

## **APPENDIX 3**



## VERBALE DI COMUNICAZIONE RISULTATI DI CONFERMA rEPO/NESP

Rif. MP031

Pag. 1/1  
Rev. 3

LOTTO DI ACCETTAZIONE :	CODICE LABORATORIO:	DATA:
10E003	A4433	22/5/10

## VALUTAZIONE/OSSERVAZIONI

PRESENZA di Mircera. ACCERTATA CONFORMITÀ CON I CRITERI DI POSITIVITÀ PRESCRITTI NEL DOCUMENTO TECNICO WADA TD 2009 EPC

		Criterio	Si	No
	0	il test di stabilità è stato superato	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> rEPO (epoetina α e β)	1	nell'area basica ci sono almeno tre bande consecutive accettabili, che devono essere identificate come "1,2,3" nella corrispondente preparazione di riferimento	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	2	le due bande più intense dell'area basica, devono essere consecutive e devono essere la 1 e la 2, o la 2 e la 3	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	3	ciascuna delle due bande più intense nell'area basica deve essere più intensa (approssimativamente 2 volte o più) di ogni altra banda nell'area endogena	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> altre epoetine	1	nell'area basica ci sono almeno tre bande consecutive accettabili	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	2	le due bande più intense nell'area basica devono essere consecutive	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	3	la somma delle intensità di tutte le bande nell'area basica deve essere approssimativamente l'85% o più della intensità totale delle bande presenti nella lane del campione	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> NESP	1	nell'area acida ci sono almeno tre bande consecutive accettabili, che devono essere identificate come "B,C e D" nella corrispondente preparazione di riferimento	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	2	la banda più intensa nell'area acida deve essere la "C" o la "D"	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	3	entrambe le bande, "C" o "D" devono essere più intense della banda "B"	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input checked="" type="checkbox"/> Mircera	1	nell'area basica ci sono almeno quattro bande consecutive accettabili e corrispondenti alla preparazione di riferimento	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

RESPONSABILE  
ESECUZIONE PROVA

Sigla

Firma

1



## VERBALE DI COMUNICAZIONE RISULTATI DI CONFERMA rEPO/NESP

Pag. 1/1  
Rev. 3

Rif. MP031

LOTTO DI ACCETTAZIONE :	CODICE LABORATORIO:	DATA:
10E 003	B44 33	27/10

## VALUTAZIONE/OSSERVAZIONI

PRESENZA DI MIRCERA ACCERTATA CONFORMITÀ CON I CRITERI DI POSITIVITÀ PRESCRITTI NEL DOCUMENTO TECNICO WADA  
TD 2009 EPO.

		Criterio	Si	No
		0 il test di stabilità è stato superato	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	rEPO (epoetina $\alpha$ e $\beta$ )	1 nell'area basica ci sono almeno tre bande consecutive accettabili, che devono essere identificate come "1,2,3" nella corrispondente preparazione di riferimento	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>		2 le due bande più intense dell'area basica, devono essere consecutive e devono essere la 1 e la 2, o la 2 e la 3	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>		3 ciascuna delle due bande più intense nell'area basica deve essere più intensa (approssimativamente 2 volte o più) di ogni altra banda nell'area endogena	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	altre epoetine	1 nell'area basica ci sono almeno tre bande consecutive accettabili	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>		2 le due bande più intense nell'area basica devono essere consecutive	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>		3 la somma delle intensità di tutte le bande nell'area basica deve essere approssimativamente l'85% o più della intensità totale delle bande presenti nella lane del campione	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	NESP	1 nell'area acida ci sono almeno tre bande consecutive accettabili, che devono essere identificate come "B,C e D" nella corrispondente preparazione di riferimento	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>		2 la banda più intensa nell'area acida deve essere la "C" o la "D"	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>		3 entrambe le bande, "C" o "D" devono essere più intense della banda "B"	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input checked="" type="checkbox"/>	Mircera	1 nell'area basica ci sono almeno quattro bande consecutive accettabili e corrispondenti alla preparazione di riferimento	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

RESPONSABILE  
ESECUZIONE PROVA

Sigla

TESSig. Francesco

Firma



## APPENDIX 4

---



Messaggio inoltrato  
**Da:** Francesco Botrè <[francesco.botre@uniroma1.it](mailto:francesco.botre@uniroma1.it)>  
**Data:** Sat, 22 May 2010 14:03:12 +0200  
**A:** Francoise Lasne <[F.Lasne@afld.fr](mailto:F.Lasne@afld.fr)>  
**Conversazione:** Suspicious CERA sample  
**Oggetto:** Suspicious CERA sample

Dear Françoise,

I am here transmitting the files respective to a urine sample (internal code: 10E003A4433) that shows the presence of CERA. We have learned that blood is a better and more stable matrix for CERA, but we have still to screen for/confirm it in urine if so requested by an ADO.

The files I am transmitting are the following:

GASepo and tiff images of the screening analysis (image obtained on May 13th, sample is on lane 3);  
GASepo and tiff images of the confirmation analysis (imaged obtained today, May 22nd, sample is on lane 8 and the stability test on lane 5).

Please note that on lane 10 we had another sample being confirmed for CERA, but, in our opinion, the signal is not good enough to report an adverse analytical finding: our plan is to report the sample as negative, with the indication "IEF profile not compatible with endogenous EPO. Athlete's targeting and/or CERA analysis in blood is recommended".

I thank you once again for your cooperation and support.

Best regards, greetings from Italy, and have a nice weekend

Francesco

(with Xavier and Stefania)

-----  
Prof. Francesco Botrè  
Scientific Director  
Laboratorio Antidoping FMSI  
Largo Giulio Onesti, 1  
00197 Rome RM  
Italy  
phone: +39-06-36859600  
fax: +39-06-8078971  
email: [francesco.botre@uniroma1.it](mailto:francesco.botre@uniroma1.it)



Châtenay-Malabry May 25<sup>th</sup>, 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



-----Messaggio inoltrato  
**Da:** Francesco Botrè <[francesco.botre@uniroma1.it](mailto:francesco.botre@uniroma1.it)>  
**Data:** Wed, 16 Jun 2010 13:32:16 +0200  
**A:** Francoise Lasne <[F.Lasne@afl.d.fr](mailto:F.Lasne@afl.d.fr)>  
**Conversazione:** "B" analysis for CERA  
**Oggetto:** "B" analysis for CERA

Dear Françoise,

We are here enclosing the .tiff and GASEpo files of the IEF "B" analysis of sample code 10E003B4433; for the corresponding "A" sample you gave your second opinion on May 25th. 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.

Tomorrow we will also send to you the files of the SDS-PAGE analysis, which will be completed at around this time.

Thank you again for your cooperation and assistance.

Best regards

Francesco

-----  
Prof. Francesco Botrè  
Scientific Director  
Laboratorio Antidoping FMSI  
Largo Giulio Onesti, 1  
00197 Rome RM  
Italy  
phone: +39-06-36859600  
fax: +39-06-8078971  
email: [francesco.botre@uniroma1.it](mailto:francesco.botre@uniroma1.it)

----- Fine del messaggio inoltrato

----- Fine del messaggio inoltrato



**Da:** Francesco Botrè <[francesco.botre@uniroma1.it](mailto:francesco.botre@uniroma1.it)>

**Data:** Thu, 17 Jun 2010 14:59:38 +0200

**A:** Francoise Lasne <[F.Lasne@afl.d.fr](mailto:F.Lasne@afl.d.fr)>

**Conversazione:** SDS-PAGE image

**Oggetto:** SDS-PAGE image

Dear Françoise,

As announced, we are here sending the files respective to the SDS-PAGE analysis of the same B sample we have sent you the IEF images yesterday.

Sample is on lane 3.

Once again, thank you for your cooperation and support

Francesco

-----  
Prof. Francesco Botrè  
Scientific Director  
Laboratorio Antidoping FMSI  
Largo Giulio Onesti, 1  
00197 Rome RM  
Italy  
phone: +39-06-36859600  
fax: +39-06-8078971  
email: [francesco.botre@uniroma1.it](mailto:francesco.botre@uniroma1.it)

----- Fine del messaggio inoltrato



-----Messaggio inoltrato

**Da:** Francoise Lasne <[F.Lasne@afid.fr](mailto:F.Lasne@afid.fr)>

**Data:** Fri, 18 Jun 2010 09:55:20 +0200

**A:** Francesco Botrè <[francesco.botre@uniroma1.it](mailto:francesco.botre@uniroma1.it)>

**Conversazione:** "B" analysis for CERA

**Oggetto:** RE: "B" analysis for CERA

Dear Francesco,

The presence of CERA in the sample is clear, 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. Would this create any problem (not from a technical but from a regulation point of view)?

Best regards,  
Françoise



-----  
Messaggio inoltrato  
**Da:** Francoise Lasne <[F.Lasne@afld.fr](mailto:F.Lasne@afld.fr)>  
**Data:** Fri, 18 Jun 2010 11:11:04 +0200  
**A:** Francesco Botrè <[francesco.botre@uniroma1.it](mailto:francesco.botre@uniroma1.it)>  
**Conversazione:** SDS-PAGE image  
**Oggetto:** RE: SDS-PAGE image

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



-----  
Messaggio inoltrato  
**Da:** Francesco Botrè <[francesco.botre@uniroma1.it](mailto:francesco.botre@uniroma1.it)>  
**Data:** Wed, 07 Jul 2010 13:01:45 +0200  
**A:** Francoise Lasne <[F.Lasne@afl.d.fr](mailto:F.Lasne@afl.d.fr)>  
**Conversazione:** "B" analysis for CERA - follow up  
**Oggetto:** "B" analysis for CERA - follow up

Dear Françoise,

We go back to you for the evaluation of the .tiff (also in inverted colors) and the GASEpo files obtained following the repetition of the IEF "B" analysis of sample code 10E003B4433, that has just been completed. The files of the first IEF analysis and of the SDS-PAGE analysis had been sent to you on June 16th and 17th respectively.

The sample is on lane 11 and the stability test is on lane 13.

Best regards

Francesco



Châtenay-Malabry July 08<sup>th</sup>, 2010

Département des analyses

**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 10E003B4433 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



Messaggio inoltrato  
**Da:** Francesco Botrè <[francesco.botre@uniroma1.it](mailto:francesco.botre@uniroma1.it)>  
**Data:** Wed, 07 Jul 2010 13:18:56 +0200  
**A:** Francoise Lasne <[F.Lasne@afld.fr](mailto:F.Lasne@afld.fr)>  
**Conversazione:** WADA Technical Document for EPO  
**Oggetto:** WADA Technical Document for EPO

Dear Françoise,

I have been asked by Prof. Oftebro, that is the Athlete's expert attending the "B" analysis for CERA we just sent to you the files, to ask directly to you some clarifications on the wording used in the current version of the WADA technical document for EPO, and specifically regarding the use of the terms "bands" and "corresponding" in section 3.2.4 of the same document.

Prof. Oftebro is also asking for further clarifications on the differences between the definitions given in section 3.2.4. and 3.2.5. SDS-PAGE, as far as the criteria used to identify the SDS-PAGE bands and the IEF bands, and why the criteria used for SDS-PAGE appear to have been specified in the technical document in more details. I answered to those questions myself, but Prof. Oftebro has kindly requested me to forward these questions to you, as one of the Authors of the technical document.

I thank you once again for your cooperation.

Best regards

Francesco

-----  
Prof. Francesco Botrè  
Scientific Director  
Laboratorio Antidoping FMSI  
Largo Giulio Onesti, 1  
00197 Rome RM  
Italy  
phone: +39-06-36859600  
fax: +39-06-8078971  
email: [francesco.botre@uniroma1.it](mailto:francesco.botre@uniroma1.it)

----- Fine del messaggio inoltrato



Messaggio inoltrato  
**Da:** Francoise Lasne <[F.Lasne@afld.fr](mailto:F.Lasne@afld.fr)>  
**Data:** Thu, 8 Jul 2010 11:32:29 +0200  
**A:** Francesco Botrè <[francesco.botre@uniroma1.it](mailto:francesco.botre@uniroma1.it)>  
**Conversazione:** "B" analysis for CERA - follow up  
**Oggetto:** RE: "B" analysis for CERA - follow up

Dear Francesco,

Here is the second opinion.

Are you sure that we must answer the question of Prof. Oftebro?

The pattern of CERA is described in section 3 as « some bands approximately colocalized with those defined by rEPO and others interspersed amongst rEPO bands ».

In section 3.2.4, the identification criteria of CERA are “in the basic area, there must be at least 4 consecutive bands corresponding with CERA reference substance”.

The position of CERA reference substance (from its most basic to its most acidic isoform) in the image defines the area that must be considered for interpretation of a result.

Taking in account the description of the pattern, the identification criteria are “in the basic area, there must be at least 4 consecutive bands situated in the area defined by the position of CERA reference with some bands approximately colocalized with those defined by rEPO and others interspersed amongst rEPO bands”.

The specificity of these criteria has been validated by evaluation of control urine (including “effort urine” samples) and blood samples.

I don't understand the meaning of “why the criteria used for SDS-PAGE appear to have been specified in the technical document in more details”. The interpretation of a SDS image is based on the “behaviour of each substance, i.e. position and shape (width, focused or more diffused)”, and, in my opinion, this is not a detailed description.

What is your opinion about the questions of Prof. Oftebro?

---

Best regards,  
Françoise



## APPENDIX 5





FEDERAZIONE MEDICO SPORTIVA ITALIANA

LABORATORIO ANTIDOPING

30 JUL. 2010

PROT. N. 2349/DEX/sbr

OGG.: Documentation Package  
Sample B coded 3511558

ROMA, 28<sup>th</sup> July 2010

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

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

Nella risposta citare il numero di protocollo

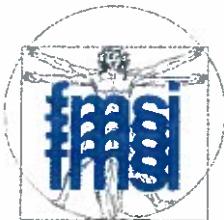
Dear Dr. Capdevielle,

Following to your e-mail request dated 08<sup>th</sup> July 2010, please find here enclosed the Documentation Package concerning the sample B coded 3511558.

Best regards,

Xavier de la Torre  
Scientific Vice-Director

The stamp contains the following text:  
FEDERAZIONE MEDICO SPORTIVA ITALIANA - ROMA  
LABORATORIO ANTIDOPING  
Xavier de la Torre  
Scientific Vice-Director



FEDERAZIONE MEDICO SPORTIVA ITALIANA  
LABORATORIO ANTIDOPING

**SAMPLE CODE: 3511158  
INTERNAL LABORATORY CODE: 10E003 B4433**

**PRESENCE OF  
CONTINUOUS ERYTHROPOIETIN RECEPTOR  
ACTIVATOR  
(CERA)**

Reviewed by:

Xavier Lele

Date:

27.7.10

Approved by:

François Jester

Date:

27.07.2010

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
<b>SECTION I: RECEIPT AND HANDLING OF SAMPLES .....</b>	<b>7</b>
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. "B" Analysis sample opening forms .....	13
I.6 Sample chain of custody (Distribution forms of new aliquots) .....	18
<b>SECTION II: SAMPLE 3511158 CONFIRMATION PROCEDURE.....</b>	<b>20</b>
II.1 Preliminary tests .....	21
II.1.1 Visual inspection.....	21
II.1.2 Preanalysis results forms .....	22
II.1.3 Preliminary determinations .....	23
II.1.4 Preliminary determinations results.....	24
<b>CONTINUOUS ERYTHROPOIETIN RECEPTOR ACTIVATOR (CERA)</b>	
CONFIRMATION RESULTS .....	26
II.2 Confirmation Test Data - IEF .....	27
II.2.1 Confirmation procedure IEF Test Description.....	27
II.2.2 Instruments and instrumental conditions .....	28
II.2.3 Confirmation procedure - Aliquot chain of custody documentation.....	30
II.2.4 Confirmation Test Results .....	40
II.2.5 Test Validity Data .....	45
II.2.6 Confirmation IEF conclusions .....	46
II.2.7 Second Confirmation procedure - Aliquot chain of custody documentation....	47

II.2.8 Second Confirmation Test Results .....	57
II.2.9 Test Validity Data .....	62
II.2.10 Result review .....	63
II.2.11 Conclusions .....	64
II.3 Second opinion by AFLD Laboratory (Paris) on the EPO analysis results on sample code 10E003 B4433 .....	65
II.4 SDS analysis .....	66
II.4.1 Instrumental conditions for SDS analysis .....	66
II.4.2 Additional evidence .....	67
II.4.3 SDS-Page results .....	74
II.5 Test Report .....	79

## 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 MGA</i>	X
ALOCCI ROBERTO	RAL	QUALITY CONTROL MANAGER ANALYST	<i>Roberto RAL</i>	
BARBERINI STEFANO	SBR	TECHNICAL SECRETARIAT	<i>Stefano Barberini SBR</i>	X
BOTRÈ FRANCESCO	FMB	SCIENTIFIC DIRECTOR HEAD OF LABORATORY	<i>Francesco Botrè FMB</i>	X
BRAGANÒ MARIA CRISTINA	MCB	SENIOR ANALYST	<i>Maria Cristina Braganò MCB</i>	
CIACCIavicca PIETRO	PCC	ANALYST	<i>Pietro Cacciavicca PCC</i>	
GANCIULLI ALESSANDRO	ACI	ANALYST	<i>Alessandro Ganciulli ACI</i>	
COLAMONICI CRISTIANA	CCM	SENIOR ANALYST	<i>Cristiana Colamоничи CCM</i>	
CORPETTI GIORGIA	GIC	SENIOR ANALYST	<i>Giorgia Corpetti GIC</i>	
CURCIO DAVIDE	CUR	SENIOR ANALYST	<i>David Curcio CUR</i>	
DE ANGELIS FRANCESCA	FDA	ANALYST	<i>Francesca De Angelis FDA</i>	
DE FELICE FABIO	FDF	TECHNICAL SECRETARIAT	<i>Fabio de Felice FDF</i>	
DE LA TORRE XAVIER	DEX	DEPUTY SCIENTIFIC DIRECTOR TECHNICAL DIRECTOR	<i>Xavier de la Torre DEX</i>	X
DI CICCO TERESA	TED	ANALYST	<i>Teresa Di Cicco TED</i>	
DONATI FRANCESCO	DOF	SENIOR ANALYST	<i>Francesco Donati DOF</i>	
FOLCHITTO FABRIZIA	FAF	SCIENTIFIC SECRETARIAT MANAGER	<i>Fabrizia Folchitto FAF</i>	X
FOSCHI CRISTIANO	FOC	TECHNICAL SECRETARIAT	<i>Cristiano Foschi FOC</i>	
GARRIBBA FLAMINIA	FLG	SENIOR ANALYST	<i>Flaminia Garribba FLG</i>	
JARDINES DANIEL	DAG	SENIOR ANALYST	<i>Daniel Jardines DAG</i>	
LONGO DONATELLA	DLO	SENIOR ANALYST	<i>Donatella Longo DLO</i>	
MANCA MANUELA	MMN	TECHNICAL SECRETARIAT	<i>Manuela Manca MMN</i>	
MAZZARINO MONICA	MMZ	SENIOR ANALYST	<i>Monica Mazzarino MMZ</i>	
MOLAIONI FRANCESCO	MLJ	SENIOR ANALYST	<i>Francesco Molaioni MLJ</i>	X

ROMANI ROBERTO	RRM	ANALYST	Paola Roberto RRM	
SPIRITO ELENA	ESP	QUALITY MANAGER	Elena Spirito tfp	
STEFANUCCI ROBERTA	RST	TECHNICAL SECRETARIAT	Stefanucci Roberta RST	
STRANO ROSSI SABINA	SSR	SENIOR ANALYST	Sabina Strano ML	
TURI STEFANIA	TUS	SENIOR ANALYST	Stephanie Turi WS	X
VENDEMIATI DAVIDE	DAV	TECHNICAL SECRETARIAT	Davide Vendemiati LH	

## 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 B4433. The "B" samples were immediately stored in the freezer (-20°C). The "B" analysis started on 14/06/2010 at the presence of Prof. Helge Oftebro, Mr. Stephan Platzer and Mr. Erik Tysse, the "B" sample identified with internal code 10E003 B4433 was visually inspected by FAF.

