ERIK TYSSE

Appellant

-v-

(1) THE NORWEGIAN ATHLETICS FEDERATION ("NAF")

(2) THE INTERNATIONAL ASSOCIATION OF ATHLETICS FEDERATIONS ("IAAF")

Respondents

WITNESS STATEMENT OF PROFESSOR FRANCESCO BOTRÈ

I, Professor Francesco Botrè, of Laboratorio Antidoping FMSI, Largo Giulio Onesti, 1, 00197 Rome, Italy, will say as follows:

Introduction

1. I am the head of the WADA-accredited Laboratorio Antidoping FMSI in Rome, Italy ("the Rome Laboratory"), a position which I have held since November 1998. As my Curriculum Vitae shows at Appendix 1 to this witness statement, I have been involved in anti-doping work since 1996. Under my direction, the Rome Laboratory has analysed over 100,000 samples in the last 10 years and over 50,000 samples since moving to our new, larger premises in 2007.
2. The Rome Laboratory has been accredited for analysing EPO since 2003 and CERA was added to our scope of accreditation in the second half of 2008. In total, the Rome Laboratory has analysed

roughly 10,000 samples for EPOs, 70% of which (about 7,000 samples) in the period 2007-2010. In that period, we have reported 35 adverse analytical findings for EPOs (33 since 2007) of which 27 have been for human recombinant EPO, 5 for NESP and 3 for CERA. All 35 adverse analytical findings to date have been reported from urine samples. In addition to the above, all blind samples and double blind samples containing EPOs received by our laboratory as part of the WADA external quality assessment scheme (EQAS) and the IOC laboratory evaluation scheme for the 2006 Turin Winter Olympics have always been correctly reported.

3. In this witness statement, I have been asked to address the following issues:
 - (i) the chain of custody of sample 3511158;
 - (ii) the A sample analysis;
 - (iii) the B sample analysis;
 - (iv) my response to the Panel's requests for further information on the analyses; and
 - (v) my response to various criticisms made of the analytical process by the athlete's experts.

Chain of Custody of Sample

4. The Rome Laboratory was asked to conduct the analysis of urine sample number 3511158 collected in competition at the Coppa Città di Sesto event held in Sesto San Giovanni, Italy on 1 May 2010.
5. A summary of the complete laboratory chain of custody for sample 3511158 (A and B samples) is set out at page 6/70 of the A sample Laboratory Documentation Package at Appendix 2 and at page 6/79 of the B sample Laboratory Documentation Package at Appendix 5, and is further described below.
6. Urine sample number 3511158 was collected at the Coppa Città di Sesto event as part of IAAF Test mission code "IAAF 03/2010" and handed over for transportation to the Rome Laboratory by TNT courier numbered "NT - 81322796-2" (at page 8/70 of Appendix 2). The sample was handed over in a shipping container, together with 5 other samples (A and B samples) collected from the same event.

7. The Chain of Custody Form (at page 8/70 of Appendix 2) records that my colleague, Francesco Molaioni (MLJ), took delivery of the package from TNT at 08:20hrs on 2 May 2010. The 2 May 2010 was a Sunday, so we followed the procedure for the reception of samples outside of normal business hours (8am to 5pm Monday to Friday), as indicated on the relevant form (FL103, "Accettazione straordinaria" at page 11/70 of Appendix 2). Upon receipt of the courier, MLJ checked the identity of the shipment, its proper refrigeration and the integrity of the packages containing the samples. Having done so to his satisfaction, he ticked the requisite boxes on the Chain of Custody Form and then signed it (at page 8/70 of Appendix 2).
8. A copy of the corresponding TNT form is at page 9/70 of Appendix 2. This bears the same TNT reference 81322796-2 as recorded on the Chain of Custody Form.
9. The Laboratory sample reception form is the first internal document to be filled out in cases such as this and further records that MLJ took delivery of TNT package numbered 81322796-2 at 08:20hrs on 2 May 2010 (11/70 of Appendix 2). No observations were made by MLJ on receipt of the samples and he signed the form accordingly, indicating that all was in order. The samples were immediately placed in refrigerator FR018 for storage at a temperature of 4°C.
10. The Laboratory sample registration form FL102 ("accettazione e registrazione campioni") is at 12/70 of Appendix 2. This form records that, on the following day, Monday 3 May 2010, Stefano Barberini (SBR) assigned batch "IAAF 03/2010" with an internal reception number of 10E003 and urine sample 3511158 with an internal laboratory number of 4433 ("A4433" for the A bottle and "B4433" for the B bottle). The complete and unique internal codes for the A and B samples therefore were 10E003A4433 and 10E03B4433, but, for all internal operations, the samples were identified by the last part of the respective code: "A4433" and "B4433". SBR also verified the identity of the samples on 3 May 2010, including sample 3511158, against the accompanying doping control forms (page 10/70), and checked that the seals of the bottles were intact. At the same time, SBR conducted a visual inspection of the incoming samples and recorded that sample A4433 was unremarkable being of a bright yellow colour and containing no sediment (pages 15 and 16/70 of Appendix 2). No traces of blood were identified in sample A4433. The A samples, including sample A4433, were placed in refrigerator FR019, while the corresponding B samples, including sample B4433, were placed in CO010 (page 12/70 of Appendix 2).
11. On 3 May 2010, Stefania Turi (TUS) broke the seal of sample A4433 and took the aliquot necessary for the EPOs/NESP/CERA analysis; the aliquot was placed in refrigerator FR016 and

the A bottle was placed back in FR019 (page 13/70 of Appendix 2). It is usual laboratory practice that the aliquoting for EPO is done separately by the individual EPO analyst and TUS indicated in the comments box on page 13/70 the words "*solo epo*" meaning that she took only the EPO aliquot on 3 May 2010. The following day, 4 May 2010, Roberto Romani (RRM) performed the remaining aliquoting for the additional analytical procedures to be carried out (i.e. pH and specific gravity, stimulants narcotics, anabolic steroids, diuretics and glucocorticoids...). Once the aliquoting was completed, the A bottle containing the remainder of the sample was placed in freezer CO010.

12. On 5 May 2010, Francesca De Angelis (FDA) measured the pH and specific gravity values on the dedicated aliquot of sample A4433 (page 18/70). The pH was recorded as 5.0 and the specific gravity as 1.010. Both values are well within the range of normal values for urine samples analysed by our laboratory and neither raised any concern about the sample's suitability for analysis.

The analysis of the A sample

13. The initial testing procedure was performed by Stefania Turi (TUS) between 7 and 11 May 2010 (page 6/70 and pages 21-31/70 of Appendix 2) in accordance with the Rome Laboratory's internal procedure for the detection of recombinant erythropoietin and analogues, including CERA. A brief description of the method used, which is consistent with the method described in the WADA Technical Document TD2009EPO, is given on page 20/70 of Appendix 2 as follows:

- Sample preparation (concentration by ultrafiltration), including also the aliquot used for the stability test in the case of the confirmation of a suspicious sample;
- Pre-focusing;
- Isoelectric focusing;
- First blotting;
- Incubation with the anti-EPO antibody;
- Second blotting;
- Incubation with the biotinylated secondary antibody;
- Incubation with the streptavidine-peroxidase complex;
- Covering with the chemiluminescent substrate;
- Exposure of the membrane and acquisition of the image by a dedicated digital camera.

14. Details related both to the instruments used and the instrumental conditions for the initial testing procedure are set out on page 21/70 of Appendix 2 and the worksheets recording the various steps

that were taken in the procedure are recorded as part of the aliquot chain of custody documentation at pages 22-31/70 of Appendix 2.

15. The results of the initial testing procedure are set out at pages 32-34/70 of Appendix 2. It should be noted that the purpose of the initial testing procedure is NOT to report a positive or suspicious sample but instead to exclude from any further investigation those samples that are clearly negative. This was not the case for the sample A4433 in lane 2 (page 34/70) which shows a clear signal in the CERA area. However, since some of the lanes on the gel - including lane 2 – showed signs of lateral drift, the gel did not comply with our internal criteria and so our analyst, Stefania Turi (TUS), proposed repeating the initial analysis on a new gel. I agreed to this.
16. The initial testing procedure was therefore repeated between 11 and 13 May 2010 by Giorgia Corpetti (GIC) (page 6/70 and page 44/70 of Appendix 2) using another aliquot of the same retentate from the first initial screening and, once again, in accordance with the Laboratory's internal procedure for the detection of recombinant erythropoietin and analogues. The corresponding worksheets for the repeat procedure are set out at pages 35-44/70 of Appendix 2.
17. The results of the repetition of the initial testing procedure are at pages 46-48/70 of Appendix 2. The profile of lane 3, corresponding to sample A4433 (page 48/70), showed clear signals in the CERA region and therefore required a confirmation analysis according to the WADA Technical Document TD2009EPO. For this purpose, TUS prepared one aliquot for the confirmation analysis and one aliquot for a stability test to be performed. The aliquoting for the confirmation procedure was carried out by TUS on 17 May 2010 (page 51/70 of Appendix 2) and the aliquots were stored in refrigerator FR016 inside the EPO room until the confirmation procedure was started on 20 May 2010. The remaining A sample was placed back in freezer CO010.
18. The confirmation procedure was carried out by Stefania Turi (TUS) in accordance with our internal procedure for the detection of recombinant erythropoietin and analogues between 20 and 22 May 2010 (page 6/70 and page 61/70 of Appendix 2). The worksheets recording the steps that were taken are set out at pages 52-61/70 of Appendix 2.
19. The results of the confirmation procedure are at pages 62-66/70 of Appendix 2. The initial evaluation of the results of the A sample confirmation was conducted by TUS who completed internal form FL158 (at page 1 of Appendix 3) and which was then reviewed in turn by me. My review of the electropherogram confirmed the absence of spots or smears that would invalidate

the analysis and the presence of 4 consecutive bands corresponding to those of CERA reference material; furthermore, the result of the stability test also showed that the urine was stable according again to the stability criteria of the WADA Technical Document TD2009EPO. I was happy in the circumstances following my review of the results to sign off on form FL039 (page 67/70) that the sample was positive for CERA in accordance with our internal criteria (matching the requirements of TD2009EPO).

20. In accordance with the WADA Technical Document TD2009EPO, before reporting the sample as an adverse analytical finding for CERA, we are required to seek a second opinion from one of the authors of the Technical Document. On this occasion, I asked Dr Françoise Lasne of the Paris WADA-accredited Laboratory, the person who developed the double blotting technique used in the IEF analysis and who had been responsible for validating the test for CERA for anti-doping purposes. I sent Dr Lasne the relevant information for her second opinion on 22 May 2010 (copy e-mail at page 1 of Appendix 4) including the raw, unprocessed images of both the screening and the confirmation analyses, the same images in inverted colours to make their visual identification easier and the corresponding GASepo files.

21. By letter to the Rome Laboratory dated 25 May 2010, Dr Lasne confirmed (at page 69/70 of Appendix 2) as follows:

"According to the files corresponding to sample 10E003A4433 (screening, confirmation and stability test) and WADA criteria from TD2009EPO, we conclude that this sample shows the presence of recombinant erythropoietin (pegylated Epoetin beta – MICERA)."

22. Having obtained Paris's second opinion confirming our own conclusions with respect to the sample, this was noted on page 68/70 of Appendix 2 and a test report notifying an adverse analytical finding for CERA was issued to the relevant testing authority, which in this case was the IAAF, on 26 May 2010 (page 70/70 of Appendix 2).

23. The Laboratory Documentation Package for the A sample analysis was prepared and then reviewed by Dr Xavier de la Torre on 10 June 2010 (page 1/70 of Appendix 2). The results of the initial screening analysis were included for completeness even though not required by WADA TD2009LDOC. I reviewed and approved the document in my capacity as Laboratory Director on the same day.

The analysis of the B sample

24. The B sample analysis started with the opening of the B sample at 9:00am on 14 June 2010 in the presence of the athlete, together with his scientific adviser, Professor Helge Oftebro and his coach, Mr Stephan Plätzer. A full list of the persons witnessing the B sample opening on 14 June 2010 is at page 13/79 of Appendix 5.
25. The sample opening form at page 14/79 of Appendix 5 records that the B sample bottle was intact, corresponded to the code identified on the athlete's doping control form and was properly closed. The form was signed by all parties present.
26. Before opening the B sample bottle, and while the sample was thawing, my deputy, Dr Xavier de la Torre and I spent a long time explaining to the athlete and his entourage the entire analytical procedure that had been carried out on the A sample and taking them through the full documentation package. We also explained to them the procedure that would be followed for the analysis of the B sample.
27. I recall in particular that Dr Oftebro asked me some specific questions at this time. He wanted to know why WADA-accredited laboratories were not using LC-MS/MS for confirmation of EPO cases and I explained to him that there was no internationally recognised, validated and WADA-approved method to detect EPO by LC-MS/MS. He also wanted to know why we had not performed SDS-PAGE analysis on the A sample to which I responded that SDS-PAGE analysis was not required under the WADA Technical Document when the IEF result was clear, as the A sample result had been in this case. Finally, he asked whether we were going to perform a steroid profile analysis on the B sample to confirm that the sample belonged to the athlete. I confirmed that a steroid profile analysis had been conducted on the A sample but that it did not form part of the EPO confirmation procedure and that, in my opinion, a steroid profile was not necessary to establish that it was the athlete's sample. I said this because all the chain of custody documentation confirmed the integrity of the sample code 3511158 (internal code A4433); furthermore, this was the only sample in the batch found to contain traces of dextran and the doping control form for sample code 3511158 was the only one from the batch which disclosed the administration of dextran-containing iron preparations. Dr Oftebro was apparently satisfied with my explanations but nevertheless requested both the steroid profile and the SDS-PAGE analyses to be carried out on the B sample.

28. I also recall having a conversation with the athlete and his trainer. The athlete's trainer raised some doubts about the actual flasks containing the athlete's urine. He claimed that, at the time of sample collection, the urine had been poured into A and B bottles and then in turn sealed in external plastic vessels, a yellow one and a green one. I realised that the athlete's trainer, who was supported in his comments by the athlete, must have been referring by this to an older version anti-doping kit manufactured by "Versapak" that had not been used in Italy for the last 5 years or more. Since the athlete and his trainer were insisting that the test would have to be considered invalid for this reason, I telephoned the headquarters of the Italian Doping Control Officers to know, without reference to the specific event in Sesto San Giovanni, whether Versapak kits were still being used in Italy. The person I spoke to, the coordinator of all Italian DCOs (Dr. Francesco Leonelli), confirmed to me that only Berlinger kits had been in use in Italy for several years. I asked Dr. Leonelli whether he was able to confirm this to me by email or fax and he agreed to do so if necessary. I explained the outcome of my conversation with Dr. Leonelli to the athlete and his trainer who decided that a Versapak kit must therefore have been used at a different event, not the "Città di Sesto" one. They agreed that a written declaration from Dr. Leonelli was not necessary.
29. The athlete's trainer made a further comment however that the B sample bottle presented to the athlete on 14 June 2010 was not in the same plastic bag as the athlete had left it in Sesto San Giovanni on 1 May 2010. I clearly explained to them that, upon arrival at the laboratory, the bottles are taken out of the transparent, plastic bags and placed in the refrigerator awaiting analysis. They appeared to accept this explanation.
30. I recall that Professor Oftebro also commented on the discrepancy between the specific gravity readings at the time of collection and at the laboratory. I explained that this was simply due to the fact that the laboratory uses an electronic device called a thermostated digital unit which is more precise an instrument than the measuring sticks that are used by doping control officers on site, whose only job it is to check that the specific gravity is higher than the minimum acceptable level, and, if not, initiate a procedure for the collection of a further sample. I also pointed out that the specific gravity of both the A and the B samples measured at the laboratory was a good match and, as far as I can recall, both the athlete and Professor Oftebro were satisfied with this explanation.

31. The athlete's final comments and requests were recorded in writing and included in the laboratory documentation package (at page 15/79 of Appendix 5).
32. The B sample bottle was identified with internal laboratory code 10E003 B4433 and visually inspected by Fabrizia Folchitto (FAF) (at page 22/79 of Appendix 5). As in the case of the A sample, the urine was recorded as bright yellow in colour and free of sediment. Again, no traces of blood were identified in the sample and noted as an "observation".
33. The B sample bottle was opened once thawed at 11:30am. After taking portions for the analysis, the re-sealing of the B sample with a new cap bearing code number 1000892 was witnessed by the athlete, Dr Oftebro and the athlete's trainer and the re-sealed B flask was returned to freezer CO010 (page 14/79 of Appendix 5).
34. TUS measured the pH and specific gravity values of sample B4433. The pH was recorded as 5.5 and the specific gravity as 1.009 which represented a good consistency with the earlier A sample readings of 5.0 and 1.010 respectively (page 24/79 of Appendix 5).
35. The B sample confirmation analysis was conducted by Stefania Turi (TUS) between 14 and 16 June 2010 in accordance with the Laboratory's internal procedure for the detection of recombinant erythropoietin and analogues. Details of the instruments and the instrumental conditions for the initial testing procedure are set out on pages 28-29/79 of Appendix 5 and the worksheets recording the various steps that were taken are recorded in the aliquot chain of custody documentation at pages 30-39/79 of Appendix 5.
36. The steroid profile analysis requested by Professor Oftebro was performed in parallel to the confirmation analysis on aliquots taken from both the A and the B sample bottles so as to be able to compare the results with those already obtained at the time of the original analysis of the A sample. The results are set out in Appendix 6 from which it can be seen that the three profiles are clearly overlapping (pages 4-6/6 of Appendix 6). This demonstrates not only that the A and B samples were from the same athlete, but also, by comparing the steroid profiles of the two A aliquots i.e., the one analyzed at the time of the first screening of the A sample and the one analyzed at the same time as the B sample analysis, that the storage of the A sample in the laboratory for a 45 day period between the two analyses had no effect on the steroid profile of the sample, thus confirming the proper storage and integrity of the sample.

37. The confirmation test results are set out at pages 40-44/70 of Appendix 5. Although lane 9, corresponding to sample B4433 (page 40/79) clearly showed bands in the CERA region and lane 11 showed that the urine was stable according to the criteria of the WADA TD2009, the signal for the positive reference sample containing CERA (lane 4) showed some spreading in the less acidic region, and the signal of the MirCERA[®] reference standard (lane 13) was relatively weak. (MirCERA[®] is the commercial name for CERA). We decided therefore in accordance with our internal procedures to repeat the analysis but also to seek Dr Lasne's second opinion on the results at the same time, which we did the same day.

38. I sent the raw data by e-mail to Dr Lasne on 16 June 2010 (page 3 of Appendix 4) in the presence of the athlete and Professor Oftebro. Although the results confirmed the presence of CERA, I also raised with Dr Lasne the possibility of a further analysis:

"Sample is on lane 9 and the stability test in lane 11. As you may see, the signal for the positive reference sample containing CERA (lane 4) shows some spreading of the signal in the less acidic region, while the signal of the MirCERA reference standard (lane 13) is relatively weak. We have another aliquot of retentate and may repeat the gel if necessary."

39. The SDS-PAGE analysis was concluded a day later on 17 June 2010 and the results are at pages 66-78/79 of Appendix 5). These results showed a signal in the CERA area matching the broader identification of SDS-PAGE for CERA but also demonstrated to my mind how much less specific and sensitive the SDS-PAGE analysis is when compared to the IEF technique. For completeness, I sent these SDS-PAGE results to Dr Lasne on the same day (page 4 of Appendix 4).

40. Dr Lasne replied to my e-mail on 17 June 2010 (page 6 of Appendix 4) confirming that, in her opinion, a further IEF analysis on the B sample should be performed:

"Dear Francesco

The presence of CERA in the sample is clear, both in the IEF and the SDS results, however, I think that, as you suggested, it would be better to perform another IEF analysis with the retentate due to the problems of CERA reference and positive control and due to the presence of some CERA bands in BRP-NESP on lane 14. Of course, the SDS analysis doesn't require to be performed again.

Best regards,
Françoise"

41. Following receipt of Dr Lasne's opinion, the conclusions from the B sample confirmation procedure were recorded at page 46/79 of Appendix 5: "Sample code 10E003 B4433 shows an IEF profile compatible with presence of CERA, but the WADA criteria for reference standards

were not completely fulfilled, so we decided, to perform a new IEF analysis". This was in full accordance with laboratory policy and WADA standards. I was ready to repeat the B sample analysis immediately but the athlete and his expert informed me that it was going to be impossible for them to stay any longer than they had originally planned. We therefore agreed to postpone the analysis to the earliest convenient date for them which was communicated to me only several days later and turned out to be 5 July 2010.

42. The second confirmation opening procedure took place at the Rome Laboratory on 5 July 2010 at 9:00am in the presence of the athlete and Professor Oftebro. A full list of persons attending at the opening is at page 16/79 of Appendix 5.
43. The sample opening form at page 17/79 of Appendix 5 records that the seal of the B sample bottle was intact, it corresponded to the re-sealed code 1000892 from the first B sample confirmation and was properly closed. The volume of urine was also confirmed to be sufficient for a re-analysis of the B sample. After a new aliquoting (page 19/79 of Appendix 5), the B sample was re-sealed with code number 1000878 and returned to refrigerator CO010 (page 17/79 of Appendix 5).
44. The B sample confirmation analysis was conducted by Stefania Turi (TUS) between 5 and 7 July 2010 in accordance with the Laboratory's internal procedure for the detection of recombinant erythropoietin and analogues. The corresponding worksheets are at pages 47-56/79 of Appendix 5.
45. The confirmation test results are set out at pages 57-62/79 of Appendix 5. The initial evaluation of the test results of the B sample confirmation, as for the A sample, was conducted by TUS (page 63/79 of Appendix 5) who again completed internal form FL158 (at page 2 of Appendix 3) to be then reviewed by me. As for the A sample, my review of the electropherogram confirmed the absence of spots or smears that would invalidate the analysis and also the presence of 4 consecutive bands corresponding to the CERA reference material; and, once more, the result of the stability test showed that the urine was stable according to the stability criteria of the WADA Technical Document TD2009EPO. Again, I was happy in the circumstances following such review to sign off on form FL039 on 7 July 2010 (page 63/79) that the sample was positive for CERA in accordance with our internal criteria.

46. I sent the raw data to Dr Lasne in Paris by e-mail on 7 July 2010 (page 7 of Appendix 4). On 8 July 2010, Dr Lasne provided her second opinion on the results of the second confirmation procedure as follows (page 65/79):

“According to the files to sample 10E003B4433 and WADA criteria from TD2009EPO, we conclude that this sample shows the presence of recombinant erythropoietin (pegylated Epoetin beta – MIRCERA).”

47. Upon receipt of Dr Lasne’s opinion, the conclusions of the B sample analysis were recorded at page 64/79 of Appendix 5 as follows:

“Data were evaluated according to the WADA Technical Document TD2009EPO.

The acceptability, identification and stability criteria defined in the WADA technical document TD2009EPO are fulfilled.

The second opinion of a different accredited anti-doping laboratory (AFLD Laboratory) confirmed our conclusions.

An adverse analytical finding for Continuous Erythropoietin Receptor Activator (CERA) was consequently reported for sample code 10E003 B4433”.

48. I did not refer to the SDS-PAGE results in my conclusions on page 64/79 of Appendix 5 because, although to my mind they confirmed the presence of CERA in the sample, they did not form any part of my analysis of the sample’s positivity under the WADA Technical Document. As I have already stated, we did not see the need to conduct an SDS-PAGE analysis at the time of the A sample and the SDS-PAGE analysis on the B sample was only carried out at the specific request of Professor Oftebro. The results were included in the Laboratory Documentation Package for the sake of completeness only.

49. I subsequently reported to the IAAF on 8 July 2010 that the analysis of the B sample had confirmed the presence of CERA (page 79/79 of Appendix 5).

50. The Laboratory Documentation Package for the complete B sample analysis was prepared and then reviewed by Dr Xavier de la Torre on 27 July 2010. I reviewed and approved the document in my capacity as Laboratory Director on the same date.

51. As part of the hearing process in Norway, I was asked to provide the athlete’s steroid profile, as had also been requested by Professor Oftebro at the time of the B-sample analysis. This I did and the results that I sent to Norway are attached at Appendix 6.

Response to the Panel's requests for further information

52. I am advised that the Panel has asked for further information from the Rome Laboratory in relation to three issues related to the analyses that we performed: (a) whether any other analyses were performed on the athlete's urine samples; (b) an explanation regarding the alleged "manipulation" of the GASepo Analysis Report; and (c) any documented evaluation of the "Acceptance Criteria".
53. In relation to (a), I have referred above to the IEF, SDS-PAGE (on the B sample only) and steroid profile analyses that we performed. We also performed on the A sample the usual range of analyses for stimulants, narcotics, anabolic steroids, diuretics and glucocorticosteroids (page 13/70 of Appendix 2) for which the sample was negative. Traces of the plasma volume expander dextran were found in the sample but not in sufficient quantities to be reported as an adverse analytical finding.
54. The only other procedure conducted on the sample was an internal test that we carry out routinely on samples that require the EPO/NESP/CERA analysis to be repeated and is done to estimate the protein concentration in the athlete's urine. It is a simple test in which a drop or two of urine retentate is applied to a test strip and the approximate protein concentration measured against a colorimetric scale. The test in this case was conducted by my colleague, Giorgia Corpetti, and her written statement sets out the details of what she did. As Ms Corpetti confirms, the estimated protein concentration in this case indicated that the protein concentration of the athlete's sample was increased but not so high that the analysis could not be repeated without modification to the usual procedure (which meant essentially that the amount of urine retentate to be loaded onto the IEF gel was the same as for the first IEF analysis of the A sample).
55. In relation to (b), it is normal practice to optimise the contrast in an image, in the same way as with a camera when working under natural light conditions. This is merely to aid the "visual" assessment of the results. It does not affect the GASepo report because the integration values of the single bands are not modified. As can be seen, the original raw images and data were all supplied to Dr. Lasne in unaltered form for the purposes of her conducting her own interpretation. Dr. Lasne reviewed the raw data and independently reached the same conclusions as we did. I am confident therefore that the results we obtained correctly identified the presence of CERA in the sample. In no way did I attempt to manipulate those results at any point.

56. In relation to (c), there is no specific requirement in the WADA TD2009EPO to document the evaluation of the acceptance criteria in any particular form. The evaluation that I made of the acceptance criteria and indeed the other criteria required by the WADA TD2009EPO is described above in paragraph 19 (A sample) and 45 (B sample) of this statement. The results of the evaluations conducted in both cases were recorded in the laboratory documentation packages (at page 68/70 of Appendix 2 and page 64/79 of Appendix 5).

Response to criticisms of the analytical process by the athlete's experts

57. I have been shown a copy of the athlete's Appeal Brief together with Exhibits in this matter and it has been brought to my attention that it contains a number of criticisms of my personal expertise as well as observations and criticisms of the analytical work that was conducted by the Rome Laboratory in relation to the athlete's sample. I will seek to respond to each of the criticisms made in turn:

58. Lack of competence to interpret analytical results: In the Appeal Brief, the athlete questions my competence to interpret CERA results both generally and in relation to the specific results in this case:

"8.3 The accredited doping laboratories probably have a great deal of experience in the analysis work itself despite the fact that the analytical results in this case do not indicate such and despite the fact that the Laboratory Director Francesco Botre told Mr Tysse, in connection with the analysis of the B-sample, that neither he nor his deputy could carry out the analysis process for the EPO test. However, in regard to the interpretation of the analysis results, the doping laboratory in Rome does not hold a corresponding level of competence. Laboratory Director Francesco Botre showed by his reaction during the preliminary negotiations in the NIF Tribunal that he had not registered that the bands, marked 2, in the samples from Erik Tysse in SDS page had moved further down in the lane than the standard in the CERA lanes, nos. 1 and 5".

.....

8.2 The poor professional quality [of the analytical work and its reporting] was confirmed by the witness statement given by Laboratory Director Francesco Botre. In his statement, Botre stated that he:

- A. Could not be 100% certain that CERA was present in Mr Tysse's sample
- B. Could not say with certainty that the substance that was found had passed through the body of Mr Tysse
- C. Could not confirm that the substance found was a synthetic substance.

Botre stated the test result was *suspicious*. The bands were in the CERA area. He believed therefore that the test was positive according to WADA's criteria in TD2009EPO".

59. In response to the passage at section 8.3 of the Appeal Brief, it is true that neither Dr de la Torre nor I are certified as one of the Rome Laboratory's 4 certified EPO analysts. However, both Dr de la Torre and I have senior qualifications under the certification system and it is not true to state that I do not have the expertise in reviewing and interpreting EPO results in accordance with the requirements of WADA TD2009EPO. As I have already indicated, the Rome Laboratory has analysed approximately 10,000 EPO samples, 7,000 of which were in the period from 2007-2010 and we have reported 33 adverse analytical findings, including 3 for CERA in urine. As Director of the Laboratory and the person responsible for reviewing all adverse findings before they are reported, it is clear that I have considerable expertise in this area. Moreover, as I have also already explained, one of the world's leading EPO experts, Dr Lasne, agreed with my interpretation that the sample in this case was positive for CERA.
60. In response to section 8.2 of the Appeal Brief, I would respond as follows: (A) my words have been misunderstood. The point I was making here is that the IEF test used for detecting EPO is different from a test based on mass spectrometry. The IEF test is a qualitative test based on electrical charges, the so-called electrophoretic moiety of different EPOs, and on the reactivity with specific anti-EPO antibodies. Mass spectrometry is capable of identifying the specific type and number of atoms in a molecule. I would have expected Dr Oftebro to have understood this distinction. I never suggested that the athlete's sample was not an adverse analytical finding since, in accordance with WADA TD2009EPO, CERA was identified in the sample; (B) again, my words have been misunderstood. My point was simply that not all prohibited substances are detected through the identification of a metabolite that has been produced by their "passage" through the human body, nor do they need to be. CERA is passed through the body but is not identified as a "metabolite"; (C) to describe the substance as synthetic is misleading. The term "synthetic" is normally reserved for substances that are distinctly chemically different from those produced naturally in the body. Apart from the naturally produced substances, there is a third category known as "biosynthetic" that consist of a modification of a naturally produced substance. Very often such substances have characteristics very similar to those that are naturally produced as well as some important differences. CERA fits into this category. The method used to detect CERA clearly distinguishes negative samples which contain only naturally produced

EPO; this picture is further confirmed by the fact that, out of more than 5000 urine sample analyzed for EPO by our lab since the CERA test was first introduced, no bands in the CERA region, like the ones obtained by the IEF analysis performed on the athlete's urine, have ever been detected in a negative sample, only in confirmed positive samples. Finally, my use of the word "suspicious" has been taken totally out of context here, since this is the wording I use after a sample gives a non-clearly-negative result following the initial testing (or screening analysis). Clearly, in no way can the word "suspicious" be used to indicate a result that, on its own, is sufficient for our laboratory to issue an adverse analytical finding.

61. Integrity of the chain of custody: Mr Stray-Gundersen in his statement raises an issue regarding the chain of custody of the samples. Namely, he comments (as Professor Oftebro did at the time of the B-sample analysis) that there is a significant difference between the specific gravity of the sample measured on site and then again at the laboratory. This, he suggests, raises the possibility that the samples were "tampered with and/or diluted".
62. I completely reject Mr Stray-Gundersen's comment for which there is no factual evidence whatsoever. To the contrary, the clear evidence is that the sample that was collected from the athlete in Sesto San Giovanni on 1 May 2010 was the same sample as was received the following morning in Rome. As I have explained above, the chain of custody of the athlete's sample is complete and confirms that the sample arrived at the Rome Laboratory with its integrity intact.
63. If any further evidence of this is required, I confirm that the analysis of sample A4433 revealed traces of the substance dextran and this is consistent with the disclosure of Cosmofer on the athlete's doping control form. Of the batch of samples received from the Coppa Città di Sesto event on 1 May 2010, only one athlete disclosed the use of Cosmofer and only sample A4433 was shown to contain traces of dextran.
64. As I have also explained above, the answer to the difference in measurement of specific gravity is that the Laboratory uses an electronic device called a refractometer (more specifically, a digital, thermostated and certified instrument) which is more precise than the measuring sticks that are used by doping control officers on site. The measurement of the specific gravity in the laboratory is required to be solid and reliable since it is used in the analytical process to adjust the measured concentration of endogenous substances prohibited by WADA, whereas the purpose of the measurement on site is simply to verify that the specific gravity is above the required minimum

level for the acceptability of a urine sample. It is important to note also in this regard that the specific gravity between the A and the B samples is a good match.

65. In conclusion, I have absolutely no doubts about the integrity of the chain of custody in this case.
66. A-sample analysis – should have been invalidated due to smears: Professors Osterud and Skotland argue that the A sample analysis should have been invalidated because of ‘lumps’ or ‘smears’ on the athlete’s lane (even on the GasEPO pictures).
67. I disagree. It is true that the initial screening analysis had to be repeated due to lateral drifts and diffusion of bands in several lanes, including the athlete’s lane. This variability occurs from time to time with the IEF process and the fact that any such results are rejected is, in my view, a testimony to the care taken by my laboratory to ensure reliable results. The initial screening results were nullified in accordance with the ISL. In all other IEF analyses, there were no “lumps” or “smears” in the athlete’s lane that could invalidate the analysis.
68. A sample analysis – both initial A and B sample analyses returned a negative result [5.2.1, page 6]: In the Appeal Brief, the athlete asserts that “both tests of the A and the B samples showed an initial “failed” (negative) analytical result” and that this demonstrates the poor reproducibility of the test method.
69. Again, I disagree that both initial A and B sample analyses returned a negative result. The first initial testing procedure clearly demonstrated the presence of CERA but the analysis did not fulfil the internal quality control due to the presence of drifting on several of the lanes and so we repeated the procedure in accordance with our internal procedures. As for the B sample analysis, as I have explained above, the initial B sample confirmation clearly confirmed the presence of CERA but the WADA criteria for the reference standards used were not completely fulfilled and so we decided to perform a new IEF analysis, again according to our internal procedures.
70. A sample analysis – breach for conducting the repeat initial testing from the retentate [10.1, page 20]: The athlete argues that the Rome Laboratory breached WADA standards by analysing the repeat initial testing of the A sample using the retentate of the first test. They say this is a breach of section 5.2.4.3.1.4 of the International Standard and that, as a consequence, the analysis should have been nullified.

71. In my opinion, the athlete misinterprets the International Standard. Section 5.2.4.3.1.4 of the Standard, by which any re-analysis must be conducted using a new aliquot of the sample, is relevant only for confirmation analyses. There is no such provision in section 5.2.4.2 which governs the procedure for conducting the initial testing procedure. In any case, analysis of a second aliquot of retentate is not, in my opinion, a “re-analysis” but to be considered as the “re-injection” of an aliquot in a chromatographic-spectrometric technique. The main difference is that a re-injection in a chromatographic-spectrometric technique takes a few minutes to be completed whereas a re-analysis for EPO by IEF takes a couple of days.
72. A sample – analysis shows that the urine sample was destroyed during storage: Professors Osterud and Skotland suggest that the athlete’s urine sample was “destroyed during storage” and that the “confirmation analyses of both the A sample and the B sample are performed on such modified/destroyed samples”. They point to the fact that bands of endogenous EPO could be seen in the first initial A testing procedure but only faintly in the subsequent analyses. Equally, for the SDS-PAGE analysis, they state that the apparent lack of EPO at the same band as the standard EPO confirms that the “endogenous EPO in T’s urines have been modified”.
73. Once again, I disagree with the view that the athlete’s urine sample was destroyed. Consider first the A sample analysis. Apart from the very first analysis of the A sample, whose lateral drift as I have said, reduces the reliability of the integration values, the following IEF analyses show a decrease in the intensity of the signal of both the CERA and the endogenous EPO bands compared with those from the reference standards. However, this trend does not interfere with the correct evaluation of the gel, which confirmed, by the analysis of the IEF profile, that the WADA criteria to report an adverse analytical finding for CERA were still clearly met. It should be noted that the B sample was frozen upon receipt at the Laboratory and kept frozen until the B sample analysis and re-analysis were conducted so that it is unlikely that it could be “destroyed”. As for the results of the SDS-PAGE analysis, since this method is far less specific and sensitive than the IEF analysis, it does not add any further evidence to this matter, and no meaningful comparison is possible in any case since SDS-PAGE analysis was not carried out on the A sample. Finally, the result of the stability test shows that the urine was not “active” according to the definition reported in the WADA TD 2009 EPO and that the position of the bands in the IEF gel could not have been affected by urine instability.