The seal of sample internal code 10E003 B4433 was broken and aliquoting for EPO analysis, SDS Page, stability test, determination of pH and specific gravity and steroid profile(following specific request by the athlete: data not included in this package and data available upon request) by TUS on 14/06/2010. In the same day TUS measured the pH and the specific gravity and performed the sample pretreatment for confirmation. The complete procedure of detection of recombinant erythropoietin and analogues (IEF and SDS analysis) was performed by TUS between 14/06/2010 and 17/06/2010. The "B" bottle was resealed (new seal code:1000892)

The results of IEF analysis did not fully satisfied the WADA required criteria for reference standards acceptability, so that the procedure was repeated. The analysys started again on 05/07/2010 at the presence of Prof Helge Oftebro and Mr. Erik Tysse, the sample 10E003 B4433 was visually inspected by SBR. The seal of the "B" sample was newly broken and the residual volume aliquoted (for EPO analysis, stability test and determination of pH and specific gravity) to repeat the IEF analysis by TUS on 05/07/2010. TUS performed the complete procedure of detection of recombinant erythropoietin and analogues between 05/07/2010 and 07/07/2010.

The results matched our internal criteria to report an Adverse Analytical Finding for CERA.

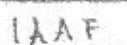
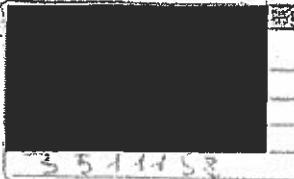
On 08/07/2010 Dr Françoise Lasne, director of WADA accredited Laboratory of Paris (France), evaluated the results and confirmed the presence of Continuous Erythropoietin Receptor Activator (CERA) in the sample code 10E003 B4433.

\*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		 FMSI TESTING AUTHORITY SAMPLE COLLECTION AGENT	
<b>1. DOPING CONTROL STATION</b>					
DC NUMBER:	MARA CAZZANIGA MASSIMILIANO SGROI		OUT OF COMPETITION <input type="checkbox"/>	IN COMPETITION <input checked="" type="checkbox"/>	
TEST LOCATION:	SESTO SAN GIOVANNI (MI) ITALY		COMPETITION COPPA CITTA' DI SESTO SAN GIOVANNI		
NUMBER OF SAMPLES:	1/2	<input checked="" type="checkbox"/>	DATE: 01/05/2010	TIME: 19:05	
<b>2. SAMPLE ID</b>					
 351158					
<b>3. CHANGE OF STORAGE</b>					
STORAGE LOCATOR #1	CAMPUS SPORTEV P. BRONZINI S. 2522 Z. GRANADA		DATE: 01/05/2010	TIME: 19:08	STORAGE LOCATOR #2
DATE:	01/05/2010	TIME:	19:08	DATE:	01/05/2010
ROOM TEMPERATURE:	<input checked="" type="checkbox"/>		COOL:	JULIO CARBALLO	
SHIRT:	<input checked="" type="checkbox"/>		WARM:	<input checked="" type="checkbox"/>	
STORAGE LOCATOR #3			DATE:	01/05/2010	TIME: 19:08
DATE:	01/05/2010	TIME:	19:08	STORAGE LOCATOR #4	
ROOM TEMPERATURE:	<input checked="" type="checkbox"/>		COOL:	JULIO CARBALLO	
SHIRT:	<input checked="" type="checkbox"/>		WARM:	<input checked="" type="checkbox"/>	
<b>4. TRANSFER TO LABORATORY</b>					
TIME OF TRANSFER FROM PREVIOUS STORAGE LOCATOR:	19:08		TIME OF RECEIPT AT THIS STORAGE LOCATOR:	01/05/2010	
<small>DC DECLARATION</small> I STATE THAT ALL THE ABOVE SHAPERS ARE PRESENT AND I HAVE PACKAGED THEM FOR TRANSPORTATION TO THE LABORATORY.					
NAME:	MASSIMILIANO SGROI		SIGNATURE:	ACQUAREDOSA ROMA LABORATORY	
<small>NAME OF THE LABORATORY</small>					
<input checked="" type="checkbox"/> ENVELOPE BY COURIER COMPAGNIE: TNT COURIER SIGNATURE: M. TAN - N.L. CARRIER NAME: ALDOREO DISBLASI <small>OPTIONAL INFORMATION</small> <input type="checkbox"/> AIR MAIL <input type="checkbox"/> OTHER INFORMATION: _____					
<small>RECEIVED</small> : NT-81322736-2 <small>NAME</small> : N. C. <small>SIGNATURE</small> : _____					
<b>5. RECEIPT BY LABORATORY</b>					
NAME OF THE LABORATORY IN RESERVE:	MOVIMENTI		DATE OF RECEIPT:	01/05/2010	
NAME OF THE LABORATORY:	LA Bormida		TIME OF RECEIPT:	19:20	
<small>DO THE CODE NUMBER OR THE LETTERS INDICATED ABOVE EQUAL TO THE SAMPLE CODE LISTED IN 2. ABOVE?</small> <input checked="" type="checkbox"/> YES <input type="checkbox"/> NO <small>IF NOT, WHAT IS THE CODE?</small> <input type="checkbox"/> DIFFERENT FROM: _____ <small>Comments:</small> <small>IF POSSIBLE, SEND THIS FORM IMMEDIATELY TO THE IAAF BY FAX +377 92 80 43 45</small>					
<small>PRINT NAME &amp; TITLE</small> <small>FORM 7 - ILLINOIS APPROVED BY ACT 1985 - JAMES</small> <small>CM 2 - UNDERSIDE - PMS</small>					

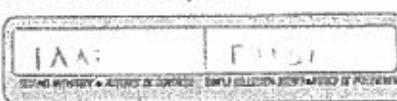
Cognome, Nome, Città		Posto partenza		Posto arrivo		Data spedizione		Ora	DATA DI CONSEGNA		
Via											
Città		Cap.		Città		Cap.					
Ad indirizzo		Cognome		Tel.	Via	Tel.	Via	Tel.	CROCIARE SE FERMO DEPOSITO		
Nome		Cognome	Viale	Premio ass.	Indiriz.	Vocimponibile	Allegati/Inv - Bollo	Costo invito	Ambedue	Volume	
<input type="checkbox"/> CHIUDERE IL FRIZIONATO ATTINCI A DOMANDA		<input type="checkbox"/> ASSENTE ASSOCIAMENTO		<input type="checkbox"/> FATTURAZIONE A NOME RESE		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/> SALVETTI PICCOLI	<input type="checkbox"/> GRANDI	<input type="checkbox"/> Volume autocl. ed indicare telefono destinatario	
NUERO LETTERA NT DI VETTURA		81322796-2				<input type="checkbox"/> CROCIARE SE STACO D:		<input type="checkbox"/> CROCIARE SE ARRIB:		TNT	
Numero invito per avere la vettura con doppia segna di nome		Per ricevere informazioni sulle imprese della zona di consegna								803 888	
Tutore e linea telefonica posta ricevuta											
B - COPIA PER DESTINATARIO											

## I.2 Doping control form

Please write legibly and in CAPITAL letters / Ecrire lisiblement en majuscules



### DOPING CONTROL FORM FORMULAIRE DE CONTROLE ANTIDOPAGE



#### 1. ATHLETE INFORMATION • RENSEIGNEMENTS SUR L'ATHLET

Alih33

#### TESTING LOCATION • LIEU DU TEST

<b>NAME OF THE ATHLETE</b> Ali H. 33	<b>TEST DATE</b> 11/11/15	<b>SAMPLE NUMBER</b> A/B	<b>TIME TESTED</b> 13:42	<b>DAIKA</b> <input type="checkbox"/>
				<b>DAIKA</b> <input checked="" type="checkbox"/>

#### 2. INFORMATION FOR ANALYSIS • INFORMATIONS POUR L'ANALYSE

<b>NAME OF THE ATHLETE</b> Ali H. 33		<b>TEST DATE</b> 11/11/15		<b>DAIKA</b> <input checked="" type="checkbox"/>
<b>URINE</b> <input checked="" type="checkbox"/> A/B	<b>TIME TESTED</b> 13:42	<b>DAIKA</b> <input type="checkbox"/>	<b>DAIKA</b> <input checked="" type="checkbox"/>	
<small>TEST SAMPLE NUMBER / NUMERO DE SAMPLAGE</small> A/B		<small>TEST TIME / HEURE DE TEST</small> 13:42		<small>DAIKA TIME AT DOING CONTROL, EXCEPT IF OTHER DATE IS SHOWN IN CONTROL NUMBER</small> 11/11/15
<b>BLOOD / SANG</b> <input type="checkbox"/> A/B	<b>TIME TESTED</b> 13:42	<small>EXPLANATION OF TESTS CONDUCTED OVER THE LAST 6 MONTHS: EXPLANATION DES TESTS CONDUITS AU COURS DES 6 DERNIERS MOIS</small>		
<small>EXPLANATION OF TESTS CONDUCTED OVER THE LAST 6 MONTHS: EXPLANATION DES TESTS CONDUITS AU COURS DES 6 DERNIERS MOIS</small>				
<small>TESTS CONDUCTED OVER THE PAST 7 DAYS TESTS CONDUITS DURANT LES DERNIERS 7 JOURS</small>				
<small>TESTS CONDUCTED OVER THE PAST 30 DAYS TESTS CONDUITS DURANT LES 30 DERNIERS JOURS</small>				
<small>TESTS CONDUCTED OVER THE PAST 6 MONTHS TESTS CONDUITS DURANT LES 6 DERNIERS MOIS</small>				
<small>TESTS CONDUCTED OVER THE PAST 12 MONTHS TESTS CONDUITS DURANT LES 12 DERNIERS MOIS</small>				
<small>TESTS CONDUCTED OVER THE PAST 24 MONTHS TESTS CONDUITS DURANT LES 24 DERNIERS MOIS</small>				

#### 3. CONFIRMATION OF PROCEDURE FOR URINE AND / OR BLOOD TESTING • CONFIRMATION DE LA PROCEDURE POUR LE CONTROLE D'URINÉ ET / OU DE SANG

<b>NAME OF THE ATHLETE</b> Ali H. 33		<b>TEST DATE</b> 11/11/15		<b>DAIKA</b> <input checked="" type="checkbox"/>
<b>DAIKA</b> <input checked="" type="checkbox"/>		<b>DAIKA</b> <input type="checkbox"/>		<b>DAIKA</b> <input checked="" type="checkbox"/>

CONFIRMATION OF PROCEDURE FOR URINE AND / OR BLOOD TESTING • CONFIRMATION DE LA PROCEDURE POUR LE CONTROLE D'URINÉ ET / OU DE SANG

### I.3 Laboratory sample reception form

FEDERAZIONE MEDICO SPORTIVA ITALIANA LABORATORIO ANTIDOPING	FOGLIO DI LAVORO	FL 103
ACCETTAZIONE STRAORDINARIA		
Rif. PG001	Pag. 1/1	Rev. 1

DATA DI RICEVIMENTO:	02/05/10	ORA:	8.20
N° BORSE DI TRASPORTO RICEVUTE:			
RICEVUTE TRAMITE:			
<input type="checkbox"/> MEDICO SPORTIVO	COGNOME E NOME	FIRMA	
<input checked="" type="checkbox"/> CORRIERE	IDENTIFICATIVO	N° VETTURA	
<input type="checkbox"/> POSTA	IDENTIFICATIVO	N° VETTURA	
<input type="checkbox"/> ALTRI	IDENTIFICATIVO / COGNOME E NOME	N° VETTURA / FIRMA	
N° CATENA DI CUSTODIA			
1 A A F 003/2010			
OSSERVAZIONI:			
LA CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI AVVIENE SECONDO QUANTO SPECIFICATO NELLE: PG001/PG018			
SIGLA E FIRMA DEL PERSONALE CHE HA EFFETTUATO LA RICEZIONE:			
<i>ML-fk.</i>			

DA COMPILARSI A CURA DEL PERSONALE DOPO AVER EFFETTUATO LA RICEZIONE:			
LOCALIZZAZIONE BORSE:	FRW18		
SIGLA E FIRMA DEL PERSONALE CHE HA EFFETTUATO LA RICEZIONE:			
<i>ML-fk.</i>			

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

RIF. FL046	1008																																																		
<b>FEDERAZIONE MEDICO SPORTIVA ITALIANA LABORATORIO ANTIDOPING</b>																																																			
<b>FOGLIO DI LAVORO</b>																																																			
FL 102																																																			
ACCETTAZIONE E REGISTRAZIONE CAMPIONI																																																			
RIF. PG001 <span style="float: right;">Pag. 1/1</span> LOTTO DI ACCETTAZIONE N° <b>10E003</b> <span style="float: right;">Rev. 4</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">4429-4434</span>																																																			
CATENA DI CUSTODIA: IAAF 03/2010																																																			
DATA DI RICEVIMENTO: <b>02/05/2010</b> ORA <b>8.20</b> RICEVUTA TRAMITE: <b>CORRIERE</b>																																																			
<b>PARTE I: ACCETTAZIONE</b>																																																			
SPORT-GARA:	ATHLETICS GARA INT.LE DI MARCIA 20 KM - IAAF	SVOLTA IN DATA:	01/05/2010																																																
LOCALITA':	SESTO SAN GIOVANNI	FEDERAZIONE	IAAF																																																
<b>PARTE II: REGISTRAZIONE CODICI ESTERNI/CAMPIONI A E B E ASSEGNAZIONE CODICI DI LABORATORIO</b>																																																			
<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="2">CAMPIONI A E B</th> <th colspan="2">CAMPIONI A E B</th> <th colspan="2">CAMPIONI A E B</th> </tr> <tr> <th>CODICE ESTERNO</th> <th>CODICE INTERNO</th> <th>CODICE ESTERNO</th> <th>CODICE INTERNO</th> <th>CODICE ESTERNO</th> <th>CODICE INTERNO</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td colspan="2"></td> <td colspan="2"></td> <td colspan="2"></td> </tr> <tr> <td>3511158</td> <td>4433</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td colspan="2"></td> <td colspan="2"></td> <td colspan="2"></td> </tr> </tbody> </table>		CAMPIONI A E B		CAMPIONI A E B		CAMPIONI A E B		CODICE ESTERNO	CODICE INTERNO	CODICE ESTERNO	CODICE INTERNO	CODICE ESTERNO	CODICE INTERNO							3511158	4433																														
CAMPIONI A E B		CAMPIONI A E B		CAMPIONI A E B																																															
CODICE ESTERNO	CODICE INTERNO	CODICE ESTERNO	CODICE INTERNO	CODICE ESTERNO	CODICE INTERNO																																														
3511158	4433																																																		
<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="2">CAMPIONI A E B</th> <th colspan="2">CAMPIONI A E B</th> <th colspan="2">CAMPIONI A E B</th> </tr> <tr> <th>ESTERNO</th> <th>INTERNO</th> <th>ESTERNO</th> <th>INTERNO</th> <th>ESTERNO</th> <th>INTERNO</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>		CAMPIONI A E B		CAMPIONI A E B		CAMPIONI A E B		ESTERNO	INTERNO	ESTERNO	INTERNO	ESTERNO	INTERNO																																						
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: <b>FR019</b>																																																			
I CAMPIONI "B" SONO STATI COLLOCATI NEL FRIGO/CONGELATORE: <b>CO010</b>																																																			
IL LOTTO E' STATO ACCETTATO REGOLARMENTE?																																																			
<input checked="" type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO VEDERE RAPPORTO FL002 RIF. PNC		N°	PROT.	N°	PROT.																																														
CAMPIONI SOSPESI: _____																																																			

DATA, SIGLA E FIRMA DEL RESPONSABILE ACCETTAZIONE 03/05/2010

## I.5. "B" Analysis sample opening forms

FEDERAZIONE MEDICO SPORTIVA ITALIANA LABORATORIO ANTIDOPING		FOGLIO DI LAVORO	FL090
NUOVO VERBALE DI APERTURA IN CONTROANALISI			
Rif.PG002-Allegato			Pag. 1/2 Rev. 3
DATA DI CONTROANALISI: 14/06/2010 "B" sample analysis date:	ORA DI INIZIO: Start time: 09:00		
L'APERTURA DEL CAMPIONE "B" SI SVOLGE AI LA PRESENZA DI: People witnessing "B" sample opening:			
COGNOME E NOME Last name and first name		QUALIFICA Position	
TYSSE ERIK		ATHLETE	
PLATZER STEPHAN		TRAINER	
OTTERBO KELGÅRD		SCIENTIFIC ADVISOR	
BOTRE FRANCESCO		SCIENTIFIC DIRECTOR	
DE LA TORRE XAVIER		VICE SCIENTIFIC DIRECTOR	
ABATE MARIA GABRIELLA		QUALITY MANAGER	
FOLCHITTO FABRIZIA		SCIENTIFIC SECRETARIAT MANAGER	
TUPI STEFANIA		ANALYST OF B-SAMPLE ANALYSIS	
(X) NOT PRESENT AT THE OPENING.		14/06/10 DK	
(*) ALLEGARE EVENTUALI DELEGHE DI RAPPRESENTANZA Please, enclose here all the relevant authorizations			
IDENTIFICAZIONE DEL CAMPIONE SAMPLE IDENTIFICATION			
GARA: GARA INTERNAZIONALE DI MARCIA 20 KM Competition:			
SVOLTA IN DATA: 01/05/2010 Competition date:		LOCALITÀ: SESTO SAN GIOVANNI Place:	
FEDERAZIONE / SPORT: IAAF / ATHLETICS Federation / Sport:		DATA DI ARRIVO DEL CAMPIONE: 02/05/2010 Sample receipt date:	
CODICE CAMPIONE "A": 3511158 Sample "A" code:		CODICE INTERNO ATTRIBUITO: 10E003 A4433 Allocated internal code:	
CODICE CAMPIONE "B": 3511158 Sample "B" code:		CODICE INTERNO ATTRIBUITO: 10E003 B4433 Allocated internal code:	
FARMACO/METABOLITA RISCONTRATO IN PRIMA ANALISI: CONTINUOUS ERYTHROPOIETIN RECEPTOR ACTIVATOR Drug/Metabolite focused on first analysis:			

Siglare tutte le pagine del verbale – Please, sign all the pages

FEDERAZIONE MEDICO SPORTIVA ITALIANA LABORATORIO ANTIDOPING	FOGLIO DI LAVORO	FL090
NUOVO VERBALE DI APERTURA IN CONTROANALISI		
Rif.PG002-Allegato	Pag. 2/2	
	Rev. 3	
<b>VERIFICA DELLO STATO DEL CAMPIONE "B"</b> "B" SAMPLE CONDITIONS		
<b>CAPSULA ( CONTENITORE ) "B" SE PRESENTE :</b> <i>"B" container if any :</i> LA CAPSULA "B" È SIGILLATA CORRETTAMENTE? <input checked="" type="checkbox"/> Sì/yes <input type="checkbox"/> NO <i>Is the "B" container properly sealed?</i>		
IL CODICE CORRISPONDE A QUELLO RIPORTATO SUL VERBALE DI PRELIEVO ? <i>Does "B" container code correspond to the one reported in the dope testing report?</i> <input type="checkbox"/> Sì/yes <input checked="" type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> NON RIPORTATO/not reported		
<b>FLACONE "B":</b> <input checked="" type="checkbox"/> SIGILLO PREVISTO/ seal contemplated <input type="checkbox"/> SIGILLO NON PREVISTO/ seal not contemplated <i>"B" bottle:</i> IL SIGILLO È INTEGRO? <input checked="" type="checkbox"/> Sì/yes <input type="checkbox"/> NO <i>Is the "B" bottle seal intact?</i>		
IL CODICE DEL <input checked="" type="checkbox"/> SIGILLO / <input type="checkbox"/> ETICHETTA CORRISPONDE A QUELLO RIPORTATO SUL VERBALE DI PRELIEVO? <i>Does "B" bottle seal / label code correspond to that reported in the dope testing report?</i> <input checked="" type="checkbox"/> Sì/yes <input type="checkbox"/> NO		
IL FLACONE "B" È CHIUSO CORRETTAMENTE ? <input checked="" type="checkbox"/> Sì/yes <input type="checkbox"/> NO <i>Is the "B" bottle properly closed?</i>		
IL VOLUME È MAGGIORU O UGUALE AL LIMITE MINIMO? <input checked="" type="checkbox"/> Sì/yes <input type="checkbox"/> NO <i>Is the sample volume greater than or equal to the minimum limit?</i>		
VOLUME RESIDUO DOPO PRELIEVO ALIQUOTE: <u>&lt;10</u> ml (OTTENUTO PER CONFRONTO CON UN VOLUME DI RIFERIMENTO) <i>Sample volume after aliquoting (estimated by comparison with a calibrated bottle)</i> IL FLACONE "B" È STATO RISIGILLATO DOPO IL PRELIEVO DELLE ALIQUOTE? <input checked="" type="checkbox"/> Sì/yes <input type="checkbox"/> NO <i>Was bottle "B" re-sealed after aliquoting?</i>		
CODICE DEL NUOVO CONTENITORE: <u>1000 892</u> <i>Re-sealing container code</i> IL CAMPIONE È STATO COLLOCATO NELLA CELLA FRIGO/CONGELATORE N° <u>606</u> <i>Refrigerator N°/Freezer N° contains the re-sealed "B" sample</i>		
<b>SPAZIO RISERVATO ALLA ANNOTAZIONE DI EVENTUALI COMMENTI, RICHIESTE E/O NON-CONFORMITÀ</b> <i>Please, write all comments, non-conformity or requests inside this place</i> <p>SEE COMMENTS ON THE ATTACHED DOCUMENT.</p>		
<b>FIRME:</b> <i>Ernesto G. -</i> <i>Signatures:</i> <i>Erich Kord</i> <i>Walter S. -</i> <i>Xavier de la</i> <i>Stephanie</i> <i>Muglack</i> <i>F. -</i>		

Comments on B-sample 3511158

Rome, 16th of July 2010

The analysis of the B-sample 3511158 started at FMSI in Rome on Monday, 14<sup>th</sup> of June 2010.

We arrived at 08.30am and started the procedure at 09.00am. After we went through the A-package side by side with the director antidoping laboratory of FMSI, a person went to the fridge at 10.48am! The director left the meeting at 11am. I received the B-sample not in the same way that I left it in Sesto San Giovanni. They only presented me the "pure" bottle. It was not covered by the plastic bag/material I left it after finishing the test and leaving the room in Sesto. The fact that the analysis would take three days made impossible for my attending person, Dr. med. Oftebro, to stay through the whole procedure, until the 16<sup>th</sup> of June. Dr. Oftebro already commented the big difference of the specific gravity of 1.025 (measured on May 1<sup>st</sup>) to a value of 1.010 (measured in the A-sample). Dr. Oftebro asked also for a steroid profile on A and B samples and a SDS page on the B-sample. After thawing of the B-sample, the bottle was opened at 11.30am. The bottle was closed again at 11.43am and went back into the fridge (CO010) at 12.07pm.



FEDERAZIONE MEDICO SPORTIVA ITALIANA LABORATORIO ANTIDOPING	FOGLIO DI LAVORO	FL090
NUOVO VERBALE DI APERTURA IN CONTROANALISI		
Rif.PG002-Allegato	Pag. 1/2	
	Rev. 3	
DATA DI CONTROANALISI: 05/07/2010 "B" sample analysis date:		ORA DI INIZIO: Start time: 9.00
L'APERTURA DEL CAMPIONE "B" SI SVOLGE ALLA PRESENZA DI: People witnessing "B" sample opening:		
COGNOME E NOME * SEE NOTE 2 Last name and first name		QUALIFICA * Position
TYSSB ERIK		ATLETA
DETERBO HELGE		PERITO ATLETA
BOTRE' FRANCESCO		DIRETTORE SCIENTIFICO
DELLA TORRE XAVIER		VICE DIRETTORE SCIENTIFICO
ABAITE MARIA GABRIELLA		RESPONSABILE QUALITA'
BAMBERINI STEFANO		RESPONSABILE ARREDAMENTO
(*) ALLEGARE EVENTUALI DELEGHE DI RAPPRESENTANZA Please, enclose here all the relevant authorizations		
IDENTIFICAZIONE DEL CAMPIONE SAMPLE IDENTIFICATION		
GARA: GARA INTERNAZIONALE DI MARCIA 20 KM Competition:		
SVOLTA IN DATA: 01/05/2010 Competition date:	LOCALITÀ: SESTO SAN GIOVANNI Place:	
FEDERAZIONE / SPORT: IAAF / ATHLETICS Federation / Sport:	DATA DI ARRIVO DEL CAMPIONE: 02/05/2010 Sample receipt date:	
CODICE CAMPIONE "A": 3511158 Sample "A" code:	CODICE INTERNO ATTRIBUITO: 10E003 A4433 Allocated internal code:	
CODICE CAMPIONE "B": 3511158 Sample "B" code:	CODICE INTERNO ATTRIBUITO: 10E003 B4433 Allocated internal code:	
CODICE SIGILLO: 1000892 Seal code:		
FARMACO/METABOLITA RISCONTRATO IN PRIMA ANALISI: CONTINUOUS ERYTHROPOIETIN RECEPTOR ACTIVATOR Drug/Metabolite focused on first analysis:		
or		

Sigliare tutte le pagine del verbale - Please, sign all the pages

SBR RGA  
Feder  
FmBN  
AB

FEDERAZIONE MEDICO SPORTIVA ITALIANA LABORATORIO ANTIDOPING	FOGLIO DI LAVORO	FL090
NUOVO VERBALE DI APERTURA IN CONTROANALISI		
Rif.PG002-Allegato	Pag. 2/2	Rev. 3
<p align="center"><b>VERIFICA DELLO STATO DEL CAMPIONE "B"</b> <i>"B" SAMPLE CONDITIONS</i></p> <p>CAPSULA ( CONTENITORE ) "B" SE PRESENTE :      "B" container if any :</p> <p>LA CAPSULA "B" È SIGILLATA CORRETTAMENTE? <input checked="" type="checkbox"/> Sì/yes      <input type="checkbox"/> NO  <i>Is the "B" container properly sealed?</i></p> <p>IL CODICE CORRISPONDE A QUELLO RIPORTATO SUL VERBALE DI PRELIEVO ?  <i>Does "B" container code correspond to the one reported in the dope testing report?</i></p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Sì/yes      <input type="checkbox"/> NO      <input type="checkbox"/> NON RIPORTATO/not reported</p> <p>FLACONE "B": <input checked="" type="checkbox"/> SIGILLO PREVISTO/ seal contemplated      <input type="checkbox"/> SIGILLO NON PREVISTO/ seal not contemplated</p> <p>"B" bottle :</p> <p>IL SIGILLO È INTEGRO? <input checked="" type="checkbox"/> Sì/yes      <input type="checkbox"/> NO  <i>Is the "B" bottle seal intact?</i></p> <p>IL CODICE DEL <input checked="" type="checkbox"/> SIGILLO / <input type="checkbox"/> ETICHETTA CORRISPONDE A QUELLO RIPORTATO SUL VERBALE DI PRELIEVO?  <i>Does "B" bottle seal / label code correspond to that reported in the dope testing report?</i> <input checked="" type="checkbox"/> Sì/yes      <input type="checkbox"/> NO</p> <p>IL FLACONE "B" È CHIUSO CORRETTAMENTE ? <input checked="" type="checkbox"/> Sì/yes      <input type="checkbox"/> NO  <i>Is the "B" bottle properly closed?</i></p> <p>IL VOLUME È MAGGIORTE O UGUALE AL LIMITE MINIMO?  <input checked="" type="checkbox"/> Sì/yes      <input type="checkbox"/> NO  <i>Is the sample volume greater than or equal to the minimum limit?</i></p> <p>VOLUME RESIDUO DOPO PRELIEVO ALIQUOTE: <u>0</u> ml (OTTENUTO PER CONFRONTO CON UN VOLUME DI RIFERIMENTO)  <i>Sample volume after aliquoting (estimated by comparison with a calibrated bottle)</i></p> <p>IL FLACONE "B" È STATO RISIGILLATO DOPO IL PRELIEVO DELLE ALIQUOTE? <input checked="" type="checkbox"/> Sì/yes      <input type="checkbox"/> NO  <i>Was bottle "B" re-sealed after aliquoting?</i></p> <p>CODICE DEL NUOVO CONTENITORE: <u>1000878</u>  <i>Re-sealing container code</i></p> <p>IL CAMPIONE È STATO COLLOCATO NELLA CELLA FRIGO/CONGELATORE N° <u>Co 010</u>  <i>Refrigerator N°/Freezer N° contains the re-sealed "B" sample</i></p> <p align="center"><b>SPAZIO RISERVATO ALLA ANNOTAZIONE DI EVENTUALI COMMENTI, RICHIESTE E/O NON-CONFORMITÀ</b>  <i>PLEASE, WRITE ALL COMMENTS, NON-COMFORMITY OR REQUESTS INSIDE THIS PLACE</i></p> <p>1* SURPIGENT (ENPN IF <math>\text{PP} &lt; 30 \text{ mL}</math>) - SINCE IT IS A RE-ANALYSIS OF A "B" SAMPLE - TO START THE PROCESS</p> <p>2* THE ANALYSIS STARTED WITHOUT THE PRESENCE OF DR. PERNILLE S. ROBINSON.</p> <p>FIRME:      Signatures:</p> <p><i>François J. Xerc 26/3 Eric Kyre      Stéphane M. Myslak</i></p>		

## I.6 Sample chain of custody (Distribution forms of new aliquots)

FEDERAZIONE MEDICO SPORTIVA ITALIANA LABORATORIO ANTIDOPING	FOGLIO DI LAVORO	FL010
RICHiesta DI DISTRIBUZIONE NUOVE ALIQUOTE		
Rif. PG001	Pag. 1/1	Rev. 1

### RICHiesta DI NUOVE ALIQUOTE

Codice di laboratorio campione	Aliquote richieste		Analisi da effettuare e screening corrispondente	(*) Codice assegnato a ciascuna aliquota
	N°	Volume (ml)		
10E003B4433	1	2,0	cof. e po. (confirmation)	10E003B4433C
10E003B4433	1	0,6	STABILITY TEST	10E003B4433STAB
10E003B4433	1	0,5	ph e densità (specific gravity)	10E003B4433ph
10E003B4433	1	2	S4B (STEROIDI PROFILLE)	10E003B4433S4B

RICHIEDENTE

PGS  
SiglaStefanoni  
FirmaDATA 14/06/10

### DISTRIBUZIONE DI NUOVE ALIQUOTE

Si è provveduto alla distribuzione delle aliquote richieste; le aliquote e i campioni sono stati archiviati come segue:

ALIQUOTE DISTRIBUITE  Frigo \_\_\_\_\_  Congelatore \_\_\_\_\_  Consegnate direttamente a HG \*

CAMPIONI  Frigo \_\_\_\_\_  Congelatore coldbox  Altro: \_\_\_\_\_

RESPONSABILE DISTRIBUZIONE

PGS  
SiglaStefanoni  
FirmaDATA 14/06/10

(\*) Le nuove aliquote distribuite devono essere identificate con la lettera C se distribuite per analisi di Conferma e con la lettera R se distribuite per Ripetizione dello screening.

Esempio: la seconda aliquota dello stesso campione, distribuita per Conferma per lo screening 4A verrà identificata con C4A-2 preceduto dal codice di laboratorio del campione.

X L'ALIQUOTA IDENTIFICATA CON SAB È STATA TRASFERITA NEL FRIGO FRO19 14/6/10 PGS Stefanoni

FEDERAZIONE MEDICO SPORTIVA ITALIANA LABORATORIO ANTIDOPING	FOGLIO DI LAVORO	FL010
RICHiesta DI DISTRIBUZIONE NUOVE ALIQUOTE		
RIF. PG001	Pag. 1/1	Rev. 1

**RICHiesta DI NUOVE ALIQUOTE**

Codice di laboratorio campione	Aliquote richieste		Analisi da effettuare e screening corrispondente	(*) Codice assegnato a ciascuna aliquota
	N°	Volume (ml)		
UE003B6433	1	10	Conferma	UE003B6433C
UE003B6433	1	0,6	stability test	UE003B6433STAB
UE003B6433	1	0,5	pH e densità	UE003B6433ph

RICHIEDENTE

TGS  
SiglaStefano Sartori  
FirmaDATA 5/4/10**DISTRIBUZIONE DI NUOVE ALIQUOTE**

Si è provveduto alla distribuzione delle aliquote richieste; le aliquote e i campioni sono stati archiviati come segue:

ALIQUOTE DISTRIBUITE  Frigo \_\_\_\_\_  Congelatore \_\_\_\_\_  Consegnate direttamente a HCCAMPIONI  Frigo \_\_\_\_\_  Congelatore: Coolo  Altro: \_\_\_\_\_

RESPONSABILE DISTRIBUZIONE

TGS  
SiglaStefano Sartori  
FirmaDATA 5/4/10

(\*) Le nuove aliquote distribuite devono essere identificate con la lettera C se distribuite per analisi di Conferma e con la lettera R se distribuite per Ripetizione dello screening.

Esempio: la seconda aliquota dello stesso campione, distribuita per Conferma per lo screening 4A verrà identificata con C4A-2 preceduto dal codice di laboratorio del campione.

**SECTION II:**  
**SAMPLE 3511158**  
**CONFIRMATION PROCEDURE**

## 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 forms

FEDERAZIONE MEDICO SPORTIVA ITALIANA LABORATORIO ANTIDOPING		FOGLIO DI LAVORO		FL100				
COMUNICAZIONE RISULTATI ESAMI PRELIMINARI				Pag. 1/1				
RIG. PG001		LOTTO DI ACCETTAZIONE N°		1NE003				
Kit utilizzato:		<input type="checkbox"/> ELK	<input type="checkbox"/> VERSAPACK	<input checked="" type="checkbox"/> BERLINGER				
				<input type="checkbox"/> ALTRO _____				
CODICE LABORATORIO CAMPIONE (A O B)	VOLUME [mL]	COLORE (*)	SEDIMENTI (**)	OSSERVAZIONI				
				B6G33	~30	2	0	SPACO
				~				
				~				
				~				
				~				
				~				
				~				
				~				
I CAMPIONI SONO STATI COLLOCATI NEL FRIGO N°:								

SONO STATI RISCONTRATI PNC?	
<input checked="" type="checkbox"/> NO	<input type="checkbox"/> SI - VEDERE RAPPORTO FL002 RIF. PG001
DATA: 16/06/2010 OPERATORE: FAZ	

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

(\*\*) 0 assenti; + scars.; ++ abbondanti

FEDERAZIONE MEDICO SPORTIVA ITALIANA LABORATORIO ANTIDOPING		FOGLIO DI LAVORO		FL100				
COMUNICAZIONE RISULTATI ESAMI PRELIMINARI				Pag. 1/1				
RIG. PG001		LOTTO DI ACCETTAZIONE N°		10E003				
Kit utilizzato:		<input type="checkbox"/> ELK	<input type="checkbox"/> VERSAPACK	<input type="checkbox"/> BERLINGER				
				<input type="checkbox"/> ALTRO _____				
CODICE LABORATORIO CAMPIONE (A O B)	VOLUME [mL]	COLORE (*)	SEDIMENTI (**)	OSSERVAZIONI				
				B4433	~13	2	0	SPACO
				~				
				~				
				~				
				~				
				~				
				~				
				~				
I CAMPIONI SONO STATI COLLOCATI NEL FRIGO N°:								

SONO STATI RISCONTRATI PNC?	
<input checked="" type="checkbox"/> NO	<input type="checkbox"/> SI - VEDERE RAPPORTO FL002 RIF. PG001
DATA: 05/07/2010 OPERATORE: RR	

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

(\*\*) 0 assenti; + scars.; ++ 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 :	<u>105003</u>				
Peso Specifico (S.G.)		Lettura	Osservazioni		
Cod. DS003	H <sub>2</sub> O	0,9997			
Interv. Accett. [0,9995-0,9998]					
<input type="checkbox"/> pH (strumentale)	Tampone pH 7.	+/-			
Cod:	Tampone pH 4.				
<input checked="" type="checkbox"/> pH (cartina)	Range cartina utilizzata: <u>5,0 - 10,0</u>				
Codici Campioni	Letture pH	Letture S.G.	Codici Campioni	Letture pH	Letture S.G.
<u>B1433</u>	<u>5,5</u>	<u>1009</u>			

Responsabile  
esecuzione misure pH

ces  
Sigla

Sieferm  
Firma

14/06/10  
ces  
Data

Responsabile  
esecuzione misure S.G.

ces  
Sigla

Sieferm  
Firma

14/06/10  
Data



# **CONTINUOUS ERYTHROPOIETIN RECEPTOR ACTIVATOR (CERA)**

## **CONFIRMATION RESULTS**

## II.2 Confirmation Test Data - IEF

### II.2.1 Confirmation procedure IEF 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 002/003/004**

**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

**Confirmation procedure analysis: original identification of the lanes on the gel ("sequence")**

- [1] rhEPO and NESP standards (BRNE)
- [2] rhEPO and NESP standards (BRNE)
- [3] urinary EPO standard :NIBSC (UEPO)
- [4] Positive reference sample (Usp Mir)
- [5] Negative reference sample (Bur)
- [6] urinary EPO standard :NIBSC (UEPO)
- [7] Bur Stability test
- [8] urinary EPO standard :NIBSC (UEPO)
- [9] 10E003 B4433C (3511158) (confirmation)

- [10] urinary EPO standard :NIBSC (UEPO)
- [11] 10E003 B4433C (3511158) (stability test)
- [12] urinary EPO standard :NIBSC (UEPO)
- [13] Mircera standard (Mir)
- [14] rhEPO and NESP standards (BRNE)

**II.2.3 Confirmation procedure - Aliquot chain of custody documentation**

Worksheet for the confirmation 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: 14/06/20 07.20

Lotto di accettazione	Codice campioni preparati
20E003	DA: B4433C + STABILITY TEST
	DA: A:

**A – PREPARAZIONE DEL GEL 17 x8 x 0,1CM**

- 1 Pesare 14,71 g di urea [R-181 Lotto 047 ], 1,75 g di saccarosio [R-306 Lotto 002 ] e trasferirli in un pallone di reazione da 100 ml posto su un agitatore elettromagnetico
- 2 Aggiungere 14,17 ml di acqua ultrapura e 1,89 ml di anfolita 2-4 [R-168 Lotto 041 ], 1,89ml di anfolita 4-6 [R-169 Lotto 042 ] e 4,74 ml di soluzione di bisacrilamide 40% [R-184 Lotto 008 ]
- 3 Tappare il pallone e collegarlo ad una pompa da vuoto per 15 min.
- 4 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 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 Aggiungere 31 µl di TEMED [R-180 Lotto 023 ] e 310 µl di APS nel pallone
- 7 Lasciare 30 s in agitazione
- 8 Prelevare la soluzione di gel mediante pipetta e trasferirla rapidamente fra le due lastre, avendo cura di non generare bolle d'aria
- 9 Lasciare il gel per almeno tre ore nella camera umida

**B – PREPARAZIONE DEL CAMPIONE**

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

- 10/I 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<sup>1</sup> [R-172 Lotto 052 ] e mescolando mediante agitatore elettromagnetico
- 11/I<sup>2</sup> Prelevare 20 ml di urina<sup>2</sup> (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 14/06/10
- 12/I<sup>2</sup> Aggiungere 400 µl di soluzione Complete (200 µl ogni 10 ml di urina)
- 13/I<sup>2</sup> Aggiungere 2 ml di TRISHCl 3,75M [TRISHCl 3,75, Lotto 023 ] (1ml ogni 10 ml di urina)
- 14/I<sup>2</sup> 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 023 ] 14/06/10
- 15/I<sup>2</sup> Centrifugare per 10 min nella centrifuga refrigerata a 20°C con rotore basculante a 3000 rcf