74. A sample – breach for failing to report the tests results within 10 days: The athlete states that, since the Rome Laboratory failed to report the test results within 10 days, this “invalidates” the results.
75. Again, the athlete has misinterpreted the International Standard. The Standard states that “reporting of A sample results *should* occur within ten (10) working days of receipt of the sample. It is not mandatory therefore to report within 10 days but only a recommendation. Some analyses such as EPO take substantially longer than others to perform and, in my experience, it is very rare to report such analyses within the specified 10 day period.
76. B sample – the second B sample confirmation was negative according to the WADA Technical Document: Professors Osterud and Skotland claim that the B sample confirmation should have been declared negative for CERA because the pattern in the athlete’s sample is different to that of the CERA standard and therefore breached section 3.1.2 of the WADA Technical Document.
77. The precise matching of the CERA bands with the reference standard is not as critical for CERA as it is for other non-endogenous erythropoietins (e.g. alpha-epoietin) since the IEF mobility of CERA and of endogenous EPO is very different and there is no overlap between CERA and the endogenous bands. This is specifically reflected in the fact that, in the WADA Technical Document TD 2009EPO, the CERA bands are not uniquely identified, as is the case for NESP bands (A, B, C,...), endogenous bands (alpha, beta, gamma...) and rhEPO bands (1, 2, 3...): the difference is that, while NESP and rhEPO bands may overlap with endogenous bands, CERA bands never do. In the case of a confirmation analysis for rhEPO, the exact position of the bands is adjusted by correcting the run of the single lanes against a marker (methyl red) which allows correction of any lane-to-lane variability of the migration times. Such an adjustment is not necessary at all in the case of bands migrating to the CERA region, since, as I have said above, there is no possibility of misidentifying a band in the CERA region (a “totally positive” region) with a band in the endogenous (and therefore non-positive) region.
78. B sample – SDS-PAGE analysis shows no CERA band: Professors Osterud and Skotland assert that the SDS-PAGE results show no CERA band since the “very weak band labelled 2 moves longer than CERA and has mobility similar to the very weak band observed in the Photo-shop modified picture”.

79. Contrary to what is claimed by the athlete's experts, I maintain that the weak band labelled 2 does confirm a CERA band in the SDS-PAGE results. The uncertainty in the position of the bands in a SDS-PAGE analysis for EPOs is higher than it is in an IEF analysis. This is why, according to the WADA Technical Document, IEF, and not SDS-PAGE, is the reference technique for EPOs and why I do not believe in the diagnostic power of SDS-PAGE for EPOs. I did not initiate this analysis on the A sample and I would not have gone ahead with the analysis on the B sample if it had not been for the specific request to do so from Professor Oftebro (page 15/79 of Appendix 2).
80. Storage and handling of samples: The athlete criticises the storage and handling of his sample at the Rome Laboratory pointing to the absence of chain of custody, the fact that the samples were kept at room temperature and that the air conditioning in the laboratory was set at 26 degrees. In particular, he claims that aliquots taken for analysis were left at room temperature for several days before being analysed (e.g., the aliquot for the initial testing was taken on 3 May and the analysis did not start until 7 May and for the A sample confirmation was taken on 17 May and the analysis did not start until 20 May). He claims that inadequate storage conditions at the Laboratory led to instability of the sample which affected the results, notably, in the fact that there was only very faint endogenous EPO in all but the first analysis.
81. I totally disagree with this criticism. As my statement shows, the chain of custody of the sample is intact and no sample or aliquot was stored at room temperature for any period of time. The stability tests conducted on the A and B samples show that the urine was stable at all times and, even if there were issues relating to storage, which is not the case, this could not have affected the results. Furthermore, it has to be kept in mind that, if degradation of a sample occurs, all EPOs degrade and not only the endogenous ones. Finally, and in any case, should any significant change have been occurring, and, again, this is not the case, this would have affected the A sample only, since the B sample was kept frozen immediately after receipt up to the start of the B analysis.
82. Failure to document: The athlete suggests that the Rome Laboratory failed to provide documentation in respect of the procedures followed and notably any evaluation of the acceptance criteria.
83. I disagree. As I have explained above, the A and B sample Laboratory Documentation Packages contain full details of the analytical method involved, the worksheets completed and all results of the analyses undertaken, including a record of which personnel did what. As the evidence shows,

the documentation and reporting are fully in accordance with the WADA International Standard for Laboratories, and the WADA Technical Documents on EPO (TD2009EPO), on the Laboratory Internal Chain of Custody (TD2009LCOC) and on the Laboratory Documentation Package (TD2009LDOC).

84. No second opinion: The athlete asserts that WADA's regulations in relation to second opinions are inadequate and that, in order to give her second opinion, Dr Lasne should have been required to carry out a completely new analysis in the second opinion provider's own laboratory".
85. As is clearly shown by the email exchange between our laboratory and Dr. Lasne, we supplied her with all necessary documents, both for the A and the B analyses: (a) original, unprocessed, raw images, in .tiff format of the IEF analyses, also in inverted colours; and (b) the full GASepo files of the same IEF analyses, built up on the raw images. In addition to the above, we also sent to Dr. Lasne the two sets of samples (raw images and GASepo file) of the SDS-PAGE analysis of the B sample. This was the entirety of the data that our Laboratory used to make its assessment in the case and, in my opinion, is in full agreement with the WADA rules. The WADA rules do not require a completely new analysis to be performed in the second opinion provider's own laboratory.
86. Self-interest in the outcome of the analysis: The athlete asserts that the Rome Laboratory had a self-interest in upholding a positive analysis in his case and that I gave a TV interview after the hearing confirming this. They say that an analytical result from a doping laboratory that has a self-interest in its outcome has no value.
87. I do not understand the basis for this comment because I have never given a TV interview in relation to this case. I do recall however that the athlete and his expert at the B sample analysis asked me whether I had an interest in confirming the A sample result. I replied that my only interest is to ensure that I (and the laboratory that I direct) work in accordance with the WADA rules and that I can defend the credibility of our work and the solidity of the results that we issue, regardless of whether they are negative or positive.

I confirm that the contents of this statement are true and correct to the best of my knowledge.



Professor Francesco Botrè

Date: June 23rd 2011

APPENDIX 1

Francesco Botrè
CURRICULUM VITAE

Date: June 15th 2011

1. BIOGRAPHICAL:

NAME:

Francesco Botrè

PLACE AND DATE OF BIRTH:

Rome, Italy, September 7th 1962

NATIONALITY:

Italian

HOME ADDRESS:

Via Emanuele Filiberto 190, 00185 Roma RM - Italy.

Phone: +39-06-77205652 Mobile: +39-348-6002219 Fax: +39-06-23310228

e-mail: francesco.botre@uniroma1.it

PRESENT POSITIONS AND ADDRESS:

Professor at the "Sapienza" University of Rome, Italy, teaching at the School of Medicine and Pharmacy ("Advanced Methods for Drug and Metabolite Analysis" and "Analysis of Biopharmaceuticals") and at the Post-Degree Specialization Schools in Pharmacology and in Sport Medicine

Phone: +39-06-49766217 (direct); +39-06-49766311 (Dept. Secretariat)

Fax: +39-06-4456651

Scientific Director of the "Laboratorio Antidoping FMSI" (the Italian Anti-Doping Laboratory, WADA and ISO17025 accredited) Largo Giulio Onesti 1, 00197 Rome RM - Italy

Phone: +39-06-36859604 (direct); +39-06-36859600 (Lab Secretariat)

Fax: +39-06-8078971

2. EDUCATION:

2.1. SCHOOL AND UNIVERSITY EDUCATION:

1981: "Maturità Classica", Liceo Classico Statale "Socrate" - Rome, Italy. (Final mark: 60/60).

1986: Degree in Chemistry ("Laurea in Chimica"), University "La Sapienza", Rome, Italy; dissertation thesis in Pharmaceutical Chemistry (Final mark: 110/110 cum laude).

1986: National Professional Certificate ("Esame di Stato") of the Italian Board of Chemists.

- 1987:** Degree in Pharmaceutical Sciences ("Laurea in Farmacia") University "La Sapienza", Rome, Italy; dissertation thesis in Applied Biochemistry (Final mark: 110/110 cum laude).
- 1987:** National Professional Certificate ("Esame di Stato") of the Italian Board of Pharmacists.
- 1989:** Post-Degree Specialization School in Experimental Pharmacology ("Diploma di Specializzazione Post-Laurea in Farmacologia Sperimentale"), University of Milan, Italy; dissertation thesis in Respiratory Physiology (Final mark: 70/70 cum laude).

2.2. FURTHER PROFESSIONAL QUALIFICATIONS:

- 1981:** Professional certificate of swimming instructor, issued by the Italian Federation of Swimming (F.I.N.) of the Italian National Olympic Committee (C.O.N.I.), followed by various, periodical courses on training techniques.
- 1981:** Participation to the "Hewlett-Packard Italia" training course on computer programming and analytical instruments interfacing.
- 1991:** Participation to the 10th Italian School of the National Group of Cybernetic and Biophysics of the C.N.R. (Italian National Research Council) on *Layers, Interfaces and Biological Membranes (Strati, Interfacce e Membrane Biologiche)*, held in Portonovo (Ancona, Italy), September 16-21.
- 2001:** Certificate of Quality Systems Inspector, according to the ISO 17025.

2.3. MILITARY SERVICE:

- 1987:** Admitted, after a National Contest, as First-Lieutenant in permanent service of the Air Force Corps of Chemists ("Genio Aeronautico, ruolo Chimici") of the Italian Air Force ("Aeronautica Militare Italiana"). Resigned in 1991 with the rank of Captain.
- 1988:** (January-June) Participation to the Annual Course for First- and Second-Lieutenants in permanent service of the Italian Air Force, held at the Italian School of Air Force, Florence, Italy.

2.4. MEMBERSHIPS:

- Ordine dei Chimici (Italian Board of Chemists) (1987-present)
- Ordine dei Farmacisti (Italian Board of Pharmacists) (1988-present)
- New York Academy of Sciences (NYAS) (1993-present)
- European Society of Toxicology In Vitro (ESTIV) (1996-present)
- World Association of Anti-Doping Scientists (2001-present)
- American Society of Mass Spectrometry (2009-present)
- British Pharmacological Society (2009-present)
- American Chemical Society (2010-present)

3. PROFESSIONAL CURRICULUM:

3.1. WORK EXPERIENCES:

1984-1985 (TOTAL OF 6 MONTHS):

Chemist at the "Department of Pharmaceuticals" of the Smith, Kline & French (now Smith, Kline & Beecham), Philadelphia, Pennsylvania (USA). (Supervisor: Dr. Robin Roman).

1987 (TOTAL OF 6 MONTHS):

Researcher at the Immunochemistry Department of Fidia SpA, Fidia Research Laboratories, Abano Terme, Padova, Italy (Supervisor: Dr. Lanfranco Callegaro).

January 1988 - August 1990:

Head of the Corrosion Laboratory at the Central Chemistry Department of Italian Air Force, Air base of Pratica di Mare, Pomezia, Rome, Italy.

August 1990 - June 1991:

Head of the Metallography Laboratory at the Central Chemistry Department of Italian Air Force, Air base of Pratica di Mare, Pomezia, Rome, Italy.

July 1991 - present:

Professor at the University "La Sapienza" of Rome, Dipartimento per le Tecnologie, le Risorse e lo Sviluppo.

1993-1994:

Visiting Scholar at the Department of Physiology of the University of Pennsylvania School of Medicine, Philadelphia (PA), USA.

January 2004 – March 2006:

Scientific Director "Pro-Tempore" of the Italian Anti-Doping Laboratory in its temporary, Olympic location, at the Azienda Ospedaliera "San Luigi Gonzaga" in Orbassano (Torino), responsible for the anti-doping analysis for the "Torino 2006" Winter Olympic and Paralympic Games.

November 1998 - present:

Scientific Director of the Italian Anti-Doping Laboratory, Largo Giulio Onesti 1, 00197 Rome RM – Italy, presently accredited by the World Anti-Doping Agency and ISO 17025. International expert participating to the scientific activities of other WADA-accredited laboratories on the occasion of major international sport events, e.g. Commonwealth Games (2002 and 2010), Asian Games (2006), Mediterranean Games (2005, as member of the International Committee for the Mediterranean Games Medical Commission), Summer Olympic Games (2004 and 2008), Winter Olympic Games (2010, as member of the International Olympic Committee Medical Commission Games Group).

3.2. COMMITTEE RESPONSIBILITIES:

1988-1991:

Permanent member of working groups of the Italian Air Force, investigating on the causes of flight accidents, malfunctioning and failures, involving either civil and/or military aircrafts.

1990-1994:

Permanent member of the Commission, of the Italian Normative Agency, for the Classification of Titanium and Titanium Alloys (commissione UNI "Titanio e sue leghe"), from the constitution of the Commission to the end of its activities.

1996-1998:

Permanent member of the Anti-Doping Investigation Office ("Procura Antidoping") of the Italian Olympic Committee, from the constitution of the Office to the appointment of Scientific Director of the Anti-doping laboratory of Rome.

2000-2006:

Member of the Scientific Anti-Doping Commission of the Italian National Olympic Committee.

2001-2004:

Member of the Italian Working Group of the European Union Project "CAFDIS" (Concerted Action in the Fight against Doping In Sport), in charge for the technical and procedural aspects of scientific research.

2002-2003:

Member of the Italian Working Group for the International Project "CAMAD" ("Collaborazione atlantico-mediterranea anti-doping", Atlantic-Mediterranean Anti-Doping Cooperation).

2007-2008:

Member of the Laboratory Working Group of the World Anti-Doping Agency.

2009-2010:

Member of the International Olympic Committee Medical Commission Games Group.

2001-present:

Member (Fellow since 2002) of the World Association of Anti-Doping Scientists (WAADS); President for the 2006-2008 term.

2002-present:

Technical Expert – in the field of pharmacology and toxicology – for several penal cases discussed at the Tribunals of Rome, Torino, Brescia, Sulmona, Napoli and Alessandria.

2002-present:

Member of the Medical Commission of the International Committee for the Mediterranean Games (C.I.J.M.).

2003-present:

Permanent member of the Scientific Committee of the International Academy of Environmental Studies (IAES).

2009-present:

Member of the Virtual Interdisciplinary Advisory Group on Mass Gathering of the World Health Organization.

2010-present:

Member of the Italian Ministry of Instruction, University and Research Panel of Experts for the evaluation of national and international scientific research projects.

4. SCIENTIFIC RESEARCH INTERESTS:

4.1. MAIN FIELDS OF SCIENTIFIC RESEARCH (1983-2008):

- A. Study of the direct and indirect effects of biologically active substances (drugs and metabolites, toxicants, food and environmental contaminants) and development of instrumental analytical methods for their identification and determination.
- B. Development of new electrochemical sensors, microsensors, biosensors and microbiosensors and their application in biomedical pharmacology, clinical chemistry, environmental monitoring and food analysis.
- C. Biophysico-chemical characterization of membrane transport processes, for the study (both *in vitro* and *in vivo*) of ionic and gaseous exchange processes, focusing on the role played by the carbonic anhydrase (E.C. 4.2.1.1.) family of isoenzymes.
- D. Development of physico-chemical model systems, based on irreversible thermodynamics theories, and their application to physiological, pharmacological and toxicological processes.

4.2. SCIENTIFIC AWARDS:

- 1988:** Award of the Cenci-Bolognetti Foundation ("Fondazione Cenci-Bolognetti"), Rome, Italy, for the best dissertation thesis in Pharmaceutical Sciences of the Academic Year 1986-1987. .
- 1993:** Award of the Italian National Research Council for the visiting scholarship at the University of Pennsylvania (Philadelphia, PA, USA).
- 2000:** Award of the Center for the Alternatives to Animal Testing (CAAT) - John Hopkins University (Baltimore, MD, USA), with a Research Grant for a 3-year research program (US\$ 14000 per year) for the development of alternative analytical methods for the control of algal toxins.
- 2006:** Award ("Leonardo d'Oro") of the Italian Sport Medicine Federation (Federazione Medico-Sportiva Italiana, FMSI) for the scientific activity in the fight against doping in sport.

5. EDITORIAL ACTIVITY:

Member of the Editorial Board of several scientific journals ("Drugs Under Experimental and Clinical Research", "Italian Journal of Sport Medicine", "Medicina dello Sport", "International Journal of Ecodynamics", "International Journal of Environmental Health", the last as "Associate Editor") and for the series "Recent Advances in oping Analysis" (publishing yearly the Proceedings of the Manfred Donike Workshop).

Scientific Reviewer for other scientific journals (including "Analytica Chimica Acta", "Analytical and Bioanalytical Chemistry", "Analytical Chemistry", "Biosensors & Bioelectronics", "Chemical Engineering Science", "Clinical Chemistry", "Clinical Chemistry and Laboratory Medicine", "Environmental Pollution", "Environmental Toxicology and Chemistry", "Gut", "Journal of the American Society for Mass Spectrometry", "Journal of Analytical Toxicology", "Journal of the Brazilian Chemical Society", "Journal of Cellular and Molecular Medicine", "Journal of Chromatography A", "Journal of Chromatography B", "Journal of Mass Spectrometry", "Journal of Separation Science", "Pancreas", "Rapid Communications in Mass Spectrometry", "Steroids", "Talanta", "Trends in Biotechnology").

Guest Editor for special issues of the journals "International Journal of Environment and Pollution" and "International Journal of Risk Assessment and Management".

Dr. Francesco Botrè – Bibliography

Original research articles and reviews.

- 1) Botrè, F.; D'Ascenzo, E.; Lucarini, C.; Memoli, A.; Bianchi, R. "A New Approach to Study Oscillating Chemical Reactions". *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 11: 89-95 (1983)
- 2) Botrè, C.; Botrè, F.; Jommi, G.; Signorini, R. "Synthesis and Inhibitory Activity on Carbonic Anhydrase of Some New Sulpiride Analogues Studied by Means of a New Method". *J. Med. Chem.*, 29: 1814-1820 (1986)
- 3) Botrè, C.; Botrè, F. "La termodinamica dei processi irreversibili in ecologia e tossicologia". *Chimica Oggi*, 9-16, (Luglio-Agosto 1987)
- 4) Botrè, C.; Botrè, F. "Rischi derivanti dall'alterazione dei ritmi naturali: inquinamento e cancro". III Convegno ANDNI Roma, 10-12 Dicembre 1986.
- 5) Botrè, F.; Pecori-Giraldi, J. "Gli inibitori dell'anidrasi carbonica nella terapia del glaucoma: nuovi composti e nuovo metodo di analisi" *Bollettino di Oculistica*, 67: 135-169 (1988)
- 6) Botrè, C.; Botrè, F. "Farmacologia, tossicologia ed ecologia: le nuove frontiere della termodinamica irreversibile". *La Chimica e l'Industria*, 70: 2-12 (1988)
- 7) Botrè, C.; Scibona, G.; Botrè, F.; Modica, G.; Giuffrè, L. "Membrane Processes. Evaluation of Lij Coefficient". *Gazz. Chim. It.*, 119: 353-355 (1989)
- 8) Scibona, G.; Botrè, F.; Botrè, C.; Fabiani, C.; Croce, F. "Streaming Potential Across Nafion Membranes" *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.*, 93: 764-765 (1989)
- 9) Scibona, G.; Radatti, N.; Botrè, C.; Botrè, F.; Gavelli, G. "Electrolyte and Water Osmotic Flow Coefficients in Nafion Membranes". *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.*, 93: 766-770 (1989)
- 10) Botrè, C.; Botrè, F. "Carbonic Anhydrase and Urease: an Investigation "in vitro" on the Possibility of a Synergic Action". *Biochim. Biophys. Acta*, 997: 111-114 (1989)
- 11) Botrè, C.; Botrè, F.; Fortunato, C.; Campanella, L.; Mazzei, F. "Carbonic Anhydrase Facilitated CO₂ Diffusion Studied by Means of an Ammonia Sensing Urease Electrode". *Anal. Lett.*, 22: 2413-2421 (1989)
- 12) Botrè, C.; Botrè, F. "Determination of Carbonic Anhydrase Activity by a pCO₂ Sensor" *Anal. Biochem.*, 185: 254-265 (1990)
- 13) Botrè, C.; Botrè, F.; Fortunato, C.; Campanella, L.; Mazzei, F. "On the Influence of Carbonic Anhydrase Facilitated CO₂ Diffusion on the *Saccharomyces Cerevisiae* Respiration" *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 23: 361-364 (1990)
- 14) Scibona, G.; Botrè, C.; Botrè, F.; Fabiani, C. "The Thermoelectric Potential of Liquid Anion Exchange Membrane". *Gazz. Chim. It.*, 120: 453-456 (1990)
- 15) Botrè, C.; Botrè, F.; Rosati, C. "Anidrasi Carbonica e Glaucoma: Nuovi Inibitori analoghi della Sulpiride come Possibili Agenti Antiipertensivi Topici". *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Science*, 17: 169-177 (1990)
- 16) Botrè, F. "Operating Behaviour of Aeronautic Titanium Components" *Proceedings of the VI International Meeting on Titanium and its Alloys*. Torino, Italy, November 23 1990.
- 17) Scibona, G.; Botrè, C.; Botrè, F.; Fabiani, C. "Nafion Membrane Potential in Non Isothermal Systems". *Electrochimica Acta*, 36: 135-138 (1991)
- 18) Scibona, G.; Botrè, C.; Botrè, F.; Gavelli, G. "Electrokinetic Effects Across Nafion 120 Membranes". *Electrochimica Acta*, 36: 139-141 (1991)

- 19) Maccotta, A.; Scibona, G.; Valensin, G.; Gaggelli, E.; Botrè, F.; Botrè, C. "Nuclear Magnetic Resonance Investigations of Calcium-Antagonist Drugs. Part 2. Conformational and Dynamic Features of Verapamil in [2H₆] DMSO". *J. Pharm. Sci.*, 80: 586-589 (1991)
- 20) Botrè, C.; Botrè, F.; Pranzoni, C. "A Potentiometric Approach to the Study of the Antagonism between Acetazolamide and L-Carnitine Congeners on Carbonic Anhydrase Activity". *Electroanalysis*, 3: 567-572 (1991)
- 21) Botrè, C.; Botrè, F.; Lorenti, G.; Pranzoni, C.; Scibona, G. "Interactions between Calcium Entry Blocker Drugs and Carbonic Anhydrase" *Arzneim. Forschung*, 41: 891-894 (1991)
- 22) Botrè, F.; Botrè, C. "Physiologic Implications of Carbonic Anhydrase Facilitated CO₂ Diffusion: Coupling to Other Metabolic Processes" in: "Carbonic Anhydrase: from Biochemistry and Genetics to Physiology and Clinical Medicine" (F. Botrè, G. Gros and B. T. Storey, Eds.) VCH, Weinheim, 1991, pp. 309-321.
- 23) Botrè, C.; Botrè, F.; Greco, A.; Mazzei, F. "A Potentiometric Ion Selective Bicarbonate Electrode Based on a Liquid Exchanger Membrane" in: "Carbonic Anhydrase: from Biochemistry and Genetics to Physiology and Clinical Medicine" (F. Botrè, G. Gros and B. T. Storey, Eds.) VCH, Weinheim, 1991, pp. 322-326.
- 24) Stacchini, P.; Baldini, M.; Botrè, F.; Zanasi, F. "Studio sul Ruolo di Nitriti e Nitrati sulla Formazione di Nitrosammine nei Prodotti Carnei". *Riv. Soc. It. Sci. Alim.*, 20: 187-193 (1991)
- 25) Botrè, C.; Botrè, F.; Lanzi, M.; Lorenti, G.; Mazzei, F. "Plant Tissue Electrode for the Determination of Catechol". *Anal. Chim. Acta*, 255: 59-62 (1991)
- 26) Botrè, C.; Botrè, F.; Galli, M.; Lorenti, G.; Mazzei, F.; Porcelli, F. "Determination of Glutamic Acid Decarboxylase Activity and Inhibition by an H₂O₂-Sensing Glutamic Acid Oxidase Biosensor" *Anal. Biochem.*, 201: 227-232 (1992)
- 27) Mazzei, F.; Botrè, F.; Lanzi, M.; Lorenti, G.; Porcelli, F.; Botrè, C. "Plant Metabolism as an Analytical Tool: Some Applications of Plant Tissue Electrodes for the Determination of Catecholamines". *Sensors and Actuators B* 7: 427-430 (1992)
- 28) Botrè, F.; Botrè, C.; Mazzei, F. "Carbonic Anhydrase, CO₂ Transport and GABA Homeostasis: an "in vitro" Model". *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 27: 487-494 (1992)
- 29) Botrè, F.; Botrè, C. "Electrochemistry of Enzyme Sensors and their Use in Life Sciences" in: "Trends in Electrochemical Biosensors" (G. Costa and S. Miertus, Eds.), World Scientific Publishing Co. PTE Ltd, Singapore, 1992, pp. 107-125.
- 30) Mazzei, F.; Botrè, C.; Lorenti, G.; Botrè, F.; Porcelli, F.; Scibona, G. "Influence of the Enzymatic Membrane on the Analytical Performance of Amperometric Glutamic Acid Biosensors" in: "Trends in Electrochemical Biosensors" (G. Costa and S. Miertus, Eds.), World Scientific Publishing Co. PTE Ltd, Singapore, 1992, pp. 163-170.
- 31) Lorenti, G.; Mazzei, F.; Polati, P.; Porcelli, F.; Botrè, F.; Vinci, G. "Plant Tissue Electrode for the Determination of Ascorbic Acid" in: "Trends in Electrochemical Biosensors" (G. Costa and S. Miertus, Eds.), World Scientific Publishing Co. PTE Ltd, Singapore, 1992, pp. 171-179.
- 32) Botrè, C.; Botrè, F.; Canofeni, S.; Lorenti, G.; Mazzei, F.; Pilloton, R.; Pizzichini, M. "Whole Plant Tissue Bioreactor for the Enzymatic Degradation of Mono and Polyphenols" in: "Trends in Ecological Physical Chemistry" (L. Bonati, U. Cosentino, M. Lasagni, G. Moro, D. Pitea and A. Schiraldi, Eds.), Elsevier, Amsterdam, London, New York, Tokio, 1993, pp. 223-232.
- 33) Botrè, F.; Pecci, G. "Alcune considerazioni sullo smaltimento dei rifiuti solidi". *Rass. Chim.* 45: 177-182 (1993).
- 34) Botrè, F.; Botrè, C.; Lorenti, G.; Mazzei, F.; Porcelli, F.; Scibona, G. "Plant Tissue Biosensors for the Determination of Biogenic Diamines and of their Amino Acid Precursors: Effect of Carbonic Anhydrase". *Sensors and Actuators B* 15-16: 135-140 (1993)

- 35) Botrè, F.; Botrè, C.; Lorenti, G.; Mazzei, F.; Porcelli, F.; Scibona, G.**"Determination of L-Glutamate and L-Glutamine in Pharmaceutical Formulations by Amperometric L-Glutamate Oxidase Based Enzyme Sensors". *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* 11: 679-686 (1993)
- 36) Botrè, F.; Botrè, C.**"The Carbonic Anhydrases: Are these Enzymes Still a Good Deal for a Pharmacologist?". *Current Topics in Med. Chem.*, 1: 313-347 (1993)
- 37) Botrè, F.**"Ricerca e Sviluppo, Regolamentazione e Libera Circolazione nel Sistema Farmaceutico Europeo" in:"Libera Circolazione e Qualità dei Prodotti nel Mercato Unico Europeo. Atti del XV Congresso di Merceologia, Roma, 24-26 settembre 1992" (F. Botrè e E. Iannucci, Eds.), Edizioni Kappa, Roma, Vol. I, 1994, pp. 299-311.
- 38) Botrè, F.; Lorenti, G.; Mazzei, F.**"I Tessuti Vegetali Interi: Nuovi Materiali Biocatalitici per la Realizzazione di Biosensori e Bioreattori" in:"Libera Circolazione e Qualità dei Prodotti nel Mercato Unico Europeo. Atti del XV Congresso di Merceologia, Roma, 24-26 settembre 1992" (F. Botrè e E. Iannucci, Eds.), Edizioni Kappa, Roma, Vol. II, 1994, pp. 1113-1125.
- 39) Botrè, F.; Pecci, G.**"Suono e rumore nell'ambiente: problemi connessi con lo sviluppo urbano ed industriale". *Rass. Chim.* 46: 13-20 (1994).
- 40) Botrè, F.; Botrè, C.; Greco, A.; Data, P. G.; Di Giulio, C.; Morelli, L.**"Potentiometric Determination of Carbonic Anhydrase Activity in Rabbit Carotid Bodies: Comparison among Normoxic, Hyperoxic and Hypoxic Animals". *Neurosci. Lett.*, 166: 126-130 (1994)
- 41) Botrè, F.; Lorenti, G.; Mazzei, F.; Simonetti, G.; Porcelli, F.; Botrè, C.; Scibona, G.**"Cholinesterase Based Bioreactor for the Determination of Pesticides". *Sensors and Actuators B*, 18-19: 689-693 (1994)
- 42) Mazzei, F.; Botrè, F.; Lorenti, G.; Mele, G.; Vinci, G.; Botrè, C.**"Plant Tissue Electrodes: "Partially Disposable" Biosensors for the Determination of Nutrients and Toxicants in Food". *Life Chemistry Reports*, 11: 385-390 (1994)
- 43) Botrè, C.; Botrè, F.; Mazzei, F.**"Biosensori ed anticorpi catalitici: nuove strategie di analisi e di intervento nello studio delle tossicodipendenze" In: *L'approccio integrato della moderna biologia: uomo, territorio, ambiente. Ordine Nazionale dei Biologi - European Communities Biologists Association*, Roma, 1994, pp. 114-139.
- 44) Ruggieri, G.; Botrè, F.; Caparrelli, C.; Mele, G.; Vinci, G.**"Biosensori in merceologia: situazione attuale e prospettive future" In: *"Innovazioni tecnologiche, Qualità e Ambiente". Atti del XVI Congresso di Merceologia, Pavia, 1-3 settembre 1994, Pragma (Pavia), vol. II, 1994, pp.165-172.*
- 45) Botrè, F.; Fonseca, G.**"La valutazione quantitativa delle caratteristiche organolettiche degli alimenti: sensori e biosensori olfattivi per l'analisi degli odori" In: *"Innovazioni tecnologiche, Qualità e Ambiente". Atti del XVI Congresso di Merceologia, Pavia, 1-3 settembre 1994, Pragma (Pavia), vol. II, 1994, pp.278-285.*
- 46) Botrè, F.; Lorenti, G.; Mele, G.; Mazzei, F.; Vinci, G.; Ruggieri, G.**"Bioelettrodi accoppiati a bioreattori a tessuto vegetale intero: nuovi sistemi bioanalitici per il rilevamento in continuo di pesticidi ed erbicidi nelle acque" In: *"Innovazioni tecnologiche, Qualità e Ambiente". Atti del XVI Congresso di Merceologia, Pavia, 1-3 settembre 1994, Pragma (Pavia), vol. II, 1994, pp.286-293.*
- 47) Vinci, G.; Antonelli, M. L.; Botrè, F.; Mele, G.; Ruggieri, G.**"Determinazione dell'attività catalitica delle amilasi mediante cromatografia liquida HPLC: confronto con altri metodi di indagine" In: *"Innovazioni tecnologiche, Qualità e Ambiente". Atti del XVI Congresso di Merceologia, Pavia, 1-3 settembre 1994, Pragma (Pavia), vol. II, 1994, pp.521-528.*
- 48) Mokashi, A.; Ray, D.; Botrè, F.; Katayama, M.; Osanai, S.; Lahiri, S.**"Effect of Hypoxia on Intracellular pH of Glomus Cells Cultured from Cat and Rat Carotid Bodies". *J. Appl. Physiol.*, 78: 1875-1881 (1995)
- 49) Vinci, G.; Botrè, F.; Mele, G.; Ruggieri, G.**"Ascorbic Acid in Exotic Fruits: A Liquid Chromatographic Investigation". *Food Chemistry*, 53: 211-214 (1995).
- 50) Bartuli, C.; Botrè, F.; Spirito, E.; Valente, M.**"Il ruolo dell'amianto nell'industria moderna: motivi e scelte per la sua sostituzione". *Rass. Chim.* 47: 59-73 (1995).

- 51) Ruggieri, G.; Botrè, F.; D'Alessandro, M. C.; Mele, G.; Vinci, G.**"Determinazione di Ammine Biogeniche per la Valutazione della Freschezza delle Carni: Confronto tra una Tecnica Cromatografica HPLC ed una Bioelettrochimica" in: Atti del 2° Congresso Nazionale di Chimica degli Alimenti, Giardini Naxos, 24-27 maggio 1995, La Grafica Editoriale, Messina, vol. II, 1995, pp. 1095-1100.
- 52) Mazzei, F.; Azzoni, A.; Cavalieri, B.; Botrè, F.; Botrè, C.**"Un nuovo bioelettrodo per la determinazione rapida di D(-)-L(+) lattato in matrici alimentari diverse" in: Atti del 2° Congresso Nazionale di Chimica degli Alimenti, Giardini Naxos, 24-27 maggio 1995, La Grafica Editoriale, Messina, vol. III, 1995, pp. 173-183.
- 53) Mazzei, F.; Botrè, F.; Lorenti, G.; Simonetti, G.; Porcelli, F.; Scibona, G.; Botrè, C.**"Plant Tissue Electrode for the Determination of Atrazine". *Anal. Chim. Acta*, 316: 79-82 (1995).
- 54) Mazzei, F.; Azzoni, A.; Cavalieri, B.; Botrè, F.; Botrè, C.**"A Multi-Enzyme Bioelectrode for the Rapid Determination of Total Lactate Concentration in Tomato Juice and Tomato Paste " *Food Chemistry*, 55: 413-418 (1996).
- 55) Botrè, F.** "Panorama rifiuti: rischio esplosione nel trattamento". *GEA Gestione ed Economia dell'Ambiente*, 9 (2): 16-23 (1996).
- 56) Porcelli, F.; Scibona, G.; Botrè, F.; Lorenti, G.; Mazzei, F.; Botrè, C.**"A Kinetic Analysis of γ -Aminobutyrate Aminotransferase in Presence and Absence of Inhibitors". *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.*, 100: 671-679 (1996).
- 57) Lahiri, S.; Iturriaga, R.; Mokashi, A.; Botrè, F.; Chugh, D.; Osanai, S.**"Adaptation to Hypercapnia Versus Intracellular pH in Cat Carotid Body: Responses In Vitro". *J. Appl. Physiol.*, 80: 1090-1099 (1996).
- 58) Mazzei, F.; Botrè, F.; Lorenti, G.; Porcelli, F.**"Peroxidase-based Amperometric Biosensors for the Determination of γ -Aminobutyric Acid". *Anal. Chim. Acta*, 328: 41-46 (1996).
- 59) Botrè, F.; Mazzei, F.; Stacchini, A.**"Determinazioni di tossine algali in alimenti di natura ittica: bioelettrodi ad inibizione per la misura dell'acido okadaico" In: "Merci e cicli produttivi nel settore agroindustriale alle soglie del 21° secolo". Atti del XVII Congresso di Merceologia, Lecce, 3-5 ottobre 1996, vol. I, pp. 618-623.
- 60) Botrè, F.; Briganti, S.; Mazzei, F.**"Bioelettrodi selettivi ad L-lisina per la valutazione rapida del danno da trattamenti termici negli alimenti" In: "Merci e cicli produttivi nel settore agroindustriale alle soglie del 21° secolo". Atti del XVII Congresso di Merceologia, Lecce, 3-5 ottobre 1996, vol. I, pp. 624-629.
- 61) Botrè, F.; Chiaramonti, S.; Conti, M. E.; Mazzei, F.; Corazzi, L.**"Uno studio bioelettrochimico sulla variazione nel tempo del contenuto in acido L-ascorbico nel frutto feijoa sellowiana" In: "Merci e cicli produttivi nel settore agroindustriale alle soglie del 21° secolo". Atti del XVII Congresso di Merceologia, Lecce, 3-5 ottobre 1996, vol. I, pp. 630-635.
- 62) Mazzei, F.; Botrè, F.; Conti, M. E.; Mele, G.**"Biosensori elettrochimici in serie per la determinazione contemporanea e on line di indici di qualità in campioni di vino" In: "Merci e cicli produttivi nel settore agroindustriale alle soglie del 21° secolo". Atti del XVII Congresso di Merceologia, Lecce, 3-5 ottobre 1996, vol. I, 1996, pp. 703-707.
- 63) Conti, M. E.; Botrè, F.; Mazzei, F.**"On the Heavy Metals Content in Cosmetic Formulations: An Atomic Absorption Spectroscopy Investigation" *J. Appl. Cosmetology*, 14: 147-154 (1996).
- 64) Mazzei, F.; Botrè, F.; Botrè, C.** "Acid Phosphatase/Glucose Oxidase Based Biosensors for the Determination of Pesticides". *Anal. Chim. Acta*, 336: 67-71 (1996).
- 65) Botrè, F.; Mazzei, F.; Botrè, C.**"Inquinamento di falde acquifere da acque di vegetazione: un approccio biochimico alla decontaminazione". *Sanità rapporti*, 1: 25-38 (1996).
- 66) Botrè, F.; Mazzei, F.; Botrè, C.**"Biosensori e bioreattori a tessuto vegetale intero per il controllo delle contaminazioni alimentari ed ambientali" Atti del Congresso Europeo "La ricerca ed il controllo chimico quale contributo alla lotta alle frodi nell'Unione Europea", Venezia, 6-8 Novembre 1996, pp. 145-153.

- 67) Mazzei, F.; Botrè, F.; Botrè, C.; Stacchini, A.I.**"Detection of Poisoning Algal Toxins in Seafood: "Inhibition" Bioelectrodes for the Determination of Okadaic Acid". Proceedings of the International Symposium on Environmental Pollution and Impact Assessment, Mohammedia (Marocco), 9-11 Ottobre 1996, p.257-270.
- 68) Conti, M. E.; Botrè, F.**"The Content of Heavy Metals in Food Packaging Paper: An Atomic Absorption Spectroscopy Investigation". Food Control, 8: 131-136 (1997).
- 69) Bartuli, C.; Botrè, C.; Botrè, F.; Pecci, G.**"Atmospheric Pollution Originating from the Interaction of Different Gaseous Effluents". J. Environm. Pathol. Toxicol. Oncol., 16: 245-252 (1997).
- 70) Botrè, F.; Chiacchierini, E.**"Innovazione tecnologica e organizzazione della produzione in attività di acquacoltura. 1. L'allevamento di prodotti di alta qualità" In: "Qualità verso il 2000. Contributi dalle Scienze Merceologiche". Atti del XVIII Congresso di Merceologia, Verona, 1-3 ottobre 1998, vol. III, pp. 101-108.
- 71) Botrè, F.; Chiacchierini, E.**"Innovazione tecnologica e organizzazione della produzione in attività di acquacoltura. 2. Verso l'ottimizzazione delle risorse naturali" In: "Qualità verso il 2000. Contributi dalle Scienze Merceologiche". Atti del XVIII Congresso di Merceologia, Verona, 1-3 ottobre 1998, vol. III, pp. 109-117.
- 72) Botrè, F.**"Classi di sostanze e metodi doping: schede riassuntive" In: "Il CONI contro il doping" Comitato Olimpico Nazionale Italiano, Roma, 1999, pp. 29-47.
- 73) Botrè, F.**"Il destino del campione nel controllo antidoping: dal campionamento alla comunicazione dei risultati" In: "Il CONI contro il doping" Comitato Olimpico Nazionale Italiano, Roma, 1999, pp. 48-56.
- 74) Botrè, F.; Mazzei, F.**"Interactions between Carbonic Anhydrase and some Decarboxylating Enzymes as Studied by a New Bioelectrochemical Approach " Bioelectrochem. Bioenerg., 48: 463-467 (1999).
- 75) Botrè, F.; Buiarelli, F.; Mazzei, F.**"Electrochemical Sensors and Biosensors for the Detection of Doping Substances and Methods" In: "Proceedings of the Second Workshop on Chemical Sensors and Biosensors" (F. Mazzei and R. Pilloton, Eds.) ENEA, ISDN 88-8286-072-8, Roma, 2000, pp. 77-88.
- 76) Mazzei, F.; Botrè, F.** "Inhibition Based Biosensors: Environmental Applications" In: "Proceedings of the Second Workshop on Chemical Sensors and Biosensors" (F. Mazzei and R. Pilloton, Eds.) ENEA, ISDN 88-8286-072-8, Roma, 2000, pp. 151-170.
- 77) Amendola, L.; Molaioni, F.; Botrè, F.**"Detection of Beta-Blockers in Human Urine by GC-MS-MS-El: Perspectives for the Antidoping Control". J. Pharmaceut. Biomed. Anal., 23: 211-221 (2000).
- 78) Botrè, F.; Mazzei, F.**"Inhibition Enzymatic Biosensors: An Alternative to Global Toxicity Bioassays for the Rapid Determination of Phycotoxins". Int. J. Environ. Pollut., 13: 173-189 (2000).
- 79) Botrè, F.; Strano Rossi, S.; Chiarotti, M.**"L'analisi dei capelli nei controlli antidoping: potenzialità e prospettive". Med. Sport, 53: 75-81 (2000).
- 80) Botrè, F.; Conti, M. E.**"Inquinamento Indoor: aspetti sanitari e socioeconomici" In: "La sfida per il terzo millennio: tecnologia, innovazione, qualità e ambiente". Atti del XIX Congresso Nazionale di Merceologia, Sassari, 27-29 settembre 2000, vol. II, pp. 76-85
- 81) Botrè, F.; Botrè, C.; Podestà, E.**"Tossine come armi biologiche: aspetti tossicologici e potenziali rischi per la salute pubblica". Biologi Italiani., 30: 19-26 (2000).
- 82) Botrè, C.; Botrè, F.; Mazzei, F.; Podestà, E.**"Inhibition Based Biosensors for the Detection of Environmental Contaminants: Direct Determination of 2,4 Dichloro Phenoxyacetic Acid". Environ. Toxicol. Chem., 19: 2876-2881 (2000).
- 83) Pecori-Giraldi, J.; Botrè, F.; Mazzarino, M.; Rossi, F.; Paone, E.**"Detection of Dorzolamide and of N-Desethyl-Dorzolamide in Urine Following Topical Administration in Glaucoma Patients" Boll. Ocul., 79: 325-331 (2000).

- 84) Conti, M.E.; Facchini, M.; Botrè, F.** "Indicadores biológicos para la evaluación de metales pesados en un ecosistema marino del Mediterraneo" *Acta Toxicol. Argentina*, **8**: 65-68 (2000).
- 85) Botrè, F.; Botrè, C.** "I gas nervini: aspetti tossicologici e potenziali rischi per la salute" *Ambiente, Risorse e Salute*, **20-1**: 37-43 (2001).
- 86) Conti, M. E.; Botrè, F.** "Honey Bees and Their Products as Potential Bioindicators of Heavy Metals Contamination". *Environ. Monit. Assess.*, **69**: 267-282 (2001).
- 87) Croci, L.; Stacchini, P.; Cozzi, L.; Ciccaglioni, G.; Mazzei, F.; Botrè, F.; Toti, L.** "Evaluation of Rapid Methods for the Determination of Okadaic Acid in Mussels". *J. Appl. Microbiol.*, **90**: 73-77 (2001).
- 88) Botrè, F.; Botrè, C.** "L'uranio impoverito". *Ambiente, Risorse e Salute*, **20-2**: 40-43 (2001).
- 89) Botrè, F.; Tranquilli, C.** "Uso e diffusione degli integratori in Italia: opinioni a confronto". *Med. Sport*, **54**: 263-274 (2001).
- 90) Scibona, G.; Botrè, F.; Botrè, C.; Porcelli, F.** "The Rate of Entropy Change: Gravitational Effects". *J. Non-Equilib. Thermodyn.*, **26**: 1-11 (2001).
- 91) Buiarelli, F.; Cartoni, G.P.; Amendola, L.; Botrè, F.** "Screening and Confirmation Analysis of Anabolic Agents in Human Urine by Gas Chromatography-Hybrid Mass Spectrometry (High Resolution – Time of Flight)" *Anal. Chim. Acta*, **447**: 75-88 (2001).
- 92) Botrè, F.; Podestà, E.; Silvestrini, B.; Botrè, C.** "Toxicity Testing in Environmental Monitoring: The Role of Enzymatic Biosensors". *Ann. Ist. Super. Sanita*, **37**: 607-613 (2001).
- 93) Botrè, F.; Mazzarino, M.; Podestà, E.; Rossi, F.; Mazzei, F.** "Is there a Place for Electroanalysis in the Antidoping Laboratory?" in: W. Schänzer, H. Geyer, A. Gotzman, U. Mareck-Engelke (Eds.) *Recent Advances in Doping Analysis (9) Sport & Buch Strauß, Köln, 2001*, pp. 223-227.
- 94) Botrè, F.; Amendola, L.; Mazzarino, M.; Molaioni, F.; Neri, B. Rossi, F.; De Feo, G.** "One Year of Nandrolone at the Antidoping Laboratory of Rome" in: W. Schänzer, H. Geyer, A. Gotzman, U. Mareck-Engelke (Eds.) *Recent Advances in Doping Analysis (9) Sport & Buch Strauß, Köln, 2001*, pp. 265-268.
- 95) Mazzarino, M.; Botrè, F.; Rossi, F.; Paone, E.; Pecori-Giraldi, J.** "Lack of Increased Diuresis after Topical Administration of the Carbonic Anhydrase Inhibitor Dorzolamide". in: W. Schänzer, H. Geyer, A. Gotzman, U. Mareck-Engelke (Eds.) *Recent Advances in Doping Analysis (9) Sport & Buch Strauß, Köln, 2001*, pp. 269-273.
- 96) Amendola, L.; Colamonicì, C.; Rossi, F.; Botrè, F.** "Determination of Clenbuterol in Human Urine by GC-MS-MS-MS: A Confirmation Analysis in Antidoping Control". *J. Chromatogr. B*, **773**: 7-16 (2002).
- 97) Amendola, L.; Botrè, F.; Carollo, A. S.; Longo, D.; Zoccolillo, L.** "Analysis of Organophosphorous Pesticides by Gas Chromatography – Mass Spectrometry with Negative Chemical Ionization: A Study on the Ionization Condition". *Anal. Chim. Acta.*, **461**: 97-108 (2002).
- 98) Botrè, F.** "Il Laboratorio Antidoping del CIO di Roma" in: *Attività fisico-sportiva: aspetti fisiopatologici* Associazione Nazionale Specialisti in Medicina dello Sport dell'Università "G. D'Annunzio", Avellino, pp. 128-138
- 99) Botrè, C.; Botrè, F.; Mazzei, F.; Montilla, S.; Podestà, E.; Scibona, G.** "Some Considerations on the Kinetics of Pathogenic Prions Formation". *Ann. Ist. Super. Sanita*, **38**: 195-198 (2002).
- 100) Botrè, F.** "Doping e antidoping fra passato e futuro: dalla frode sportiva al rischio tossicologico" in: *Patologia cerebrale, patologia del rachide cervicale e dorsale, sport terapia e idoneità agonistica nelle patologie croniche, la medicina dello sport nel terzo millennio*, Istituto di Medicina dello Sport - FMSI di Torino, Associazioni Medico Sportive del Piemonte, Torino, Novembre 2002, pp. 197-210
- 101) Amendola, L.; Colamonicì, C.; Garribba, F.; Botrè, F.** "Microwave-assisted Derivatization: Application to the Analysis of Diuretics and Corticosteroids" in: W. Schänzer, H. Geyer, A. Gotzman,

U. Mareck-Engelke (Eds.) Recent Advances in Doping Analysis (10) Sport & Buch Strauß, Köln, 2002, pp. 223-227.

102) Longo, D.; Colamonici, C.; Molaioni, F.; Botrè, F. "Synephrine (Oxedrine): Analytical and Pharmacokinetic Issues" in: W. Schänzer, H. Geyer, A. Gotzman, U. Mareck-Engelke (Eds.) Recent Advances in Doping Analysis (10) Sport & Buch Strauß, Köln, 2002, pp. 223-227.

103) Amendola, L.; Colamonici, C.; Mazzarino, M.; Botrè, F. "Rapid Determination of Diuretics in Human Urine by Gas Chromatography – Mass Spectrometry Following Microwave Assisted Derivatization" *Anal. Chim. Acta*, **475**: 125-136 (2003).

104) Botrè, F.; Botrè, C.; Podestà, E.; Podda, M.; Invernizzi, P. "The Effect of Anti-Carbonic Anhydrase Antibodies on Carbonic Anhydrases I and II". *Clin. Chem.*, **49**: 1221-1223 (2003)

105) Amendola, L.; Garribba, F.; Botrè, F. "Determination of Endogenous and Synthetic Glucocorticoids in Human Urine by Gas Chromatography – Mass Spectrometry Following Microwave Assisted Derivatization". *Anal. Chim. Acta*, **489**: 233-243 (2003).

106) Botrè, F. "Drugs of Abuse and Abuse of Drugs in Sportsmen: The Role of In Vitro Methods to Study Effect and Mechanism". *Toxicol. In Vitro*, **17**: 509-513 (2003).

107) Botrè, F. "Il ruolo del laboratorio nella lotta al doping" in: T. Fanfani, F. Ghelli (Eds.) Con il calcio contro il doping. Evidenze scientifiche e strategie di intervento nella lotta contro il doping in Italia. Quaderni della Fondazione Piaggio, nuova serie, II 2003, "Le Regole dell'Etica", Periodici Le Monnier, Firenze, 2003, pp. 114-129.

108) Botrè, C.; Botrè, F. "Alcune considerazioni sui pericoli associati all'impiego del gallio e dei suoi sali". *Biologi Italiani*, **34**: 17-22 (2004).

109) Mazzarino, M.; Botrè, F. "La lotta al doping da steroidi anabolizzanti: il ruolo del laboratorio antidoping". In: G.P. Palombo, G. Buonfiglio (Eds.) Progressi in Medicina dello Sport, I.N.C. Innovation-News-Communication, Roma, 2004, pp. 53-55.

110) Botrè, F.; Pezzano, A. "Il controllo antidoping fra passato e futuro: il ruolo della Federazione Medico Sportiva Italiana" *Med. Sport*, **57**: 95-97 (2004).

111) Botrè, C.; Botrè, F. "Hormesis e Prudent avoidance: alcune considerazioni in merito al problema dei campi elettromagnetici". *Biologi Italiani*, **34** (6): 6-8 (2004).

112) Mazzei, F.; Botrè, F.; Montilla, S.; Pilloton, R.; Podestà, E.; Botrè, C. "Alkaline Phosphatase Inhibition Based Electrochemical Sensors for the Detection of Pesticides". *J. Electroanal. Chem.*, **574**: 95-100 (2004).

113) Botrè, F.; Amendola, L.; Borrelli, R.; Colamonici, C.; Garribba, F. "The Effect of the WADA List on the Activity of the Antidoping Laboratories: Reconsidering the "Traditional" Organization of the GC-MS Screenings". in: W. Schänzer, H. Geyer, A. Gotzman, U. Mareck (Eds.) Recent Advances in Doping Analysis (12) Sport & Buch Strauß, Köln, 2004, 15-25.

114) Mazzarino, M.; Rossi, F.; Botrè, F. "Effect of the Systemic vs. Inhalatory Administration of Synthetic Glucocorticoids on the Urinary Steroid Profile". in: W. Schänzer, H. Geyer, A. Gotzman, U. Mareck (Eds.) Recent Advances in Doping Analysis (12) Sport & Buch Strauß, Köln, 2004, 45-54.

115) Strano Rossi, S.; Molaioni, F.; Botrè, F. "Application of Solid Phase Microextraction for the Determination of Stimulants, Narcotics and other Doping Agents Excreted Free in Urine" in: W. Schänzer, H. Geyer, A. Gotzman, U. Mareck (Eds.) Recent Advances in Doping Analysis (12) Sport & Buch Strauß, Köln, 2004, 335-339.

116) Mazzarino, M.; Longo, D.; Rossi, F.; Botrè, F. "Perspectives of Capillary Electrophoresis Using Dynamic Capillary Coating for Routine Screening Procedures in Antidoping Analysis" in: W. Schänzer, H. Geyer, A. Gotzman, U. Mareck (Eds.) Recent Advances in Doping Analysis (12) Sport & Buch Strauß, Köln, 2004, 377-381.

117) Rossi, F.; Mazzarino, M.; Braganò, M.C.; Botrè, F. "Effect of Amino Acid Supplementation on the Urinary Steroid Profile Concentrations". in: W. Schänzer, H. Geyer, A. Gotzman, U. Mareck (Eds.) Recent Advances in Doping Analysis (12) Sport & Buch Strauß, Köln, 2004, 433-438.

- 118) Strano Rossi, S.; Molaioni, F.; Botrè, F.** "Application of Solid-Phase Microextraction to Antidoping Analysis: Determination of Stimulants, Narcotics and Other Classes of Substances Excreted Free in Urine" *J. Anal. Toxicol.*, **29**: 217-222 (2005).
- 119) Caprino, L.; Braganò, M. C.; Botrè, F.** "Gli integratori fitoterapici nello sport: uso ed abuso" *Ann. Ist. Super. Sanita*, **41**: 35-38 (2005).
- 120) Botrè, F.; Botrè, C.** "Campi elettromagnetici e loro interazione con sistemi biologici". In: S. Dumontet, E. Landi, F. Pastoni (Eds.) *Professione Biologo: aspetti attuali e prospettive future. Atti del XVII Congresso Internazionale Ordine Nazionale dei Biologi - European Communities Biologists Association*, Roma, 2005, 175-215.
- 121) Strano Rossi, S.; Molaioni, F.; Rossi, F.; Botrè, F.** "Rapid screening of drugs of abuse and their metabolites by gas chromatography/mass spectrometry: application to urinalysis" *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **19**: 1529-1535 (2005).
- 122) Spirito, E.; Botrè, F.** "The role of measurement uncertainty in doping analysis" *Int. J. Risk Assessment and Management*, **5**: 374-386 (2005).
- 123) Botrè, F.; Borrelli, R.; Colamonici, C.; Garribba, F.; Mazzarino, M.; Rossi, F.** "Optimizing the Cost/Benefit Ratio of the Laboratory Procedures: A Way to Match the WADA Requirements (with the Help of Microwaves)" in: W. Schänzer, H. Geyer, A. Gotzman, U. Mareck (Eds.) *Recent Advances in Doping Analysis (13) Sportverlag Strauß, Köln*, 2005, 11-20.
- 124) Molaioni, F.; Abate, M. G.; Alocci, R.; Mazzarino, M.; Rossi, F.; Botrè, F.** "Urine Stability, Steroid Profile and T/E Ratio: Towards and Index of Sample Degradation". in: W. Schänzer, H. Geyer, A. Gotzman, U. Mareck (Eds.) *Recent Advances in Doping Analysis (13) Sportverlag Strauß, Köln*, 2005, 179-188.
- 125) Mazzarino, M.; Braganò, M. C.; Donati, F.; Botrè, F.** "The Effect of the Oral Administration of Propyphenazone on the Urinary Concentration of Testosterone and 19-Nortestosterone Metabolites" in: W. Schänzer, H. Geyer, A. Gotzman, U. Mareck (Eds.) *Recent Advances in Doping Analysis (13) Sportverlag Strauß, Köln*, 2005, 189-198.
- 126) Garribba, F.; Mazzarino, M.; Rossi, F.; Botrè, F.** "Recovery of Polar and Non Polar Substances from the Ultrafiltrate Fraction of the EPO Aliquot" in: W. Schänzer, H. Geyer, A. Gotzman, U. Mareck (Eds.) *Recent Advances in Doping Analysis (13) Sportverlag Strauß, Köln*, 2005, 399-402.
- 127) Mazzarino, M.; Braganò, M. C.; Garribba, F.; Rossi, F.; Botrè, F.** "The Idea of a Threshold Value for Synthetic Glucocorticoids: Urinary Excretion Studies Following Different Routes of Administration". in: W. Schänzer, H. Geyer, A. Gotzman, U. Mareck (Eds.) *Recent Advances in Doping Analysis (13) Sportverlag Strauß, Köln*, 2005, 465-468.
- 128) Mazzarino, M.; Rossi, F.; Giacomelli, L.; Botrè, F.** "Effect of the Systemic Versus Inhalatory Administration of Synthetic Glucocorticoids on the Urinary Steroid Profile as Studied by Gas Chromatography-Mass Spectrometry" *Anal. Chim. Acta*, **559**: 30-36 (2006).
- 129) Botrè, C.; Botrè, F.** "L'Età della CO₂, Risorse Energetiche da Combustibili Fossili: Implicazioni Ecotossicologiche" In: *Ambiente, Biotecnologie, Biologia Clinica. Realtà di una Professione* (S. Dumontet, E. Landi, F. Pastoni, Eds.). *Ordine Nazionale dei Biologi - Portorose (Slovenia)*, 2006, pp. 209-222.
- 130) Mazzarino, M.; Botrè, F.** "A fast liquid chromatographic/mass spectrometric screening method for the simultaneous detection of synthetic glucocorticoids, some stimulants, anti-oestrogen drugs and synthetic anabolic steroids". *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **20**: 3465-3476 (2006).
- 131) Morra, V.; Davit, P.; Capra, P.; Vincenti, M.; Di Stilo, A.; Botrè, F.** "Fast gas chromatographic/mass spectrometric determination of diuretics and masking agents in human urine. Development and validation of a productive screening protocol for antidoping analysis". *J. Chrom. A*, **1135**: 219-229 (2006).
- 132) Mazzarino, M.; Braganò, M.C.; Botrè, F.** "An LC/MS-MS Screening Method for Synthetic Glucocorticoids Based on Pharmacological Structure-Activity Relationships". in: W. Schänzer, H.

Geyer, A. Gotzman, U. Mareck (Eds.) Recent Advances in Doping Analysis (14) Sportverlag Strauß, Köln, 2006, 17-25.

133) Mazzarino, M.; Molaioni, F.; Riggi, S.; Rossi, F.; Botrè, F. "Speeding Up the Rate of Antidoping Analysis: Some Perspectives on the Use of Microwave assisted Extraction and Fast Chromatography". in: W. Schänzer, H. Geyer, A. Gotzman, U. Mareck (Eds.) Recent Advances in Doping Analysis (14) Sportverlag Strauß, Köln, 2006, 55-64.

134) Strano Rossi, S.; Colamonici, C.; Botrè, F. "Detection of Sibutramine Administration: A Gas Chromatography/Mass Spectrometry Study of the Main Urinary Metabolites". Rapid Commun. Mass Spectrom., **21**: 79-88 (2007).

135) D'Ascenzo, S.; Millimaggia, D.; Di Massimo, C.; Sacconi-Jotti, G.; Botrè, F.; Carta, G.; Tozzi, M.G.; Pavan, A.; Dolo, V. "Detrimental Effects of Anabolic Steroids on Human Endothelial Cells". Toxicol. Lett., **169**: 129-136 (2007).

136) Pino, A.; Alimonti, A.; Botrè, F.; Minoia, C.; Bocca, B.; Conti, M.E. "Determination of Twenty-five Elements in Lichens by Sector Field Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry and Microwave Assisted Acid Digestion". Rapid Commun. Mass Spectrom., **21**: 1900-1906 (2007).

137) Botrè, F. "I controlli antidoping nel terzo millennio: mai più sostanze 'invisibili'?" Med. Sport, **60**: 119-131 (2007).

138) Mazzei, F.; Botrè, F. "Enzymatic Inhibition-Based Electrochemical Biosensors: General Aspects and Applications for the Monitoring of Aquatic Ecosystems". Int. J. Environment and Health, **1**: 185-198 (2007).

139) Mazzarino, M.; Oreggia, M.; Botrè, F. "Application of fast GC/MS for the rapid screening of synthetic anabolic steroids and narcotics in anti-doping analysis". Rapid Commun. Mass Spectrom., **21**: 4117-4124 (2007).

140) Mazzei, F.; Favero, G.; Botrè, F. "Peroxidase Based Biosensors for the Selective Determination of D,L-Lactic Acid and L-Malic Acid in Wines". Microchem. J., **87**: 81-86 (2007).

141) Mazzarino, M.; Botrè, F. "How Safe Are Our Internal Procedures? Some Preliminary Experimental Evidence on the Problem of "lab-oriented" Potential Masking Agents". in: W. Schänzer, H. Geyer, A. Gotzman, U. Mareck (Eds.) Recent Advances in Doping Analysis (15) Sportverlag Strauß, Köln, 2007, 49-58.

142) Strano Rossi, S.; Colamonici, C.; Botrè, F. "Parallel Analysis of Stimulants in Saliva and Urine by Gas Chromatography - Mass Spectrometry: Perspectives for "In Competition" Antidoping Analysis". Anal. Chim. Acta, **606**: 217-222 (2008).

143) Mazzarino, M.; Turi, S.; Botrè, F. "A Screening Method for the Detection of Synthetic Glucocorticoids in Human Urine by Liquid Chromatography - Mass Spectrometry Based on Class Characteristic Fragmentation Pathways". Anal. Bioanal. Chem., **390**: 1389-1402 (2008).

144) Botrè, F.; Pavan, A. "Enhancement drugs and the athlete". Neurol. Clin., **26**: 149-167 (2008).

144a) Botrè, F.; Pavan, A. "Enhancement drugs and the athlete". Phys Med Rehabil Clin N Am. **20**: 133-148 (2009).

145) Mazzarino, M.; Fiacco, I.; de la Torre, X.; Botrè, F. "A Mass Spectrometric Approach for the Study of the Metabolism of Clomiphene, Tamoxifen and Toremifene by liquid Chromatography Time-of-Flight Spectroscopy". Eur. J. Mass Spectrom., **14**: 171-180 (2008).

146) Botrè, F. "New and old challenges of sports drug testing". J. Mass Spectrom., **43**: 903-907 (2008).

147) Mazzarino, M.; de la Torre, X.; Botrè, F. "A screening method for the simultaneous detection of glucocorticoids, diuretics, stimulants, anti-oestrogens, beta-adrenergic drugs and anabolic steroids in human urine by LC-ESI-MS/MS". Anal. Bioanal. Chem., **392**: 681-698 (2008).

149) Mazzarino, M.; Braganò, M. C.; Turi, S.; Botrè, F. "LC-ESI/MS-MS Screening Method for Simultaneous Detection in Human Urine of Glucocorticoids, Diuretics, some Stimulants, some Beta-2-

Agonists, some Beta-Blockers, Anti-Oestrogens and New Designer Steroids". in: W. Schänzer, H. Geyer, A. Gotzman, U. Mareck (Eds.) *Recent Advances in Doping Analysis* (16) Sportverlag Strauß, Köln, 2008, 313-316.

150) Mazzarino, M.; Botrè, F. "Fast Screening for the Detection of HES and Dextran" in: W. Schänzer, H. Geyer, A. Gotzman, U. Mareck (Eds.) *Recent Advances in Doping Analysis* (16) Sportverlag Strauß, Köln, 2008, 329-332.

151) Donati, F.; Botrè, F. "Using Advia 120 Hematological Analyzer as a Fast Screening Method for HBOCs Detection in Human Whole Blood". in: W. Schänzer, H. Geyer, A. Gotzman, U. Mareck (Eds.) *Recent Advances in Doping Analysis* (16) Sportverlag Strauß, Köln, 2008, 363-366.

152) Botrè, F. "Mass spectrometry and illicit drug testing: analytical challenges of the antidoping laboratories". *Expert Rev. Proteomics*, **5**: 535-539 (2008).

153) Mazzei, F.; Botrè, F.; Favero, G.; Podestà, E.; Botrè, C. "Partially disposable biosensors for the quick assessment of damage in foodstuff after thermal treatment" *Microchemical Journal* **91**: 209-213 (2009)

154) Conti, M.E.; Pino, A.; Botrè, F.; Bocca, B.; Alimenti, A. "Lichen *Usnea barbata* as biomonitor of airborne elements deposition in the Province of Tierra del Fuego (southern Patagonia, Argentina)". *Ecotoxicol Environ Saf.*, **72**: 1082-1089 (2009).

155) Di Luigi, L.; Sgrò, P.; Romanelli, F.; Mazzarino, M.; Donati, F.; Braganò, M.C.; Bianchini, S.; Fierro, V.; Casasco, M.; Botrè, F.; Lenzi, A. "Urinary and serum hormones profiles after testosterone enanthate administration in male hypogonadism: concerns on the detection of doping with testosterone in treated hypogonadal athletes" *J Endocrinol Invest.*, **32**: 445-453 (2009).

156) Strano Rossi, S.; Leone, D.; de la Torre, X.; Botrè, F. "The relevance of the urinary concentration of ephedrines in anti-doping analysis: determination of pseudoephedrine, cathine, and ephedrine after administration of over-the-counter medicaments". *Ther Drug Monit.*, **31**: 520-526 (2009).

157) Frascioni, M.; Mazzarino, M.; Botrè, F.; Mazzei, F. "Surface plasmon resonance immunosensor for cortisol and cortisone determination". *Anal. Bioanal. Chem.*, **394**: 2151-2159 (2009).

158) Botrè, F. "Humanized Animal Models to Study Drug Metabolism: No Longer a "Chimera"?" *Clin Chem.*, **55**: 1763-1764 (2009).

159) Strano-Rossi S, Abate MG, Braganò MC, Botrè F. "[Use of stimulants and drugs of abuse in sport: the Italian experience". *Adicciones* **21**: 239-242 (2009).

160) Mazzarino M, de la Torre X, Mazzei F, Botrè F. "Rapid screening of beta-adrenergic agents and related compounds in human urine for anti-doping purpose using capillary electrophoresis with dynamic coating." *J Sep Sci.* **32**: 3562-3570 (2009).

161) Strano-Rossi S, Botrè F, Bermejo AM, Tabernero MJ. "A rapid method for the extraction, enantiomeric separation and quantification of amphetamines in hair." *Forensic Sci Int.* **193**: 95-100 (2009).

162) Botrè F, de la Torre X, Mazzarino M, Tieri A, Bush K, Cowan D. "Are liposomes masking agents? An in-progress study" in: W.Schänzer, H. Geyer, A. Gotzman, U. Mareck (Eds.) *Recent Advances in Doping Analysis* (17) Sportverlag Strauß, Köln, 2009, 21-28.

163) Strano Rossi S, Leone D, de la Torre X, Botrè F. "Urinary concentrations of threshold substances: a clear enough discrimination between doping and therapy? The case of ephedrines" in: W. Schänzer, H. Geyer, A. Gotzman, U. Mareck (Eds.) *Recent Advances in Doping Analysis* (17) Sportverlag Strauß, Köln, 2009, 35-42.

164) Strano Rossi S, de la Torre X, Botrè F. "A rapid method for the extraction and enantiomeric separation of amphetamine-type stimulants" in: W. Schänzer, H. Geyer, A. Gotzman, U. Mareck (Eds.) *Recent Advances in Doping Analysis* (17) Sportverlag Strauß, Köln, 2009, 203-206.

165) Mazzarino M, de la Torre X, Botrè F, Gray N, Cowan D. "A rapid screening LC/MS-MS method based on conventional HPLC pumps for the analysis of low molecular weight xenobiotics: application

to doping control analysis" in: W. Schänzer, H. Geyer, A. Gotzman, U. Mareck (Eds.) *Recent Advances in Doping Analysis* (17) Sportverlag Strauß, Köln, 2009, 207-210.

166) Galesio M, Capelo-Martinez JL, de la Torre X, Botrè F. "Speeding up the process: ultrasounds for sample preparation for steroids analysis" in: W. Schänzer, H. Geyer, A. Gotzman, U. Mareck (Eds.) *Recent Advances in Doping Analysis* (17) Sportverlag Strauß, Köln, 2009, 253-256.

167) Garribba F, Turi S, de la Torre X, Botrè F. "Technical improvement of the screening method for the detection of erythropoietins in urine" In: W. Schänzer, H. Geyer, A. Gotzman, U. Mareck (Eds.) *Recent Advances in Doping Analysis* (17) Sportverlag Strauß, Köln, 2009, 285-288.

168) Mazzarino M, Donati F, de la Torre X, Botrè F, Huskie RJ, Cowan DA. "Development and validation of a rapid method for enzymatic digestion of HBCOs utilizing microwave irradiation" in: W. Schänzer, H. Geyer, A. Gotzman, U. Mareck (Eds.) *Recent Advances in Doping Analysis* (17) Sportverlag Strauß, Köln, 2009, 289-292.

169) Mazzarino M, Braganò MC, Donati F, de la Torre X, Botrè F. "Effects of propyphenazone and other non-steroidal anti-inflammatory agents on the synthetic and endogenous androgenic anabolic steroids urinary excretion and/or instrumental detection" *Anal Chim Acta.* **657**: 60-68 (2010).

170) Strano Rossi S, Leone D, de la Torre X, Botrè F. "Analysis of stimulants in oral fluid and urine by gas chromatography-mass spectrometry II: pseudophedrine" *J Anal Toxicol.* **34**: 210-215 (2010).

171) Mazzarino M, de la Torre X, Di Santo R, Fiacco I, Rosi F, Botrè F. "Mass spectrometric characterization of tamoxifene metabolites in human urine utilizing different scan parameters on liquid chromatography/tandem mass spectrometry" *Rapid Commun Mass Spectrom.* **24**: 749-760 (2010).

172) Donati F, Botrè F. "A fast screening method for the detection of the abuse of hemoglobin-based oxygen carriers (HBOCs) in doping control" *Talanta* **81**: 252-254 (2010).

173) Strano Rossi S, de la Torre X, Botrè F. "A fast gas chromatography/mass spectrometry method for the determination of stimulants and narcotics in urine" *Rapid Commun Mass Spectrom.* **24**: 1475-1480 (2010).

174) Donati F, Mazzarino M, de la Torre X, Botrè, F. "A fast pre-confirmation method for the detection of HBOCs by capillary electrophoresis and UV detection" in: W. Schänzer, H. Geyer, A. Gotzman, U. Mareck (Eds.) *Recent Advances in Doping Analysis* (18) Sportverlag Strauß, Köln, 2010, 138-141.

175) Strano Rossi S, de la Torre X, Molaioni F, Botrè, F. "Determination of sildenafil, vardenafil and tadalafil metabolites in human urine by GC-MS" in: W. Schänzer, H. Geyer, A. Gotzman, U. Mareck (Eds.) *Recent Advances in Doping Analysis* (18) Sportverlag Strauß, Köln, 2010, 142.

176) Mazzarino M, Braganò MC, de la Torre X, Botrè, F. "Effects of toremifene and tamoxifene on the urinary androgenic steroid profile in males and females" in: W. Schänzer, H. Geyer, A. Gotzman, U. Mareck (Eds.) *Recent Advances in Doping Analysis* (18) Sportverlag Strauß, Köln, 2010, 171-174.

177) Mazzarino M, Jardines D, Turi S, de la Torre X, Botrè, F. "Effects of synthetic glucocorticoid administrations on the urinary endogenous corticosteroids profile" in: W. Schänzer, H. Geyer, A. Gotzman, U. Mareck (Eds.) *Recent Advances in Doping Analysis* (18) Sportverlag Strauß, Köln, 2010, 204-207.

178) Strano Rossi S, de la Torre X, Botrè, F. "Speeding up the analytical times: Fast GC analysis for stimulants, narcotics and drugs of abuse " in: W. Schänzer, H. Geyer, A. Gotzman, U. Mareck (Eds.) *Recent Advances in Doping Analysis* (18) Sportverlag Strauß, Köln, 2010, 236.

179) Furlanello F, Botrè F, Accettura D. "Pharmacological advice in sports cardiology" *Med. Sport,* **63**: 127-135 (2010).

180) Mazzarino M, Riggi S, de la Torre X, Botrè, F. "Speeding up the process urine sample pre-treatment: Some perspectives on the use of microwave assisted extraction in the anti-doping field" *Talanta* **81**: 1264-1272 (2010).