<sup>1</sup> E' possibile preparare quantità differenti purché restino invariate le proporzioni.<sup>2</sup> In caso di urina diluita e prelievi maggiori, prelevare le quantità di Complete e di TRISHCl3,75 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 TRISHCl 50 mM [TRISHCl 50 Lotto 62 ] 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 ritenuto, 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)		
<b>Z II (PER TEST DI STABILITÀ)</b>			
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 sovranatante 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 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 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													
<p>32 ✓ Preparare la soluzione catodica aggiungendo a 1,9 ml di acqua ultrapura 100 µl di soluzione di anfolfiti 6-8 [R-170 Lotto 008 ] e 10 µl di RMET<sup>3</sup> [Lotto 002 ]</p> <p>33 ✓ Posizionare sui lati più lunghi le strips imbevute rispettivamente della soluzione catodica ed anodica</p> <p>34 ✓ Chiudere il supporto e impostare i seguenti parametri:            Potenziale: 250 V            Corrente: 17 mA (proporzionale alle dimensioni del Gel)            Potenza: 17 W            Durata: 30 min/ 60min            O nel caso la lunghezza del gel sia pari a 25 cm:            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>200</td> <td>25</td> <td>5</td> <td>0'</td> </tr> <tr> <td>250</td> <td>16.5</td> <td>4</td> <td>40'</td> </tr> </tbody> </table> <p>35 ✓ Prelevare gli standard dal congelatore</p> <p>36 ✓ Preparare gli standard:  <b>MISCELA BRP NESP 1-2 (BRNE1-2)</b>            Aggiungere 0,32 – 0,16 ng<sup>3</sup> di BRP [BRP Lotto 006 ] a 0,2 – 0,15ng<sup>3</sup>di NESP [NESP Lotto 013 ]  <b>MISCELA BRP NIBSC (BRNIB)</b>            Aggiungere 0,16 ng<sup>3</sup> di BRP [BRP Lotto 001 ] a 0,0025 ng<sup>3</sup> di NIBSC [NIBSC Lotto 001 ]  <b>MISCELA NESP NIBSC (NENIB)</b>            Aggiungere 0,15 ng<sup>3</sup> di NESP [NESP Lotto 001 ] a 0,0025<sup>3</sup> ng di NIBSC [NIBSC Lotto 001 ]  <b>SOLUZIONE NIBSC 0,02UI - 0,04UI (NIBSC1- 2)</b>            Prelevare dalla soluzione standard [NIBSC Lotto 011 ] 10-20 µl, in modo tale da ottenere una soluzione da 0,02-0,04 UI  <b>SOLUZIONE MIRCERA (MIR)</b>            Prelevare 20 µl dalla soluzione standard di Mircera [MIR Lotto 005 ]  <b>SOLUZIONE Dynepo (Dyn)</b>            Prelevare 20 µl dalla soluzione standard di Dynepo [Dyn Lotto 001 ]</p> <p>37a □ Scaldate i campioni a 87 °C per 6 min      37b ✓ aggiungere quantità sufficiente di urea poco a poco fino a saturazione <i>andare a punto 39</i></p> <p>38 □ Immergere i campioni precedentemente scaldati, nel bagno refrigerante per 30 s</p> <p>39 ✓ Aggiungere: -ai campioni il 10% di Surfact-amps 80 (Tween 80) [R-166 Lotto 001 ] per volume di ritenzione            -agli standard (eccetto Mircera) aggiungere 2,2 µl di Surfact-amps 80 (Tween 80) [R-166 Lotto 001 ] ogni 20 µl</p>			Potenziale (V)	Corrente (mA)	Potenza (W)	Tempo (min)	200	25	5	0'	250	16.5	4	40'
Potenziale (V)	Corrente (mA)	Potenza (W)	Tempo (min)											
200	25	5	0'											
250	16.5	4	40'											

<sup>3</sup> 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 anfolfiti 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

40,2	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 strips<sup>4</sup> secondo il seguente schema:</p> <p>BRNIB NENIB Dyn<sup>5</sup> MIR NIBSC (1 o 2) BRNE (1 o 2) Bur<sup>5</sup> USPrEPO<sup>5</sup> 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) Bur<sup>5</sup> USPrEPO<sup>5</sup> CAMPIONI BRNE (1 o 2) CAMPIONI BRNE (1 o 2) CAMPIONI NIBSC (1 o 2) BRNE (1 o 2) NIBSC (1 o 2) Dyn<sup>5</sup> MIR</p>

Compilare la tabella seguente in base alla sequenza di caricamento:

Posizione	Campione	Volume di ritenzione ( $\mu$ l)
1	BRP + NESPO	16+10
2	BRP + NESPO	16+10
3	NIBSC	20
4	USP MIR	30
5	BUR	28
6	NIBSC	20
7	BUR STAB	40
8	NIBSC	20

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

<sup>5</sup> 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	10f003-B4483C	80
10	NIBSC	20
11	10E003.B4433 STAB	40
12	NIBSC	20
13	HUR	20
14	BEP + NESP	1000
15		
16		
17		
18		
19		
20		
21		
22		
23		
24		
25		
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<br>(V) | Corrente<br>(mA) | Potenza<br>(W) | Potenziale per ora<br>(Vh) | Tempo<br>(min) |
|-------------------|------------------|----------------|----------------------------|----------------|
| 30,7              | 25               | 9              | 1                          | 0'             |
| 15,8              | 15,8             | 25             | 4000                       | 3,5            |
43.  Tagliare due rettangoli di Durapore e Immobilon P e 16 rettangoli di carta da filtro<sup>6</sup> 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 C09 ] 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 S93 ], acqua ultrapura e GLI-TRIS

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

FEDERAZIONE MEDICO SPORTIVA ITALIANA LABORATORIO ANTIDOPING	FOGLIO DI LAVORO	FL119																						
<b>RICERCA DI ERITROPOIETINA RICOMBINANTE E ANALOGHI</b>																								
Rif. MP031 - Allegato	Pag. 6/10	Rev. 9																						
<p><b>46</b> <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.</p> <p><b>47</b> <input checked="" type="checkbox"/> Immergere un rettangolo della Durapore nella vaschetta contenente GLI-TRIS per almeno 20 minuti e posizionarla sullo Slow mixer.</p> <p><b>48</b> <input checked="" type="checkbox"/> Quando la corsa eletroforetica 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<sup>6</sup>, in modo tale che si imbevano di soluzione per capillarità.</p> <p><b>49</b> <input checked="" type="checkbox"/> Prolungare la corsa</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 60%; padding: 5px; vertical-align: top;"> <input checked="" type="checkbox"/> Sì            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:            Potenziale: 2500 V            Corrente: 17 mA            Potenza: 34 W            Potenziale per ora: 500 Vh            O nel caso la lunghezza del gel sia pari a 25 cm:            Potenziale: 2500 V            Corrente: 25 mA            Potenza: 50 W            Potenziale per ora: 500 Vh             Completare la seguente tabella con i parametri di inizio e fine corsa:  <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 20%;">Potenziale (V)</th> <th style="width: 20%;">Corrente (mA)</th> <th style="width: 20%;">Potenza (W)</th> <th style="width: 20%;">Potenziale per ora (Vh)</th> <th style="width: 20%;">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> <tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr> </tbody> </table> </td> <td style="width: 40%; padding: 5px; vertical-align: top;"> <input type="checkbox"/> NO <input checked="" type="checkbox"/> andare al punto 50         </td> </tr> </table>			<input checked="" type="checkbox"/> Sì 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: Potenziale: 2500 V Corrente: 17 mA Potenza: 34 W Potenziale per ora: 500 Vh O nel caso la lunghezza del gel sia pari a 25 cm: Potenziale: 2500 V Corrente: 25 mA Potenza: 50 W Potenziale per ora: 500 Vh  Completare la seguente tabella con i parametri di inizio e fine corsa: <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 20%;">Potenziale (V)</th> <th style="width: 20%;">Corrente (mA)</th> <th style="width: 20%;">Potenza (W)</th> <th style="width: 20%;">Potenziale per ora (Vh)</th> <th style="width: 20%;">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> <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)																<input type="checkbox"/> NO <input checked="" type="checkbox"/> andare al punto 50
<input checked="" type="checkbox"/> Sì 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: Potenziale: 2500 V Corrente: 17 mA Potenza: 34 W Potenziale per ora: 500 Vh O nel caso la lunghezza del gel sia pari a 25 cm: Potenziale: 2500 V Corrente: 25 mA Potenza: 50 W Potenziale per ora: 500 Vh  Completare la seguente tabella con i parametri di inizio e fine corsa: <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 20%;">Potenziale (V)</th> <th style="width: 20%;">Corrente (mA)</th> <th style="width: 20%;">Potenza (W)</th> <th style="width: 20%;">Potenziale per ora (Vh)</th> <th style="width: 20%;">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> <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)																<input type="checkbox"/> NO <input checked="" type="checkbox"/> andare al punto 50			
Potenziale (V)	Corrente (mA)	Potenza (W)	Potenziale per ora (Vh)	Tempo (min)																				
<p><b>50</b> <input checked="" type="checkbox"/> Eseguire il controllo visivo per verificare l'uniformità della migrazione del rosso metile e se possibile fotografare il gel</p>																								
<b>D - PRIMO BLOTTING</b>																								
<p><b>51</b> <input checked="" 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)</p> <p><b>52</b> <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.</p> <p><b>53</b> <input checked="" type="checkbox"/> Prefequare 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.</p> <p><b>54</b> <input checked="" type="checkbox"/> Sovrapporre quindi un rettangolo di parafilm, facendo pressione con un rullo, per eliminare le bolle d'aria.</p> <p><b>55</b> <input checked="" type="checkbox"/> Capovolgere l'insierme (pacchetto, Immobilon P, Durapore e gel) sulla piastra Multiphor II</p> <p><b>56</b> <input checked="" type="checkbox"/> Rimuovere il gel dal Gelbond e sovrapporvi rapidamente il secondo pacchetto di carta da filtro</p> <p><b>57</b> <input checked="" type="checkbox"/> Sovrapporre quindi un rettangolo di parafilm, facendo pressione con un rullo, per eliminare le bolle d'aria.</p>																								

<b>FEDERAZIONE MEDICO SPORTIVA ITALIANA LABORATORIO ANTIDOPING</b>	<b>FOGLIO DI LAVORO</b>	<b>FL119</b>												
<b>RICERCA DI ERITROPOIETINA RICOMBINANTE E ANALOGHI</b>														
Rif. MP031 - Allegato	Pag. 7/10 Rev. 9													
<p><b>58</b>) 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="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <thead> <tr> <th style="text-align: center;">Potenziale (V)</th> <th style="text-align: center;">Corrente (mA)</th> <th style="text-align: center;">Potenza (W)</th> <th style="text-align: center;">Tempo (min)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">10</td> <td style="text-align: center;">132</td> <td style="text-align: center;">1</td> <td style="text-align: center;">0'</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">21</td> <td style="text-align: center;">132</td> <td style="text-align: center;">3</td> <td style="text-align: center;">30'</td> </tr> </tbody> </table> <p><b>59</b>) 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 039]. Mescolare mediante agitatore elettromagnetico.</p> <p>DTT  Portare a volume con PBS in un matraccio da 250 ml 192,8 mg ditioltreitolo [R-182 Lotto 023]. Tale soluzione deve essere utilizzata entro trenta minuti dalla preparazione, causa ossidazione.</p> <p><b>60</b>) Al 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)</p> <p><b>61</b>) Posizionare la vaschetta per 60 minuti in incubatore a 37°C.</p> <p><b>62</b>) 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.</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> <p><b>63</b>) 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> <p><b>64</b>) Posizionare la vaschetta sullo Slow mixer per 60 min</p> <p><b>65</b>) Lavare la IP1 con PBS</p> <p><b>66</b>) Preparare la soluzione Clone AE75A  Aggiungere 40 <math>\mu</math>l<sup>1</sup> di anticorpo antiepo [R-173 Lotto 649] a 40 ml di LFM 1%</p> <p><b>67</b>) 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> <p><b>68</b>) 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>			Potenziale (V)	Corrente (mA)	Potenza (W)	Tempo (min)	10	132	1	0'	21	132	3	30'
Potenziale (V)	Corrente (mA)	Potenza (W)	Tempo (min)											
10	132	1	0'											
21	132	3	30'											

<sup>1</sup> 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

69/1	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 084]. 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
70/1	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
71/1	Effettuare tale lavaggio per altre tre volte ponendo la vaschetta sullo Slow mixer per 10 minuti

**E - SECONDO BLOTTING**

72/1	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 02].
73/1	Preparare tre vaschette delle dimensioni di 25 x 25 x 8h cm contenenti rispettivamente metanolo, acqua ultrapura e acido acetico 0,7%
74/1	Immergere un rettangolo della Immobilon P nella vaschetta contenente metanolo [R-038 Lotto 593] 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
75/1	Immergere un rettangolo della Durapore nella vaschetta contenente acido acetico allo 0,7% per almeno 20 minuti.
76/1	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, in modo tale che si imbevano di soluzione per capillarità
77/1	Sulla piastra del Nova Blot posizionare il pacchetto da quattro fogli di carta da filtro
78/1	Lavare la IP1 con PBS e sovrapporla rapidamente al pacchetto
79/1	Sovrapporre rapidamente la Durapore
80/1	Sovrapporre rapidamente la Immobilon P (al termine della corsa nominata IP2)
81/1	Sovrapporre rapidamente il pacchetto da quattro fogli di carta da filtro
82/1	Sovrapporre quindi un rettangolo di parafilm, facendo pressione con un rullo, per eliminare le bolle d'aria.
83/1	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)
6	106	1	0'
6	106	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 checked="" 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 checked="" 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: □ 26 µl <sup>2</sup> di anticorpo segnato con la biotina Pierce [R-175 Lotto <input checked="" type="checkbox"/> ] a 40 ml di LFM 1% □ 10 µl <sup>2</sup> di anticorpo segnato con la biotina Paris [R-175 Lotto <input checked="" 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 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 <input checked="" 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 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 <input checked="" type="checkbox"/> ]. Agitare con agitatore magnetico.	
96 <input checked="" type="checkbox"/>	Preparare la soluzione Perossidasi □ Aggiungere 150 µl <sup>2</sup> di streptavidina perossidasi Pierce [R-174 Lotto <input checked="" type="checkbox"/> ] a 40 ml di LFM 1% □ Aggiungere 20 µl <sup>2</sup> di streptavidina perossidasi Biospa [R-174 Lotto <input checked="" 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 type="checkbox"/> subito prima di utilizzarla la soluzione Covalight, mescolando uguali volumi (15 ml + 15 ml) <sup>2</sup> delle due soluzioni West Pico Pierce [R-176 Lotto A/2];
	<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

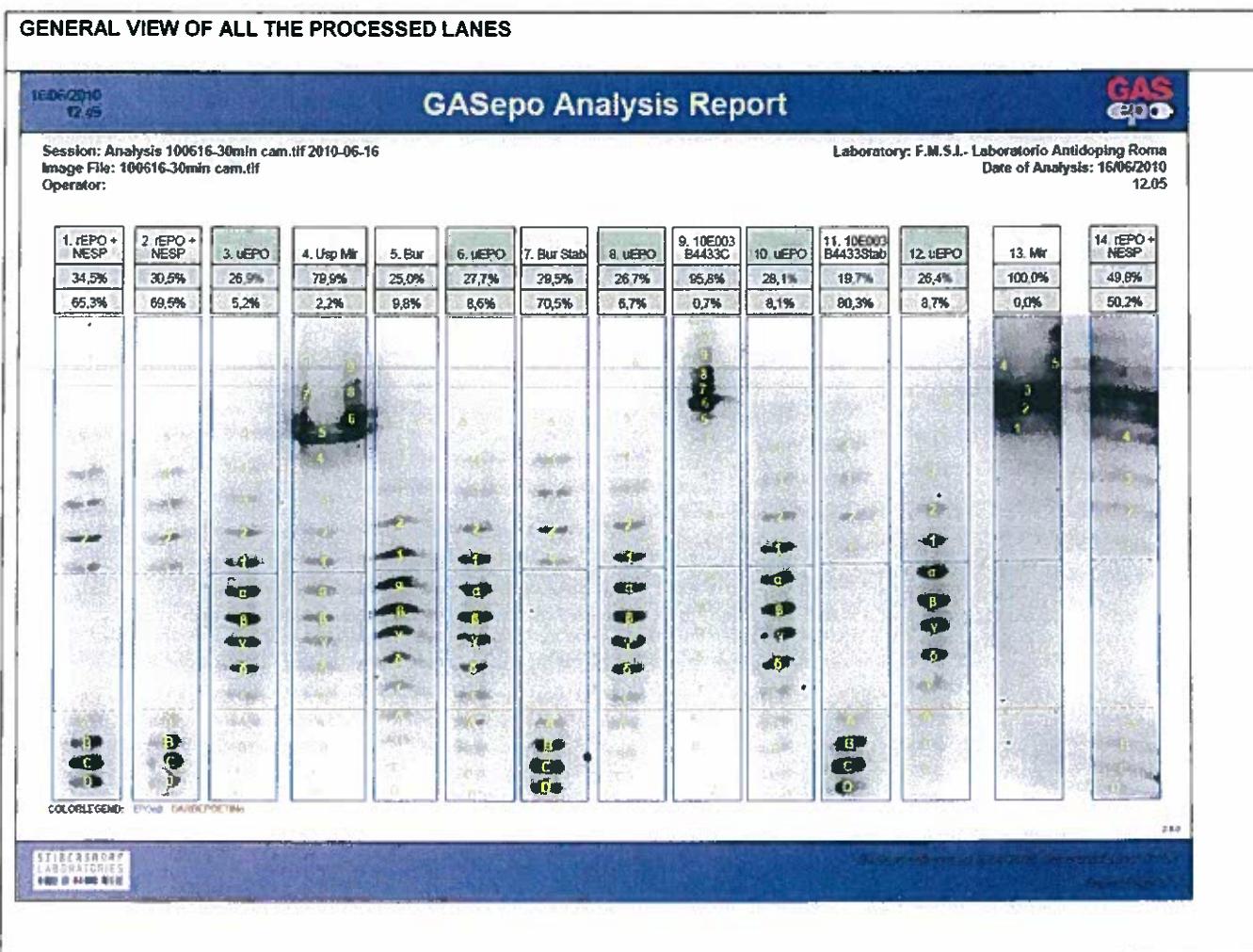
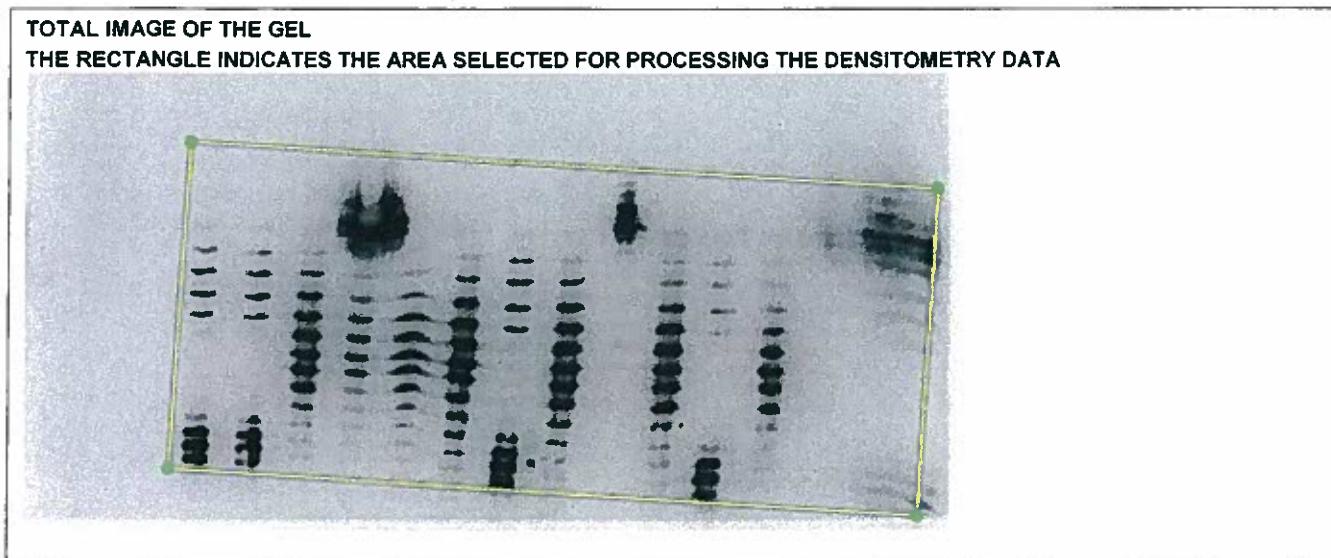
106 <input checked="" type="checkbox"/>	Posizionare la IP2 nel rivelatore.
107 <input checked="" type="checkbox"/>	Esporla per: <input type="checkbox"/> 1 minuto <input checked="" type="checkbox"/> 5 minuti <input type="checkbox"/> 10 minuti <input checked="" type="checkbox"/> 15 minuti <input checked=""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