- 181) Strano-Rossi S, Anzillotti L, de la Torre X, Botrè F.** "A gas chromatography/mass spectrometry method for the determination of sildenafil, vardenafil and tadalafil and their metabolites in human urine" *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **24**: 1697-706 (2010).
- 182) Galesio M, Rial-Otero R, Simal-Gandara J, de la Torre X, Botrè F, Capelo-Martinez JL.** "Improved ultrasonic-based sample treatment for the screening of anabolic steroids by gas chromatography/mass spectrometry" *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **24**: 2375-2385 (2010).
- 183) Strano Rossi S, Cadwallader AB, de la Torre X, Botrè, F.** "Toxicological determination and in vitro metabolism of the designer drug methylenedioxypropylvalerone (MPDV) by gas chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry" *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **24**: 2706-2714 (2010).
- 184) Cadwallader AB, de la Torre X, Tieri A, Botrè, F.** "The abuse of diuretics as performance-enhancing drugs and masking agents in sport doping: pharmacology, toxicology and analysis" *Brit J Pharmacol* **161**: 1-16 (2010).
- 185) Frasconi M, Tortolini C, Botrè, F, Mazzei F.** "Multifunctional au nanoparticle dendrimer-based surface plasmon resonance biosensor and its application for improved insulin detection" *Anal Chem.* **82**: 7335-7342 (2010).
- 186) Furlanello F, Vitali Serdoz L, Botrè F, Accettura D, Lestuzzi C, De Ambroggi L, Cappato R.** "Quanto sono compatibili i farmaci con l'attività atletica" *G Ital Cardiol* **11**: 118S-121S (2010).
- 187) Mazzarino M, de la Torre X, Botrè F, Gray N, Cowan D.** "A rapid screening LC-MS/MS method based on conventional HPLC pumps for the analysis of low molecular weight xenobiotics: application to doping control analysis" *Drug Testing Anal.* **2**: 311-322 (2010).
- 188) Mazzarino M, De Angelis F, De Cicco T, de la Torre X, Botrè F.** "Microwave irradiation for a fast gas chromatography-mass spectrometric analysis of polysaccharide-based plasma volume expanders in human urine" *J Chromatogr B.* **878**: 3024-3032 (2010).
- 189) Galesio M, Mazzarino M, de la Torre X, Botrè F, Capelo JL.** "Accelerated sample treatment for the screening of banned doping substances by GC-MS: ultrasounds versus microwave energy" *Anal. Bioanal. Chem.* **399**: 861-875 (2011).
- 190) Strano Rossi S, Bermejo Am, de la Torre X, Botrè F.** "Fast GC-MS method for the simultaneous screening of THC-COOH, cocaine, opiates and analogues including buprenorphine and fentanyl, and their metabolites in urine". *Anal Bioanal Chem.* **399**: 1623-1630 (2011).
- 191) Mazzarino M, Abate MG, Alocci R, Stinchelli R, Molaioni F, de la Torre X, Botrè F.** "Urine stability and steroid profile: towards a screening index of urine degradation for anti-doping purpose" *Anal. Chim. Acta.* **683**: 221-226 (2011).
- 192) Strano Rossi S, Botrè F.** "Prevalence of illicit drug use among the Italian athlete population with special attention on drugs of abuse: A 10-year review". *J Sports Sci.* **29**: 471-476 (2011).
- 193) de la Torre X, Colamonici C, Curcio D, Molaioni F, Pizzardi M, Botrè F.** "A simplified procedure for GC/C/IRMS analysis of underivatized 19-norandrosterone in urine following HPLC purification". *Steroids.* **76**: 471-477 (2011).
- 194) Mazzarino M, de la Torre X, Botrè F.** "Urinary excretion profiles of toremifene metabolites by liquid chromatography-mass spectrometry. Towards targeted analysis to relevant metabolites in doping control". *Anal Bioanal Chem.* **In press.**
- 195) Cadwallader AB, Lim CS, Rollins DE, Botrè F.** "The Androgen Receptor and Its Use in Biological Assays: Looking Toward Effect-Based Testing and Its Applications". *J Anal Toxicol.* **In press.**
- 196) Donati F, Mazzarino M, de la Torre X, Botrè F, Islam N, Cowan D.** "A simple and rapid pre-confirmation method to distinguish endogenous human haemoglobin from synthetic haemoglobin-based oxygen carriers in doping control". *Electrophoresis.* **In press.**

Books and Monographs

1) **Botrè, F.; Botrè, C.**

"La spada di Damocle: pericoli del progresso e progresso dei pericoli"
Ragno Editore, Roma, 1981.

2) **Botrè, F.; Gros, G.; Storey, B. T. (Eds.)**

"Carbonic Anhydrase: from Biochemistry and Genetics to Physiology and Clinical Medicine"
VCH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, 1991.

3) **Botrè, F.; Iannucci, E. (Eds.)**

"Libera Circolazione e Qualità dei Prodotti nel Mercato Unico Europeo. Atti del XV Congresso di Merceologia, Roma, 24-26 settembre 1992" (pubbl. 1994). Edizioni Kappa, Roma, Vol. I-II.

4) **Conti, M. E.; Botrè, F. (Eds.)**

"The Control of Marine Pollution: Current Status and Future Trends"
Inderscience Enterprises Ltd., Oxford, 2000.

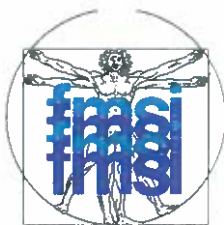
5) **Botrè, F.; Botrè, C.**

"Veleni di guerra in tempo di pace. Armi chimiche e biologiche a fini bellici e terroristici"
Collana "Prometeus", Franco Angeli, Milano, 2003.

6) **Conti, M. E.; Botrè, F. (Eds.)**

"On the Relevance of Uncertainty in the Management of Environmental and Health Problems"
Inderscience Enterprises Ltd., Oxford, 2005.

APPENDIX 2



FEDERAZIONE MEDICO SPORTIVA ITALIANA

LABORATORIO ANTIDOPING

14 JUN 2010

PROT. N. 1915/FMB/dav

ROMA, 10th June 2010

LARGO GIULIO ONESTI, 1 - TEL. 06.80.83.011 - FAX 06.80.78.971

OGG.: Documentation Package
Sample A coded 3511558

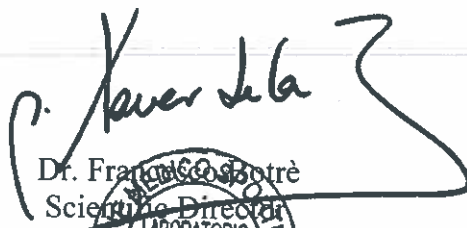
Dr. T. Capdevielle
I.A.A.F. Medical & Anti-Doping Department
17, Rue Princesse Florestine
BP 359
MC 98000 MONACO CEDEX

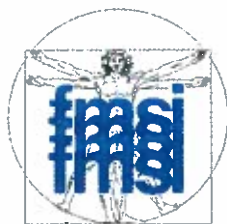
Dear Dr. Capdevielle,

Following to your e-mail request dated 4th June 2010, please find here enclosed the Documentation Package concerning the sample A coded 3511558.

Best regards,

Nella risposta citare il numero di protocollo


Dr. Franco Costantini
Scientific Director
LABORATORIO ANTIDOPING
FEDERAZIONE MEDICO SPORTIVA ITALIANA

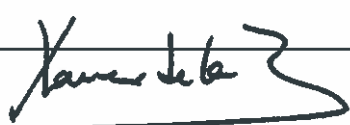



FEDERAZIONE MEDICO SPORTIVA ITALIANA

LABORATORIO ANTIDOPING

SAMPLE CODE: 3511158
INTERNAL LABORATORY CODE: 10E003 A4433

PRESENCE OF
CONTINUOUS ERYTHROPOIETIN RECEPTOR
ACTIVATOR
(CERA)

Reviewed by: 
Date: 10.06.2010

Approved by: 
Date: 10.06.2010

LABORATORIO ANTIDOPING FMSI

LARGO GIULIO ONESTI,1

00197 ROME, ITALY

TEL. +39 06 3685 9600, FAX + 39 06 8078971

THIS DOCUMENT CONTAINS AUTHENTIC COPIES
OF THE ORIGINAL LABORATORY DOCUMENTATION

TABLE OF CONTENTS

List of Laboratory Staff Involved in the Test 4

Summary of Chain of Custody..... 6

SECTION I: RECEIPT AND HANDLING OF SAMPLES 7

I.1 Documentation of shipping and receipt of intact samples..... 8

I.2 Doping control form 10

I.3 Laboratory sample reception form 11

I.4 Documentation Linking Sample Identification Number to Laboratory Identification
Number (Laboratory sample registration form)..... 12

I.5. Sample chain of custody (Distribution form of aliquots for initial testing procedures)
..... 13

SECTION II: SAMPLE 3511158

INITIAL TESTING PROCEDURE AND CONFIRMATION RESULTS 14

II.1 Preliminary tests 15

 II.1.1 Visual inspection..... 15

 II.1.2 Preanalysis results 16

 II.1.3 Preliminary determinations 17

 II.1.4 Preliminary determinations results..... 18

CONTINUOUS ERYTHROPOIETIN RECEPTOR ACTIVATOR (CERA)

INITIAL TESTING PROCEDURE AND CONFIRMATION RESULTS 19

II.2 Initial testing procedure Test Data..... 20

 II.2.1 Initial testing procedure Analysis Test Description 20

 II.2.2 Instruments and instrumental conditions 21

 II.2.3 Initial testing procedure - Aliquot chain of custody documentation 22

 II.2.4 Initial testing procedure Test Results..... 32

 II.2.5 Repetition of initial testing procedure – Aliquot chain of custody documentation
..... 35

II.2.6 Repetition of initial testing procedure Test Results.....	45
II.2.7 Test Validity Data	49
II.3 Confirmation Test Data.....	50
II.3.1 Confirmation test description	50
II.3.2 Instruments and instrumental conditions	50
II.3.3 Confirmation Aliquot Chain of Custody Documentation.....	51
II.3.4 Confirmation Test Results	62
II.3.5 Test Validity Data	66
II.3.6 Result review	67
II.3.7 Conclusions	68
II.4 Second opinion by AFLD Laboratory (Paris) on the EPO analysis results on sample code 3511158	69
II.5 Test Report.....	70

List of Laboratory Staff Involved in the Test

SURNAME NAME	INITIALS	POSITION TITLE	SIGNATURE AND HANDWRITTEN INITIALS	INVOLVED
ABATE MARIA GABRIELLA	MGA	ROUTINE DATA MANAGER SENIOR ANALYST	<i>M. Abate</i> MGA	X
ALOCCI ROBERTO	RAL	QUALITY CONTROL MANAGER ANALYST	<i>Roberto Alocchi</i> RAL	
BARBERINI STEFANO	SBR	TECHNICAL SECRETARIAT	<i>Stefano Barberini</i> SBR	X
BOTRÈ FRANCESCO	FMB	SCIENTIFIC DIRECTOR HEAD OF LABORATORY	<i>Francesco Botrè</i> FMB	X
BRAGANÒ MARIA CRISTINA	MCB	SENIOR ANALYST	<i>Maria Cristina Braganò</i> MCB	
CIACCIavicca PIETRO	PCC	ANALYST	<i>Pietro Ciacciavicca</i> Pcc	
ONCIULLI ALESSANDRO	ACI	ANALYST	<i>Alessandro Onciulli</i> ACI	
COLAMONICI CRISTIANA	CCM	SENIOR ANALYST	<i>Cristiana Colamonic</i> CCM	
CORPETTI GIORGIA	GIC	SENIOR ANALYST	<i>Giorgia Corpetti</i> GIC	X
CURCIO DAVIDE	CUR	SENIOR ANALYST	<i>Davide Curcio</i> CUR	
DE ANGELIS FRANCESCA	FDA	ANALYST	<i>Francesca De Angelis</i> FDA	X
DE FELICE FABIO	FDF	TECHNICAL SECRETARIAT	<i>Fabio de Felice</i> FDF	
DE LA TORRE XAVIER	DEX	DEPUTY SCIENTIFIC DIRECTOR TECHNICAL DIRECTOR	<i>Xavier de la Torre</i> DEX	X
DI CICCÒ TERESA	TED	ANALYST	<i>Teresa Di Ciccò</i> TED	
ONATI FRANCESCO	DOF	SENIOR ANALYST	<i>Francesco Onati</i> DOF	
FOLCHITTO FABRIZIA	FAF	SCIENTIFIC SECRETARIAT MANAGER	<i>Fabrizia Folchitto</i> FAF	
FOSCHI CRISTIANO	FOC	TECHNICAL SECRETARIAT	<i>Cristiano Foschi</i> FOC	
GARRIBBA FLAMINIA	FLG	SENIOR ANALYST	<i>Flaminia Garribba</i> FLG	
JARDINES DANIEL	DAG	SENIOR ANALYST	<i>Daniel Jardines</i> DAG	
LONGO DONATELLA	DLO	SENIOR ANALYST	<i>Donatella Longo</i> DLO	
MANCA MANUELA	MMN	TECHNICAL SECRETARIAT	<i>Manuela Manca</i> MMN	
MAZZARINO MONICA	MMZ	SENIOR ANALYST	<i>Monica Mazzarino</i> MMZ	
MOLAIONI FRANCESCO	MLJ	SENIOR ANALYST	<i>Francesco Molaioni</i> MLJ	X

ROMANI ROBERTO	RRM	ANALYST	<i>Roberto Romani RRM</i>	X
SPIRITO ELENA	ESP	QUALITY MANAGER	<i>Elena Spirito ESP</i>	
STEFANUCCI ROBERTA	RST	TECHNICAL SECRETARIAT	<i>Roberta Stefanucci RST</i>	
STRANO ROSSI SABINA	SSR	SENIOR ANALYST	<i>Sabrina Strano Rossi SSR</i>	
TURI STEFANIA	TUS	SENIOR ANALYST	<i>Stefania Turi TUS</i>	X
VENDEMIATI DAVIDE	DAV	TECHNICAL SECRETARIAT	<i>Davide Vendemiati DAV</i>	

Summary of Chain of Custody

Sample code 3511158 (A+B bottles) was delivered to the laboratory together with 5 other samples (A+B bottles) by TNT and received by MLJ* on 02/05/2010; samples were registered and visually inspected by SBR on 03/05/2010. Sample 3511158 was identified with internal code 10E003 A4433. The "A" samples were stored at 4°C waiting for aliquoting, while the "B" samples were immediately stored in the freezer (-20°C). The seal of sample internal code 10E003 A4433 was broken and aliquoting (for EPO analysis) was carried out by TUS on 03/05/2010, while RRM aliquoted the samples for all other screening analyses on 04/05/2010. On 05/05/2010 FDA measured the pH and the specific gravity.

TUS performed the screening procedure between 07/05/2010 and 11/05/2010. The screening analysis was newly performed by GIC between 11/05/2010 and 13/05/2010. The screening analysis showed a suspect result for the presence of Continuous Erythropoietin Receptor Activator (CERA). TUS requested one additional aliquot of sample 10E003 A4433 for CERA confirmation and one for the stability test on 17/05/2010. Aliquoting for confirmation was carried out by TUS on 17/05/2010. The complete procedure of detection of recombinant erythropoietin and analogues was performed by TUS between 20/05/2010 and 22/05/2010. The results matched our internal criteria to report an Adverse Analytical Finding for CERA.

On 25/05/2010 Dr Françoise Lasne, head of the biology department of the WADA accredited Laboratory of Paris (France), evaluated the results and confirmed the presence of Continuous Erythropoietin Receptor Activator (CERA) in the sample code 10E003 A4433.

*The person performing the specific task is indicated by an internal three-letter code (see list of laboratory staff).

SECTION I:
RECEIPT AND HANDLING OF SAMPLES

I.1 Documentation of shipping and receipt of intact samples



CHAIN OF CUSTODY FORM

IAAF FMSI
TESTING AGENCY SAMPLE COLLECTION AGENCY

1. DOPING CONTROL STATION

DOB NAME: MARA CAZZANIGA MASSIHLIANO SCRZI OUT OF COMPETITION IN COMPETITION

TEST LOCATION: SESTO SAN GIOVANNI (MI) ITALY COMPETITION: COPPA CITA' DI SESTO SAN GIOVANNI

AMOUNT OF SAMPLE: 12 DATE: 01 05 2010 TIME: 19:05

2. SAMPLE I.D.

<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>

3511158

3. CHANGE OF STORAGE

STORAGE LOCATION #1: CAMPIONE SPORTIVI P. DOTT. SCARZI S. CROVA DATE: 01 05 2010 TIME: 19:08

STORAGE CONDITIONS: ROOM TEMPERATURE COOL OTHER SIGNATURE: [Signature]

STORAGE LOCATION #2: [Blank] DATE: [Blank]

STORAGE CONDITIONS: ROOM TEMPERATURE COOL OTHER SIGNATURE: [Blank]

STORAGE LOCATION #3: [Blank] DATE: [Blank]

STORAGE CONDITIONS: ROOM TEMPERATURE COOL OTHER SIGNATURE: [Blank]

STORAGE LOCATION #4: [Blank] DATE: [Blank]

STORAGE CONDITIONS: ROOM TEMPERATURE COOL OTHER SIGNATURE: [Blank]

4. TRANSFER TO LABORATORY

THE SERVICE PROVIDER'S CONTACT NUMBER: 19:08 DATE: 01 05 2010

DCI DECLARATION: I DECLARE THAT ALL THE ABOVE SAMPLES ARE PRESENT AND I HAVE PACKAGED THEM FOR TRANSPORTATION TO THE ACQUAFEDUSA ROMA LABORATORY.

NAME: MASSIHLIANO SCRZI SIGNATURE: [Signature] NAME OF THE LABORATORY: ACQUAFEDUSA ROMA

DELIVERED BY COURIER

COURIER NAME: TNT COURIER NO.: NT-81322796-2

COURIER SIGNATURE: [Signature] COURIER NAME: ALBERTO DI GIACI COMMENTS: N.C.

DELIVERED BY OTHER MEANS

OTHER: [Blank] NAME: [Blank] SIGNATURE: [Blank]

5. RECEIPT BY LABORATORY

NAME OF THE LABORATORY: MOUATIONI

PERSON IN CHARGE: LA SORIANA PUPA

I DECLARE THAT I HAVE RECEIVED THE SAMPLES IN GOOD CONDITION. DATE: 02 05 2010 TIME: 09:20


DO NOT WRITE NUMBERS OF THIS FORM OVERPRINTED TO THE SAMPLE LABELS LENGTH 2 (mm) 2

DO NOT WRITE IN THE 4TH COLUMN

DO NOT SIGN IN THE 4TH COLUMN

COMMENT: [Blank]

LABORATORY AUTHORIZED REPRESENTATIVE: [Signature]

Completare		Folce partenza		Filiale arrivo		Ora spedizione		Ora		BOLLA DI CONSEGNA			
Mittente						Destinatario						<input type="checkbox"/> Crociare se FERMO DEPOSITO <input type="checkbox"/> ed indicare telefono destinatario	
Via						Via							
Città						Città						<input type="checkbox"/> Valore assicurato	
Al. invio		Contenuto		N. coll.		Segnalo		P. fondo kg		Volume			
Press		Conca		Viale		Premio ass.		Inalzo		Doc. imponible		Pkg. hs - bullo	
										<input type="checkbox"/> BALOTTO PICCOLO <input type="checkbox"/> GRANDE		<input type="checkbox"/> Contrassegno <input type="checkbox"/> Anticipo <input type="checkbox"/> Totale	
<input type="checkbox"/> CROCIARE SE INVESTITO RITIRO A DOMICILIO				<input type="checkbox"/> ESIGERE AMBACAMENTO				<input type="checkbox"/> FATTURAZIONE A FINE FIDE				 803 888 <small>TNT Global Express S.p.A. SpA 00100 ROMA</small> <small>Capitale Sociale 1.000.000.000,00</small> <small>Isola Legale Roma Consob 01 - 0691 244 4400 111 (linea)</small> <small>tel. (06) 23.26.01 - 4 linee dirette - 82 x 10 (24h/24)</small> <small>Regione operaie e talia Isola 00100 Roma tel. (06) 23.26.01</small> <small>1711 167121 - Direzione e Amministrazione a 06 87 87 87</small>	
NUMERO LETTERA DI VETTURA NT 81382786-2						<input type="checkbox"/> CROCIARE SE TRACCO IS.		<input type="checkbox"/> CROCIARE SE					
<small>Attenzione per mittente: per evitare sequestro di corrispondenza, evitare di allegare documenti non necessari</small>						<small>Timbro e firma completa lettera ritorno</small>							

B - COPIA PER DESTINATARIO

I.3 Laboratory sample reception form

FEDERAZIONE MEDICO SPORTIVA ITALIANA LABORATORIO ANTIDOPING	FOGLIO DI LAVORO	FL103
ACCETTAZIONE STRAORDINARIA		
		Pag. 1/1
		Rev 1

Rif. PG001

DATA DI RICEVIMENTO: 020510	ORA: 8.20	
N° BORSE DI TRASPORTO RICEVUTE: 1		
RICEVUTE TRAMITE:		
<input type="checkbox"/> MEDICO SPORTIVO	COGNOME E NOME	FIRMA
<input checked="" type="checkbox"/> CORRIERE	IDENTIFICATIVO TNT	N° VETTURA 813227962
<input type="checkbox"/> POSTA	IDENTIFICATIVO	N° VETTURA
<input type="checkbox"/> ALTRO	IDENTIFICATIVO / COGNOME E NOME	N° VETTURA / FIRMA
N° CATENA DI CUSTODIA IAAF 003/2010		
OSSERVAZIONI:		
LA CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI AVVIENE SECONDO QUANTO SPECIFICATO NELLE PG001/PG018		
SIGLA E FIRMA DEL PERSONALE CHE HA EFFETTUATO LA RICEZIONE: ML - fM		

DA COMPILARSI A CURA DEL PERSONALE DOPO AVER EFFETTUATO LA RICEZIONE:

LOCALIZZAZIONE BORSE:	FRW18
SIGLA E FIRMA DEL PERSONALE CHE HA EFFETTUATO LA RICEZIONE: ML - fL	

I.4 Documentation Linking Sample Identification Number to Laboratory Identification Number (Laboratory sample registration form)

RIF. FL046 1008

FEDERAZIONE MEDICO SPORTIVA ITALIANA LABORATORIO ANTIDOPING		FOGLIO DI LAVORO		FL102	
ACCETTAZIONE E REGISTRAZIONE CAMPIONI					
RIF PG001				Pag.	1/1
				Rev.	4
LOTTO DI ACCETTAZIONE N° <u>10E003</u>		4429-4434			
CATENA DI CUSTODIA: <u>IAAF 03/2010</u>					
PARTE I - ACCETTAZIONE					
DATA DI RICEVIMENTO: <u>02/05/2010</u>		ORA: <u>8.20</u>			
RICEVUTA TRAMITE: <u>CORRIERE</u>					
PARTE II - GARA DI APPARTENENZA					
SPORT-GARA:	<u>ATHLETICS</u>	<u>GARA INT.LE DI MARCIA 20 KM - IAAF</u>	SVOLTA IN DATA:	<u>01/05/2010</u>	
LOCALITA':	<u>SESTO SAN GIOVANNI</u>		FEDERAZIONE:	<u>IAAF</u>	
PARTE III - REGISTRAZIONE CODICI ESTERNI CAMPIONI A E B E ASSEGNAZIONE CODICI DI LABORATORIO					
CAMPIONI A E B		CAMPIONI A E B		CAMPIONI A E B	
CODICE ESTERNO	CODICE INTERNO	CODICE ESTERNO	CODICE INTERNO	CODICE ESTERNO	CODICE INTERNO
<u>3511158</u>	<u>4433</u>				
CAMPIONI A E B		CAMPIONI A E B		CAMPIONI A E B	
ESTERNO	INTERNO	ESTERNO	INTERNO	ESTERNO	INTERNO
I CAMPIONI "A" SONO STATI COLLOCATI NEL FRIGO/CONGELATORE: <u>FR019</u>					
I CAMPIONI "B" SONO STATI COLLOCATI NEL FRIGO/CONGELATORE: <u>CO010</u>					
IL LOTTO E' STATO ACCETTATO REGOLARMENTE?					
<input checked="" type="checkbox"/> SI		<input type="checkbox"/> NO VEDERE RAPPORTO FL002 RIF. PNC		N°	PROT
				N°	PROT
				N°	PROT
CAMPIONI SOSPESI: _____					

DATA, SIGLA E FIRMA DEL RESPONSABILE ACCETTAZIONE 03/05/2010 *[Signature]*

SECTION II:
SAMPLE 3511158
INITIAL TESTING PROCEDURE AND
CONFIRMATION RESULTS

II.1 Preliminary tests

Please note: The results of the preliminary tests and of the preliminary determinations are recorded on single forms for all samples belonging to the same batch.

II.1.1 Visual inspection

COLOUR:

VISUAL TEST, ACCORDING TO THIS TABLE:

- 1 LIGHT YELLOW**
- 2 BRIGHT YELLOW**
- 3 DARK YELLOW**
- 4 PINK-BROWN**
- 5 RED**
- 6 OTHER (TO BE SPECIFIED)**

SEDIMENT:

VISUAL TEST, ACCORDING TO THIS TABLE:

- 0 ABSENT**
- + POOR**
- ++ ABUNDANT**

VOLUME:

COMPARISON AGAINST A CALIBRATED BOTTLE

II.1.2 Preanalysis results

FEDERAZIONE MEDICO SPORTIVA ITALIANA LABORATORIO ANTIDOPING	FOGLIO DI LAVORO	FL-100
COMUNICAZIONE RISULTATI ESAMI PRELIMINARI		
RIG. PG001		Pag. 1/1
		REV. 1

LOTTO DI ACCETTAZIONE N° 10E003

Kit utilizzato: ELK VERSAPACK BERLINGER ALTRO _____

CODICE LABORATORIO CAMPIONE (A O B)	VOLUME [mL]	COLORE (*)	SEDIMENTI (**)	OSSERVAZIONI
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
A4433	200	2	0	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
--				
--				
--				
--				
--				
--				
--				
--				
--				
--				
--				
--				
--				
--				
--				
--				
--				
--				
--				
--				

I CAMPIONI SONO STATI COLLOCATI NEL FRIGO N°: FR019

SONO STATI RICONTRATI PNC? NO SI - VEDERE RAPPORTO #L002 RIF. PNC N° _____

DATA: 03/05/2010 OPERATORE: [Signature] [Signature]

(*) 1 Colore molto debole o privo di colore; 2 Giallo paglierino; 3 Giallo scuro; 4 Rosa-bruno; 5 Rosso; 6 Altro
 (**) 0 assenti; + scarsi; ++ abbondanti

II.1.3 Preliminary determinations

pH

Colorimetric determination

Specific gravity

Electronic densimeter

II.1.4 Preliminary determinations results

Federazione Medico Sportiva Italiana Laboratorio Antidoping	FOGLIO DI LAVORO	FL054
Verbale di comunicazione risultati preanalisi		
Rif. PG001		Pag. 1/1
		Rev. 3

Lotto di accettazione : 10E003

Peso Specifico (S.G.)		Letture	Osservazioni
Cod. DS003	H ₂ O	0,9996	
Interv. Accett. [0,9995-0,9998]			

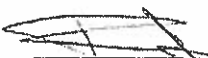
<input type="checkbox"/> pH (strumentale)	Tampone pH 7.		
Cod: PH001	Tampone pH 4.		

<input type="checkbox"/> pH (cartina)	Range cartina utilizzata	
Cod: R140-019		5,0-10,0

Codici Campioni	Letture pH	Letture S.G.	Codici Campioni	Letture pH	Letture S.G.
[REDACTED]					
A4433	5,0	1,010			
[REDACTED]					

Responsabile esecuzione misure pH


Sigla


Firma

05/05/10
Data

Responsabile esecuzione misure S.G.


Sigla


Firma

05/05/10
Data

**CONTINUOUS ERYTHROPOIETIN RECEPTOR
ACTIVATOR
(CERA)**

**INITIAL TESTING PROCEDURE AND
CONFIRMATION RESULTS**

II.2 Initial testing procedure Test Data

II.2.1 Initial testing procedure Analysis Test Description

Initial testing procedure and Confirmation analysis were carried out according to the internal procedure for Detection of recombinant erythropoietin and analogues. The worksheets are enclosed in the aliquot chain of custody documentation (worksheet for the initial testing procedure FL119).

A brief description of the method is given below:

- sample preparation (concentration by ultrafiltration), including also the aliquot used for the stability test in the case of the confirmation of a suspicious sample;
- pre-focusing;
- isoelectric focusing;
- first blotting;
- incubation with the antiEPO antibody;
- second blotting;
- incubation with the biotinylated secondary antibody;
- incubation with the streptavidine-peroxidase complex;
- covering with the chemiluminescent substrate;
- exposure of the membrane and acquisition of the image by a dedicated digital camera.

II.2.2 Instruments and instrumental conditions

IEF SYSTEM (INCLUDING THE IMAGE ACQUISITION SYSTEM "epoCAM")

EF 002/003

**INCUBATOR
SLOW MIXER
MAGNETIC SHAKER
FRIDGE
FREEZER
VORTEX
BALANCE
BASCULANT ROTOR REFRIGERATED CENTRIFUGE
FIXED ANGLE (34°) ROTOR CENTRIFUGE
WATER BATH**

Operating conditions (for further details please refer to the worksheet FL119):

Prefocusing:

250 V
25 mA
25 W
time: 30-60 min

Focusing:

2000 V
25 mA
25 W
4000 Wh

First blotting:

40 V
mA adjusted for the gel area
90 W
time: 30 min

Second blotting:

35 V
mA adjusted for the gel area
40 W
time: 10 min

Initial testing procedure analysis: original identification of the lanes on the gel ("sequence")

- [1] rhEPO and NESP standards (BRNE)
- [2] 10E003 A4433
- [3-12] Routine samples
- [13] rhEPO and NESP standards (BRNE)
- [14-24] Routine samples
- [25] urinary EPO standard (NIBSC)
- [26] rhEPO and NESP standards (BRNE)
- [27] Mircera standard (Mir)

II.2.3 Initial testing procedure - Aliquot chain of custody documentation

Worksheet for the initial testing procedure

FEDERAZIONE MEDICO SPORTIVA ITALIANA LABORATORIO ANTIDOPING	FOGLIO DI LAVORO	FL119
RICERCA DI ERITROPOIETINA RICOMBINANTE E ANALOGHI		
Rif. MP031 - Allegato	Pag. 1/10	Rev. 9

Data e ora di inizio analisi: 4/5/10 10.00

Lotto di accettazione	Codice campioni preparati
10E003	DA: A 4433

A - PREPARAZIONE DEL GEL 17 X8 X 0,1CM

1 <input type="checkbox"/>	Pesare 14,71 g di urea [R-181 Lotto 02], 1,75 g di saccarosio [R-306 Lotto 01] e trasferirli in un pallone di reazione da 100 ml posto su un agitatore elettromagnetico
2 <input type="checkbox"/>	Aggiungere 14,17 ml di acqua ultrapura e 1,89 ml di anfolita 2-4 [R-168 Lotto 01], 1,89 ml di anfolita 4-6 [R-169 Lotto 01] e 4,74 ml di soluzione di bisacrilamide 40% [R-184 Lotto 003]
3 <input checked="" type="checkbox"/>	Tappare il pallone e collegarlo ad una pompa da vuoto per 15 min.
4 <input checked="" type="checkbox"/>	Nel frattempo (durante i 15 minuti): a) detergere le lastre con etanolo assoluto [R-033 Lotto 02] b) far aderire il Gelbond alla lastra di supporto ponendovi l'opportuna quantità di acqua ultrapura c) eliminare le eventuali bolle d'aria e l'acqua in eccesso ponendo sul Gelbond un foglio di carta da filtro e facendo pressione con un rullo d) sovrapporre la seconda lastra e) bloccare le lastre con le apposite pinze
5 <input checked="" type="checkbox"/>	Preparare l'APS sciogliendo in una vial di plastica da 1,5 ml con tappo 100 mg di persolfato d'ammonio [R-179 lotto 002] in 1 ml di acqua ultrapura e agitando manualmente
6 <input checked="" type="checkbox"/>	Aggiungere 31 µl di TEMED [R-180 Lotto 003] e 310 µl di APS nel pallone
7 <input checked="" type="checkbox"/>	Lasciare 30 s in agitazione
8 <input checked="" type="checkbox"/>	Prelevare la soluzione di gel mediante pipetta e trasferirla rapidamente fra le due lastre, avendo cura di non generare bolle d'aria
9 <input checked="" type="checkbox"/>	Lasciare il gel per almeno tre ore nella camera umida

B - PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

per screening e conferma (non SDS PAGE) A (per la purificazione per immunoaffinità) andare al FL162

10/1 <input checked="" type="checkbox"/>	Condizionare il campione a temperatura ambiente e preparare la soluzione Complete portando a volume con acqua ultrapura in un matraccio da 10 ml 5 tavolette di Complete ¹ [R-172 Lotto 159] e mescolando mediante agitatore elettromagnetico
11/1 <input checked="" type="checkbox"/>	Prelevare 20 ml di urina ² (in caso di prelievi inferiori, portare a 20 ml con TRISHCl 50 mM [TRISHCl 50 Lotto ---]) e trasferirli in una provetta da 50 ml CS 4/5/10
12/1 <input checked="" type="checkbox"/>	Aggiungere 400 µl di soluzione Complete (200 µl ogni 10 ml di urina)
13/1 <input checked="" type="checkbox"/>	Aggiungere 2 ml di TRISHCl 3,75M [TRISHCl 3.75 Lotto 022] (1ml ogni 10 ml di urina)
14/1 <input checked="" type="checkbox"/>	Controllare il pH con delle strips indicatrici in modo che sia compreso fra 6,8 e 7,9; in caso non risulti nel range, correggerlo con tampone TRISHCl 3,75M [TRISHCl 3.75 Lotto ---] CS 4/5/10
15/1 <input checked="" type="checkbox"/>	Centrifugare per 10 min nella centrifuga refrigerata a 20°C con rotore basculante a 3000 rcf

¹ E' possibile preparare quantità differenti purché restino invariate le proporzioni.² In caso di urina diluita e prelievi maggiori, prelevare le quantità di Complete e di TRISHCl 75 rispettando i rapporti fra i reattivi.

FEDERAZIONE MEDICO SPORTIVA ITALIANA LABORATORIO ANTIDOPING	FOGLIO DI LAVORO	FL119
RICERCA DI ERITROPOIETINA RICOMBINANTE E ANALOGHI		
Rif. MP031 - Allegato	Pag. 2/10	Rev. 9

16/I <input checked="" type="checkbox"/>	Applicare alle provette il componente della filtrazione del kit Steriflip, assemblandolo in posizione verticale
17/I <input checked="" type="checkbox"/>	Ruotare delicatamente di 180° il Kit assemblato
18/I <input checked="" type="checkbox"/>	Collegarlo alla pompa da vuoto per la filtrazione
19/I <input checked="" type="checkbox"/>	Trasferire il filtrato nelle provette amicon ultra-15
20/I <input checked="" type="checkbox"/>	Centrifugare per 20 min nella centrifuga refrigerata a 20°C con rotore basculante a 3500 rcf
21/I <input checked="" type="checkbox"/>	Eliminare il filtrato e lavare il filtro riempiendo la parte superiore della Amicon ultra-15 con TRISHCI 50 mM [TRISHCI 50 Lotto <i>CC</i>] e 400 µl di soluzione Complete (200µl ogni 10 ml di urina)
22/I <input checked="" type="checkbox"/>	Centrifugare per 20 min nella centrifuga refrigerata a 20°C con rotore basculante a 3500 rcf
23/I <input checked="" type="checkbox"/>	Nel frattempo lavare le Amicon ultra-4 con 2 ml di acqua ultrapura ponendole a centrifugare a 5000 rpm per 20 min nella centrifuga refrigerata a 17°C con rotore ad angolo fisso.
24/I <input checked="" type="checkbox"/>	Prelevare con una micropipetta dalla parte superiore della Amicon ultra-15 il residuo (circa 120µl) e trasferirlo nelle Amicon ultra-4 precedentemente lavate (anche se si usa il FL162)
25/I <input checked="" type="checkbox"/>	Centrifugare a 6200 rpm per 60 min nella centrifuga refrigerata a 17°C con rotore ad angolo fisso
26/I <input checked="" type="checkbox"/>	Misurare il volume di ritentato, trasferirlo in una vial di raccolta e conservare in frigorifero (nel caso si intenda utilizzare oltre le 24 h, conservare in congelatore a -20°C)

II (PER TEST DI STABILITÀ)

10/II <input type="checkbox"/>	Centrifugare 0.6 ml di urina per 10 min a 20°C con rotore basculante a 2700 rcf
11/II <input type="checkbox"/>	Mettere 0,5 ml di sovrantante in una provetta Microcon
12/II <input type="checkbox"/>	Aggiungere 20 µl di Pepstatina A e 5 µl di soluzione Complete
13/II <input type="checkbox"/>	Centrifugare a 6200 rpm per 20 min nella centrifuga refrigerata a 17°C con rotore ad angolo fisso, concentrando fino ad un volume approssimativo di 30 µl
14/II <input type="checkbox"/>	Aggiungere 200 µl di tampone acetato 50 mM nel restante campione e mescolare con vortex prima di capovolgerlo
15/II <input type="checkbox"/>	Capovolgere la Microcon e centrifugare a 3000 rpm per 10 min nella centrifuga refrigerata a 17°C con rotore ad angolo fisso
16/II <input type="checkbox"/>	Portare il volume del campione recuperato fino a 0,5 ml con tampone acetato 50 mM
17/II <input type="checkbox"/>	Aggiungere 20 µl di Pepstatina A e 5 µl di soluzione Complete
18/II <input type="checkbox"/>	Incubare per 15 ± 2 min a T ambiente
19/II <input type="checkbox"/>	Aggiungere una miscela di BRP e NESP in modo da ottenere una concentrazione pari a 1.5 volte la concentrazione usata per gli standard di riferimento
20/II <input type="checkbox"/>	Incubare tutta la notte a 37°C
21/II <input type="checkbox"/>	Prendere 20 µl e riscaldarli a 80°C per 3 min
22/II <input type="checkbox"/>	Andare al punto 27 e seguire il procedimento (esclusi i punti 28 e 37)

**C – FOCALIZZAZIONE ISOELETTRICA
PREFOCALIZZAZIONE**

27 <input checked="" type="checkbox"/>	Accendere il refrigerante, impostando la temperatura a 8-10°C
28 <input checked="" type="checkbox"/>	Prelevare i campioni trattati dal frigo
29 <input checked="" type="checkbox"/>	Prelevare il Gelbond e tagliarlo di lunghezza pari a 16,5 cm utilizzando la parte più omogenea o lasciarlo tal quale
30 <input checked="" type="checkbox"/>	Posizionarlo sulla piastra del Multiphor II, già bagnata con kerosene [R-171 Lotto <i>CC</i>]
31 <input checked="" type="checkbox"/>	Rimuovere l'eccesso di kerosene con carta da filtro

FEDERAZIONE MEDICO SPORTIVA ITALIANA LABORATORIO ANTIDOPING	FOGLIO DI LAVORO	FL119
RICERCA DI ERITROPOIETINA RICOMBINANTE E ANALOGHI		
Rif. MP031 - Allegato		Pag. 3/10 Rev. 9

32. <input checked="" type="checkbox"/>	Preparare la soluzione catodica aggiungendo a 1,9 ml di acqua ultrapura 100 µl di soluzione di anfoliti 6-8 [R-170 Lotto <i>007</i>] e 10 µl di RMET ³ [Lotto <i>007</i>]												
33. <input checked="" type="checkbox"/>	Posizionare sui lati più lunghi le strips imbevute rispettivamente della soluzione catodica ed anodica												
34. <input checked="" type="checkbox"/>	<p>Chiudere il supporto e impostare i seguenti parametri:</p> <p>Potenziale: 250 V Corrente: 17 mA (proporzionale alle dimensioni del Gel) Potenza: 17 W Durata: 30 min/ 60min</p> <p>O nel caso la lunghezza del gel sia pari a 25 cm:</p> <p>Potenziale: 250 V Corrente: 25 mA Potenza: 25 W Durata: 30 min/ 60min</p> <p>Completare la seguente tabella con i parametri di inizio e fine corsa:</p> <table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <thead> <tr> <th>Potenziale (V)</th> <th>Corrente (mA)</th> <th>Potenza (W)</th> <th>Tempo (min)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><i>189</i></td> <td><i>25</i></td> <td><i>5</i></td> <td><i>0</i></td> </tr> <tr> <td><i>250</i></td> <td><i>17.8</i></td> <td><i>4</i></td> <td><i>33'</i></td> </tr> </tbody> </table>	Potenziale (V)	Corrente (mA)	Potenza (W)	Tempo (min)	<i>189</i>	<i>25</i>	<i>5</i>	<i>0</i>	<i>250</i>	<i>17.8</i>	<i>4</i>	<i>33'</i>
Potenziale (V)	Corrente (mA)	Potenza (W)	Tempo (min)										
<i>189</i>	<i>25</i>	<i>5</i>	<i>0</i>										
<i>250</i>	<i>17.8</i>	<i>4</i>	<i>33'</i>										
35. <input checked="" type="checkbox"/>	Prelevare gli standard dal congelatore												
36. <input checked="" type="checkbox"/>	<p>Preparare gli standard:</p> <p>MISCELA BRP NESP 1-2 (BRNE1-2) Aggiungere 0,32 – 0,16 ng³ di BRP [BRP Lotto <i>015</i>] a 0,2 – 0,15ng³ di NESP [NESP Lotto <i>015</i>]</p> <p>MISCELA BRP NIBSC (BRNIB) Aggiungere 0,16 ng³ di BRP [BRP Lotto] a 0,0025 ng³ di NIBSC [NIBSC Lotto]</p> <p>MISCELA NESP NIBSC (NENIB) Aggiungere 0,15 ng³ di NESP [NESP Lotto] a 0,0025³ ng di NIBSC [NIBSC Lotto]</p> <p>SOLUZIONE NIBSC 0,02UI - 0,04UI (NIBSC1- 2) Prelevare dalla soluzione standard [NIBSC Lotto <i>041</i>] 10-20 µl, in modo tale da ottenere una soluzione da 0,02-0,04 UI</p> <p>SOLUZIONE MIRCERA (MIR) Prelevare 20 µl dalla soluzione standard di Mircera [MIR Lotto <i>005</i>]</p> <p>SOLUZIONE Dynepo (Dyn) Prelevare 20 µl dalla soluzione standard di Dynepo [Dyn Lotto]</p>												
37a. <input type="checkbox"/>	Scaldare i campioni a 87 °C per 6 min												
37b. <input checked="" type="checkbox"/>	aggiungere quantità sufficiente di urea poco a poco fino a saturazione <i>andare a punto 39</i>												
38. <input type="checkbox"/>	Immergere i campioni precedentemente scaldati, nel bagno refrigerante per 30 s												
39. <input checked="" type="checkbox"/>	<p>Aggiungere: -ai campioni il 10% di Surfacts-amps 80 (Tween 80) [R-166 Lotto <i>001</i>] per volume di ritentato</p> <p>-agli standard (eccetto Mircera) aggiungere 2,2 µl di Surfacts-amps 80 (Tween 80) [R-166 Lotto <i>001</i>] ogni 20 µl</p>												

³ 1 UI = 8 ng. E' consentito variare le quantità purchè la concentrazione raggiunta non superi quella corrispondente a 3 volte il LOD. E' consentito variare il volume di RMET purchè il rapporto fra il volume della soluzione di anfoliti 6-8 e quello totale resti invariato.

FEDERAZIONE MEDICO SPORTIVA ITALIANA LABORATORIO ANTIDOPING	FOGLIO DI LAVORO	FL119
RICERCA DI ERITROPOIETINA RICOMBINANTE E ANALOGHI		
Rif. MP031 - Allegato	Pag.	4/10
	Rev.	9

FOCALIZZAZIONE

40	Aprire il supporto e posizionare le strips portacampioni (o applicatori a pozzetto) dalla parte del catodo nel numero corrispondente ai campioni ed agli standard
41	<p>Prelevare i campioni e gli standard e posizionarli sulle strips⁴ secondo il seguente schema.</p> <p>BRNIB NENIB Dyn⁵ MIR NIBSC (1 o 2) BRNE (1 o 2) Bur⁵ USPrEPO⁵ CAMPIONI BRNE (1 o 2) NENIB BRNIB</p> <p>Oppure nel caso la lunghezza del gel sia pari a 25 cm:</p> <p>NIBSC (1 o 2) BRNE (1 o 2) Bur⁵ USPrEPO⁵ CAMPIONI BRNE (1 o 2) CAMPIONI BRNE (1 o 2) CAMPIONI NIBSC (1 o 2) BRNE (1 o 2) NIBSC (1 o 2) Dyn⁵ MIR</p>

Compilare la tabella seguente in base alla sequenza di caricamento:

Posizione	Campione	Volume di ritentato (µl)
1		
2	BRNIB + NENIB	10 ± 10
3	ME 003 AL 035	44
4		
5		
6		
7		
8		

⁴ Quantitativo massimo per ogni strip/pozzetto: 20 µl. In caso di volumi superiori, sovrapporre un'altra strip e ripetere l'operazione. La posizione degli standard può anche essere variata, purchè i campioni restino in posizione centrale. La sequenza descritta è indicativa.

⁵ Il BUR è obbligatorio solo in sede di conferma; in base alla sostanza da confermare sarà impiegata la USP corrispondente; in sede di screening è possibile omettere la presenza dello standard di Dynepo.

FEDERAZIONE MEDICO SPORTIVA ITALIANA LABORATORIO ANTIDOPING	FOGLIO DI LAVORO	FL119
RICERCA DI ERITROPOIETINA RICOMBINANTE E ANALOGHI		

Rif. MP031 - Allegato

Pag.	5/10
Rev.	9

9		
10		
11		
12		
13		
14	BRP + NESP	(6+10)
15		
16		
17		
18		
19		
20		
21		
22		
23		
24		
25	WISC	20
26	BRP + NESP	(6+10)
27	HR	20
28		
29		
30		

42. Chiedere il supporto e impostare i seguenti parametri:
 Potenziale: 2000 V
 Corrente: 17 mA
 Potenza: 17 W
 Potenziale per ora: 3600 Vh
 O nel caso la lunghezza del gel sia pari a 25 cm:
 Potenziale: 2000 V
 Corrente: 25 mA
 Potenza: 25 W
 Potenziale per ora: 4000 Vh
 Completare la seguente tabella con i parametri di inizio e fine corsa:
- | Potenziale (V) | Corrente (mA) | Potenza (W) | Potenziale per ora (Vh) | Tempo (min) |
|----------------|---------------|-------------|-------------------------|-------------|
| 333 | 25 | 8 | 1 | 01 |
| 1615 | 15.5 | 25 | 4000 | 3,15 |
43. Tagliare due rettangoli di Durapore e Immobilon P e 16 rettangoli di carta da filtro⁶ o simile delle dimensioni di 8 (esatti) x 16,5 cm. Nel caso la lunghezza del gel sia pari a 25 cm, le dimensioni sono 8 x 22,5 cm.
44. Preparare GLI-TRIS aggiungendo a 7,21 g di Glicina [R-164 Lotto 009] 1,51g di Trizmabase [R-167 Lotto 009] e portando a volume con acqua ultrapura in un matraccio da 500 ml.
45. Quando il potenziale ha raggiunto circa 2800 Vh, preparare tre vaschette delle dimensioni di 25 x 25 x 8h cm contenenti rispettivamente metanolo [R-038 Lotto 593], acqua ultrapura e GLI-TRIS

⁶ E' consentito variare il numero dei fogli a seconda dello spessore della carta.

FEDERAZIONE MEDICO SPORTIVA ITALIANA LABORATORIO ANTIDOPING	FOGLIO DI LAVORO	FL119
--	------------------	-------

RICERCA DI ERITROPOIETINA RICOMBINANTE E ANALOGHI

Rif. MP031 - Allegato

Pag.	6/10
Rev.	9

46	<input checked="" type="checkbox"/>	Immergere un rettangolo della Immobilon P nella vaschetta contenente metanolo per 1 minuto, quindi immergerla in quella contenente acqua per 2 minuti e quindi in quella contenente GLI-TRIS per almeno 20 minuti e posizionarla sullo Slow mixer.															
47	<input checked="" type="checkbox"/>	Immergere un rettangolo della Durapore nella vaschetta contenente GLI-TRIS per almeno 20 minuti e posizionarla sullo Slow mixer.															
48	<input checked="" type="checkbox"/>	Quando la corsa elettroforetica è a circa 3500Vh nel caso lunghezza del gel sia pari a 16,5 cm o 3900Vh nel caso la lunghezza sia pari a 25 cm, appoggiare ai bordi della vaschetta contenente GLI-TRIS i fogli di carta da filtro in due pacchetti da quattro ciascuno ⁶ , in modo tale che si imbevano di soluzione per capillarità.															
49	<input type="checkbox"/>	<p>Prolungare la corsa</p> <p>SI <input type="checkbox"/></p> <p>NO <input type="checkbox"/> andare al punto 50</p> <p>Al termine della corsa (3600Vh nel caso lunghezza del gel sia pari a 16,5 cm o 4000Vh nel caso la lunghezza sia pari a 25 cm), impostare i seguenti parametri per 10-15 minuti max:</p> <p style="padding-left: 20px;">Potenziale: 2500 V Corrente: 17 mA Potenza: 34 W Potenziale per ora: 500 Vh</p> <p>O nel caso la lunghezza del gel sia pari a 25 cm:</p> <p style="padding-left: 20px;">Potenziale: 2500 V Corrente: 25 mA Potenza: 50 W Potenziale per ora: 500 Vh</p> <p>Completare la seguente tabella con i parametri di inizio e fine corsa:</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 15%;">Potenziale (V)</th> <th style="width: 15%;">Corrente (mA)</th> <th style="width: 15%;">Potenza (W)</th> <th style="width: 15%;">Potenziale per ora (Vh)</th> <th style="width: 15%;">Tempo (min)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td> </td> <td> </td> <td> </td> <td> </td> <td> </td> </tr> <tr> <td> </td> <td> </td> <td> </td> <td> </td> <td> </td> </tr> </tbody> </table>	Potenziale (V)	Corrente (mA)	Potenza (W)	Potenziale per ora (Vh)	Tempo (min)										
Potenziale (V)	Corrente (mA)	Potenza (W)	Potenziale per ora (Vh)	Tempo (min)													

50	<input checked="" type="checkbox"/>	Eseguire il controllo visivo per verificare l'uniformità della migrazione del rosso metile e se possibile fotografare il gel
----	-------------------------------------	--

D - PRIMO BLOTTING

51	<input type="checkbox"/>	E' possibile immergere il gel in una vaschetta contenente Gli-Tris 2 (preparata di fresco pesando 3,02 g di Trizma, 7,21 g di Glicina e portando a un volume pari a 500ml con acqua ultrapura)
52	<input checked="" type="checkbox"/>	Posizionare il Gelbond sul film remover e tagliarlo in modo che la larghezza sia esattamente 8 cm e la lunghezza 16,5 cm o 22,5 cm.
53	<input checked="" type="checkbox"/>	Prelevare dalla vaschetta il rettangolo della Durapore e sovrapporlo rapidamente al Gel e analogamente sovrapporvi il rettangolo della Immobilon P e quindi un pacchetto di carta da filtro prelevati dalle vaschette.
54	<input type="checkbox"/>	Sovraporre quindi un rettangolo di parafilm, facendo pressione con un rullo, per eliminare le bolle d'aria.
55	<input checked="" type="checkbox"/>	Capovolgere l'insieme (pacchetto, Immobilon P, Durapore e gel) sulla piastra Multiphor II
56	<input checked="" type="checkbox"/>	Rimuovere il gel dal Gelbond e sovrapporvi rapidamente il secondo pacchetto di carta da filtro
57	<input checked="" type="checkbox"/>	Sovraporre quindi un rettangolo di parafilm, facendo pressione con un rullo, per eliminare le bolle d'aria.

FEDERAZIONE MEDICO SPORTIVA ITALIANA LABORATORIO ANTIDOPING	FOGLIO DI LAVORO	FL119
RICERCA DI ERITROPOIETINA RICOMBINANTE E ANALOGHI		
Rif. MP031 - Allegato		Pag. 7/10
		Rev. 9

58	<p>Chiudere il supporto e impostare i seguenti parametri:</p> <p>Potenziale: 40 V Corrente: Area del gel Potenza: 90 W Durata: 30 min</p> <p>Completare la seguente tabella con i parametri di inizio e fine corsa:</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Potenziale (V)</th> <th>Corrente (mA)</th> <th>Potenza (W)</th> <th>Tempo (min)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>9</td> <td>192</td> <td>2</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>22</td> <td>192</td> <td>4</td> <td>30</td> </tr> </tbody> </table>	Potenziale (V)	Corrente (mA)	Potenza (W)	Tempo (min)	9	192	2	5	22	192	4	30
Potenziale (V)	Corrente (mA)	Potenza (W)	Tempo (min)										
9	192	2	5										
22	192	4	30										
59	<p>Preparare PBS e DTT.</p> <p>PBS Portare a volume con acqua ultrapura in un matraccio da 1000 ml 5 tavolette di tampone fosfato salino [R-165 Lotto 032]. Mescolare mediante agitatore elettromagnetico.</p> <p>DTT Portare a volume con PBS in un matraccio da 250 ml 192,8 mg ditiotreitolo [R-182 Lotto 032]. Tale soluzione deve essere utilizzata entro trenta minuti dalla preparazione, causa ossidazione.</p>												
60	<p>Al termine della migrazione, dopo aver aperto il supporto</p> <p>Mettere in una vaschetta da 30x 15 x 8 cm 250 ml di DTT e immergervi il rettangolo di Immobilon P (IP1)</p>												
61	<p>Posizionare la vaschetta per 60 minuti in incubatore a 37°C.</p>												
62	<p>Preparare le soluzioni LFM</p> <p>LFM 5% Portare a volume con PBS in un matraccio da 250 ml 12,5 g di latte in polvere a bassi grassi [R-178 Lotto 032]. Agitare con agitatore magnetico.</p> <p>LFM 1% Portare a volume con PBS in un matraccio da 100 ml 1 g di latte in polvere a bassi grassi [R-178 Lotto 032]. Agitare con agitatore magnetico.</p>												
63	<p>Lavare la IP1 con PBS, mettere in una vaschetta da 30x 15 x 8 cm 250 ml di LFM 5% e immergervi il rettangolo di IP1</p>												
64	<p>Posizionare la vaschetta sullo Slow mixer per 60 min</p>												
65	<p>Lavare la IP1 con PBS</p>												
66	<p>Preparare la soluzione Clone AE75A</p> <p>Aggiungere 40 µl⁷ di anticorpo antiiepo [R-173 Lotto 032] a 40 ml di LFM 1%</p>												
67	<p>Mettere in una vaschetta di vetro da 17x 8 cm (dimensioni interne-oppure da 25x 13 cm in caso di gel da 25 cm) 40 ml di soluzione Clone AE75A e immergervi la IP1</p>												
68	<p>Posizionare la vaschetta sullo Slow mixer per 60 min: in caso di tempi superiori, porre lo Slow mixer in frigorifero (in quest'ultimo caso dopo aver tolto la vaschetta dal frigorifero lasciarla ad agitare sullo Slow mixer a T ambiente per circa 20 min)</p>												

⁷ Nel caso di vaschette di dimensioni interne: 25x 13 cm, considerare un volume totale di 50 ml o quindi variare opportunamente le proporzioni fra i reattivi.

FEDERAZIONE MEDICO SPORTIVA ITALIANA LABORATORIO ANTIDOPING	FOGLIO DI LAVORO	FL119
RICERCA DI ERITROPOIETINA RICOMBINANTE E ANALOGHI		
Rif. MP031 - Allegato		Pag. 8/10 Rev. 9

- 69 Preparare le soluzioni:
 -PBS

 -LFM 0,5%
 Portare a volume con PBS in un matraccio da 2000 ml 10 g di latte in polvere a bassi grassi [R-178 Lotto 32]. Agitare con agitatore magnetico.
 -250 ml di:
 LFM 5%
 INK: aggiungere 250 µl di Indian ink [R-177 Lotto] a 250 ml di LFM 5% precedentemente preparato
- 70 Lavare in una vaschetta da 30x 15 x 8 cm la IP1 con la soluzione LFM 0,5%, ponendola sullo Slow mixer per 1 minuto
- 71 Effettuare tale lavaggio per altre tre volte ponendo la vaschetta sullo Slow mixer per 10 minuti

E - SECONDO BLOTTING

- 72 Preparare l'acido acetico 0,7%
 Portare a volume con acqua ultrapura in un matraccio da 500 ml 3,5 ml di acido acetico [R-003 Lotto 12].
 - 73 Preparare tre vaschette delle dimensioni di 25 x 25 x 8h cm contenenti rispettivamente metanolo, acqua ultrapura e acido acetico 0,7%
 - 74 Immergere un rettangolo della Immobilon P nella vaschetta contenente metanolo [R-038 Lotto 313] per 1 minuto, quindi immergerla in quella contenente acqua per 2 minuti e quindi in quella contenente acido acetico 0,7% per almeno 20 minuti
 - 75 Immergere un rettangolo della Durapore nella vaschetta contenente acido acetico allo 0,7% per almeno 20 minuti.
 - 76 5 minuti prima di utilizzarli, appoggiare ai bordi della vaschetta contenente acido acetico 0,7% i fogli di carta da filtro o simile in due pacchetti da quattro ciascuno⁶, in modo tale che si imbevano di soluzione per capillarità
 - 77 Sulla piastra del Nova Blot posizionare il pacchetto da quattro fogli di carta da filtro
 - 78 Lavare la IP1 con PBS e sovrapporla rapidamente al pacchetto
 - 79 Sovrapporre rapidamente la Durapore
 - 80 Sovrapporre rapidamente la Immobilon P (al termine della corsa nominata IP2)
 - 81 Sovrapporre rapidamente il pacchetto da quattro fogli di carta da filtro⁶
 - 82 Sovrapporre quindi un rettangolo di parafilm, facendo pressione con un rullo, per eliminare le bolle d'aria.
 - 83 Chiudere il supporto e impostare i seguenti parametri:
 Potenziale: 35 V
 Potenza: 40 W
 Corrente: 0,8 mA x Area del gel
 Durata: 10 min

 Completare la seguente tabella con i parametri di inizio e fine corsa:
- | Potenziale (V) | Corrente (mA) | Potenza (W) | Tempo (min) |
|----------------|---------------|-------------|-------------|
| 4 | 154 | 1 | 0' |
| 8 | 154 | 1 | 10' |

FEDERAZIONE MEDICO SPORTIVA ITALIANA LABORATORIO ANTIDOPING		FOGLIO DI LAVORO	FL119
RICERCA DI ERITROPOIETINA RICOMBINANTE E ANALOGHI			
Rif. MP031 - Allegato		Pag.	9/10
		Rev.	9
84. <input checked="" type="checkbox"/>	Si è interrotta l'analisi all'incubazione con l'anticorpo primario		
	SI <input type="checkbox"/>	NO <input checked="" type="checkbox"/> andare al punto 85	
	Preparare la soluzione LFM 1% Portare a volume con PBS in un matraccio da 100 ml 1 g di latte in polvere a bassi grassi [R-178 Lotto C37]. Agitare con agitatore magnetico.		
85. <input checked="" type="checkbox"/>	Al termine della seconda migrazione aprire il supporto, prelevare il rettangolo di IP2 e immergerlo in una vaschetta da 30x 15 x 8 cm 250 ml di LFM 5% (oppure INK); immergere la IP1 in una vaschetta contenente PBS e conservarla in frigo fino al termine dell'analisi.		
86. <input checked="" type="checkbox"/>	Posizionare la vaschetta sullo Slow mixer per 60 min.		
87. <input checked="" type="checkbox"/>	Lavare la IP2 con PBS		
88. <input checked="" type="checkbox"/>	Preparare ANTI IgG Aggiungere: <input checked="" type="checkbox"/> 26 µl di anticorpo segnato con la biotina Pierce [R-175 Lotto C37] a 40 ml di LFM 1% <input type="checkbox"/> 10 µl di anticorpo segnato con la biotina Paris [R-175 Lotto C37] a 40 ml di LFM 1%		
89. <input checked="" type="checkbox"/>	Mettere in una vaschetta di vetro da 17x 8 cm (dimensioni interne-opp. da 25x13 in caso di gel da 25 cm) 40 ml di soluzione ANTI IgG e immergervi la IP2		
90. <input checked="" type="checkbox"/>	Posizionare la vaschetta sullo Slow mixer per 90 min, in caso di tempi superiori posizionare lo Slow mixer in frigo (in quest'ultimo caso dopo aver tolto la vaschetta dal frigorifero lasciarla sulla Slow mixer a T ambiente per circa 20 min)		
91. <input checked="" type="checkbox"/>	Preparare le soluzioni PBS la soluzione LFM 0,5% Portare a volume con PBS in un matraccio da 2000 ml 10 g di latte in polvere a bassi grassi [R-178 Lotto C37]. Agitare con agitatore magnetico.		
92. <input checked="" type="checkbox"/>	Lavare in una vaschetta da 30x 15 x 8 cm la IP2 con la soluzione LFM 0,5%, ponendola sullo Slow mixer per 1 minuto		
93. <input checked="" type="checkbox"/>	Ripetere tale lavaggio altre due volte		
94. <input checked="" type="checkbox"/>	Effettuare tale lavaggio per altre tre volte ponendo la vaschetta sullo Slow Mixer per 12 minuti.		
95. <input type="checkbox"/>	Si è interrotta l'analisi all'incubazione con l'anticorpo secondario:		
	SI <input checked="" type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/> andare al punto 96	
	Preparare la soluzione LFM 1%: Portare a volume con PBS in un matraccio da 100 ml 1 g di latte in polvere a bassi grassi [R-178 Lotto C37]. Agitare con agitatore magnetico.		
96. <input checked="" type="checkbox"/>	Preparare la soluzione Perossidasi <input checked="" type="checkbox"/> Aggiungere 150 µl di streptavidina perossidasi Pierce [R-174 Lotto C37] a 40 ml di LFM 1% <input type="checkbox"/> Aggiungere 20 µl di streptavidina perossidasi Biospa [R-174 Lotto C37] a 40 ml di LFM 1%		
97. <input checked="" type="checkbox"/>	Lavare la IP2 con PBS		
98. <input checked="" type="checkbox"/>	Mettere in una vaschetta di vetro da 17x 8 cm (dimensioni interne-opp. da 25x13 in caso di gel da 25 cm) 40 ml di soluzione Perossidasi e immergervi la IP2		
99. <input checked="" type="checkbox"/>	Posizionare la vaschetta sullo Slow Mixer per almeno un'ora		
100. <input checked="" type="checkbox"/>	Lavare in una vaschetta da 30x 15 x 8 cm la IP2 con la soluzione PBS, ponendola sullo Slow Mixer per 1 minuto		
101. <input checked="" type="checkbox"/>	Ripetere tale lavaggio per altre due volte		
102. <input checked="" type="checkbox"/>	Effettuare tale lavaggio per altre tre volte ponendo la vaschetta sullo Slow Mixer per 10 minuti		

FEDERAZIONE MEDICO SPORTIVA ITALIANA LABORATORIO ANTIDOPING	FOGLIO DI LAVORO	FL119
RICERCA DI ERITROPOIETINA RICOMBINANTE E ANALOGHI		
Rif. MP031 - Allegato		Pag. 10/10
		Rev. 9

103	<input checked="" type="checkbox"/>	Preparare <input checked="" type="checkbox"/> subito prima di utilizzarla la soluzione Covalight, mescolando uguali volumi (15 ml + 15 ml) ⁷ delle due soluzioni West Pico Pierce [R-176 Lotto 048]; <input type="checkbox"/> 10 minuti prima del suo utilizzo la soluzione Covalight, conservandola al buio; aggiungendo 25 gocce di CovB [R-176 B Lotto] in 25 ml di CovA [R-176 A Lotto] ⁷ .
104	<input checked="" type="checkbox"/>	Mettere in una vaschetta di vetro da 17x 8 cm (dimensioni interne-oppure da 25x 13 in caso di gel da 25 cm) la soluzione Covalight preparata al punto precedente e immergervi la IP2
105	<input checked="" type="checkbox"/>	Agitare la vaschetta per qualche secondo

F - RIVELAZIONE MEDIANTE CHEMILUMINESCENZA

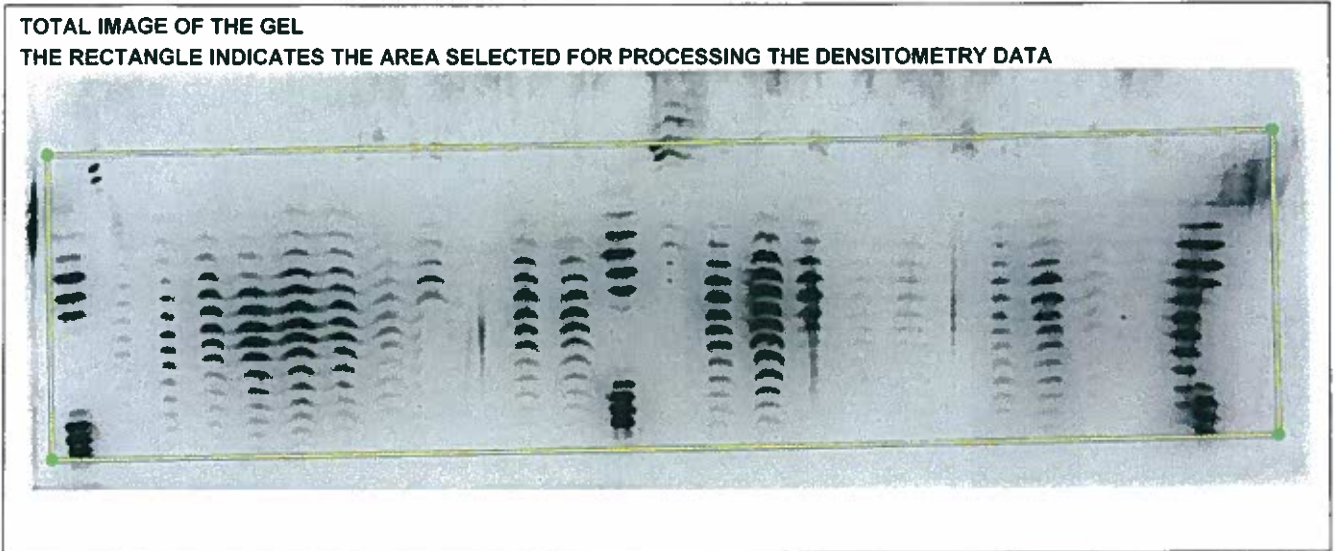
106	<input checked="" type="checkbox"/>	Posizionare la IP2 nel rivelatore.
107	<input checked="" type="checkbox"/>	Esponila per: <input type="checkbox"/> 1 minuto <input checked="" type="checkbox"/> 5 minuti <input type="checkbox"/> 10 minuti <input checked="" type="checkbox"/> 15 minuti <input type="checkbox"/> 30 minuti

NO Si sono verificate non conformità durante lo svolgimento della procedura ?
 SI vedere Rapporto FL053 N° _____

Operatore Sigla e Firma	Data	Operazioni eseguite
<i>[Handwritten Signature]</i>	6/5/20	da punto [1] a punto [24]
<i>[Handwritten Signature]</i>	10/8/20	da punto [27] a punto [48]
<i>[Handwritten Signature]</i>	11/5/20	da punto [71] a punto [102]
		da punto [] a punto []
		da punto [] a punto []
		da punto [] a punto []
		da punto [] a punto []

11.2.4 Initial testing procedure Test Results

Gel images and data of positive control (BRNE and Mir), negative control (NIBSC), sample internal laboratory code 10E003 A4433 as obtained after the initial testing procedure analysis



GENERAL VIEW OF ALL THE PROCESSED LANES

11/05/2010
16.01

GASepo Analysis Report

Session: Analysis 100511-30min-002.tif 2010-05-11
Image File: 100511-30min-002.tif
Operator:

Laboratory: Laboratory
Date of Analysis: 11/05/2010
12.38

1. E	2. 10	3. 10	4. 10	5. 10	6. 10	7. 10	8. 10	9. 10	10. 1	11. 1	12. 1	13. E	14. 1	15. 1	16. 1	17. 1	18. 1	19. 1	20. 1	21. 1	22. 1	23. 1	24. 1	25. 26.	27.
52,4	55,7	19,4	39,8	14,5	24,4	25,4	26,2	69,6	100	28,6	18,8	46,0	100	29,2	22,8	41,4	21,2	44,8	24,1	32,7	32,0	33,7	99,1	21,47,1	100
47,6	2,4%	7,3%	3,6%	7,0%	8,0%	5,8%	6,1%	0,0%	0,0%	3,8%	4,1%	54,0	0,0%	9,2%	5,5%	0,0%	1,2%	0,5%	0,0%	9,5%	7,9%	0,8%	0,0%	2,52,8	0,0%

© 2004-2005 WADA. All rights reserved. WADA-0100-01-05

POSITIVE CONTROL: RHEPO AND NESP STANDARDS (BRNE)

11/05/2010
16.01

Session: Analysis 100511-30min-002.tif 2010-05-11
Image File: 100511-30min-002.tif
Operator:

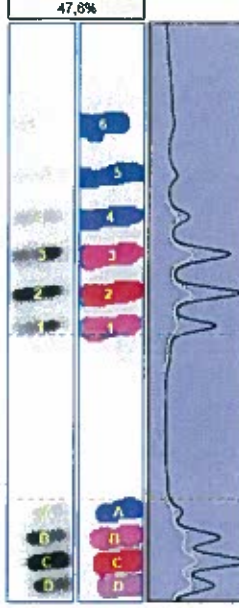
GASepo Analysis Report

GAS
epo

Laboratory: Laboratory
Date of Analysis: 11/05/2010
12.38

1. EPOαβ + Darba

52.4%
47.6%



Lane #1: EPOαβ + Darba

Name	Comment	CentX	CentY	Volume Abs	Volume nSum	Volume nMax	Height Abs	Height nSum	Height nMax
6		11.8	55.1	328.2	0.3	1.7	3.3	0.4	2.1
5		19.7	81.7	377.2	0.4	1.9	5.6	0.7	3.5
4		15.7	106.0	4203.0	4.3	21.4	33.3	4.1	21.0
3		17.0	127.0	14262.3	14.7	72.8	119.3	14.8	75.3
2		15.1	148.3	17858.3	16.4	90.9	124.2	15.4	78.4
1		16.4	166.8	12997.6	13.4	66.1	108.9	13.5	68.8
A		20.7	268.1	3477.8	3.6	17.7	28.7	3.6	18.1
B		18.7	282.8	12791.5	13.2	65.1	114.1	14.1	72.0
C		20.2	285.9	19652.7	20.3	100.0	158.4	19.6	100.0
D		20.9	309.0	9588.2	9.9	48.8	97.3	12.0	61.4

NEGATIVE CONTROL: URINARY EPO STANDARD (NIBSC)

11/05/2010
16.02

Session: Analysis 100511-30min-002.tif 2010-05-11
Image File: 100511-30min-002.tif
Operator:

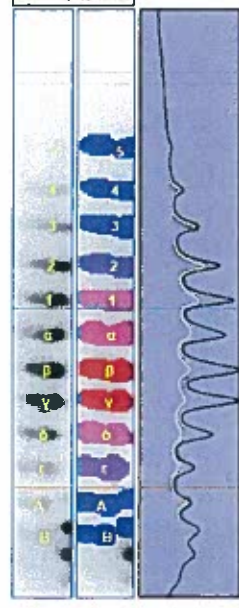
GASepo Analysis Report

GAS
epo

Laboratory: Laboratory
Date of Analysis: 11/05/2010
12.38

25 Nibsc

21.4%
2.6%



Lane #25: Nibsc

Name	Comment	CentX	CentY	Volume Abs	Volume nSum	Volume nMax	Height Abs	Height nSum	Height nMax
5		22.0	76.4	113.5	0.1	0.6	3.1	0.4	1.9
4		19.6	97.1	975.1	1.2	5.5	15.1	1.7	9.2
3		19.5	116.3	1860.7	2.0	9.3	25.9	3.0	15.9
2		19.0	138.1	4724.0	5.7	28.7	64.2	7.3	39.3
1		17.9	156.9	10267.3	12.4	58.1	126.3	14.4	77.4
α		17.6	175.5	11701.9	14.7	68.3	129.6	14.8	79.4
β		16.8	194.8	17862.4	21.4	100.0	153.0	17.5	90.7
γ		16.3	211.4	17557.9	21.2	99.4	163.3	18.7	100.0
δ		15.1	229.2	10103.2	12.2	57.2	101.9	11.7	62.4
ε		14.3	247.6	5776.0	7.0	32.7	50.9	5.8	31.1
A		12.6	268.0	1981.3	2.3	10.5	29.8	3.4	18.3
B		15.7	284.6	305.2	0.4	1.7	11.5	1.3	7.0

POSITIVE CONTROL: MIRCERA (MIR)

11/05/2010
16.02

Session: Analysis 100511-30min-002.tif 2010-05-11
Image File: 100511-30min-002.tif
Operator:

GASepo Analysis Report

Laboratory: Laboratory
Date of Analysis: 11/05/2010
12.38

27 Mir
100.0%
0.0%

Lane #27. Mir									
Name	Comment	CentX	CentY	Volume Abs	Volume nSum	Volume nMax	Height Abs	Height nSum	Height nMax
4		17,4	37,9	1927,1	2396,8	58,6	19,7	621,3	79,2
3		14,4	48,6	2906,5	3615,0	86,4	25,2	794,4	100,0
2		15,1	62,1	3288,5	4090,0	100,0	21,1	687,9	84,1
1		14,4	73,7	3137,2	3901,9	95,4	23,0	727,8	91,6

12.4

GASepo software (c) 2004-2010 Software Development Group, J. L. Garcia

Report Page 27/30

SAMPLE INTERNAL LABORATORY CODE 10E003 A4433

11/05/2010
16.01

Session: Analysis 100511-30min-002.tif 2010-05-11
Image File: 100511-30min-002.tif
Operator:

GASepo Analysis Report

Laboratory: Laboratory
Date of Analysis: 11/05/2010
12.38

2 10E003 A4433
55.7%
2.4%

Lane #2: 10E003 A4433									
Name	Comment	CentX	CentY	Volume Abs	Volume nSum	Volume nMax	Height Abs	Height nSum	Height nMax
8		8,0	44,3	161,4	1,7	8,3	3,0	2,8	21,9
7		10,9	55,5	362,4	4,0	19,8	4,3	4,1	32,0
6		13,9	69,5	1936,1	20,0	100,0	12,1	11,6	89,5
5		15,1	81,2	1000,6	10,3	51,7	10,1	9,7	75,2
4		18,3	83,9	621,2	6,4	32,1	5,6	5,4	41,6
3		18,2	115,1	515,9	5,3	26,6	6,1	5,8	45,2
2		17,9	137,0	710,6	7,3	36,7	9,8	9,4	72,4
1		17,6	155,0	1138,4	11,8	58,8	13,5	12,9	100,0
α		17,9	173,5	1242,8	12,8	64,2	12,5	12,0	93,1
β		17,9	191,9	1365,5	14,1	70,5	12,1	11,6	89,6
γ		17,7	207,5	1280,0	13,2	66,1	13,2	12,7	97,8
δ		19,8	223,3	529,9	5,5	27,4	5,8	5,6	42,9
ε		19,4	241,1	442,3	4,6	22,8	4,2	4,1	31,5
A		17,0	260,0	188,4	1,9	9,7	2,0	1,9	14,8
B		19,3	275,1	87,6	0,9	4,5	1,5	1,4	10,8
C		23,4	290,8	4,8	0,0	0,2	0,3	0,3	2,6
D		25,8	305,3	1,1	0,0	0,1	0,1	0,1	0,9

12.3

GASepo software (c) 2004-2010 Software Development Group, J. L. Garcia

Report Page 27/30

II.2.5 Repetition of initial testing procedure – Aliquot chain of custody documentation

The sample analysis was repeated since the first analysis did not fulfilled the internal quality control (drift on several lanes)

Worksheet for the repeated testing procedure

FEDERAZIONE MEDICO SPORTIVA ITALIANA LABORATORIO ANTIDOPING	FOGLIO DI LAVORO	FL119
RICERCA DI ERITROPOIETINA RICOMBINANTE E ANALOGHI		
Rif. MP031 - Allegato	Pag. 1/10	Rev. 9

Data e ora di inizio analisi: 11/05/10 ore 8.20

Lotto di accettazione	Codice campioni preparati
<u>10E003</u>	DA: <u>44633R4</u> A: _____
	DA: _____ A: _____

A - PREPARAZIONE DEL GEL 17 X 8 X 0,1CM

1 <input checked="" type="checkbox"/>	Pesare 14,71 g di urea [R-181 Lotto <u>017</u>], 1,75 g di saccarosio [R-306 Lotto <u>007</u>] e trasferirli in un pallone di reazione da 100 ml posto su un agitatore elettromagnetico
2 <input checked="" type="checkbox"/>	Aggiungere 14,17 ml di acqua ultrapura e 1,89 ml di anfolita 2-4 [R-168 Lotto <u>041</u>], 1,89ml di anfolita 4-6 [R-169 Lotto <u>041</u>] e 4,74 ml di soluzione di bisacrilamide 40% [R-184 Lotto <u>008</u>]
3 <input checked="" type="checkbox"/>	Tappare il pallone e collegarlo ad una pompa da vuoto per 15 min.
4 <input checked="" type="checkbox"/>	Nel frattempo (durante i 15 minuti): a) detergere le lastre con etanolo assoluto [R-033 Lotto <u>023</u>] b) far aderire il Gelbond alla lastra di supporto ponendovi l'opportuna quantità di acqua ultrapura c) eliminare le eventuali bolle d'aria e l'acqua in eccesso ponendo sul Gelbond un foglio di carta da filtro e facendo pressione con un rullo d) sovrapporre la seconda lastra e) bloccare le lastre con le apposite pinze
5 <input checked="" type="checkbox"/>	Preparare l'APS sciogliendo in una vial di plastica da 1,5 ml con tappo 100 mg di persolfato d'ammonio [R-179 lotto <u>002</u>] in 1 ml di acqua ultrapura e agitando manualmente
6 <input checked="" type="checkbox"/>	Aggiungere 31 µl di TEMED [R-160 Lotto <u>003</u>] e 310 µl di APS nel pallone
7 <input checked="" type="checkbox"/>	Lasciare 30 s in agitazione
8 <input checked="" type="checkbox"/>	Prelevare la soluzione di gel mediante pipetta e trasferirla rapidamente fra le due lastre, avendo cura di non generare bolle d'aria
9 <input checked="" type="checkbox"/>	Lasciare il gel per almeno tre ore nella camera umida

B- PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

I per screening e conferma (non SDS PAGE) A (per la purificazione per immunoaffinità) andare al FL162

10/ <input checked="" type="checkbox"/>	Condizionare il campione a temperatura ambiente e preparare la soluzione Complete portando a volume con acqua ultrapura in un matraccio da 10 ml 5 tavolette di Complete ¹ [R-172 Lotto <u>036</u>] e mescolando mediante agitatore elettromagnetico
11/ <input checked="" type="checkbox"/>	Prelevare 20 ml di urina (in caso di prelievi inferiori, portare a 20 ml con TRISHCI 50 mM [TRISHCI 50-Lotto _____]) e trasferirli in una provetta da 50 ml <u>GL 11/05/10</u>
12/ <input checked="" type="checkbox"/>	Aggiungere 400 µl di soluzione Complete (200 µl ogni 10 ml di urina)
13/ <input checked="" type="checkbox"/>	Aggiungere 2 ml di TRISHCI 3,75M [TRISHCI 3.75 Lotto _____] (1ml ogni 10 ml di urina)
14/ <input checked="" type="checkbox"/>	Controllare il pH con delle strips indicatrici in modo che sia compreso fra 6,8 e 7,9; in caso non risulti nel range, correggerlo con tampone TRISHCI 3,75M [TRISHCI 3.75-Lotto _____] <u>GL 11/05/10</u>
15/ <input checked="" type="checkbox"/>	Centrifugare per 10 min nella centrifuga refrigerata a 20°C con rotore basculante a 3000 rcf

¹ E' possibile preparare quantità differenti purchè restino invariate le proporzioni.

² In caso di urina diluita e prelievi maggiori, prelevare le quantità di Complete e di TRISHCI 3,75M rispettando i rapporti fra i reattivi.

* Esatto risultato residuo

FEDERAZIONE MEDICO SPORTIVA ITALIANA LABORATORIO ANTIDOPING	FOGLIO DI LAVORO	FL119
RICERCA DI ERITROPOIETINA RICOMBINANTE E ANALOGHI		
Rif. MP031 - Allegato	Pag.	2/10
	Rev.	9

16/1 <input checked="" type="checkbox"/>	Applicare alle provette il componente della filtrazione del kit Steriflip, assemblandolo in posizione verticale
17/1 <input checked="" type="checkbox"/>	Ruotare delicatamente di 180° il Kit assemblato
18/1 <input checked="" type="checkbox"/>	Collegarlo alla pompa da vuoto per la filtrazione
19/1 <input checked="" type="checkbox"/>	Trasferire il filtrato nelle provette amicon ultra-15
20/1 <input checked="" type="checkbox"/>	Centrifugare per 20 min nella centrifuga refrigerata a 20°C con rotore basculante a 3500 rcf
21/1 <input checked="" type="checkbox"/>	Eliminare il filtrato e lavare il filtro riempiendo la parte superiore della Amicon ultra-15 con TRISHCl 50 mM [TRISHCl 50 Lotto 1.3.1] e 400 µl di soluzione Complete (200µl ogni 10 ml di urina)
22/1 <input checked="" type="checkbox"/>	Centrifugare per 20 min nella centrifuga refrigerata a 20°C con rotore basculante a 3500 rcf
23/1 <input checked="" type="checkbox"/>	Nel frattempo lavare le Amicon ultra-4 con 2 ml di acqua ultrapura ponendole a centrifugare a 5000 rpm per 20 min nella centrifuga refrigerata a 17°C con rotore ad angolo fisso.
24/1 <input type="checkbox"/>	Prelevare con una micropipetta dalla parte superiore della Amicon ultra-15 il residuo (circa 120µl) e trasferirlo nelle Amicon ultra-4 precedentemente lavate (anche se si usa il FL162)
25/1 <input checked="" type="checkbox"/>	Centrifugare a 6200 rpm per 60 min nella centrifuga refrigerata a 17°C con rotore ad angolo fisso
26/1 <input checked="" type="checkbox"/>	Misurare il volume di ritentato, trasferirlo in una vial di raccolta e conservare in frigorifero (nel caso si intenda utilizzare oltre le 24 h, conservare in congelatore a -20°C)

II (PER TEST DI STABILITÀ)

10/II <input type="checkbox"/>	Centrifugare 0.6 ml di urina per 10 min a 20°C con rotore basculante a 2700 rcf
11/II <input type="checkbox"/>	Mettere 0,5 ml di sovrantante in una provetta Microcon
12/II <input type="checkbox"/>	Aggiungere 20 µl di Pepstatina A e 5 µl di soluzione Complete
13/II <input type="checkbox"/>	Centrifugare a 6200 rpm per 20 min nella centrifuga refrigerata a 17°C con rotore ad angolo fisso, concentrando fino ad un volume approssimativo di 30 µl
14/II <input type="checkbox"/>	Aggiungere 200 µl di tampone acetato 50 mM nel restante campione e mescolare con vortex prima di capovolgerlo
15/II <input type="checkbox"/>	Capovolgere la Microcon e centrifugare a 3000 rpm per 10 min nella centrifuga refrigerata a 17°C con rotore ad angolo fisso
16/II <input type="checkbox"/>	Portare il volume del campione recuperato fino a 0,5 ml con tampone acetato 50 mM
17/II <input type="checkbox"/>	Aggiungere 20 µl di Pepstatina A e 5 µl di soluzione Complete
18/II <input type="checkbox"/>	Incubare per 15 ± 2 min a T ambiente
19/II <input type="checkbox"/>	Aggiungere una miscela di BRP e NESP in modo da ottenere una concentrazione pari a 1,5 volte la concentrazione usata per gli standard di riferimento
20/II <input type="checkbox"/>	Incubare tutta la notte a 37°C
21/II <input type="checkbox"/>	Prendere 20 µl e riscaldarli a 80°C per 3 min
22/II <input type="checkbox"/>	Andare al punto 27 e seguire il procedimento (esclusi i punti 28 e 37)

C – FOCALIZZAZIONE ISOELETRICA

PREFOCALIZZAZIONE

27 <input checked="" type="checkbox"/>	Accendere il refrigerante, impostando la temperatura a 8-10°C
28 <input checked="" type="checkbox"/>	Prelevare i campioni trattati dal frigo
29 <input checked="" type="checkbox"/>	Prelevare il Gelbond e tagliarlo di lunghezza pari a 16,5 cm utilizzando la parte più omogenea o lasciarlo tal quale
30 <input checked="" type="checkbox"/>	Posizionarlo sulla piastra del Multiphor II, già bagnata con kerosene [R-171 Lotto 002]
31 <input checked="" type="checkbox"/>	Rimuovere l'eccesso di kerosene con carta da filtro

FEDERAZIONE MEDICO SPORTIVA ITALIANA LABORATORIO ANTIDOPING	FOGLIO DI LAVORO	FL119
RICERCA DI ERITROPOIETINA RICOMBINANTE E ANALOGHI		
Rif. MP031 - Allegato	Pag. 3/10	Rev. 9

32 <input checked="" type="checkbox"/>	Preparare la soluzione catodica aggiungendo a 1,9 ml di acqua ultrapura 100 µl di soluzione di anfoliti 6-8 [R-170 Lotto 057] e 10 µl di RMET ³ [Lotto 057]												
33 <input checked="" type="checkbox"/>	Posizionare sui lati più lunghi le strips imbevute rispettivamente della soluzione catodica ed anodica												
34 <input checked="" type="checkbox"/>	<p>Chiudere il supporto e impostare i seguenti parametri:</p> <p>Potenziale: 250 V Corrente: 17 mA (proporzionale alle dimensioni del Gel) Potenza: 17 W Durata: 30 min/ 60min</p> <p>O nel caso la lunghezza del gel sia pari a 25 cm:</p> <p>Potenziale: 250 V Corrente: 25 mA Potenza: 25 W Durata: 30 min/ 60min</p> <p>Completare la seguente tabella con i parametri di inizio e fine corsa:</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Potenziale (V)</th> <th>Corrente (mA)</th> <th>Potenza (W)</th> <th>Tempo (min)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>250</td> <td>17,5</td> <td>5</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>250</td> <td>13,4</td> <td>3</td> <td>55'</td> </tr> </tbody> </table>	Potenziale (V)	Corrente (mA)	Potenza (W)	Tempo (min)	250	17,5	5	0	250	13,4	3	55'
Potenziale (V)	Corrente (mA)	Potenza (W)	Tempo (min)										
250	17,5	5	0										
250	13,4	3	55'										
35 <input checked="" type="checkbox"/>	Prelevare gli standard dal congelatore												
36 <input checked="" type="checkbox"/>	<p>Preparare gli standard:</p> <p>MISCELA BRP NESP 1-2 (BRNE1-2) Aggiungere 0,32 – 0,16 ng³ di BRP [BRP Lotto 015] a 0,2 – 0,15ng³ di NESP [NESP Lotto 013]</p> <p>MISCELA BRP NIBSC (BRNIB) Aggiungere 0,16 ng³ di BRP [BRP Lotto] a 0,0025 ng³ di NIBSC [NIBSC Lotto]</p> <p>MISCELA NESP NIBSC (NENIB) Aggiungere 0,15 ng³ di NESP [NESP Lotto] a 0,0025³ ng di NIBSC [NIBSC Lotto]</p> <p>SOLUZIONE NIBSC 0,02UI - 0,04UI (NIBSC1- 2) Prelevare dalla soluzione standard [NIBSC Lotto 011] 10-20 µl, in modo tale da ottenere una soluzione da 0,02-0,04 UI</p> <p>SOLUZIONE MIRCERA (MIR) Prelevare 20 µl dalla soluzione standard di Mircera [MIR Lotto 005]</p> <p>SOLUZIONE Dynepo (Dyn) Prelevare 20 µl dalla soluzione standard di Dynepo [Dyn Lotto]</p>												
37a <input type="checkbox"/>	Scaldare i campioni a 87 °C per 6 min	37b <input checked="" type="checkbox"/>	aggiungere quantità sufficiente di urea poco a poco fino a saturazione <i>andare a punto 39</i>										
38 <input type="checkbox"/>	Immergere i campioni precedentemente scaldati, nel bagno refrigerante per 30 s												
39 <input checked="" type="checkbox"/>	<p>Aggiungere: -ai campioni il 10% di Surfacts-amps 80 (Tween 80) [R-166 Lotto 001] per volume di ritentato</p> <p>-agli standard (eccetto Mircera) aggiungere 2,2 µl di Surfacts-amps 80 (Tween 80) [R-166 Lotto 001] ogni 20 µl</p>												

³ 1 UI = 8 ng. E' consentito variare le quantità purchè la concentrazione raggiunta non superi quella corrispondente a 3 volte il LOD. E' consentito variare il volume di RMET purchè il rapporto fra il volume della soluzione di anfoliti 6-8 e quello totale resti invariato.

FEDERAZIONE MEDICO SPORTIVA ITALIANA LABORATORIO ANTIDOPING	FOGLIO DI LAVORO	FL119
RICERCA DI ERITROPOIETINA RICOMBINANTE E ANALOGHI		
Rif. MP031 - Allegato	Pag.	4/10
	Rev.	9

FOCALIZZAZIONE

40 <input checked="" type="checkbox"/>	Aprire il supporto e posizionare le strips portacampioni (o applicatori a pozzetto) dalla parte del catodo nel numero corrispondente ai campioni ed agli standard
41 <input checked="" type="checkbox"/>	<p>Prelevare i campioni e gli standard e posizionarli sulle strips⁴ secondo il seguente schema:</p> <ul style="list-style-type: none"> BRNIB NENIB Dyn⁵ MIR NIBSC (1 o 2) BRNE (1 o 2) Bur⁵ USPrEPO⁵ CAMPIONI BRNE (1 o 2) NENIB BRNIB <p>Oppure nel caso la lunghezza del gel sia pari a 25 cm:</p> <ul style="list-style-type: none"> NIBSC (1 o 2) BRNE (1 o 2) Bur⁵ USPrEPO⁵ CAMPIONI BRNE (1 o 2) CAMPIONI BRNE (1 o 2) CAMPIONI NIBSC (1 o 2) BRNE (1 o 2) NIBSC (1 o 2) Dyn⁵ MIR

Compilare la tabella seguente in base alla sequenza di caricamento:

Posizione	Campione	Volume di ritentato (µl)
1	BRP+NE SP	16+10
2	[REDACTED]	
3	10E003A6433R	77
4	[REDACTED]	
5	[REDACTED]	
6	[REDACTED]	
7	[REDACTED]	
8	[REDACTED]	

⁴ Quantitativo massimo per ogni strip/pozzetto: 20 µl ; in caso di volumi superiori, sovrapporre un'altra strip e ripetere l'operazione. La posizione degli standard può anche essere variata, purchè i campioni restino in posizione centrale. La sequenza descritta è indicativa.
⁵ Il BUR è obbligatorio solo in sede di conferma: in base alla sostanza da confermare sarà impiegata la USP corrispondente; in sede di screening è possibile omettere la presenza dello standard di Dynepo.

FEDERAZIONE MEDICO SPORTIVA ITALIANA LABORATORIO ANTIDOPING	FOGLIO DI LAVORO	FL119
RICERCA DI ERITROPOIETINA RICOMBINANTE E ANALOGHI		
Rif. MP031 - Allegato		Pag. 5/10
		Rev. 9

9		
10		
11		
12		
13		
14	BRP + UESP	15+10
15		
16		
17		
18		
19		
20		
21		
22		
23	U105C	20
24	HUR	20
25	BRP + UESP	15+10
26		
27		
28		
29		
30		

- 42 Chiudere il supporto e impostare i seguenti parametri:
 Potenziale: 2000 V
 Corrente: 17 mA
 Potenza: 17 W
 Potenziale per ora: 3600 Vh
 O nel caso la lunghezza del gel sia pari a 25 cm:
 Potenziale: 2000 V
 Corrente: 25 mA
 Potenza: 25 W
 Potenziale per ora: 4000 Vh
 Completare la seguente tabella con i parametri di inizio e fine corsa:
- | Potenziale (V) | Corrente (mA) | Potenza (W) | Potenziale per ora (Vh) | Tempo (min) |
|----------------|---------------|-------------|-------------------------|-------------|
| 226 | 25 | 11 | 2 | 0 |
| 1556 | 16 | 25 | 4000 | 3h 08 |
- 43 Tagliare due rettangoli di Durapore e Immobilon P e 16 rettangoli di carta da filtro⁶ o simile delle dimensioni di 8 (esatti) x 16,5 cm. Nel caso la lunghezza del gel sia pari a 25 cm, le dimensioni sono 8 x 22,5 cm.
- 44 Preparare GLI-TRIS aggiungendo a 7,21 g di Glicina [R-164 Lotto 069] 1,51g di Trizmabase [R-167 Lotto 069] e portando a volume con acqua ultrapura in un matraccio da 500 ml.
- 45 Quando il potenziale ha raggiunto circa 2800 Vh, preparare tre vaschette delle dimensioni di 25 x 25 x 8h cm contenenti rispettivamente metanolo [R-038 Lotto 593], acqua ultrapura e GLI-TRIS

⁶ E' consentito variare il numero dei fogli a seconda dello spessore della carta.

FEDERAZIONE MEDICO SPORTIVA ITALIANA LABORATORIO ANTIDOPING	FOGLIO DI LAVORO	FL119
RICERCA DI ERITROPOIETINA RICOMBINANTE E ANALOGHI		
Rif. MP031 - Allegato	Pag. 6/10	Rev. 9

46 <input checked="" type="checkbox"/>	Immergere un rettangolo della Immobilon P nella vaschetta contenente metanolo per 1 minuto, quindi immergerla in quella contenente acqua per 2 minuti e quindi in quella contenente GLI-TRIS per almeno 20 minuti e posizionarla sullo Slow mixer.															
47 <input checked="" type="checkbox"/>	Immergere un rettangolo della Durapore nella vaschetta contenente GLI-TRIS per almeno 20 minuti e posizionarla sullo Slow mixer.															
48 <input checked="" type="checkbox"/>	Quando la corsa elettroforetica è a circa 3500Vh nel caso lunghezza del gel sia pari a 16,5 cm o 3900Vh nel caso la lunghezza sia pari a 25 cm, appoggiare ai bordi della vaschetta contenente GLI-TRIS i fogli di carta da filtro in due pacchetti da quattro ciascuno ⁶ , in modo tale che si imbevano di soluzione per capillarità.															
49 <input checked="" type="checkbox"/>	<p>Prolungare la corsa</p> <p>SI <input type="checkbox"/> NO <input checked="" type="checkbox"/> andare al punto 50</p> <p>Al termine della corsa (3600Vh nel caso lunghezza del gel sia pari a 16,5 cm o 4000Vh nel caso la lunghezza sia pari a 25 cm), impostare i seguenti parametri per 10-15 minuti max:</p> <p>Potenziale: 2500 V Corrente: 17 mA Potenza: 34 W Potenziale per ora: 500 Vh</p> <p>O nel caso la lunghezza del gel sia pari a 25 cm:</p> <p>Potenziale: 2500 V Corrente: 25 mA Potenza: 50 W Potenziale per ora: 500 Vh</p> <p>Completare la seguente tabella con i parametri di inizio e fine corsa:</p> <table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <thead> <tr> <th>Potenziale (V)</th> <th>Corrente (mA)</th> <th>Potenza (W)</th> <th>Potenziale per ora (Vh)</th> <th>Tempo (min)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td> </td> <td> </td> <td> </td> <td> </td> <td> </td> </tr> <tr> <td> </td> <td> </td> <td> </td> <td> </td> <td> </td> </tr> </tbody> </table>	Potenziale (V)	Corrente (mA)	Potenza (W)	Potenziale per ora (Vh)	Tempo (min)										
Potenziale (V)	Corrente (mA)	Potenza (W)	Potenziale per ora (Vh)	Tempo (min)												

50 <input checked="" type="checkbox"/>	Eseguire il controllo visivo per verificare l'uniformità della migrazione del rosso metile e se possibile fotografare il gel
--	--

D - PRIMO BLOTTING

51 <input type="checkbox"/>	E' possibile immergere il gel in una vaschetta contenente Gli-Tris 2 (preparata di fresco pesando 3,02 g di Trizma, 7,21 g di Glicina e portando a un volume pari a 500ml con acqua ultrapura)
52 <input checked="" type="checkbox"/>	Posizionare il Gelbond sul film remover e tagliarlo in modo che la larghezza sia esattamente 8 cm e la lunghezza 16,5 cm o 22,5 cm.
53 <input checked="" type="checkbox"/>	Prelevare dalla vaschetta il rettangolo della Durapore e sovrapporlo rapidamente al Gel e analogamente sovrapporvi il rettangolo della Immobilon P e quindi un pacchetto di carta da filtro prelevati dalle vaschette.
54 <input checked="" type="checkbox"/>	Sovrapporre quindi un rettangolo di parafilm, facendo pressione con un rullo, per eliminare le bolle d'aria.
55 <input checked="" type="checkbox"/>	Capovolgere l'insieme (pacchetto, Immobilon P, Durapore e gel) sulla piastra Multiphor II
56 <input checked="" type="checkbox"/>	Rimuovere il gel dal Gelbond e sovrapporvi rapidamente il secondo pacchetto di carta da filtro
57 <input checked="" type="checkbox"/>	Sovrapporre quindi un rettangolo di parafilm, facendo pressione con un rullo, per eliminare le bolle d'aria.

FEDERAZIONE MEDICO SPORTIVA ITALIANA LABORATORIO ANTIDOPING	FOGLIO DI LAVORO	FL119
RICERCA DI ERITROPOIETINA RICOMBINANTE E ANALOGHI		
Rif. MP031 - Allegato		Pag. 7/10 Rev. 9

58	Chiudere il supporto e impostare i seguenti parametri: Potenziale: 40 V Corrente: Area del gel Potenza: 90 W Durata: 30 min Completare la seguente tabella con i parametri di inizio e fine corsa:												
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Potenziale (V)</th> <th>Corrente (mA)</th> <th>Potenza (W)</th> <th>Tempo (min)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>5</td> <td>180</td> <td>90</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>15</td> <td>180</td> <td>270</td> <td>30</td> </tr> </tbody> </table>	Potenziale (V)	Corrente (mA)	Potenza (W)	Tempo (min)	5	180	90	30	15	180	270	30
Potenziale (V)	Corrente (mA)	Potenza (W)	Tempo (min)										
5	180	90	30										
15	180	270	30										
59	Preparare PBS e DTT. PBS Portare a volume con acqua ultrapura in un matraccio da 1000 ml 5 tavolette di tampone fosfato salino [R-165 Lotto 037]. Mescolare mediante agitatore elettromagnetico. DTT Portare a volume con PBS in un matraccio da 250 ml 192.8 mg diltiotreitolo [R-182 Lotto 022]. Tale soluzione deve essere utilizzata entro trenta minuti dalla preparazione, causa ossidazione												
60	Ai termine della migrazione, dopo aver aperto il supporto Mettere in una vaschetta da 30x 15 x 8 cm 250 ml di DTT e immergervi il rettangolo di Immobilon P (IP1)												
61	Posizionare la vaschetta per 60 minuti in incubatore a 37°C.												
62	Preparare le soluzioni LFM LFM 5% Portare a volume con PBS in un matraccio da 250 ml 12,5 g di latte in polvere a bassi grassi [R-178 Lotto 037]. Agitare con agitatore magnetico. LFM 1% Portare a volume con PBS in un matraccio da 100 ml 1 g di latte in polvere a bassi grassi [R-178 Lotto 037]. Agitare con agitatore magnetico.												
63	Lavare la IP1 con PBS, mettere in una vaschetta da 30x 15 x 8 cm 250 ml di LFM 5% e immergervi il rettangolo di IP1												
64	Posizionare la vaschetta sullo Slow mixer per 60 min												
65	Lavare la IP1 con PBS												
66	Preparare la soluzione Clone AE75A Aggiungere 40 µl ⁷ di anticorpo antiiepo [R-173 Lotto 027] a 40 ml di LFM 1%												
67	Mettere in una vaschetta di vetro da 17x 8 cm (dimensioni interne-oppure da 25x 13 cm in caso di gel da 25 cm) 40 ml di soluzione Clone AE75A e immergervi la IP1												
68	Posizionare la vaschetta sullo Slow mixer per 60 min: in caso di tempi superiori, porre lo Slow mixer in frigorifero (in quest'ultimo caso dopo aver tolto la vaschetta dal frigorifero lasciarla ad agitare sullo Slow mixer a T ambiente per circa 20 min)												

⁷ Nel caso di vaschette di dimensioni interne: 25x 13 cm, considerare un volume totale di 50 ml e quindi variare opportunamente le proporzioni fra i reattivi.

FEDERAZIONE MEDICO SPORTIVA ITALIANA LABORATORIO ANTIDOPING	FOGLIO DI LAVORO	FL119
RICERCA DI ERITROPOIETINA RICOMBINANTE E ANALOGHI		
Rif. MP031 - Allegato		Pag. 8/10
		Rev. 9

- 69 Preparare le soluzioni:
-PBS

-LFM 0,5%
Portare a volume con PBS in un matraccio da 2000 ml 10 g di latte in polvere a bassi grassi [R-178 Lotto 037]. Agitare con agitatore magnetico.
-250 ml di:
 LFM 5%
 INK:aggiungere 250 µl di Indian ink [R-177 Lotto] a 250 ml di LFM 5% precedentemente preparato
- 70 Lavare in una vaschetta da 30x 15 x 8 cm la IP1 con la soluzione LFM 0,5%, ponendola sullo Slow mixer per 1 minuto
- 71 Effettuare tale lavaggio per altre tre volte ponendo la vaschetta sullo Slow mixer per 10 minuti

E - SECONDO BLOTTING

- 72 Preparare l'acido acetico 0,7%
Portare a volume con acqua ultrapura in un matraccio da 500 ml 3,5 ml di acido acetico [R-003 Lotto 012].
- 73 Preparare tre vaschette delle dimensioni di 25 x 25 x 8h cm contenenti rispettivamente metanolo, acqua ultrapura e acido acetico 0,7%
- 74 Immergere un rettangolo della Immobilon P nella vaschetta contenente metanolo [R-038 Lotto 033] per 1 minuto, quindi immergerla in quella contenente acqua per 2 minuti e quindi in quella contenente acido acetico 0,7% per almeno 20 minuti
- 75 Immergere un rettangolo della Durapore nella vaschetta contenente acido acetico allo 0,7% per almeno 20 minuti.
- 76 5 minuti prima di utilizzarli, appoggiare ai bordi della vaschetta contenente acido acetico 0,7% i fogli di carta da filtro o simile in due pacchetti da quattro ciascuno⁵, in modo tale che si imbevano di soluzione per capillarità
- 77 Sulla piastra del Nova Blot posizionare il pacchetto da quattro fogli di carta da filtro
- 78 Lavare la IP1 con PBS e sovrapporla rapidamente al pacchetto
- 79 Sovrapporre rapidamente la Durapore
- 80 Sovrapporre rapidamente la Immobilon P (al termine della corsa nominata IP2)
- 81 Sovrapporre rapidamente il pacchetto da quattro fogli di carta da filtro⁶
- 82 Sovrapporre quindi un rettangolo di parafilm, facendo pressione con un rullo, per eliminare le bolle d'aria.
- 83 Chiudere il supporto e impostare i seguenti parametri:
Potenziale: 35 V
Potenza: 40 W
Corrente: 0,8 mA x Area del gel
Durata: 10 min
- Completare la seguente tabella con i parametri di inizio e fine corsa:
- | Potenziale (V) | Corrente (mA) | Potenza (W) | Tempo(min) |
|----------------|---------------|-------------|------------|
| S | 154 | 1 | 0 |
| S' | -154 | 1 | 10 |

FEDERAZIONE MEDICO SPORTIVA ITALIANA LABORATORIO ANTIDOPING	FOGLIO DI LAVORO	FL119
RICERCA DI ERITROPOIETINA RICOMBINANTE E ANALOGHI		
Rif. MP031 - Allegato		Pag. 9/10 Rev. 9

84 <input checked="" type="checkbox"/>	Si è interrotta l'analisi all'incubazione con l'anticorpo primario SI <input type="checkbox"/> NO <input checked="" type="checkbox"/> andare al punto 85 Preparare la soluzione LFM 1% Portare a volume con PBS in un matraccio da 100 ml 1 g di latte in polvere a bassi grassi [R-178 Lotto]. Agitare con agitatore magnetico.
85 <input checked="" type="checkbox"/>	Al termine della seconda migrazione aprire il supporto, prelevare il rettangolo di IP2 e immergerlo in una vaschetta da 30x 15 x 8 cm 250 ml di LFM 5% (oppure INK); immergere la IP1 in una vaschetta contenente PBS e conservarla in frigo fino al termine dell'analisi.
86 <input checked="" type="checkbox"/>	Posizionare la vaschetta sullo Slow mixer per 60 min.
87 <input checked="" type="checkbox"/>	Lavare la IP2 con PBS
88 <input checked="" type="checkbox"/>	Preparare ANTI IgG Aggiungere: <input checked="" type="checkbox"/> 26 µl di anticorpo segnato con la biotina Pierce [R-175 Lotto] a 40 ml di LFM 1% <input type="checkbox"/> 10 µl di anticorpo segnato con la biotina Paris [R-175 Lotto] a 40 ml di LFM 1%
89 <input checked="" type="checkbox"/>	Mettere in una vaschetta di vetro da 17x 8 cm (dimensioni interne-opp. da 25x13 in caso di gel da 25 cm) 40 ml di soluzione ANTI IgG e immergervi la IP2
90 <input checked="" type="checkbox"/>	Posizionare la vaschetta sullo Slow mixer per 90 min, in caso di tempi superiori posizionare lo Slow mixer in frigo (in quest'ultimo caso dopo aver tolto la vaschetta dal frigorifero lasciarla ad agitare sullo Slow mixer a T ambiente per circa 20 min)
91 <input checked="" type="checkbox"/>	Preparare le soluzioni PBS la soluzione LFM 0,5% Portare a volume con PBS in un matraccio da 2000 ml 10 g di latte in polvere a bassi grassi [R-178 Lotto]. Agitare con agitatore magnetico.
92 <input checked="" type="checkbox"/>	Lavare in una vaschetta da 30x 15 x 8 cm la IP2 con la soluzione LFM 0,5%, ponendola sullo Slow mixer per 1 minuto
93 <input checked="" type="checkbox"/>	Ripetere tale lavaggio altre due volte
94 <input checked="" type="checkbox"/>	Effettuare tale lavaggio per altre tre volte ponendo la vaschetta sullo Slow Mixer per 12 minuti.
95 <input checked="" type="checkbox"/>	Si è interrotta l'analisi all'incubazione con l'anticorpo secondario. SI <input checked="" type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> andare al punto 96 Preparare la soluzione LFM 1%: Portare a volume con PBS in un matraccio da 100 ml 1 g di latte in polvere a bassi grassi [R-178 Lotto]. Agitare con agitatore magnetico.
96 <input checked="" type="checkbox"/>	Preparare la soluzione Perossidasi <input checked="" type="checkbox"/> Aggiungere 150 µl di streptavidina perossidasi Pierce [R-174 Lotto] a 40 ml di LFM 1% <input type="checkbox"/> Aggiungere 20 µl di streptavidina perossidasi Biospa [R-174 Lotto] a 40 ml di LFM 1%
97 <input checked="" type="checkbox"/>	Lavare la IP2 con PBS
98 <input checked="" type="checkbox"/>	Mettere in una vaschetta di vetro da 17x 8 cm (dimensioni interne-opp. da 25x13 in caso di gel da 25 cm) 40 ml di soluzione Perossidasi e immergervi la IP2
99 <input checked="" type="checkbox"/>	Posizionare la vaschetta sullo Slow Mixer per almeno un'ora
100 <input checked="" type="checkbox"/>	Lavare in una vaschetta da 30x 15 x 8 cm la IP2 con la soluzione PBS, ponendola sullo Slow Mixer per 1 minuto
101 <input checked="" type="checkbox"/>	Ripetere tale lavaggio per altre due volte
102 <input checked="" type="checkbox"/>	Effettuare tale lavaggio per altre tre volte ponendo la vaschetta sullo Slow Mixer per 10 minuti

FEDERAZIONE MEDICO SPORTIVA ITALIANA LABORATORIO ANTIDOPING	FOGLIO DI LAVORO	FL119
RICERCA DI ERITROPOIETINA RICOMBINANTE E ANALOGHI		
Rif. MP031 - Allegato	Pag.	10/10
	Rev.	9

103. <input checked="" type="checkbox"/>	Preparare <input checked="" type="checkbox"/> subito prima di utilizzarla la soluzione Covalight, mescolando uguali volumi (15 ml + 15 ml) delle due soluzioni West Pico Pierce [R-176 Lotto <u>048</u>]; <input type="checkbox"/> 10 minuti prima del suo utilizzo la soluzione Covalight, conservandola al buio; aggiungendo 25 gocce di CovB [R-176 B Lotto] in 25 ml di CovA [R-176 A Lotto]'.
104. <input checked="" type="checkbox"/>	Mettere in una vaschetta di vetro da 17x 8 cm (dimensioni interne-oppure da 25x 13 in caso di gel da 25 cm) la soluzione Covalight preparata al punto precedente e immergervi la IP2
105. <input type="checkbox"/>	Agitare la vaschetta per qualche secondo

F - RIVELAZIONE MEDIANTE CHEMILUMINESCENZA

106. <input checked="" type="checkbox"/>	Posizionare la IP2 nel rivelatore.
107. <input checked="" type="checkbox"/>	Esporta per: <input type="checkbox"/> 1 minuto <input checked="" type="checkbox"/> 5 minuti <input type="checkbox"/> 10 minuti <input checked="" type="checkbox"/> 15 minuti <input type="checkbox"/> 30 minuti

NO Si sono verificate non conformità durante lo svolgimento della procedura ?
 SI vedere Rapporto FL053 N° _____

Operatore Sigla e Firma	Data	Operazioni eseguite
<i>D. P. Pizzini Pizzini</i>	<u>11/05/10</u>	da punto [<u>4</u>] a punto [<u>31</u>]
<i>D. P. Pizzini Pizzini</i>	<u>12/05/10</u>	da punto [<u>7</u>] a punto [<u>52</u>]
<i>D. P. Pizzini Pizzini</i>	<u>13/05/10</u>	da punto [<u>9</u>] a punto [<u>107</u>]
		da punto [] a punto []
		da punto [] a punto []
		da punto [] a punto []
		da punto [] a punto []

Repetition of initial testing procedure analysis: original identification of the lanes on the gel (“sequence”)

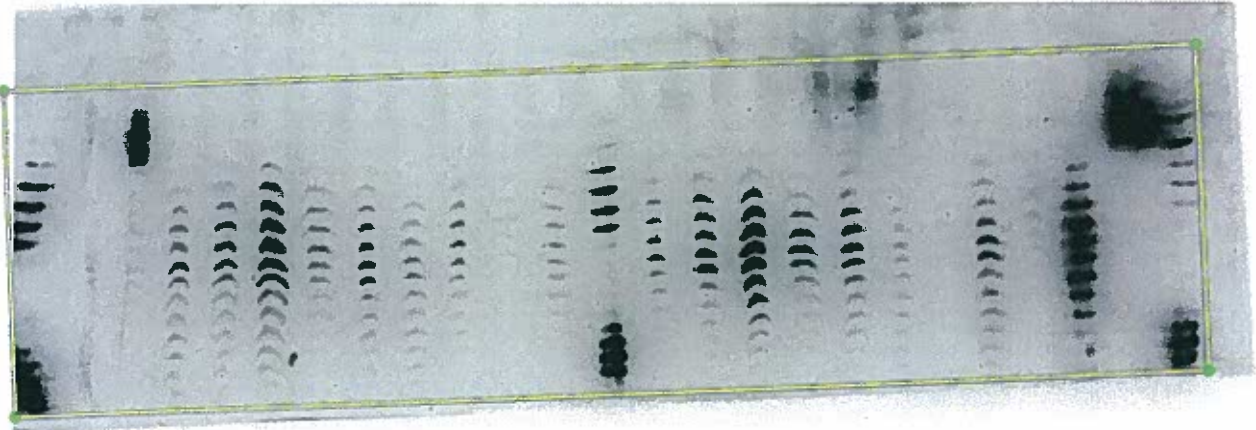
- [1] rhEPO and NESP standards (BRNE)
- [2] Routine sample
- [3] 10E003 A4433R (repeated)
- [4-12] Routine samples
- [13] rhEPO and NESP standards (BRNE)
- [14-22] Routine samples
- [23] urinary EPO standard (NIBSC)
- [24] Mircera standard (Mir)
- [25] rhEPO and NESP standards (BRNE)

II.2.6 Repetition of initial testing procedure Test Results

Gel images and data of positive control (BRNE and Mir), negative control (NIBSC), sample internal laboratory code 10E003 A4433 as obtained after the repetition of initial testing procedure analysis.