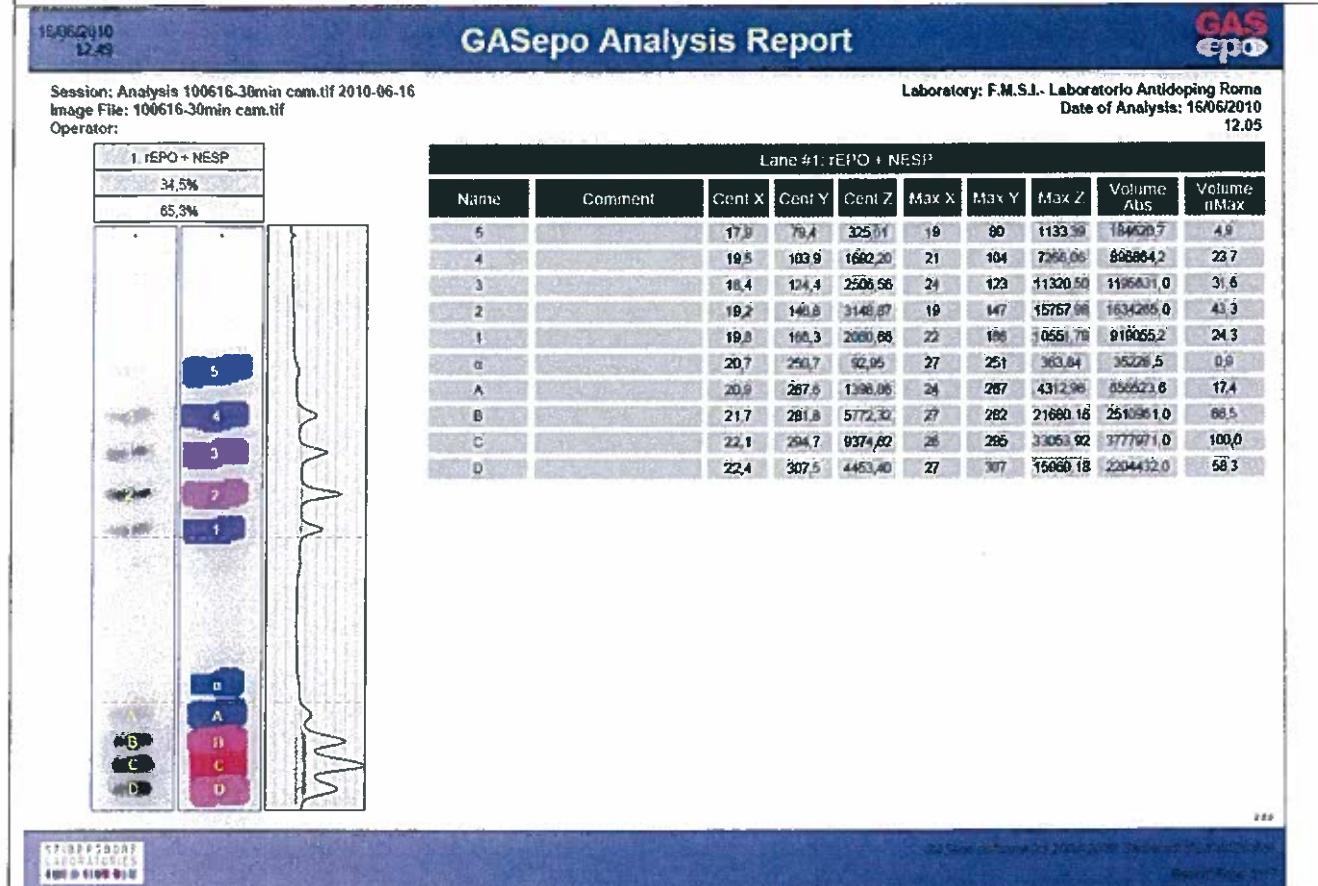
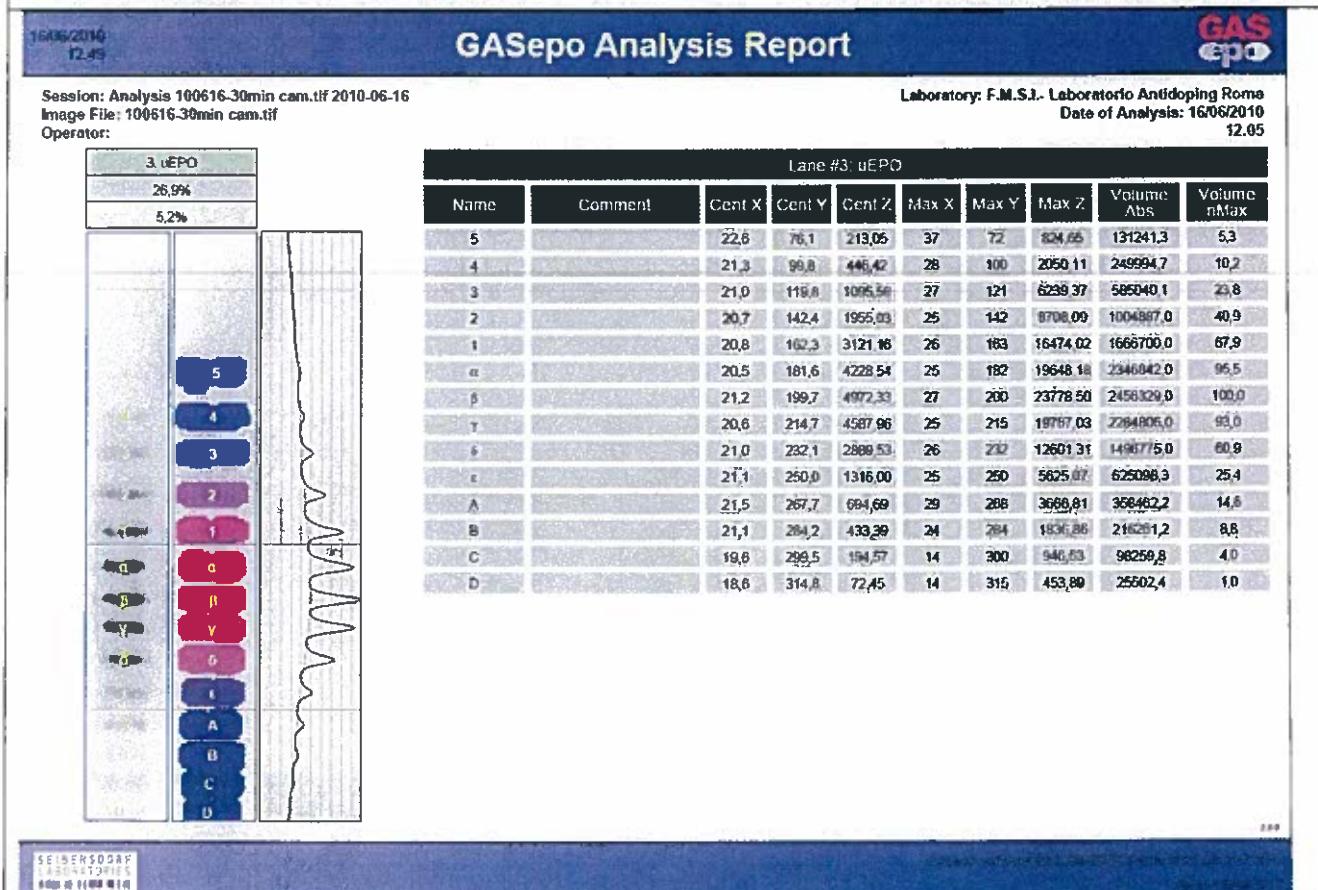
NO Si sono verificate non conformità durante lo svolgimento della procedura ?  
 SI vedere Rapporto FL053 N° \_\_\_\_\_

Operatore Sigla e Firma	Data	Operazioni eseguite
tes Stefanini	14/6/10	da punto [ ] a punto [ ] e da [ ] a [ ]
tes Stefanini	15/6/10	da punto [ ] a punto [ ] e [ ] e [ ]
tes Stefanini	16/6/10	da punto [ ] a punto [ ]
		da punto [ ] a punto [ ]
		da punto [ ] a punto [ ]
		da punto [ ] a punto [ ]

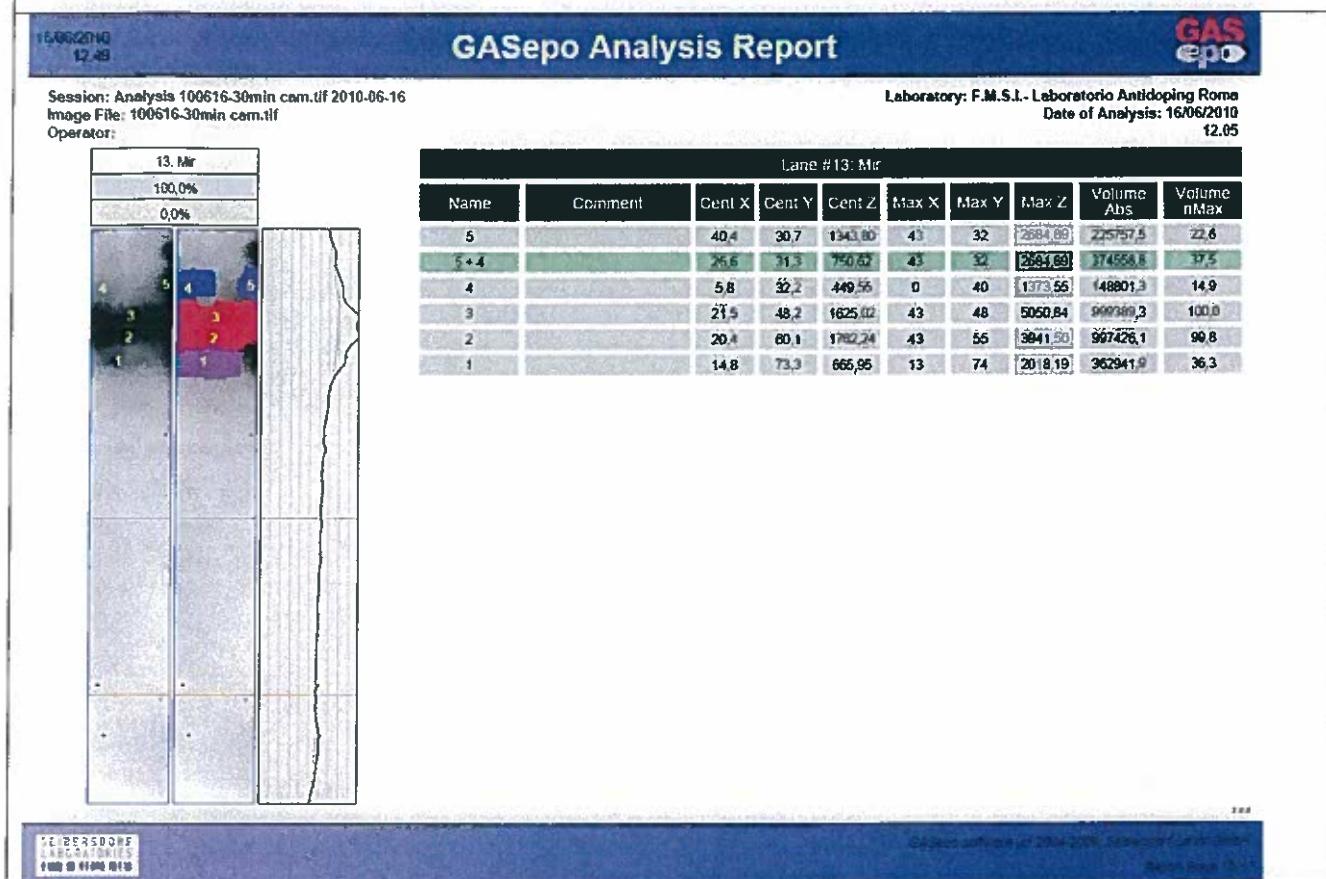
## II.2.4 Confirmation Test Results

**Gel images and data of positive control standards (BRNE and Mir), negative control standard (NIBSC), sample internal laboratory code 10E003 B4433 (including the stability test), positive reference sample (USPMir) and negative reference sample (Bur) (including the stability test).**

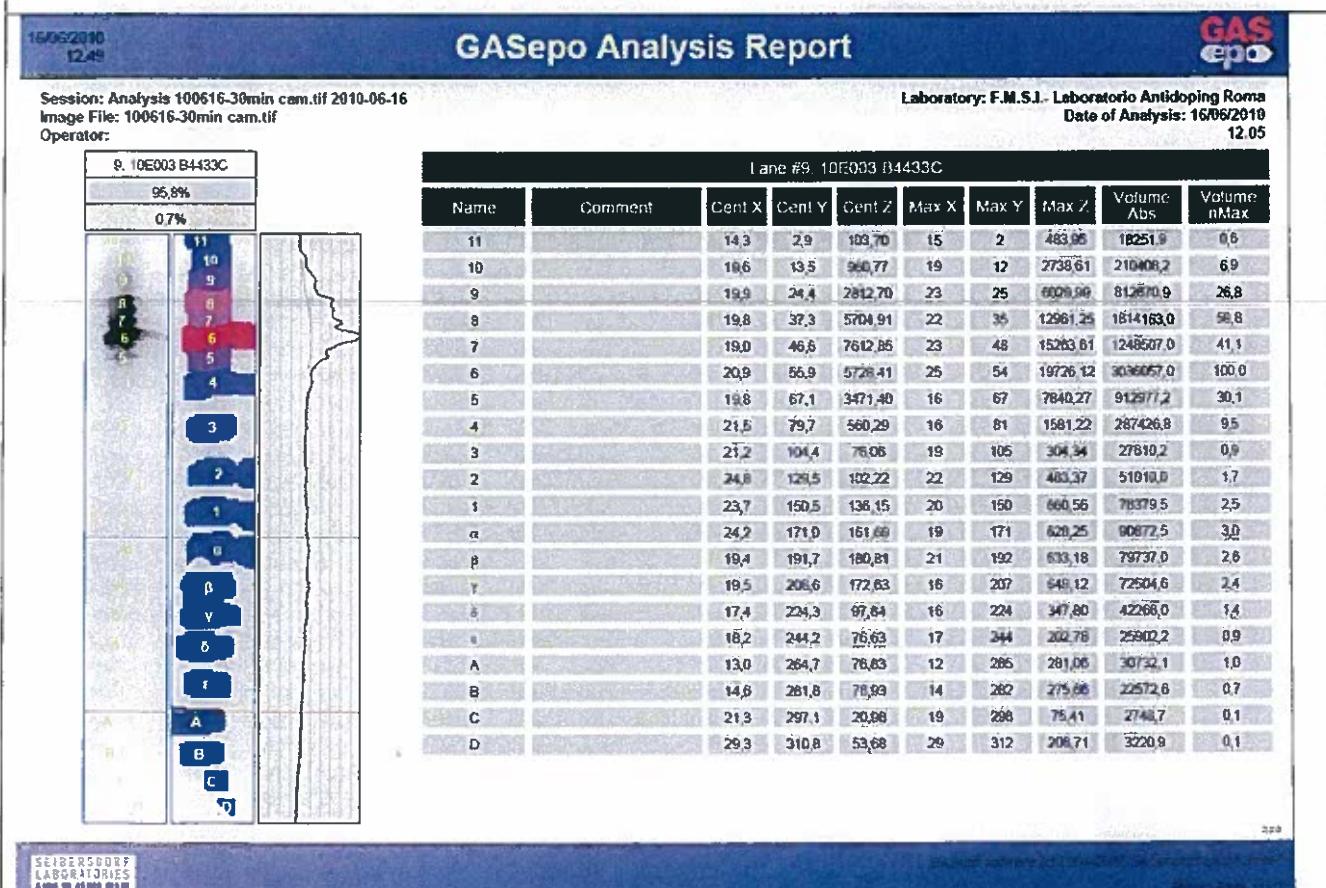


**POSITIVE CONTROL: rEPO AND NESP STANDARDS (BRNE)****NEGATIVE CONTROL: URINARY EPO STANDARD :NIBSC (UEPO)**

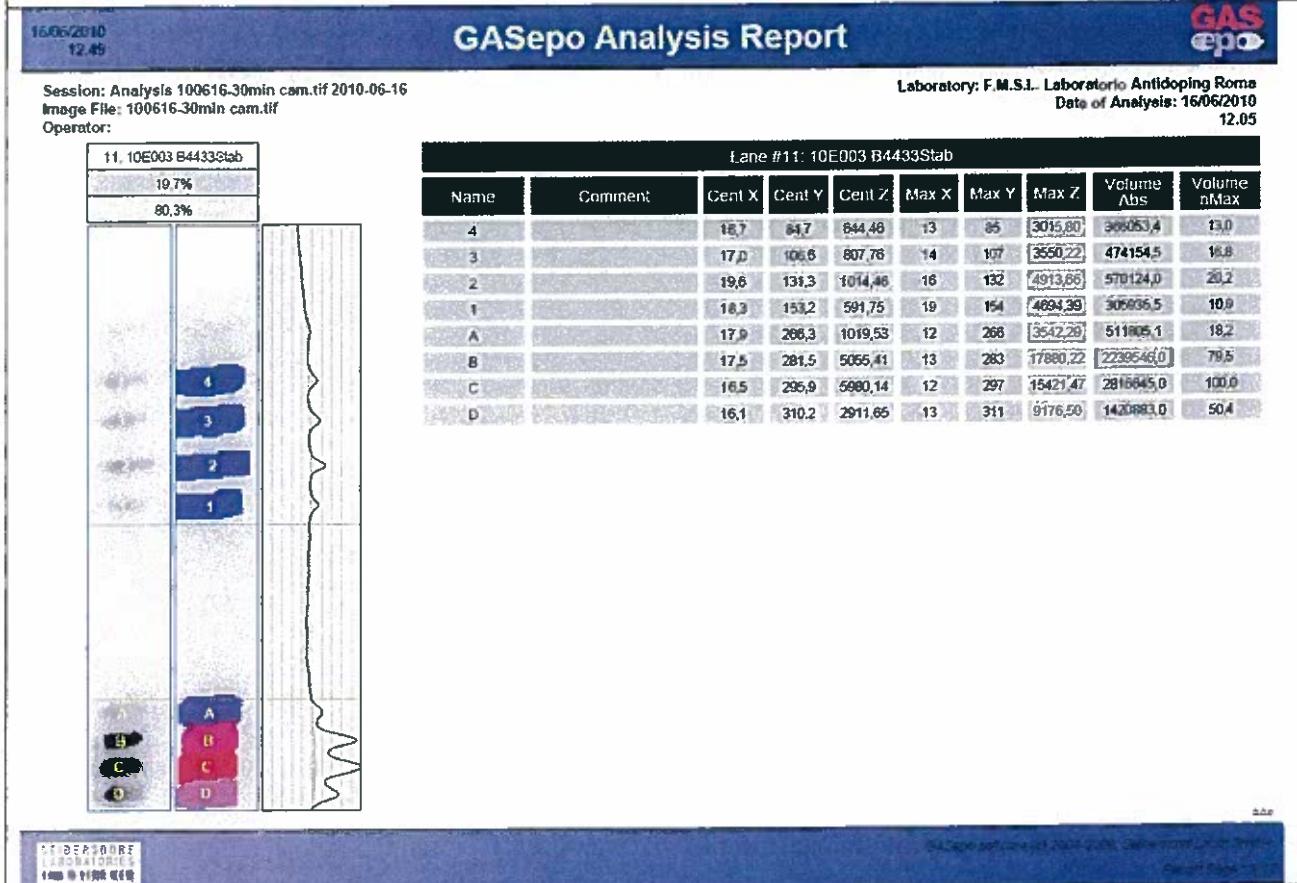
## POSITIVE CONTROL: MIRCERA (MIR)