TOTAL IMAGE OF THE GEL

THE RECTANGLE INDICATES THE AREA SELECTED FOR PROCESSING THE DENSITOMETRY DATA



GENERAL VIEW OF ALL THE PROCESSED LANES

13/05/2010
15.14

GASepo Analysis Report

Session: Analysis 100513_30min_002.tif 2010-05-13
 Image File: 100513_30min_002.tif
 Operator:

Laboratory: Laboratory
 Date of Analysis: 13/05/2010
 14.38

1. EPO	2. 10E	3. 10E	4. 10E	5. 10E	6. 10	7. 10	8. 10	9. 10	10. 1	11. 10	12. 1	13. E	14. 1	15. 1	16. 1	17. 1	18. 1	19. 1	20. 1	21. 1	22. 1	23. N	24. M	25. E
44,0%	0,0%	86,2%	22,6%	32,2%	40,3%	38,6%	27,8%	15,5%	39,8%	80,9%	38,4%	33,1%	36,2%	32,7%	19,1%	21,2%	26,0%	15,1%	6,2%	14,9%	62,2%	15,6%	100,0%	27,9%
55,3%	54,8%	0,0%	10,6%	5,9%	3,0%	1,1%	5,6%	17,4%	2,4%	1,0%	1,0%	65,1%	0,9%	3,9%	6,4%	3,2%	10,1%	21,8%	3,8%	19,1%	0,0%	9,6%	0,0%	71,6%

COLORLEGEND: EPO=0 DARK=POE=10

GASepo Software v. 2004/02/01 (Modificato) Versione 2.0.0000

POSITIVE CONTROL: RHEPO AND NESP STANDARDS (BRNE)

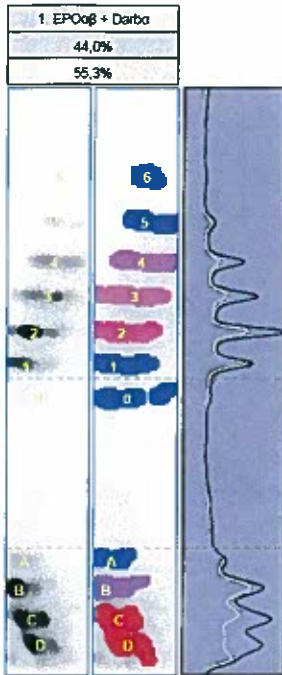
13/05/2010
15:14

GASepo Analysis Report

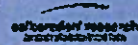


Session: Analysis 100513_30min_002.tif 2010-05-13
Image File: 100513_30min_002.tif
Operator:

Laboratory: Laboratory
Date of Analysis: 13/05/2010
14.38



Lane #1: EPOαβ + Darba									
Name	Comment	CentX	CentY	Volume Abs	Volume nSum	Volume nMax	Height Abs	Height nSum	Height nMax
6		29,3	51,5	128,9	0,2	0,7	2,5	0,4	1,6
5		27,9	77,9	1668,8	2,6	6,9	21,3	3,5	13,8
4		26,3	101,5	8390,4	13,3	44,6	57,5	9,4	37,2
3		22,5	121,9	10449,0	16,5	55,5	87,4	14,3	56,5
2		15,2	143,0	12855,3	20,4	68,3	154,7	25,3	100,0
1		10,8	182,7	2103,8	3,3	11,2	35,5	5,8	23,0
α		18,6	180,5	585,3	0,9	3,1	3,9	0,6	2,5
A		10,0	276,3	630,4	1,0	3,3	16,3	2,7	10,5
B		7,0	282,6	7066,5	11,2	37,5	88,4	14,8	57,8
C		14,4	310,6	18231,8	28,9	98,8	106,8	17,4	69,0
D		19,6	324,8	18831,1	29,8	100,0	116,1	19,0	75,1



NEGATIVE CONTROL: URINARY EPO STANDARD (NIBSC)

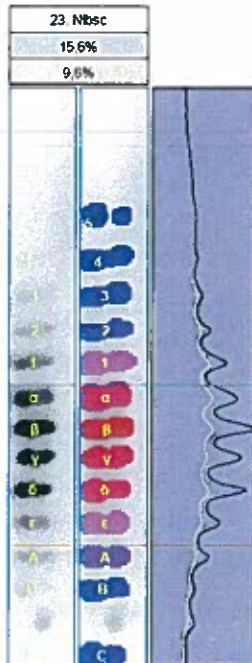
13/05/2010
15:17

GASepo Analysis Report

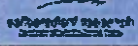


Session: Analysis 100513_30min_002.tif 2010-05-13
Image File: 100513_30min_002.tif
Operator:

Laboratory: Laboratory
Date of Analysis: 13/05/2010
14.38



Lane #23: Nibsc									
Name	Comment	CentX	CentY	Volume Abs	Volume nSum	Volume nMax	Height Abs	Height nSum	Height nMax
5		4,2	80,2	0,7	0,0	0,0	0,1	0,0	0,1
4		9,7	102,8	178,8	0,3	1,8	1,9	0,5	2,2
3		13,9	122,9	1467,3	2,7	14,5	9,2	2,5	10,6
2		14,6	143,7	2094,6	3,9	20,7	18,2	4,9	21,0
1		14,0	182,9	4654,6	6,7	45,9	28,4	7,1	30,4
α		14,4	183,4	8297,0	15,4	81,8	38,4	10,3	44,4
β		14,9	201,8	10142,6	18,9	100,0	73,1	19,6	84,4
γ		15,2	219,1	8767,1	16,3	86,4	55,7	14,9	64,3
δ		13,9	238,4	8281,5	15,4	81,5	86,6	23,2	100,0
ε		13,9	257,8	4712,1	8,8	46,5	29,1	7,8	33,8
A		14,2	278,1	3160,4	5,9	31,2	20,7	5,5	23,9
B		12,9	297,3	1301,8	2,4	12,8	9,6	2,8	11,1
C		12,4	336,3	698,0	1,3	6,9	4,5	1,2	5,2



POSITIVE CONTROL: MIRCERA (MIR)

13/05/2010
15.17

Session: Analysis 100513_30min_002.tif 2010-05-13
Image File: 100513_30min_002.tif
Operator:

GASepo Analysis Report

GAS
epo

Laboratory: Laboratory
Date of Analysis: 13/05/2010
14.38

24. Mir

100,0%

0,0%

Lane #24: Mir

Name	Comment	CentX	CentY	Volume Abs	Volume nSum	Volume nMax	Height Abs	Height nSum	Height nMax
6		17,8	27,7	1640,1	3,3	9,8	8,3	2,4	7,2
5		19,0	44,9	4868,2	9,7	29,2	26,5	7,8	23,0
4		19,9	61,8	10160,2	20,2	61,0	53,3	15,7	46,4
3		20,8	77,4	10664,7	33,2	100,0	115,0	33,8	100,0
2		20,0	88,4	13708,4	27,3	82,3	91,0	26,8	79,2
1		26,1	98,4	2823,0	5,8	17,5	41,2	12,1	35,8

121

GASepo software (c) 2004-2009 Gaspari Research - Milano - Italy

Report Page 25/28

SAMPLE INTERNAL LABORATORY CODE 10E003 A4433

13/05/2010
15.15

Session: Analysis 100513_30min_002.tif 2010-05-13
Image File: 100513_30min_002.tif
Operator:

GASepo Analysis Report

GAS
epo

Laboratory: Laboratory
Date of Analysis: 13/05/2010
14.38

3. 10E003 A4433R

96,2%

0,0%

Lane #3: 10E003 A4433R

Name	Comment	CentX	CentY	Volume Abs	Volume nSum	Volume nMax	Height Abs	Height nSum	Height nMax
9		35,4	0,8	12,3	0,0	0,1	1,3	0,3	0,7
8		29,2	13,0	211,6	0,5	1,2	2,8	0,7	1,4
7		23,6	29,4	3205,9	7,3	18,1	43,6	10,6	21,8
6		23,4	37,4	5075,5	11,6	28,7	51,8	12,6	25,9
5		20,2	51,8	17706,4	40,5	100,0	199,8	48,8	100,0
4		21,0	67,0	14281,9	32,7	80,7	93,0	22,6	46,6
3		19,7	76,0	7880,7	18,3	45,1	80,8	19,7	40,4
2		12,9	132,8	659,3	1,5	3,7	6,5	1,6	3,3
1		13,2	152,3	904,1	2,1	5,1	8,8	2,1	4,4
α		11,9	171,7	864,2	1,5	3,8	5,2	1,3	2,6
β		11,3	191,7	821,3	1,9	4,6	6,1	1,5	3,0
γ		9,6	208,5	407,1	0,9	2,3	4,2	1,0	2,1
δ		3,1	225,2	76,7	0,2	0,4	2,2	0,5	1,1

121

GASepo software (c) 2004-2009 Gaspari Research - Milano - Italy

Report Page 27/28

II.2.7 Test Validity Data

The validity of the test is evaluated according to the WADA technical document TD2009EPO.

Sensitivity performance verification is demonstrated by the positive and negative control within the entire gel.

II.3 Confirmation Test Data

The presence of Continuous Erythropoietin Receptor Activator in sample code 10E003 A4433 was suspected after the initial testing procedure analysis.

The confirmation was performed by analyzing two newly prepared aliquots of the same sample; the first aliquot (20 ml) was prepared as described for the screening test, while the second aliquot (0.6 ml) was used to perform the stability test.

II.3.1 Confirmation test description

The confirmation procedure is the same described for the initial testing procedure analysis, but it also includes the stability test, performed as explained in the worksheet enclosed.

II.3.2 Instruments and instrumental conditions

Same as in the initial testing procedure.

Confirmation analysis: original identification of the lanes on the gel (“sequence”)

- [1] rhEPO and NESP standards (BRNE)
- [2] Mircera standard (Mir)
- [3] positive reference sample (UspMir)
- [4] negative reference urine (BUR)
- [5] 10E003A4433Stab STABILITY TEST
- [6] Routine sample
- [7] urinary EPO standard (NIBSC)
- [8] 10E003A4433C (CONFIRMATION)
- [9] urinary EPO standard (NIBSC)
- [10-13] Routine samples
- [14] rhEPO and NESP standards (BRNE)
- [15-25] Routine samples
- [26] rhEPO and NESP standards (BRNE)

Flow diagram for confirmation

FEDERAZIONE MEDICO SPORTIVA ITALIANA LABORATORIO ANTIDOPING	FOGLIO DI LAVORO	FL119
RICERCA DI ERITROPOIETINA RICOMBINANTE E ANALOGHI		
Rif. MP031 - Allegato	Pag. 1/10	Rev. 9

Data e ora di inizio analisi: 20/5/10 9.30

Lotto di accettazione	Codice campioni preparati
10E003	DA: ALU33C + Tosi + stabilità
	DA: A: A:
	DA: A: A:
	DA: A: A:
	DA: A: A:

A - PREPARAZIONE DEL GEL 17 x 8 x 0,1CM

1 <input checked="" type="checkbox"/>	Pesare 14,71 g di urea [R-181 Lotto 014], 1,75 g di saccarosio [R-306 Lotto 001] e trasferirli in un pallone di reazione da 100 ml posto su un agitatore elettromagnetico
2 <input checked="" type="checkbox"/>	Aggiungere 14,17 ml di acqua ultrapura e 1,89 ml di anfolita 2-4 [R-168 Lotto 042], 1,89ml di anfolita 4-6 [R-169 Lotto 041] e 4,74 ml di soluzione di bisacrilamide 40% [R-184 Lotto 008]
3 <input checked="" type="checkbox"/>	Tappare il pallone e collegarlo ad una pompa da vuoto per 15 min.
4 <input checked="" type="checkbox"/>	Nel frattempo (durante i 15 minuti): a) detergere le lastre con etanolo assoluto [R-033 Lotto 029] b) far aderire il Gelbond alla lastra di supporto ponendovi l'opportuna quantità di acqua ultrapura c) eliminare le eventuali bolle d'aria e l'acqua in eccesso ponendo sul Gelbond un foglio di carta da filtro e facendo pressione con un rullo d) sovrapporre la seconda lastra e) bloccare le lastre con le apposite pinze
5 <input checked="" type="checkbox"/>	Preparare l'APS sciogliendo in una vial di plastica da 1,5 ml con tappo 100 mg di persolfato d'ammonio [R-179 Lotto 002] in 1 ml di acqua ultrapura e agitando manualmente
6 <input checked="" type="checkbox"/>	Aggiungere 31 µl di TEMED [R-130 Lotto 003] e 310 µl di APS nel pallone
7 <input checked="" type="checkbox"/>	Lasciare 30 s in agitazione
8 <input checked="" type="checkbox"/>	Prelevare la soluzione di gel mediante pipetta e trasferirla rapidamente fra le due lastre, avendo cura di non generare bolle d'aria
9 <input checked="" type="checkbox"/>	Lasciare il gel per almeno tre ore nella camera umida

B - PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

per screening e conferma (non SDS PAGE) A (per la purificazione per immunoaffinità) andare al FL162

10/1 <input checked="" type="checkbox"/>	Condizionare il campione a temperatura ambiente e preparare la soluzione Complete portando a volume con acqua ultrapura in un matraccio da 10 ml 5 tavolette di Complete ¹ [R-172 Lotto 058] e mescolando mediante agitatore elettromagnetico
11/1 <input checked="" type="checkbox"/>	Prelevare 20 ml di urina ² (in caso di prelievi inferiori, portare a 20 ml con TRISHCl-50-mM [TRISHCl-50-Lotto 001]) e trasferirli in una provetta da 50 ml 003 20/5/10
12/1 <input checked="" type="checkbox"/>	Aggiungere 400 µl di soluzione Complete (200 µl ogni 10 ml di urina)
13/1 <input checked="" type="checkbox"/>	Aggiungere 2 ml di TRISHCl 3,75M [TRISHCl 3.75 Lotto 003] (1ml ogni 10 ml di urina)
14/1 <input checked="" type="checkbox"/>	Controllare il pH con delle strips indicatrici in modo che sia compreso fra 6,8 e 7,9; in caso non risulti nel range, correggerlo con tampone TRISHCl 3,75M [TRISHCl 3.75-Lotto 001] 003 20/5/10
15/1 <input checked="" type="checkbox"/>	Centrifugare per 10 min nella centrifuga refrigerata a 20°C con rotore basculante a 3000 rcf

¹ E' possibile preparare quantità differenti purchè restino invariate le proporzioni.

² In caso di urina diluita e prelievi maggiori, prelevare le quantità di Complete e di TRISHCl 3.75M rispettando i rapporti fra i reattivi.

FEDERAZIONE MEDICO SPORTIVA ITALIANA LABORATORIO ANTIDOPING	FOGLIO DI LAVORO	FL119
RICERCA DI ERITROPOIETINA RICOMBINANTE E ANALOGHI		
Rif. MP031 - Allegato		Pag. 2/10 Rev. 9

16/1 <input checked="" type="checkbox"/>	Applicare alle provette il componente della filtrazione del kit Steriflip, assemblandolo in posizione verticale
17/1 <input checked="" type="checkbox"/>	Ruotare delicatamente di 180° il Kit assemblato
18/1 <input checked="" type="checkbox"/>	Collegarlo alla pompa da vuoto per la filtrazione
19/1 <input checked="" type="checkbox"/>	Trasferire il filtrato nelle provette amicon ultra-15
20/1 <input checked="" type="checkbox"/>	Centrifugare per 20 min nella centrifuga refrigerata a 20°C con rotore basculante a 3500 rcf
21/1 <input checked="" type="checkbox"/>	Eliminare il filtrato e lavare il filtro riempiendo la parte superiore della Amicon ultra-15 con TRISHCI 50 mM [TRISHCI 50 Lotto 102] e 400 µl di soluzione Complete (200µl ogni 10 ml di urina)
22/1 <input checked="" type="checkbox"/>	Centrifugare per 20 min nella centrifuga refrigerata a 20°C con rotore basculante a 3500 rcf
23/1 <input checked="" type="checkbox"/>	Nel frattempo lavare le Amicon ultra-4 con 2 ml di acqua ultrapura ponendole a centrifugare a 5000 rpm per 20 min nella centrifuga refrigerata a 17°C con rotore ad angolo fisso.
24/1 <input checked="" type="checkbox"/>	Prelevare con una micropipetta dalla parte superiore della Amicon ultra-15 il residuo (circa 120µl) e trasferirlo nelle Amicon ultra-4 precedentemente lavate (anche se si usa il FL162)
25/1 <input checked="" type="checkbox"/>	Centrifugare a 6200 rpm per 60 min nella centrifuga refrigerata a 17°C con rotore ad angolo fisso
26/1 <input checked="" type="checkbox"/>	Misurare il volume di ritentato, trasferirlo in una vial di raccolta e conservare in frigorifero (nel caso si intenda utilizzare oltre le 24 h, conservare in congelatore a -20°C)

II (PER TEST DI STABILITÀ)

10/II <input checked="" type="checkbox"/>	Centrifugare 0.6 ml di urina per 10 min a 20°C con rotore basculante a 2700 rcf
11/II <input checked="" type="checkbox"/>	Mettere 0,5 ml di sovrantante in una provetta Microcon
12/II <input checked="" type="checkbox"/>	Aggiungere 20 µl di Pepstatina A e 5 µl di soluzione Complete
13/II <input checked="" type="checkbox"/>	Centrifugare a 6200 rpm per 20 min nella centrifuga refrigerata a 17°C con rotore ad angolo fisso, concentrando fino ad un volume approssimativo di 30 µl
14/II <input checked="" type="checkbox"/>	Aggiungere 200 µl di tampone acetato 50 mM nel restante campione e mescolare con vortex prima di capovolgerlo
15/II <input checked="" type="checkbox"/>	Capovolgere la Microcon e centrifugare a 3000 rpm per 10 min nella centrifuga refrigerata a 17°C con rotore ad angolo fisso
16/II <input checked="" type="checkbox"/>	Portare il volume del campione recuperato fino a 0,5 ml con tampone acetato 50 mM
17/II <input checked="" type="checkbox"/>	Aggiungere 20 µl di Pepstatina A e 5 µl di soluzione Complete
18/II <input checked="" type="checkbox"/>	Incubare per 15 ± 2 min a T ambiente
19/II <input checked="" type="checkbox"/>	Aggiungere una miscela di BRP e NESP in modo da ottenere una concentrazione pari a 1.5 volte la concentrazione usata per gli standard di riferimento
20/II <input checked="" type="checkbox"/>	Incubare tutta la notte a 37°C
21/II <input checked="" type="checkbox"/>	Prendere 20 µl e riscaldarli a 80°C per 3 min
22/II <input checked="" type="checkbox"/>	Andare al punto 27 e seguire il procedimento (esclusi i punti 28 e 37)

**C – FOCALIZZAZIONE ISOELETRICA
PREFOCALIZZAZIONE**

27 <input checked="" type="checkbox"/>	Accendere il refrigerante, impostando la temperatura a 8-10°C
28 <input checked="" type="checkbox"/>	Prelevare i campioni trattati dal frigo
29 <input checked="" type="checkbox"/>	Prelevare il Gelbond e tagliarlo di lunghezza pari a 16,5 cm utilizzando la parte più omogenea o lasciarlo tal quale
30 <input checked="" type="checkbox"/>	Posizionarlo sulla piastra del Multiphor II, già bagnata con kerosene [R-171 Lotto 102]
31 <input checked="" type="checkbox"/>	Rimuovere l'eccesso di kerosene con carta da filtro

FEDERAZIONE MEDICO SPORTIVA ITALIANA LABORATORIO ANTIDOPING	FOGLIO DI LAVORO	FL119
RICERCA DI ERITROPOIETINA RICOMBINANTE E ANALOGHI		
Rif. MP031 - Allegato	Pag. 3/10	Rev. 9

32. <input checked="" type="checkbox"/>	Preparare la soluzione catodica aggiungendo a 1,9 ml di acqua ultrapura 100 µl di soluzione di anfoliti 6-8 [R-170 Lotto 007] e 10 µl di RMET ³ [Lotto 007]												
33. <input checked="" type="checkbox"/>	Posizionare sui lati più lunghi le strips imbevute rispettivamente della soluzione catodica ed anodica												
34. <input checked="" type="checkbox"/>	<p>Chiudere il supporto e impostare i seguenti parametri:</p> <p>Potenziale: 250 V Corrente: 17 mA (proporzionale alle dimensioni del Gel) Potenza: 17 W Durata: 30 min/ 60min</p> <p>O nel caso la lunghezza del gel sia pari a 25 cm:</p> <p>Potenziale: 250 V Corrente: 25 mA Potenza: 25 W Durata: 30 min/ 60min</p> <p>Completare la seguente tabella con i parametri di inizio e fine corsa:</p> <table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <thead> <tr> <th>Potenziale (V)</th> <th>Corrente (mA)</th> <th>Potenza (W)</th> <th>Tempo (min)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>200</td> <td>25</td> <td>5</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>250</td> <td>14,4</td> <td>4</td> <td>50</td> </tr> </tbody> </table>	Potenziale (V)	Corrente (mA)	Potenza (W)	Tempo (min)	200	25	5	0	250	14,4	4	50
Potenziale (V)	Corrente (mA)	Potenza (W)	Tempo (min)										
200	25	5	0										
250	14,4	4	50										
35. <input checked="" type="checkbox"/>	Prelevare gli standard dal congelatore												
36. <input checked="" type="checkbox"/>	<p>Preparare gli standard:</p> <p>MISCELA BRP NESP 1-2 (BRNE1-2) Aggiungere 0,32 - 0,16 ng³ di BRP [BRP Lotto 016] a 0,2 - 0,15ng³ di NESP [NESP Lotto 043]</p> <p>MISCELA BRP NIBSC (BRNIB) Aggiungere 0,16 ng³ di BRP [BRP Lotto] a 0,0025 ng³ di NIBSC [NIBSC Lotto]</p> <p>MISCELA NESP NIBSC (NENIB) Aggiungere 0,15 ng³ di NESP [NESP Lotto] a 0,0025³ ng di NIBSC [NIBSC Lotto]</p> <p>SOLUZIONE NIBSC 0,02UI - 0,04UI (NIBSC1- 2) Prelevare dalla soluzione standard [NIBSC Lotto 004] 10-20 µl, in modo tale da ottenere una soluzione da 0,02-0,04 UI</p> <p>SOLUZIONE MIRCERA (MIR) Prelevare 20 µl dalla soluzione standard di Mircera [MIR Lotto 005]</p> <p>SOLUZIONE Dynepo (Dyn) Prelevare 20 µl dalla soluzione standard di Dynepo [Dyn Lotto]</p>												
37a. <input type="checkbox"/>	Scaldare i campioni a 87 °C per 6 min												
37b. <input checked="" type="checkbox"/>	aggiungere quantità sufficiente di urea poco a poco fino a saturazione <i>andare a punto 39</i>												
38. <input type="checkbox"/>	Immergere i campioni precedentemente scaldati, nel bagno refrigerante per 30 s												
39. <input checked="" type="checkbox"/>	<p>Aggiungere: -ai campioni il 10% di Surfacts-amps 80 (Tween 80) [R-166 Lotto 007] per volume di ritentato</p> <p>-agli standard (eccetto Mircera) aggiungere 2,2 µl di Surfacts-amps 80 (Tween 80) [R-166 Lotto 007] ogni 20 µl</p>												

³ 1 UI = 8 ng. E' consentito variare le quantità purchè la concentrazione raggiunta non superi quella corrispondente a 3 volte il LOD. E' consentito variare il volume di RMET purchè il rapporto fra il volume della soluzione di anfoliti 6-8 e quello totale resti invariato.

FEDERAZIONE MEDICO SPORTIVA ITALIANA LABORATORIO ANTIDOPING	FOGLIO DI LAVORO	FL119
RICERCA DI ERITROPOIETINA RICOMBINANTE E ANALOGHI		
Rif. MP031 - Allegato	Pag.	4/10
	Rev.	9

FOCALIZZAZIONE

40 <input checked="" type="checkbox"/>	Aprire il supporto e posizionare le strips portacampioni (o applicatori a pozzetto) dalla parte del catodo nel numero corrispondente ai campioni ed agli standard
41 <input checked="" type="checkbox"/>	<p>Prelevare i campioni e gli standard e posizionarli sulle strips⁴ secondo il seguente schema:</p> <p style="margin-left: 20px;">BRNIB NENIB Dyn⁵ MIR NIBSC (1 o 2) BRNE (1 o 2) Bur³ USPrEPO⁵ CAMPIONI BRNE (1 o 2) NENIB BRNIB</p> <p>Oppure nel caso la lunghezza del gel sia pari a 25 cm:</p> <p style="margin-left: 20px;">NIBSC (1 o 2) BRNE (1 o 2) Bur⁵ USPrEPO⁵ CAMPIONI BRNE (1 o 2) CAMPIONI BRNE (1 o 2) CAMPIONI NIBSC (1 o 2) BRNE (1 o 2) NIBSC (1 o 2) Dyn⁵ MIR</p>

Compilare la tabella seguente in base alla sequenza di caricamento:

Posizione	Campione	Volume di ritentato (µl)
1	BRP + NEBP	16-180
2	MIR	20
3	USP MIR	28
4	BUR	18
5	ICEGG3 A 4633 SAB	40
6	██	████████████████████
7	NIBSC	20
8	ICEGG3 A 4633 C	22

⁴ Quantitativo massimo per ogni strip/pozzetto: 20 µl, in caso di volumi superiori, sovrapporre un'altra strip e ripetere l'operazione. La posizione degli standard può anche essere variata, purchè i campioni restino in posizione centrale. La sequenza descritta è indicativa.

⁵ Il BUR è obbligatorio solo in sede di conferma; in base alla sostanza da confermare sarà impiegata la USP corrispondente; in sede di screening è possibile omettere la presenza dello standard di Dynepo.

FEDERAZIONE MEDICO SPORTIVA ITALIANA LABORATORIO ANTIDOPING	FOGLIO DI LAVORO	FL119
RICERCA DI ERITROPOIETINA RICOMBINANTE E ANALOGHI		
Rif. MP031 - Allegato		Pag. 5/10
		Rev. 9

9		
10	MSC	20
11		
12		
13		
14	BRP + NESP	16+10
15		
16		
17		
18		
19		
20		
21		
22		
23		
24		
25		
26	BRP + NESP	16+10
27		
28		
29		
30		

42. Chiudere il supporto e impostare i seguenti parametri:
 Potenziale: 2000 V
 Corrente: 17 mA
 Potenza: 17 W
 Potenziale per ora: 3600 Vh
 O nel caso la lunghezza del gel sia pari a 25 cm:
 Potenziale: 2000 V
 Corrente: 25 mA
 Potenza: 25 W
 Potenziale per ora: 4000 Vh
 Completare la seguente tabella con i parametri di inizio e fine corsa:

Potenziale (V)	Corrente (mA)	Potenza (W)	Potenziale per ora (Vh)	Tempo (min)
391	25	10	1	0
1608	15.5	25	4000	304

43. Tagliare due rettangoli di Durapore e Immobilon P e 16 rettangoli di carta da filtro⁵ o simile delle dimensioni di 8 (esatti) x 16,5 cm. Nel caso la lunghezza del gel sia pari a 25 cm, le dimensioni sono 8 x 22,5 cm.

44. Preparare GLI-TRIS aggiungendo a 7,21 g di Glicina [R-164 Lotto 009] 1,51g di Trizmabase [R-167 Lotto 009] e portando a volume con acqua ultrapura in un matraccio da 500 ml.

45. Quando il potenziale ha raggiunto circa 2800 Vh, preparare tre vaschette delle dimensioni di 25 x 25 x 8h cm contenenti rispettivamente metanolo [R-038 Lotto 593], acqua ultrapura e GLI-TRIS

⁵ E' consentito variare il numero dei fogli a seconda dello spessore della carta

FEDERAZIONE MEDICO SPORTIVA ITALIANA LABORATORIO ANTIDOPING	FOGLIO DI LAVORO	FL119
RICERCA DI ERITROPOIETINA RICOMBINANTE E ANALOGHI		
Rif. MP031 - Allegato		Pag. 6/10 Rev. 9

46. <input checked="" type="checkbox"/>	Immergere un rettangolo della Immobilon P nella vaschetta contenente metanolo per 1 minuto, quindi immergerla in quella contenente acqua per 2 minuti e quindi in quella contenente GLI-TRIS per almeno 20 minuti e posizionarla sullo Slow mixer.															
47. <input checked="" type="checkbox"/>	Immergere un rettangolo della Durapore nella vaschetta contenente GLI-TRIS per almeno 20 minuti e posizionarla sullo Slow mixer.															
48. <input checked="" type="checkbox"/>	Quando la corsa elettroforetica è a circa 3500Vh nel caso lunghezza del gel sia pari a 16,5 cm o 3900Vh nel caso la lunghezza sia pari a 25 cm, appoggiare ai bordi della vaschetta contenente GLI-TRIS i fogli di carta da filtro in due pacchetti da quattro ciascuno ⁶ , in modo tale che si imbevano di soluzione per capillarità.															
49. <input checked="" type="checkbox"/>	<p>Prolungare la corsa</p> <p>SI <input type="checkbox"/> NO <input checked="" type="checkbox"/> andare al punto 50</p> <p>Al termine della corsa (3600Vh nel caso lunghezza del gel sia pari a 16,5 cm o 4000Vh nel caso la lunghezza sia pari a 25 cm), impostare i seguenti parametri per 10-15 minuti max:</p> <p>Potenziale: 2500 V Corrente: 17 mA Potenza: 34 W Potenziale per ora: 500 Vh</p> <p>O nel caso la lunghezza del gel sia pari a 25 cm:</p> <p>Potenziale: 2500 V Corrente: 25 mA Potenza: 50 W Potenziale per ora: 500 Vh</p> <p>Completare la seguente tabella con i parametri di inizio e fine corsa:</p> <table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <thead> <tr> <th>Potenziale (V)</th> <th>Corrente (mA)</th> <th>Potenza (W)</th> <th>Potenziale per ora (Vh)</th> <th>Tempo (min)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td> </td> <td> </td> <td> </td> <td> </td> <td> </td> </tr> <tr> <td> </td> <td> </td> <td> </td> <td> </td> <td> </td> </tr> </tbody> </table>	Potenziale (V)	Corrente (mA)	Potenza (W)	Potenziale per ora (Vh)	Tempo (min)										
Potenziale (V)	Corrente (mA)	Potenza (W)	Potenziale per ora (Vh)	Tempo (min)												

50. <input checked="" type="checkbox"/>	Eeguire il controllo visivo per verificare l'uniformità della migrazione del rosso metile e se possibile fotografare il gel
---	---

D - PRIMO BLOTTING

51. <input type="checkbox"/>	E' possibile immergere il gel in una vaschetta contenente Gli-Tris 2 (preparata di fresco pesando 3,02 g di Trizma, 7,21 g di Glicina e portando a un volume pari a 500ml con acqua ultrapura)
52. <input checked="" type="checkbox"/>	Posizionare il Gelbond sul film remover e tagliarlo in modo che la larghezza sia esattamente 8 cm e la lunghezza 16,5 cm o 22,5 cm.
53. <input checked="" type="checkbox"/>	Prelevare dalla vaschetta il rettangolo della Durapore e sovrapporlo rapidamente al Gel e analogamente sovrapporvi il rettangolo della Immobilon P e quindi un pacchetto di carta da filtro prelevati dalle vaschette.
54. <input checked="" type="checkbox"/>	Sovrapporre quindi un rettangolo di parafilm, facendo pressione con un rullo, per eliminare le bolle d'aria.
55. <input checked="" type="checkbox"/>	Capovolgere l'insieme (pacchetto, Immobilon P, Durapore e gel) sulla piastra Multiphor II
56. <input checked="" type="checkbox"/>	Rimuovere il gel dal Gelbond e sovrapporvi rapidamente il secondo pacchetto di carta da filtro
57. <input checked="" type="checkbox"/>	Sovrapporre quindi un rettangolo di parafilm, facendo pressione con un rullo, per eliminare le bolle d'aria.