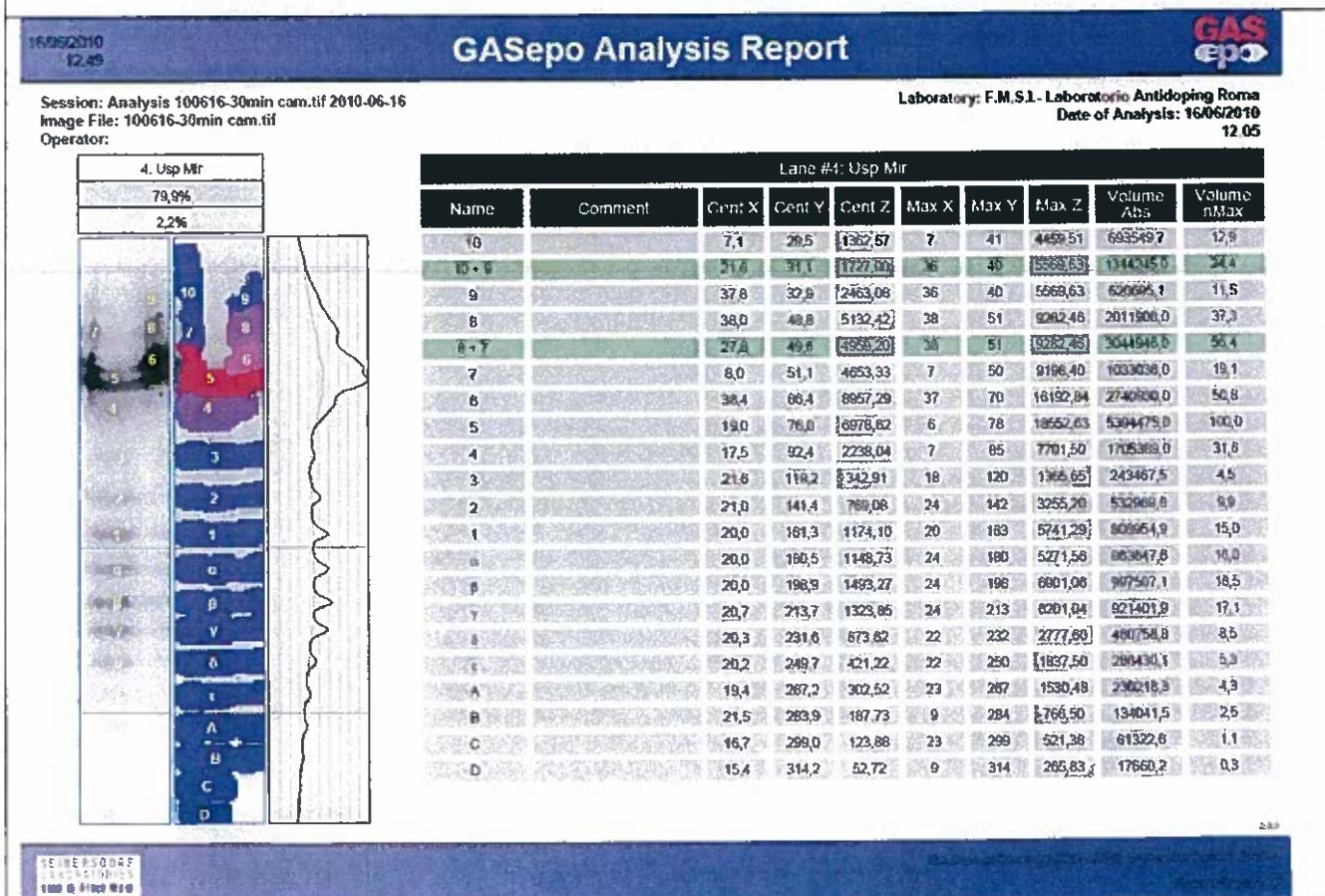
## SAMPLE INTERNAL LABORATORY CODE 10E003 B4433

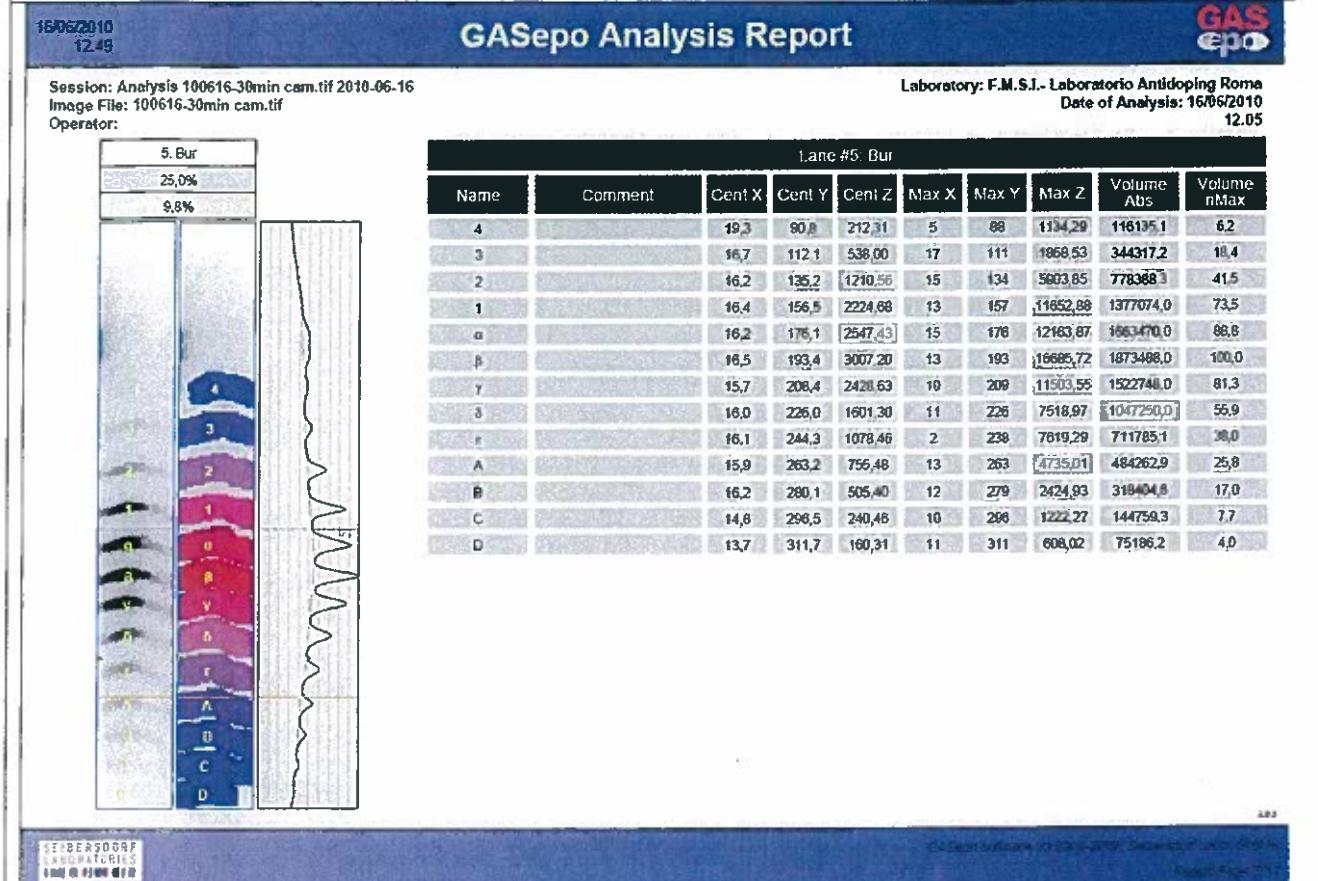
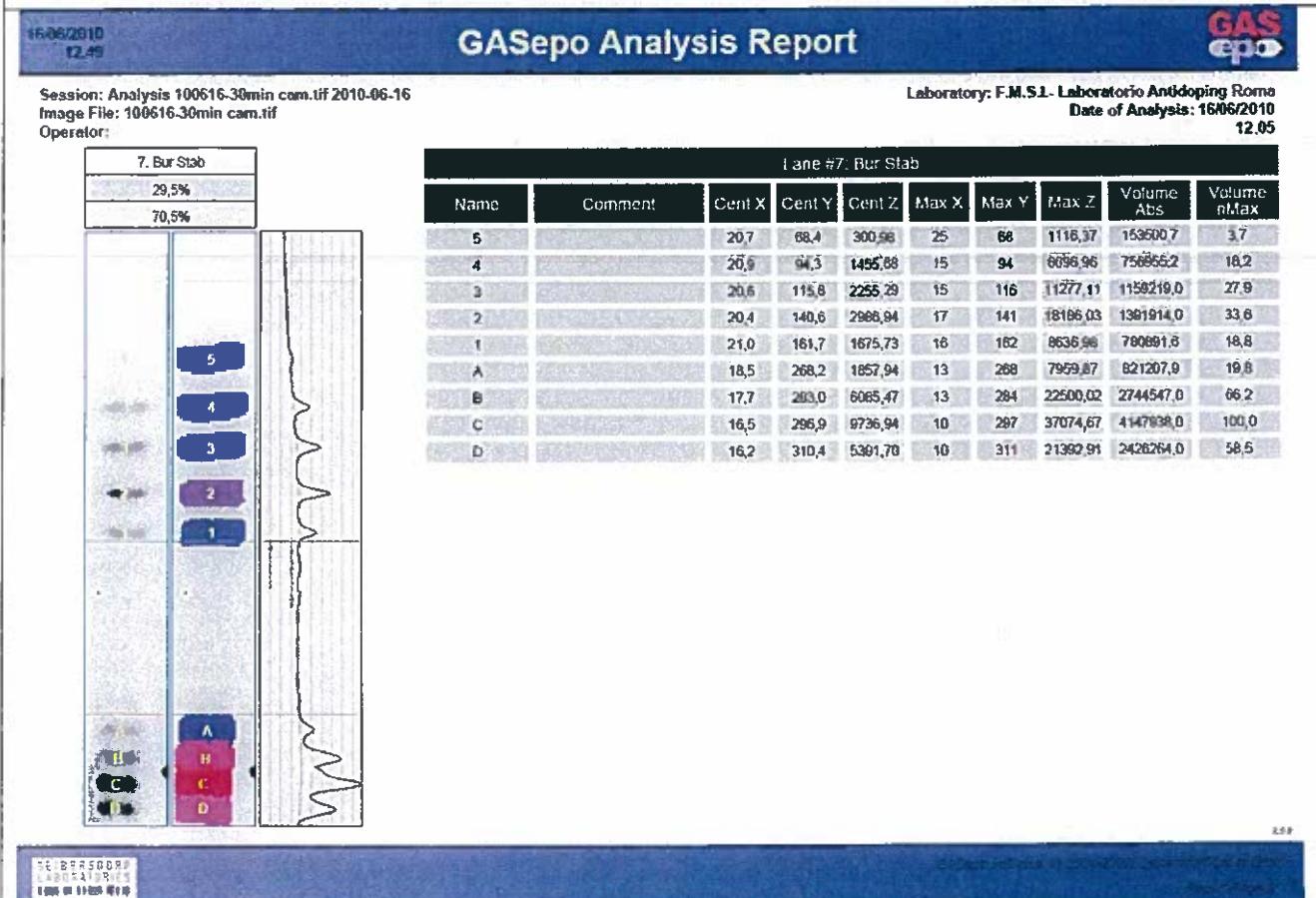


## SAMPLE INTERNAL LABORATORY CODE 10E003 B4433: STABILITY TEST



## POSITIVE REFERENCE SAMPLE (USPMIR)



**NEGATIVE REFERENCE SAMPLE(BUR)****NEGATIVE REFERENCE SAMPLE (BUR) : STABILITY TEST**

### ***II.2.5 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.2.6 Confirmation IEF conclusions**

*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, according to our internal procedures, to perform a new IEF analysis. A SDS-PAGE analysis was also performed in parallel to obtain “additional evidence”.*

## II.2.7 Second Confirmation procedure - Aliquot chain of custody documentation

Worksheet for the second confirmation 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: 5/4/10 10.05

Lotto di accettazione	Codice campioni preparati
WOF 003	DA: B4433C + tubi RTD A:
	DA: A:
	DA: A:
	DA: A:
	DA: A:
	DA: A:
	DA: A:

### A – PREPARAZIONE DEL GEL 17 X8 X 0,1CM

- 1  Pesare 14,71 g di urea [R-181 Lotto C18] , 1,76 g di saccarosio [R-306 Lotto C03] ] e trasferirli in un pallone di reazione da 100 ml posto su un agitatore eletromagnetico
- 2  Aggiungere 14,17 ml di acqua ultrapura e 1,89 ml di anfolita 2-4 [R-168 Lotto C02] , 1,89ml di anfolita 4-6 [R-169 Lotto C42] e 4,74 ml di soluzione di bisacrilamide 40% [R-184 Lotto C03]
- 3  Tappare il pallone e collegarlo ad una pompa da vuoto per 15 min.
- 4  Nel frattempo (durante i 15 minuti):
  - a) detergere le lastre con etanolo assoluto [R-033 Lotto C30]
  - 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  Preparare l'APS sciogliendo in una vial di plastica da 1,5 ml con tappo 100 mg di persolfato d'ammonio [R-179 lotto C2x] in 1 ml di acqua ultrapura e agitando manualmente
- 6  Aggiungere 31 µl di TEMED [R-180 Lotto C03] e 310 µl di APS nel pallone
- 7  Lasciare 30 s in agitazione
- 8  Prelevare la soluzione di gel mediante pipetta e trasferirla rapidamente fra le due lastre, avendo cura di non generare bolle d'aria
- 9  Lasciare il gel per almeno tre ore nella camera umida

### B – PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

1 per screening e conferma(non SDS PAGE)  1 A (per la purificazione per immunoaffinità) andare al FL162

- 10  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<sup>1</sup> [R-172 Lotto C59] e mescolando mediante agitatore eletromagnetico
- 11  Prelevare 20 ml di urina<sup>2</sup> (in caso di prelievi inferiori, portare a 20 ml con TRISHCl 50 mM [TRISHCl 50 Lotto C03]) e trasferirli in una provetta da 50 ml
- 12  Aggiungere 400 µl di soluzione Complete (200 µl ogni 10 ml di urina)
- 13  Aggiungere 2 ml di TRISHCl 3,75M [TRISHCl 3.75 Lotto C24] (1ml ogni 10 ml di urina)
- 14  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 tamponi TRISHCl 3,75M – TRISHCl 9,75 Lotto C17
- 15  Centrifugare per 10 min nella centrifuga refrigerata a 20°C con rotore basculante a 3000 rcf

<sup>1</sup> E' possibile preparare quantità differenti purchè restino invariate le proporzioni.

<sup>2</sup> In caso di urina diluita e prelievi maggiori, prelevare le quantità di Complete e di TRISHCl 3,75 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"/>	Appicare 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 TRISHCl 50 mM [TRISHCl 50 Lotto 163] 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 ritenuto, 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)

**D/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 sovraccarico 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 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 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 anfolti 6-8 [R-170 Lotto <del>003</del> ] e 10 µl di RMET <sup>3</sup> [Lotto <del>002</del> ]														
33 <input checked="" type="checkbox"/>	Posizionare sui lati più lunghi le strips imbevute rispettivamente della soluzione catodica ed anodica														
34 <input checked="" type="checkbox"/>	Chiudere il supporto e impostare i seguenti parametri: Potenziale: 250 V Corrente: 17 mA (proporzionale alle dimensioni del Gel) Potenza: 17 W Durata: 30 min/ 60min O nel caso la lunghezza del gel sia pari a 25 cm: Potenziale: 250 V Corrente: 25 mA Potenza: 25 W Durata: 30 min/ 60min 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><del>105</del></td><td><del>25</del></td><td><del>5</del></td><td><del>5</del></td></tr> <tr> <td><del>250</del></td><td><del>10.5</del></td><td><del>4</del></td><td><del>39</del></td></tr> </tbody> </table>	Potenziale (V)	Corrente (mA)	Potenza (W)	Tempo (min)	<del>105</del>	<del>25</del>	<del>5</del>	<del>5</del>	<del>250</del>	<del>10.5</del>	<del>4</del>	<del>39</del>		
Potenziale (V)	Corrente (mA)	Potenza (W)	Tempo (min)												
<del>105</del>	<del>25</del>	<del>5</del>	<del>5</del>												
<del>250</del>	<del>10.5</del>	<del>4</del>	<del>39</del>												
35 <input checked="" type="checkbox"/>	Prelevare gli standard dal congelatore														
36 <input checked="" type="checkbox"/>	Preparare gli standard: <b>MISCELA BRP NESP 1-2 (BRNE1-2)</b> Aggiungere 0,32 – 0,16 ng <sup>3</sup> di BRP [BRP Lotto <del>001</del> ] a 0,2 – 0,15ng <sup>3</sup> di NESP [NESP Lotto <del>013</del> ] <b>MISCELA BRP NIBSC (BRNIB)</b> Aggiungere 0,16 ng <sup>3</sup> di BRP [BRP Lotto <del>001</del> ] a 0,0025 ng <sup>3</sup> di NIBSC [NIBSC Lotto <del>001</del> ] <b>MISCELA NESP NIBSC (NENIB)</b> Aggiungere 0,15 ng <sup>3</sup> di NESP [NESP Lotto <del>001</del> ] a 0,0025 <sup>3</sup> ng di NIBSC [NIBSC Lotto <del>001</del> ] <b>SOLUZIONE NIBSC 0,02UI - 0,04UI (NIBSC1-2)</b> Prelevare dalla soluzione standard [NIBSC Lotto <del>001</del> ] 10-20 µl, in modo tale da ottenere una soluzione da 0,02-0,04 UI <b>SOLUZIONE MIRCERA (MIR)</b> Prelevare 20 µl dalla soluzione standard di Mircera [MIR Lotto <del>005</del> ] <b>SOLUZIONE Dynepo (Dyn)</b> Prelevare 20 µl dalla soluzione standard di Dynepo [Dyn Lotto <del>001</del> ]														
37a <input checked="" 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 andare a punto 39												
38 <input checked="" type="checkbox"/>	Immergere i campioni precedentemente scaldati, nel bagno refrigerante per 30 s														
39 <input checked="" type="checkbox"/>	Aggiungere: -ai campioni il 10% di Surfact-amps 80 (Tween 80) [R-166 Lotto <del>001</del> ] per volume di rilentato -agli standard (eccetto Mircera) aggiungere 2,2 µl di Surfact-amps 80 (Tween 80) [R-166 Lotto <del>001</del> ] ogni 20 µl														

<sup>3</sup> 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 anfolti 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 strips<sup>4</sup> secondo il seguente schema:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>BRNIB</li> <li>NENIB</li> <li>Dyn<sup>5</sup></li> <li>MIR</li> <li>NIBSC (1 o 2)</li> <li>BRNE (1 o 2)</li> <li>Bur<sup>6</sup></li> <li>USPrEPO<sup>6</sup></li> <li>CAMPIONI</li> <li>BRNE (1 o 2)</li> <li>NENIB</li> <li>BRNIB</li> </ul> <p>Oppure nel caso la lunghezza del gel sia pari a 25 cm:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>NIBSC (1 o 2)</li> <li>BRNE (1 o 2)</li> <li>Bur<sup>5</sup></li> <li>USPrEPO<sup>6</sup></li> <li>CAMPIONI</li> <li>BRNE (1 o 2)</li> <li>CAMPIONI</li> <li>BRNE (1 o 2)</li> <li>CAMPIONI</li> <li>NIBSC (1 o 2)</li> <li>BRNE (1 o 2)</li> <li>NIBSC (1 o 2)</li> <li>Dyn<sup>5</sup></li> <li>MIR</li> </ul>

Compilare la tabella seguente in base alla sequenza di caricamento:

Posizione	Campione	Volume di ritenzione ( $\mu$ l)
1	MIR	20
2	NIBSC	20
3	BRP + NESP	16+10
4	BRP + NESP	16+10
5	NIBSC	20
6	USP MIR	27
7	Bur	20
8	NIBSC	20

<sup>4</sup> Quantitativo massimo per ogni strip/pozzetto: 20  $\mu$ l ; in caso di volumi superiori, sovrapporre un'altra strip e ripetere l'operazione. La posizione degli standard può anche essere variata, purché i campioni restino in posizione centrale. La sequenza descritta è indicativa.<sup>5</sup> 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 Dynapo.