FEDERAZIONE MEDICO SPORTIVA ITALIANA LABORATORIO ANTIDOPING	FOGLIO DI LAVORO	FL119
--	------------------	-------

RICERCA DI ERITROPOIETINA RICOMBINANTE E ANALOGHI

Rif. MP031 - Allegato

Pag.	7/10
Rev.	9

58	<p>Chiudere il supporto e impostare i seguenti parametri:</p> <p>Potenziale: 40 V Corrente: Area del gel Potenza: 90 W Durata: 30 min</p> <p>Completare la seguente tabella con i parametri di inizio e fine corsa:</p> <table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <thead> <tr> <th>Potenziale (V)</th> <th>Corrente (mA)</th> <th>Potenza (W)</th> <th>Tempo (min)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>192</td> <td>2</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>21</td> <td>192</td> <td>4</td> <td>30</td> </tr> </tbody> </table>	Potenziale (V)	Corrente (mA)	Potenza (W)	Tempo (min)	0	192	2	0	21	192	4	30
Potenziale (V)	Corrente (mA)	Potenza (W)	Tempo (min)										
0	192	2	0										
21	192	4	30										
59	<p>Preparare PBS e DTT.</p> <p>PBS Portare a volume con acqua ultrapura in un matraccio da 1000 ml 5 tavolette di tampone fosfato salino [R-165 Lotto 086]. Mescolare mediante agitatore elettromagnetico.</p> <p>DTT Portare a volume con PBS in un matraccio da 250 ml 192,8 mg ditiotreitolo [R-182 Lotto 003]. Tale soluzione deve essere utilizzata entro trenta minuti dalla preparazione, causa ossidazione.</p>												
60	<p>Al termine della migrazione, dopo aver aperto il supporto</p> <p>Mettere in una vaschetta da 30x 15 x 8 cm 250 ml di DTT e immergervi il rettangolo di Immobilon P (IP1)</p>												
61	<p>Posizionare la vaschetta per 60 minuti in incubatore a 37°C.</p>												
62	<p>Preparare le soluzioni LFM</p> <p>LFM 5% Portare a volume con PBS in un matraccio da 250 ml 12,5 g di latte in polvere a bassi grassi [R-178 Lotto 037]. Agitare con agitatore magnetico.</p> <p>LFM 1% Portare a volume con PBS in un matraccio da 100 ml 1 g di latte in polvere a bassi grassi [R-178 Lotto 037]. Agitare con agitatore magnetico.</p>												
63	<p>Lavare la IP1 con PBS, mettere in una vaschetta da 30x 15 x 8 cm 250 ml di LFM 5% e immergervi il rettangolo di IP1</p>												
64	<p>Posizionare la vaschetta sullo Slow mixer per 60 min</p>												
65	<p>Lavare la IP1 con PBS</p>												
66	<p>Preparare la soluzione Clone AE75A</p> <p>Aggiungere 40 µl di anticorpo antiipo [R-173 Lotto 009] a 40 ml di LFM 1%</p>												
67	<p>Mettere in una vaschetta di vetro da 17x 8 cm (dimensioni interne-oppure da 25x 13 cm in caso di gel da 25 cm) 40 ml di soluzione Clone AE75A e immergervi la IP1</p>												
68	<p>Posizionare la vaschetta sullo Slow mixer per 60 min: in caso di tempi superiori, porre lo Slow mixer in frigorifero (in quest'ultimo caso dopo aver tolto la vaschetta dal frigorifero lasciarla ad agitare sullo Slow mixer a T ambiente per circa 20 min)</p>												

² Nel caso di vaschette di dimensioni interne: 25x 13 cm, considerare un volume totale di 50 ml e quindi variare opportunamente le proporzioni fra i reattivi

FEDERAZIONE MEDICO SPORTIVA ITALIANA LABORATORIO ANTIDOPING	FOGLIO DI LAVORO	FL119
RICERCA DI ERITROPOIETINA RICOMBINANTE E ANALOGHI		
Rif. MP031 - Allegato	Pag. 8/10	Rev. 9

69	Preparare le soluzioni: -PBS -LFM 0,5% Portare a volume con PBS in un matraccio da 2000 ml 10 g di latte in polvere a bassi grassi [R-178 Lotto <u>254</u>] Agitare con agitatore magnetico. -250 ml di -LFM 5% -INK:aggiungere 250 µl di Indian ink [R-177 Lotto <u>254</u>] a 250 ml di LFM 5% precedentemente preparato
70	Lavare in una vaschetta da 30x 15 x 8 cm la IP1 con la soluzione LFM 0,5%, ponendola sullo Slow mixer per 1 minuto
71	Effettuare tale lavaggio per altre tre volte ponendo la vaschetta sullo Slow mixer per 10 minuti

E - SECONDO BLOTTING

72	Preparare l'acido acetico 0,7% Portare a volume con acqua ultrapura in un matraccio da 500 ml 3,5 ml di acido acetico [R-003 Lotto <u>254</u>]														
73	Preparare tre vaschette delle dimensioni di 25 x 25 x 8h cm contenenti rispettivamente metanolo, acqua ultrapura e acido acetico 0,7%														
74	Immergere un rettangolo della Immobilon P nella vaschetta contenente metanolo [R-038 Lotto <u>254</u>] per 1 minuto, quindi immergerla in quella contenente acqua per 2 minuti e quindi in quella contenente acido acetico 0,7% per almeno 20 minuti														
75	Immergere un rettangolo della Durapore nella vaschetta contenente acido acetico allo 0,7% per almeno 20 minuti														
76	5 minuti prima di utilizzarli, appoggiare ai bordi della vaschetta contenente acido acetico 0,7% i fogli di carta da filtro o simile in due pacchetti da quattro ciascuno ⁹ , in modo tale che si imbevano di soluzione per capillarità														
77	Sulla piastra del Nova Blot posizionare il pacchetto da quattro fogli di carta da filtro														
78	Lavare la IP1 con PBS e sovrapporla rapidamente al pacchetto														
79	Sovrapporre rapidamente la Durapore														
80	Sovrapporre rapidamente la Immobilon P (al termine della corsa nominata IP2)														
81	Sovrapporre rapidamente il pacchetto da quattro fogli di carta da filtro ⁹														
82	Sovrapporre quindi un rettangolo di parafilm, facendo pressione con un rullo, per eliminare le bolle d'aria.														
83	Chiudere il supporto e impostare i seguenti parametri: Potenziale: 35 V Potenza: 40 W Corrente: 0,8 mA x Area del gel Durata: 10 min Completare la seguente tabella con i parametri di inizio e fine corsa:														
<table border="1" style="width: 100%;"> <thead> <tr> <th>Potenziale (V)</th> <th>Corrente (mA)</th> <th>Potenza (W)</th> <th>Tempo(min)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">I</td> <td style="text-align: center;">154</td> <td style="text-align: center;">1</td> <td style="text-align: center;">0</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">F</td> <td style="text-align: center;">154</td> <td style="text-align: center;">1</td> <td style="text-align: center;">10</td> </tr> </tbody> </table>				Potenziale (V)	Corrente (mA)	Potenza (W)	Tempo(min)	I	154	1	0	F	154	1	10
Potenziale (V)	Corrente (mA)	Potenza (W)	Tempo(min)												
I	154	1	0												
F	154	1	10												

FEDERAZIONE MEDICO SPORTIVA ITALIANA LABORATORIO ANTIDOPING	FOGLIO DI LAVORO	FL119
RICERCA DI ERITROPOIETINA RICOMBINANTE E ANALOGHI		
Rif. MP031 - Allegato	Pag.	9/10
	Rev.	9

84 <input checked="" type="checkbox"/>	Si è interrotta l'analisi all'incubazione con l'anticorpo primario
	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> andare al punto 85
	Preparare la soluzione LFM 1% Portare a volume con PBS in un matraccio da 100 ml 1 g di latte in polvere a bassi grassi [R-178 Lotto <input type="checkbox"/>]. Agitare con agitatore magnetico.
85 <input checked="" type="checkbox"/>	Al termine della seconda migrazione aprire il supporto, prelevare il rettangolo di IP2 e immergerlo in una vaschetta da 30x 15 x 8 cm 250 ml di LFM 5% (oppure INK); immergere la IP1 in una vaschetta contenente PBS e conservarla in frigo fino al termine dell'analisi.
86 <input checked="" type="checkbox"/>	Posizionare la vaschetta sullo Slow mixer per 60 min.
87 <input checked="" type="checkbox"/>	Lavare la IP2 con PBS
88 <input checked="" type="checkbox"/>	Preparare ANTI IgG Aggiungere: <input checked="" type="checkbox"/> 26 µl di anticorpo segnato con la biotina Pierce [R-175 Lotto <input type="checkbox"/>] a 40 ml di LFM 1% <input type="checkbox"/> 10 µl di anticorpo segnato con la biotina Paris [R-175 Lotto <input type="checkbox"/>] a 40 ml di LFM 1%
89 <input checked="" type="checkbox"/>	Mettere in una vaschetta di vetro da 17x 8 cm (dimensioni interne-opp. da 25x13 in caso di gel da 25 cm) 40 ml di soluzione ANTI IgG e immergervi la IP2
90 <input checked="" type="checkbox"/>	Posizionare la vaschetta sullo Slow mixer per 90 min, in caso di tempi superiori posizionare lo Slow mixer in frigo (in quest'ultimo caso dopo aver tolto la vaschetta dal frigorifero lasciarla asciugare sulla Slow mixer a T ambiente per circa 20 min)
91 <input checked="" type="checkbox"/>	Preparare le soluzioni PBS la soluzione LFM 0,5% Portare a volume con PBS in un matraccio da 2000 ml 10 g di latte in polvere a bassi grassi [R-178 Lotto <input type="checkbox"/>]. Agitare con agitatore magnetico.
92 <input checked="" type="checkbox"/>	Lavare in una vaschetta da 30x 15 x 8 cm la IP2 con la soluzione LFM 0,5%, ponendola sullo Slow mixer per 1 minuto
93 <input type="checkbox"/>	Ripetere tale lavaggio altre due volte
94 <input checked="" type="checkbox"/>	Effettuare tale lavaggio per altre tre volte ponendo la vaschetta sullo Slow Mixer per 12 minuti
95 <input checked="" type="checkbox"/>	Si è interrotta l'analisi all'incubazione con l'anticorpo secondario:
	SI <input checked="" type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> andare al punto 96
	Preparare la soluzione LFM 1%: Portare a volume con PBS in un matraccio da 100 ml 1 g di latte in polvere a bassi grassi [R-178 Lotto <input type="checkbox"/>]. Agitare con agitatore magnetico.
96 <input checked="" type="checkbox"/>	Preparare la soluzione Perossidasi <input checked="" type="checkbox"/> Aggiungere 150 µl di streptavidina perossidasi Pierce [R-174 Lotto <input type="checkbox"/>] a 40 ml di LFM 1% <input type="checkbox"/> Aggiungere 20 µl di streptavidina perossidasi Biospa [R-174 Lotto <input type="checkbox"/>] a 40 ml di LFM 1%
97 <input checked="" type="checkbox"/>	Lavare la IP2 con PBS
98 <input checked="" type="checkbox"/>	Mettere in una vaschetta di vetro da 17x 8 cm (dimensioni interne-opp. da 25x13 in caso di gel da 25 cm) 40 ml di soluzione Perossidasi e immergervi la IP2
99 <input checked="" type="checkbox"/>	Posizionare la vaschetta sullo Slow Mixer per almeno un'ora
100 <input checked="" type="checkbox"/>	Lavare in una vaschetta da 30x 15 x 8 cm la IP2 con la soluzione PBS, ponendola sullo Slow Mixer per 1 minuto
101 <input checked="" type="checkbox"/>	Ripetere tale lavaggio per altre due volte
102 <input checked="" type="checkbox"/>	Effettuare tale lavaggio per altre tre volte ponendo la vaschetta sullo Slow Mixer per 10 minuti

FEDERAZIONE MEDICO SPORTIVA ITALIANA LABORATORIO ANTIDOPING	FOGLIO DI LAVORO	FL119
RICERCA DI ERITROPOIETINA RICOMBINANTE E ANALOGHI		
Rif. MP031 - Allegato		Pag. 10/10 Rev. 9

103 <input checked="" type="checkbox"/>	Preparare <input checked="" type="checkbox"/> subito prima di utilizzarla la soluzione CovaLight, mescolando uguali volumi (15 ml + 15 ml) delle due soluzioni West Pico Pierce [R-176 Lotto <u>2, 7</u>]; <input type="checkbox"/> 10 minuti prima del suo utilizzo la soluzione CovaLight, conservandola al buio; aggiungendo 25 gocce di CovB [R-176 B Lotto] in 25 ml di CovA [R-176 A Lotto]
104 <input checked="" type="checkbox"/>	Mettere in una vaschetta di vetro da 17x 8 cm (dimensioni interne-oppure da 25x 13 in caso di gel da 25 cm) la soluzione CovaLight preparata al punto precedente e immergervi la IP2
105 <input checked="" type="checkbox"/>	Agitare la vaschetta per qualche secondo

F - RIVELAZIONE MEDIANTE CHEMILUMINESCENZA

106 <input checked="" type="checkbox"/>	Posizionare la IP2 nel rivelatore.
107 <input checked="" type="checkbox"/>	Esporta per: <input type="checkbox"/> 1 minuto <input checked="" type="checkbox"/> 5 minuti <input type="checkbox"/> 10 minuti <input checked="" type="checkbox"/> 15 minuti <input type="checkbox"/> 30 minuti

NO Si sono verificate non conformità durante lo svolgimento della procedura ?
 SI vedere Rapporto FL053 N° _____

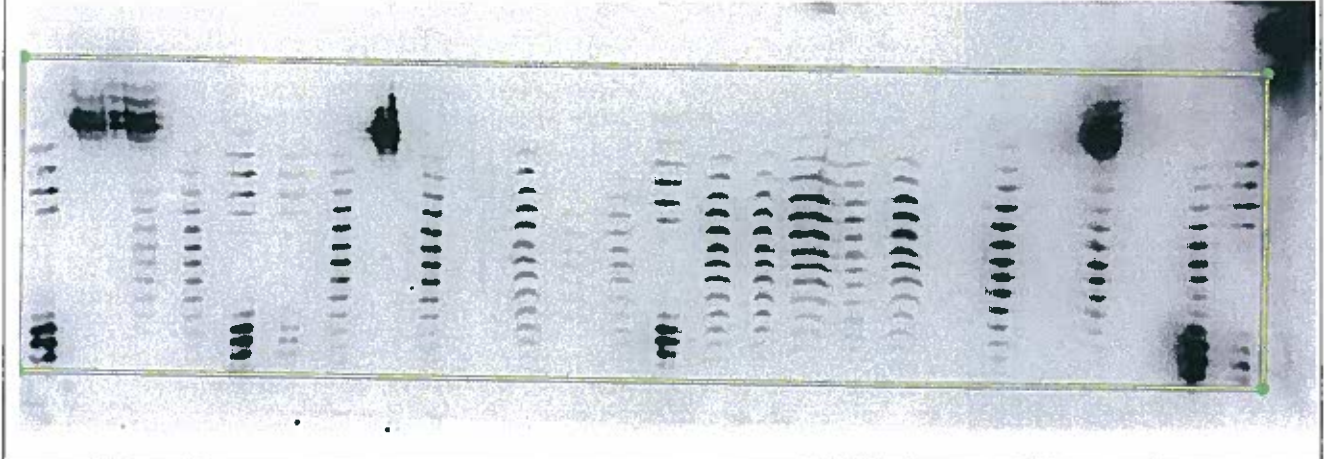
Operatore Sigla e Firma	Data	Operazioni eseguite
<u>ees S. Pico</u>	<u>20/5/10</u>	da punto [1] a punto [2] / 1 o da [1] a [2]
<u>ees S. Pico</u>	<u>21/5/10</u>	da punto [2] a punto [3] / 1 o da [2] a [3]
<u>ees S. Pico</u>	<u>22/5/10</u>	da punto [1] a punto [10]
		da punto [] a punto []
		da punto [] a punto []
		da punto [] a punto []

II.3.4 Confirmation Test Results

Gel images and data of positive control standard (BRNE and Mir), negative control standard (NIBSC), sample internal laboratory code 10E003 A4433 (including the stability test), positive reference sample (USPMir) and negative reference urine (BUR).

TOTAL IMAGE OF THE GEL

THE RECTANGLE INDICATES THE AREA SELECTED FOR PROCESSING THE DENSITOMETRY DATA



GENERAL VIEW OF ALL THE PROCESSED LANES

22/05/2010
13:30

Session: Analysis 100522-15min.tif 2010-05-22
Image File: 100522-15min.tif
Operator:

GASepo Analysis Report

GAS
epo

Laboratory: Laboratory
Date of Analysis: 22/05/2010
13.27

1. EP	2. Mir	3. Us	4. Bur	5. 10	6. 10	7. Ni	8. 10	9. Ni	10. 1	11. 1	12. 1	13. 1	14. E	15. 1	16. 1	17. 10	18. 1	19. 1	20. P	21. B	22. P	23. U	24. P	25. U	26. E
28,8	100,0	64,7	24,8	27,2	35,9	22,8	99,9	26,3	75,0	38,5	23,8	20,8	27,3	34,2	25,4	41,7%	35,0	37,8	26,9	31,8	38,2	71,4	9,0%	8,7%	52,8
71,2	0,0%	4,1%	9,6%	72,8	64,1	12,3	0,0%	10,5	0,0%	11,7	4,2%	8,6%	72,7	9,7%	14,0	7,3%	10,1	4,3%	0,2%	7,5%	13,0	2,1%	0,0%	84,7	47,2

COLORLEGEND: EPOX (A) DAUREPOETIM (B)

laboratorio antidoping
laboratorio antidoping

GASepo Software v3.2004-ARC (www.gasepo.com) - 2010

12/11

POSITIVE CONTROL: RHEPO AND NESP STANDARDS (BRNE)

22/05/2010
13.39

Session: Analysis 100522-15min.tif 2010-05-22
Image File: 100522-15min.tif
Operator:

GASepo Analysis Report

GAS
epo

Laboratory: Laboratory
Date of Analysis: 22/05/2010
13.27

1. EPOαβ + Darba	
28.8%	71.2%

Lane #1: EPOαβ + Darba									
Name	Comment	CentX	CentY	Volume Abs	Volume nSum	Volume nMax	Height Abs	Height nSum	Height nMax
5		9,5	66,8	158,8	0,2	0,6	2,8	0,4	1,6
4		16,2	93,1	3780,3	3,9	15,0	33,4	4,4	18,3
3		19,3	114,8	7648,5	7,8	30,3	62,5	8,2	34,3
2		19,0	136,8	9870,9	10,1	39,1	100,5	13,2	55,2
1		20,1	156,9	5943,3	6,1	23,6	51,7	6,8	28,4
A		18,7	265,0	6415,2	6,6	25,4	42,3	5,6	23,3
B		19,0	278,8	21049,1	22,5	87,0	146,5	19,3	80,5
C		20,0	283,0	25226,6	25,9	100,0	182,1	24,0	100,0
D		21,2	307,8	14188,9	14,5	58,2	124,9	16,4	68,6

NEGATIVE CONTROL: URINARY EPO STANDARD (NIBSC)

22/05/2010
13.39

Session: Analysis 100522-15min.tif 2010-05-22
Image File: 100522-15min.tif
Operator:

GASepo Analysis Report

GAS
epo

Laboratory: Laboratory
Date of Analysis: 22/05/2010
13.27

7. Nibsc	
22.8%	12.3%

Lane #7: Nibsc									
Name	Comment	CentX	CentY	Volume Abs	Volume nSum	Volume nMax	Height Abs	Height nSum	Height nMax
5		16,5	72,9	115,7	0,2	1,1	2,3	0,4	2,5
4		18,3	94,7	1219,7	1,8	11,8	9,3	1,8	10,3
3		19,1	112,6	2628,6	4,0	25,4	18,6	3,2	20,6
2		20,4	133,4	3814,4	5,7	38,9	32,2	5,5	36,7
1		21,0	151,8	7310,7	11,0	70,8	71,0	12,2	78,7
α		20,5	170,9	9783,1	14,7	94,5	79,9	13,8	88,6
β		20,1	188,9	9639,7	14,5	83,3	80,2	15,5	100,0
γ		20,3	205,8	10332,6	15,8	100,0	88,7	15,3	98,3
δ		20,5	223,1	7899,7	11,9	76,5	73,0	12,6	80,9
ε		18,9	241,3	5389,9	8,1	52,2	42,9	7,4	47,5
A		18,6	258,0	3443,2	5,2	33,3	30,8	5,3	33,9
B		17,4	275,9	2441,5	3,7	23,8	18,8	2,9	18,7
C		19,1	290,5	1465,0	2,2	14,2	11,1	1,9	12,3
D		18,7	307,2	818,5	1,2	7,9	7,3	1,3	8,1

POSITIVE CONTROL: MIRCERA (MIR)

22/05/2010
13.39

Session: Analysis 100522-15min.tif 2010-05-22
Image File: 100522-15min.tif
Operator:

GASepo Analysis Report

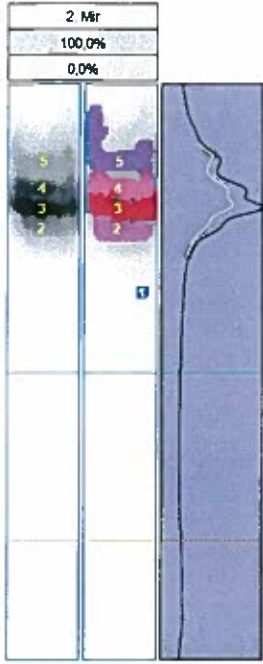
GAS
epo

Laboratory: Laboratory
Date of Analysis: 22/05/2010
13.27


2 Mir

100.0%

0.0%



Lane #2: Mir										
Name	Comment	CentX	CentY	Volume Abs	Volume nSum	Volume nMax	Height Abs	Height nSum	Height nMax	
5		18,2	42,9	5034,2	16,5	34,5	21,3	14,6	31,7	
4		17,5	57,6	8627,5	29,3	81,2	38,2	26,1	56,9	
3		17,5	69,3	14586,8	47,9	100,0	67,1	45,9	100,0	
2		17,1	60,7	6886,6	22,6	47,2	40,0	27,3	59,5	
1		30,4	116,3	31,8	0,1	0,2	1,1	0,7	1,6	



GASepo software © 2004, APC Development Systems GmbH, Austria

Report Page 4/22

SAMPLE INTERNAL LABORATORY CODE 0910E003 A4433: CONFIRMATION

22/05/2010
13.39

Session: Analysis 100522-15min.tif 2010-05-22
Image File: 100522-15min.tif
Operator:

GASepo Analysis Report

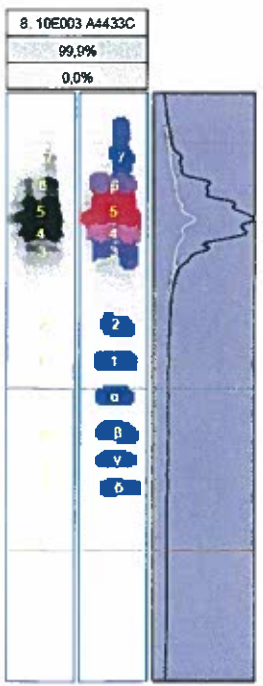
GAS
epo

Laboratory: Laboratory
Date of Analysis: 22/05/2010
13.27


8 10E003 A4433C

99.9%

0.0%



Lane #8: 10E003 A4433C										
Name	Comment	CentX	CentY	Volume Abs	Volume nSum	Volume nMax	Height Abs	Height nSum	Height nMax	
7		21,7	34,9	8102,8	6,4	13,7	109,3	14,9	54,4	
6		18,2	50,2	19416,8	15,4	32,9	196,7	26,8	98,0	
5		17,4	64,6	59066,7	47,0	100,0	200,8	27,4	100,0	
4		17,4	76,7	32938,6	26,2	56,8	192,9	28,3	96,0	
3		18,1	86,4	13730,6	10,9	23,2	134,3	18,3	66,9	
2		18,9	126,4	274,7	0,2	0,5	2,8	0,4	1,4	
1		18,0	146,1	172,6	0,1	0,3	2,3	0,3	1,2	
α		18,4	165,9	99,0	0,1	0,2	1,5	0,2	0,8	
β		20,1	184,9	37,0	0,0	0,1	0,9	0,1	0,5	
γ		20,0	199,9	25,8	0,0	0,0	0,9	0,1	0,5	
δ		20,7	215,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	



GASepo software © 2004, APC Development Systems GmbH, Austria

Report Page 1/22

SAMPLE INTERNAL LABORATORY CODE 0910E003 A4433: STABILITY TEST

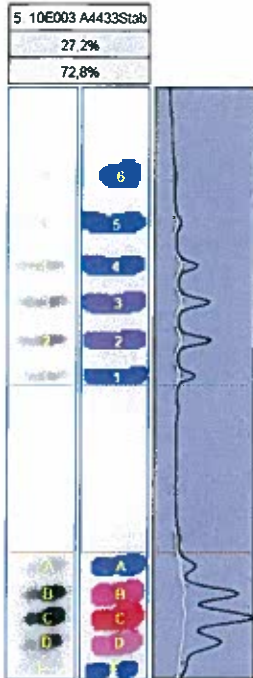
22/05/2010
13:39

GASepo Analysis Report



Session: Analysis 100522-15min.tif 2010-05-22
Image File: 100522-15min.tif
Operator:

Laboratory: Laboratory
Date of Analysis: 22/05/2010
13.27



Lane #5: 10E003 A4433Stab									
Name	Comment	CentX	CentY	Volume Abs	Volume nSum	Volume nMax	Height Abs	Height nSum	Height nMax
6		20,4	47,8	209,4	0,3	0,9	1,7	0,2	0,8
5		18,2	73,8	960,5	1,2	4,2	8,9	1,2	4,8
4		17,9	96,8	3794,0	4,6	16,6	36,7	5,0	19,8
3		19,2	116,6	6786,4	8,2	29,7	69,2	9,5	37,3
2		19,8	137,3	6784,9	8,2	29,6	77,3	10,6	41,8
1		19,1	156,7	3618,5	4,4	15,8	38,0	5,2	20,4
A		21,5	260,1	4486,2	5,4	19,6	30,1	5,4	21,1
B		21,3	275,0	16395,1	19,9	71,6	138,9	19,0	74,8
C		21,3	267,9	22883,8	27,8	100,0	185,6	25,5	100,0
D		20,7	301,6	13566,5	16,5	59,3	107,6	14,8	58,0
E		18,1	316,1	1912,1	2,3	8,4	17,7	2,4	9,5

cal/bonded research
Antidoping Laboratory

GASepo software (c) 2004 APC Software/Research/Analytical
Report Page 1/2

POSITIVE REFERENCE SAMPLE (USPMIR)

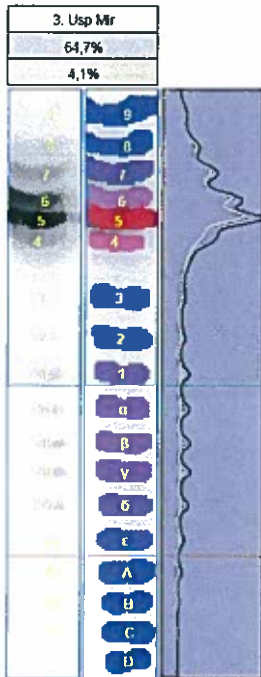
22/05/2010
13:36

GASepo Analysis Report



Session: Analysis 100522-15min.tif 2010-05-22
Image File: 100522-15min.tif
Operator:

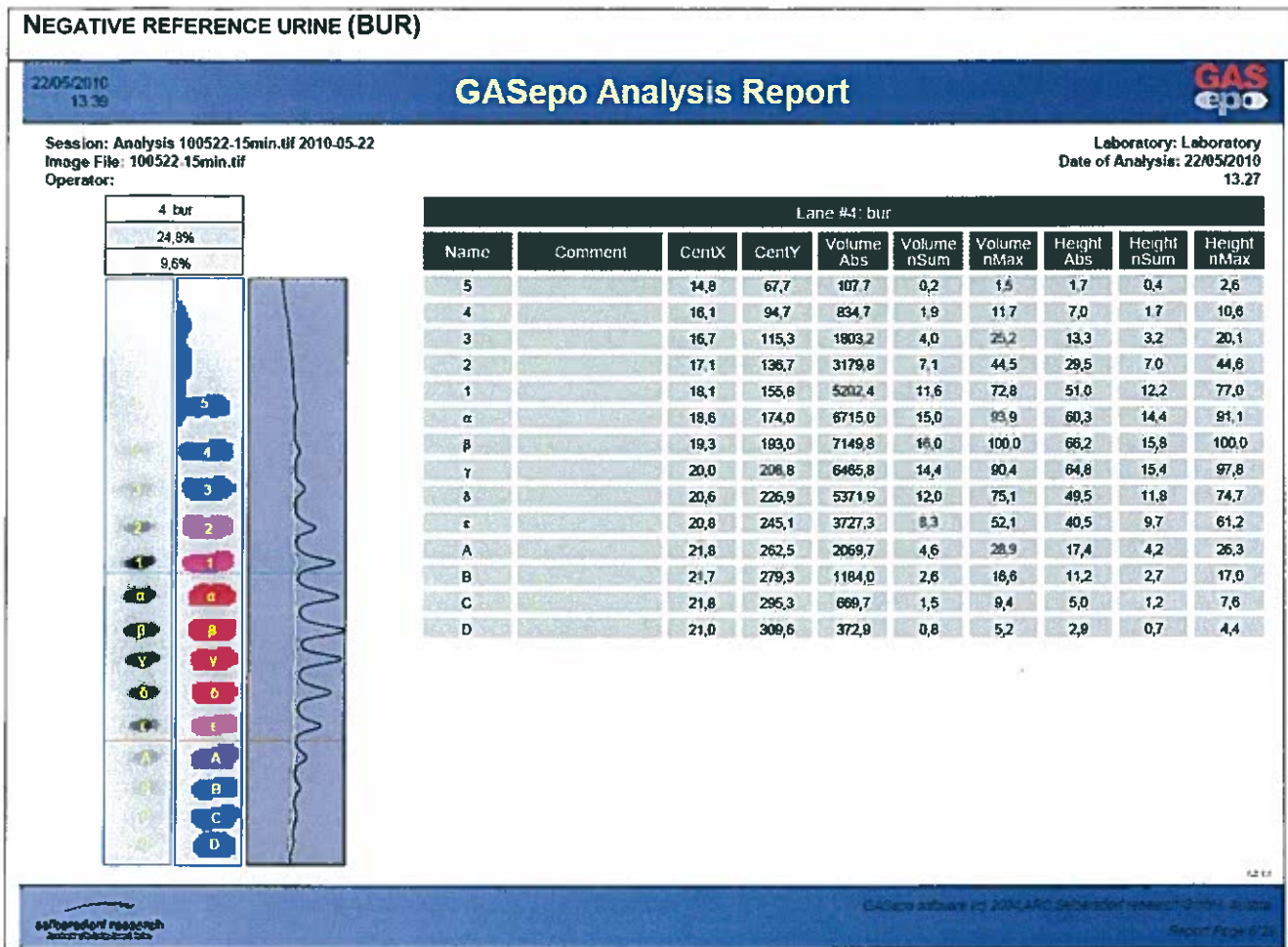
Laboratory: Laboratory
Date of Analysis: 22/05/2010
13.27



Lane #3: Usp Mir									
Name	Comment	CentX	CentY	Volume Abs	Volume nSum	Volume nMax	Height Abs	Height nSum	Height nMax
9		22,0	13,1	354,8	0,7	3,0	3,1	0,7	3,3
8		21,8	31,0	1228,6	2,3	10,5	10,1	2,4	10,8
7		19,1	46,6	3315,1	6,1	26,4	28,9	7,0	31,0
6		18,8	61,2	4921,1	9,1	42,2	42,8	10,4	45,9
5		16,9	71,9	11667,0	21,5	100,0	93,2	22,6	100,0
4		15,1	83,0	6497,7	12,0	55,7	40,9	9,9	43,9
3		17,6	113,6	1435,1	2,6	12,3	7,7	1,9	8,3
2		18,5	135,7	2084,9	3,8	17,9	11,9	2,9	12,8
1		19,5	155,1	3527,2	8,5	30,2	26,7	6,5	28,7
α		20,2	174,2	3706,5	8,8	31,8	26,0	6,3	27,9
β		20,8	193,0	3968,0	7,3	34,0	31,3	7,6	33,8
γ		21,1	206,7	3807,0	7,0	32,6	29,9	7,2	32,1
δ		21,4	226,9	3373,5	6,2	28,9	26,7	6,5	28,8
ε		21,6	245,6	2077,4	3,8	17,8	16,5	4,0	17,7
A		22,5	263,3	1043,6	1,9	8,9	7,7	1,9	8,3
B		23,2	280,9	601,1	1,1	5,2	4,8	1,2	5,2
C		23,8	296,0	368,5	0,7	3,2	3,0	0,7	3,2
D		23,3	311,3	203,6	0,4	1,7	1,8	0,4	2,0

cal/bonded research
Antidoping Laboratory

GASepo software (c) 2004 APC Software/Research/Analytical
Report Page 2/2



II.3.5 Test Validity Data

The validity of the test is evaluated according to the WADA technical document TD2009EPO. Sensitivity performance verification is demonstrated by the positive and negative control within the entire gel.

II.3.7 Conclusions

Data were evaluated according to the WADA technical document TD2009EPO.

The acceptability, identification and stability criteria defined in the WADA technical document TD2009EPO are fulfilled.

The second opinion of a different accredited antidoping laboratory (AFLD Laboratory) confirmed our conclusions.

An adverse analytical finding for Continuous Erythropoietin Receptor Activator (CERA) was consequently reported for sample code 10E003 A4433.

II.4 Second opinion by AFLD Laboratory (Paris) on the EPO analysis results on sample code 10E003 A4433

E10052600033



E10052600033

FMSI
LABORATORIO ANTIDOPING
Prot. n° 0323 26 S. 10



Département des analyses

Châtenay-Malabry May 25th, 2010

Laboratorio Antidoping

Dr. Francesco BOTRE
Federazione Medico Sportiva Italiana
Largo Giulio Onesti 1
IT - 00197 ROME RM
ITALY

According to the files corresponding to sample 10E003A4433 (screening, confirmation and stability test) and WADA criteria from TD2009EPO, we conclude that this sample shows the presence of recombinant erythropoietin (pegylated Epoetin beta - MIRCERA).

Best regards,

Dr Françoise LASNE
Director

II.5 Test Report



FEDERAZIONE MEDICO SPORTIVA ITALIANA
LABORATORIO ANTIDOPING FMSI

RAPPORTO DI PROVA TEST REPORT

Largo Giulio Onesti, 1
00197 Roma
Tel: +39.06.36859600
Fax: +39.06.8078971

Prot. 1725/DEX/rst

Data/Date 26/05/2010

RAPPORTO DI PROVA SUPPLEMENTARE AL / SUPPLEMENTARY TEST REPORT TO PROT 151517 MB1517
RISERVATA PERSONALE/CONFIDENTIAL

ATO:	I.A.A.F.
Att.no/Attention:	Dr. G. COLLE
Indirizzo/Address:	BP 359. 98007
CAP Città Nazione/PC Place Country:	MONACO CEDEX

LOTTO DI ACCETTAZIONE/RECEIPT BATCH:	10E003	CATENA DI CUSTODIA/TEST MISSION CODE:	IAAF 03/2010		
RICHIEDENTE /RICHEDEnte:	FIDAL	FEDERAZIONE /FEDERATION	IAAF		
SPORT-GARA/SPORT-EVENT:	ATHLETICS - GARA INT LE DI MARCIA 20 KM - IAAF	LUOGO /PLACE:	SESTO SAN GIOVANNI		
DATA DELLA GARA DATE OF EVENT:	01/05/2010	DATA/ORA DI ARRIVO CAMPIONI: RECEIPT OF SAMPLES	02/05/10 - 8.20		
INIZIO ANALISI: START OF ANALYSIS	03/05/2010	FINE ANALISI: END OF ANALYSIS	26/05/2010		
TIPO DI CAMPIONE/TYPE OF SAMPLE:	URINA/URINE	TIPO DI TEST TYPE OF TEST:	IN COMPETIZIONE CON EPO/INESP/IN COMPETITION WITH EPO/NESP		
CODICI DEI CAMPIONI ANALIZZATI/SAMPLE CODES					
CODICE INTERNO INTERNAL CODE	CODICE ESTERNO EXTERNAL CODE	SESSO GENDER	CODICE INTERNO INTERNAL CODE	CODICE ESTERNO EXTERNAL CODE	SESSO GENDER
A4433	3511158	M	--	--	--

I metodi utilizzati sono riportati nel documento EL008/Analytical methods are reported in EL008
Tali metodi sono in accordo con i documenti ISO/IEC 17025 e WADA International Standard for Laboratories/These methods are in compliance with ISO/IEC 17025 standard and WADA International Standard for Laboratories

I risultati analitici si riferiscono esclusivamente ai campioni sottoposti a prova/The analytical results refer exclusively to the samples included in the report.
Il campionamento è a cura del cliente/The client is responsible for the sampling

RISULTATI/RESULTS:

ANALISI PER / ANALYSIS FOR: EPO E ANALOGHI / EPO AND ANALOGUES

Adverse Analytical Finding

Le analisi effettuate sul campione A sopra riportato hanno evidenziato la presenza di/The complete analysis of the A sample showed the presence of:

- CONTINUOUS ERYTHROPOIETIN RECEPTOR ACTIVATOR (CERA)

NOTE, PARERI ED INTERPRETAZIONI /NOTES, OPINIONS AND INTERPRETATIONS

The sample showed an atypical IEF EPO profile that does not fit with endogenous EPO. Athlete's targeting and/or analysis of a blood sample, if available, is strongly recommended.

CC WADA (ADAMS)



Xavier de la Torre
Dr. Xavier de la Torre
Direttore Scientifico/Scientific Vice-Director

Vieta la riproduzione parziale del presente documento salvo autorizzazione scritta del Direttore Scientifico
Partial reproduction of this report without authorization of the Scientific Director is forbidden

Page 1/ 1