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	BUR STAB	40	
10	NIBSC	20	
11	10E003B4433C	55	
12	NIBSC	20	
13	10E003B44338TAD	40	
14	NIBSC	20	
15	MIR	20	
16	BEP + NESP	100	
17			
18			
19			
20			
21			
22			
23			
24			
25			
26			
27			
28			
29			
30			

42	<p>Chiudere il supporto e impostare i seguenti parametri:</p> <p>Potenziale: 2000 V            Corrente: 17 mA            Potenza: 17 W            Potenziale per ora: 3600 Vh</p> <p>O nel caso la lunghezza del gel sia pari a 25 cm:</p> <p>Potenziale: 2000 V            Corrente: 25 mA            Potenza: 25 W            Potenziale per ora: 4000 Vh</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>Potenziale per ora (Vh)</th><th>Tempo (min)</th></tr> </thead> <tbody> <tr> <td>342</td><td>25</td><td>9</td><td>1</td><td>0</td></tr> <tr> <td>1534</td><td>16,2</td><td>25</td><td>4000</td><td>3 h 40'</td></tr> </tbody> </table>	Potenziale (V)	Corrente (mA)	Potenza (W)	Potenziale per ora (Vh)	Tempo (min)	342	25	9	1	0	1534	16,2	25	4000	3 h 40'
Potenziale (V)	Corrente (mA)	Potenza (W)	Potenziale per ora (Vh)	Tempo (min)												
342	25	9	1	0												
1534	16,2	25	4000	3 h 40'												
43	Tagliare due rettangoli di Durapore e Immobilon P e 16 rettangoli di carta da filtro <sup>6</sup> 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 <del>009</del> ] 1,51g di Trizmabase [R-167 Lotto <del>009</del> ] 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 <del>S34</del> ], acqua ultrapura e GLI-TRIS															

<sup>6</sup> 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 eletroforetica 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 <sup>6</sup> , in modo tale che si imbevano di soluzione per capillarità.																	
49 <input type="checkbox"/>	<p>Prolungare la corsa</p> <p>SI <input type="checkbox"/> 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"> <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																	
<b>D - PRIMO BLOTTING</b>																		
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 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.																	

<b>FEDERAZIONE MEDICO SPORTIVA ITALIANA LABORATORIO ANTIDOPING</b>	<b>FOGLIO DI LAVORO</b>	<b>FL119</b>												
<b>RICERCA DI ERITROPOIETINA RICOMBINANTE E ANALOGHI</b>														
Rif. MP031 - Allegato	Pag. 7/10 Rev. 9													
<p><b>58</b> 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%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: center;">Potenziale (V)</th> <th style="text-align: center;">Corrente (mA)</th> <th style="text-align: center;">Potenza (W)</th> <th style="text-align: center;">Tempo (min)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">40</td> <td style="text-align: center;">132</td> <td style="text-align: center;">1</td> <td style="text-align: center;">30'</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">21</td> <td style="text-align: center;">132</td> <td style="text-align: center;">3</td> <td style="text-align: center;">20'</td> </tr> </tbody> </table> <p><b>59</b> 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 090]. Mescolare mediante agitatore elettromagnetico.</p> <p>DTT  Portare a volume con PBS in un matraccio da 250 ml 192,8 mg ditiorettole [R-182 Lotto 023]. Tale soluzione deve essere utilizzata entro trenta minuti dalla preparazione, causa ossidazione.</p> <p><b>60</b> <i>Al termine della migrazione, dopo aver aperto il supporto</i>  Mettere in una vaschetta da 30x 15 x 8 cm 250 ml di DTT e immergervi il rettangolo di Immobilon P (IP1)</p> <p><b>61</b> Posizionare la vaschetta per 60 minuti in incubatore a 37°C.</p> <p><b>62</b> 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.</p> <p><b>63</b> 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> <p><b>64</b> Posizionare la vaschetta sullo Slow mixer per 60 min</p> <p><b>65</b> Lavare la IP1 con PBS</p> <p><b>66</b> Preparare la soluzione Clone AE75A  Aggiungere 40 µl<sup>7</sup> di anticorpo antiepo [R-173 Lotto 0282] a 40 ml di LFM 1%</p> <p><b>67</b> 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> <p><b>68</b> 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>			Potenziale (V)	Corrente (mA)	Potenza (W)	Tempo (min)	40	132	1	30'	21	132	3	20'
Potenziale (V)	Corrente (mA)	Potenza (W)	Tempo (min)											
40	132	1	30'											
21	132	3	20'											

<sup>7</sup> 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 034]. Agitare con agitatore magnetico. -250 ml di: <input checked="" type="checkbox"/> LFM 5% <input type="checkbox"/> 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 594] 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 <sup>6</sup> , 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 <sup>6</sup>
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)
6	106	1	10
6	106	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="text"/> ]. 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 d'anticorpo segnato con la biotina Pierce [R-175 Lotto <input type="text"/> ] a 40 ml di LFM 1% <input type="checkbox"/> 10 µl d'anticorpo segnato con la biotina Paris [R-175 Lotto <input type="text"/> ] 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 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 <input type="text"/> ]. 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 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="text"/> ]. 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="text"/> ] a 40 ml di LFM 1% <input type="checkbox"/> Aggiungere 20 µl di streptavidina perossidasi Biospa [R-174 Lotto <input type="text"/> ] 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 ✓ | Preparare<br><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 CL9];<br><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 ✓ | 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 ✓ | Agitare la vaschetta per qualche secondo   |

## F - RIVELAZIONE MEDIANTE CHEMILUMINESCENZA

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

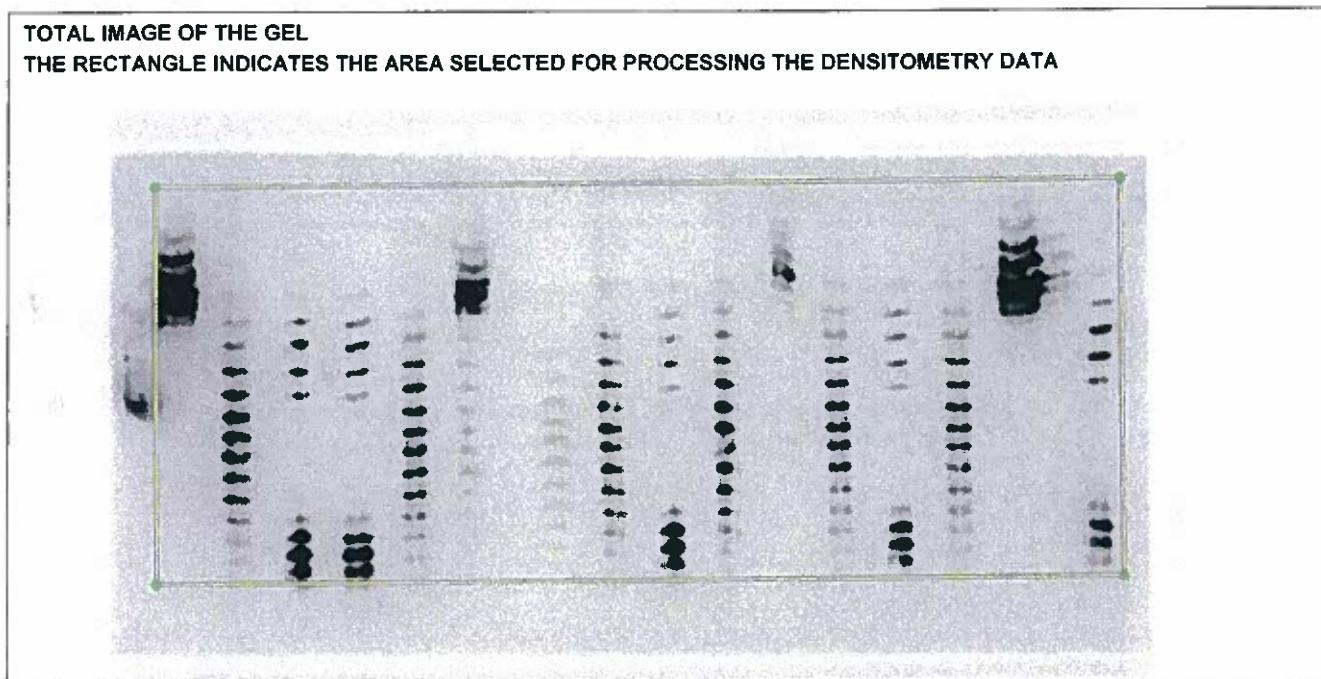
NO Si sono verificate non conformità durante lo svolgimento della procedura ?  
 SI vedere Rapporto FL053 N° \_\_\_\_\_

Operatore Sigla e Firma	Data	Operazioni eseguite
CUS Sistemic	SI 7/10	da punto [ ] a punto [ ] e da [ ] a 20/4
CUS Sistemic	6/7/10	da punto [ ] a punto 14P e 21/6 e 20/6
CUS Sistemic	2/12/10	da punto [ ] a punto [ ]
		da punto [ ] a punto [ ]
		da punto [ ] a punto [ ]
		da punto [ ] a punto [ ]

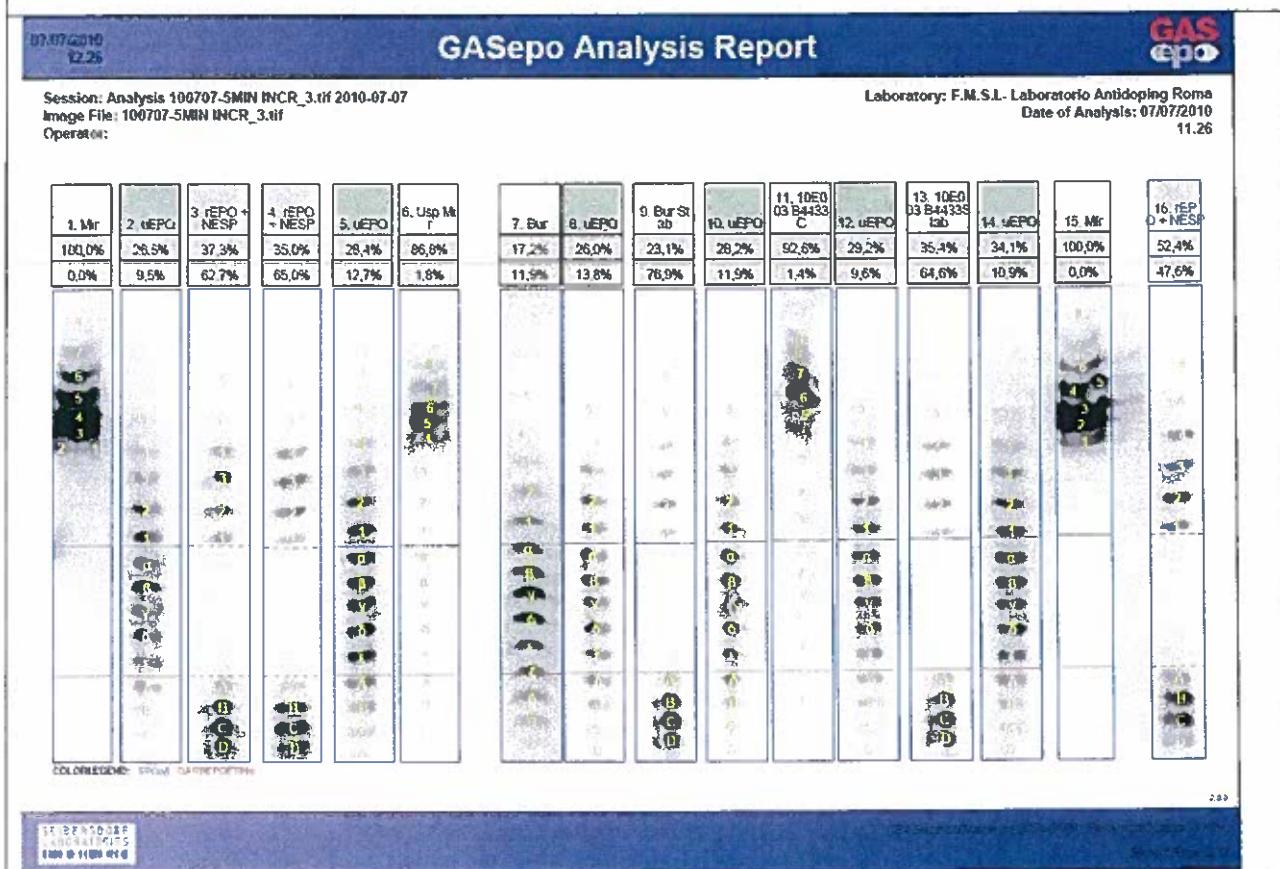
## II.2.8 Second Confirmation Test Results

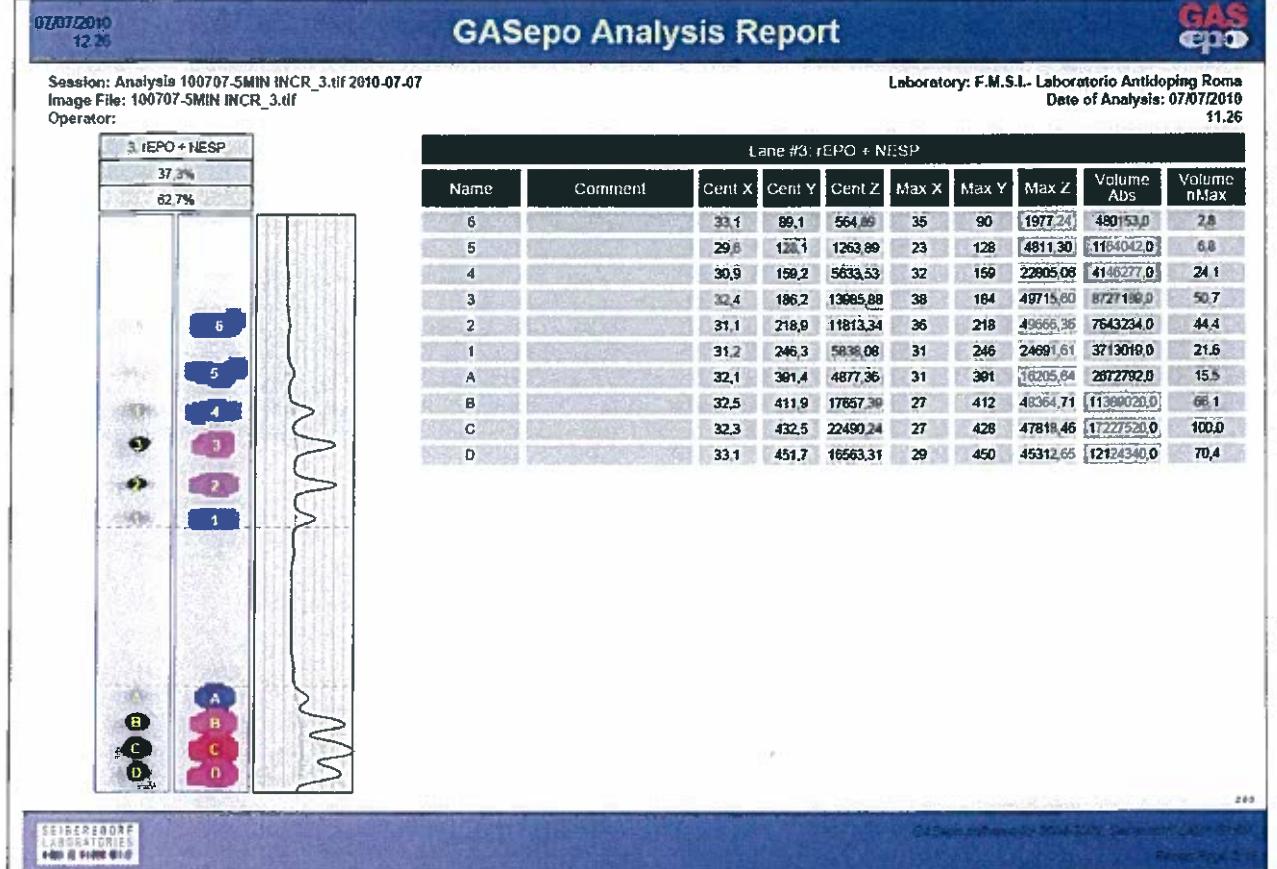
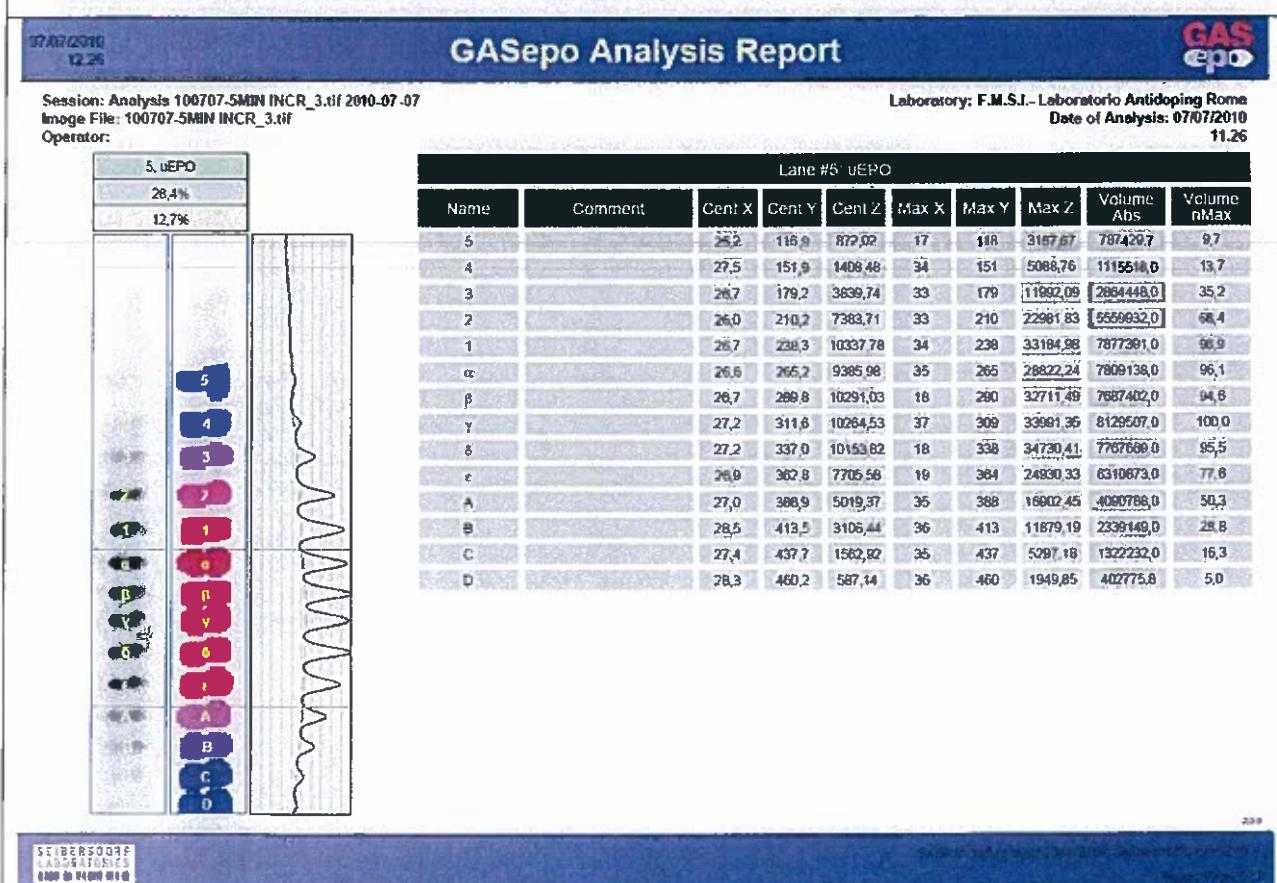
**Gel images and data of positive control standards (BRNE and Mir), negative control standard (NIBSC), sample internal laboratory code 10E003 B4433 (including the stability test), positive reference sample (USPMir) and negative reference sample BUR (including the stability test).**

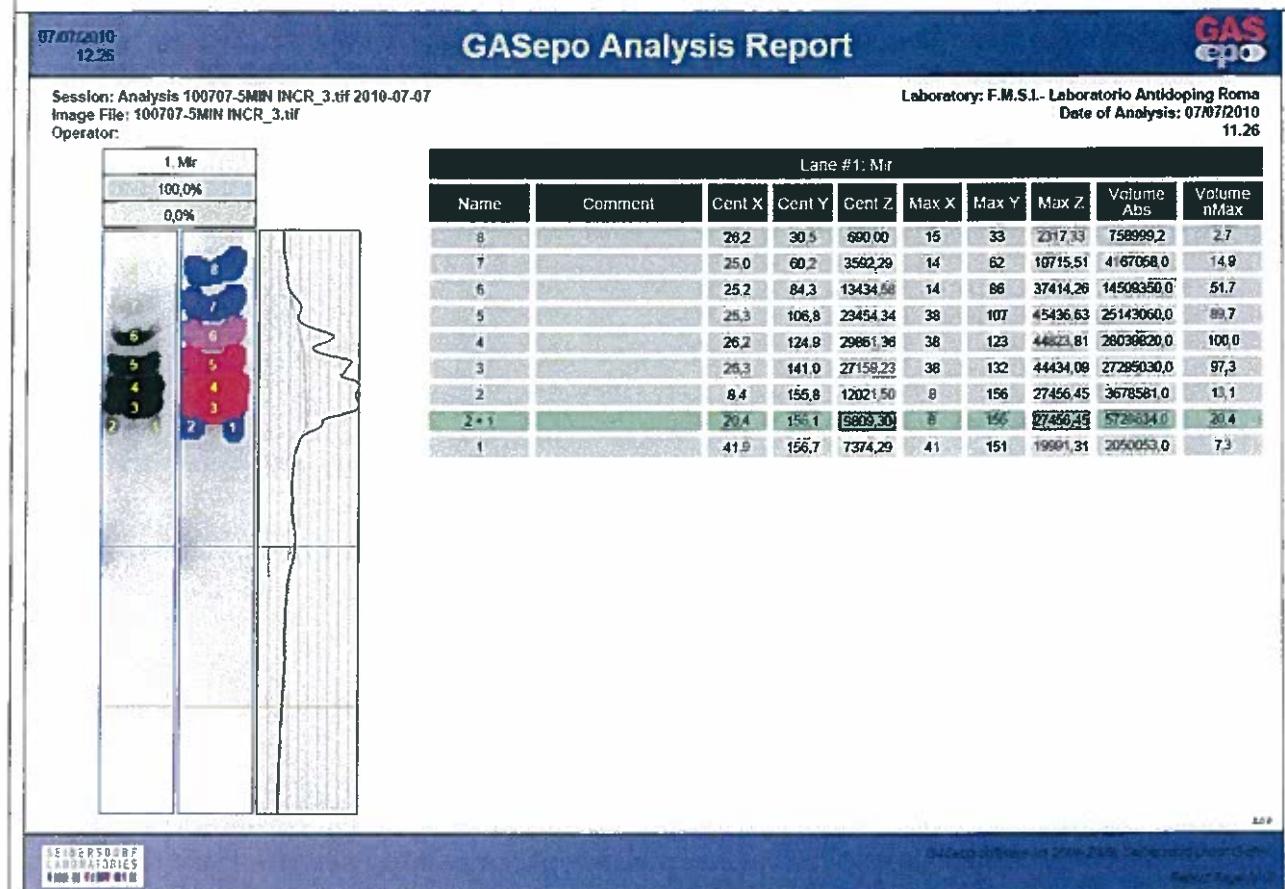
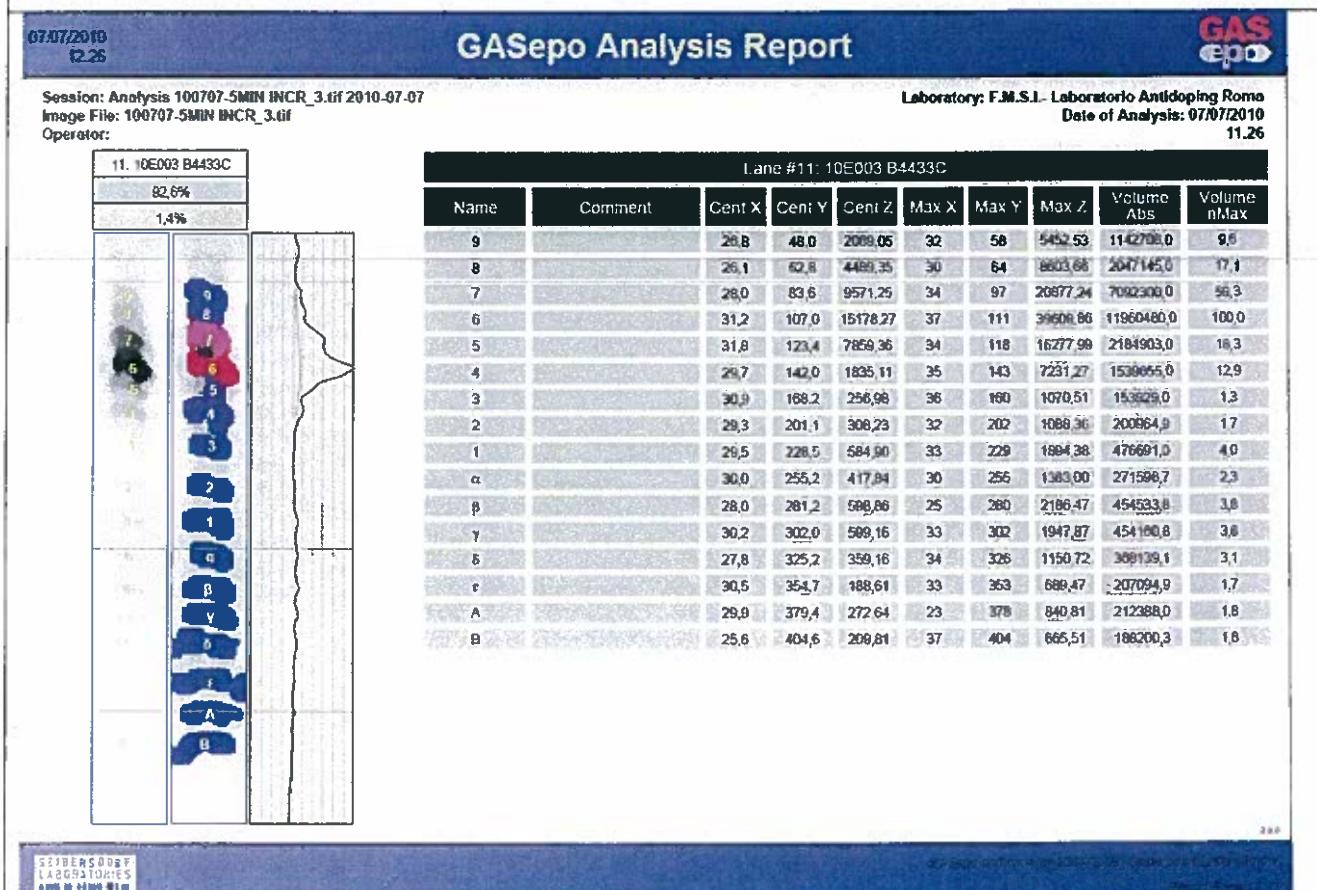
TOTAL IMAGE OF THE GEL  
THE RECTANGLE INDICATES THE AREA SELECTED FOR PROCESSING THE DENSITOMETRY DATA



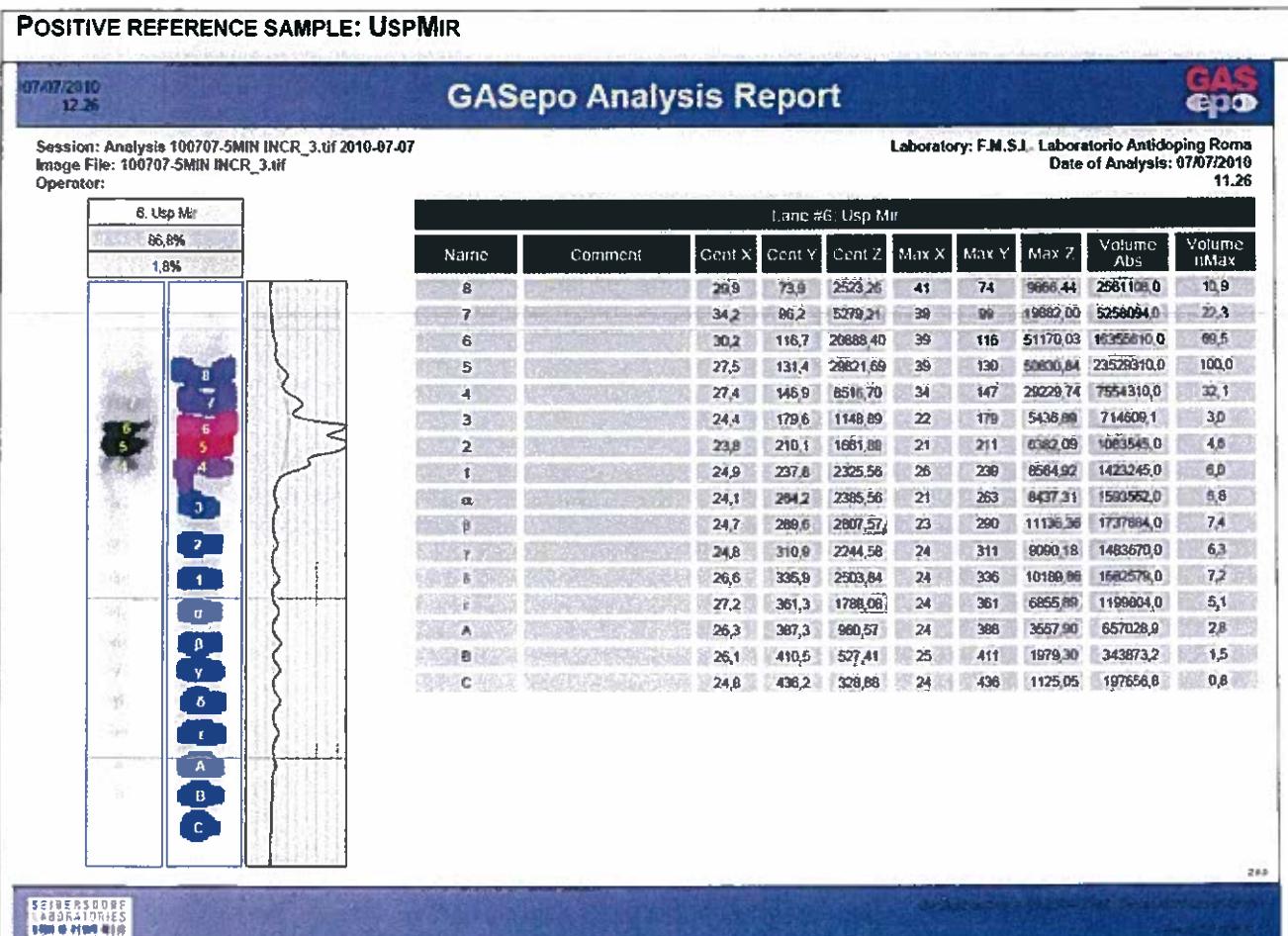
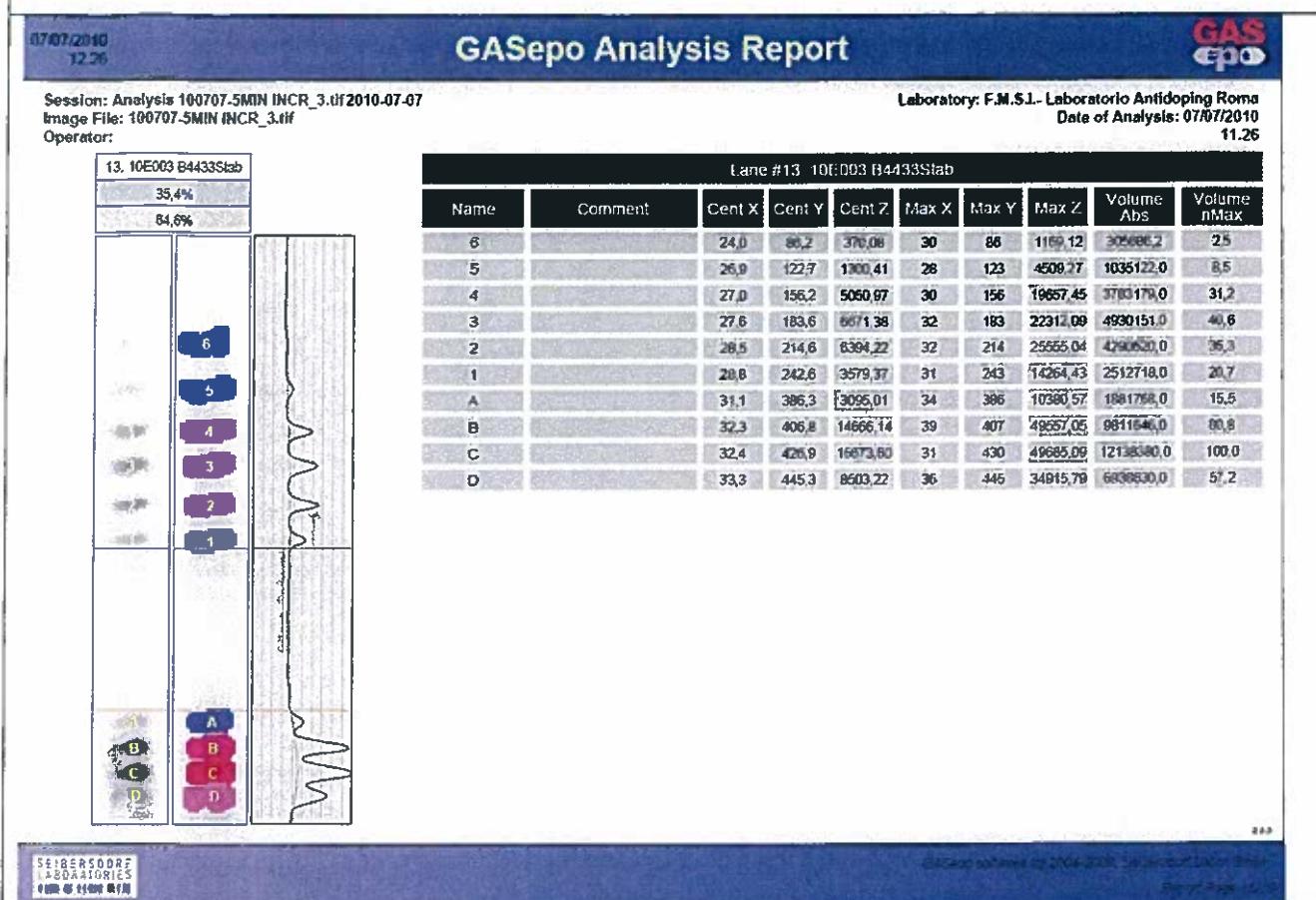
GENERAL VIEW OF ALL THE PROCESSED LANES



**POSITIVE CONTROL: rEPO AND NESP STANDARDS (BRNE)****NEGATIVE CONTROL: URINARY EPO STANDARD: NIBSC (UEPO)**

**POSITIVE CONTROL: MIRCERA STANDARD(MIR)****SAMPLE INTERNAL LABORATORY CODE 10E003 B4433: CONFIRMATION**

## SAMPLE INTERNAL LABORATORY CODE 10E003 B4433: STABILITY TEST



## NEGATIVE REFERENCE SAMPLE (BUR)

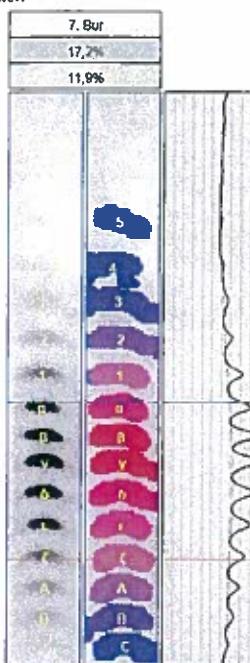
07/07/2010  
12:26

## GASepo Analysis Report



Session: Analysis 100707-5MIN INCR\_3.tif 2010-07-07  
 Image File: 100707-5MIN INCR\_3.tif  
 Operator:

Laboratory: F.M.S.I.- Laboratorio Antidoping Roma  
 Date of Analysis: 07/07/2010  
 11.26



Lane #7: Bur									
Name	Comment	Cent X	Cent Y	Cent Z	Max X	Max Y	Max Z	Volume Abs	Volume nMax
5		26,4	104,8	148,01	24	104	157,14	124328,6	5,3
4		21,1	142,3	213,70	20	139	170,23	216852,8	9,1
3		25,6	170,2	373,34	27	169	1336,49	456000,8	19,3
2		28,1	200,5	683,41	33	200	2592,80	724415,2	30,7
1		27,5	229,8	1425,00	29	229	5132,21	1240352,0	52,5
a		27,1	256,4	2091,64	21	256	7004,49	1704830,0	76,0
b		20,6	270,8	2579,37	29	270	9797,27	2244051,0	95,0
c		29,8	301,1	2448,15	36	301	8971,08	2362466,0	100,0
d		29,8	326,3	1966,77	32	325	7073,37	2001134,0	64,8
e		29,5	352,4	1846,00	35	352	6132,20	1673103,0	70,8
f		30,4	378,5	1428,99	30	377	5083,69	1316102,0	56,7
A		29,9	403,3	1034,30	35	403	3743,61	880514,5	41,5
B		29,7	427,7	587,65	35	427	2228,63	631726,9	26,7
C		32,9	451,1	296,04	30	450	1006,84	304622,3	12,9

SEIBERSDORF  
LABORATORIES  
1000 VIENNA

GASepo Software -02 COCA-ZONE, ANALYST, LSC, LC-MS

8.8.0

## NEGATIVE REFERENCE SAMPLE (BUR) STABILITY TEST

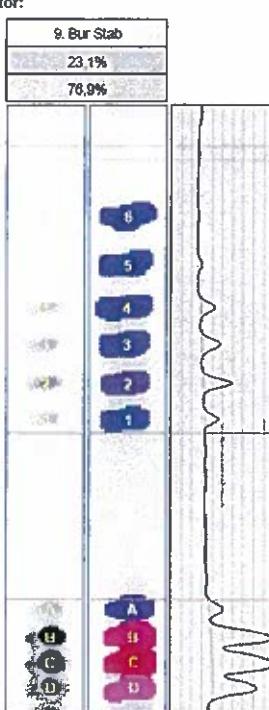
07/07/2010  
12:25

## GASepo Analysis Report



Session: Analysis 100707-5MIN INCR\_3.tif 2010-07-07  
 Image File: 100707-5MIN INCR\_3.tif  
 Operator:

Laboratory: F.M.S.I.- Laboratorio Antidoping Roma  
 Date of Analysis: 07/07/2010  
 11.26



Lane #9: Bur Stab									
Name	Comment	Cent X	Cent Y	Cent Z	Max X	Max Y	Max Z	Volume Abs	Volume nMax
6		29,6	95,2	285,94	32	85	795,89	211307,4	1,2
5		29,1	122,2	1011,80	32	123	4380,65	717411,2	4,1
4		28,7	155,2	3517,49	31	155	14800,21	2546650,0	14,4
3		28,5	183,5	4915,82	30	184	20618,19	3445966,0	19,5
2		29,5	213,4	7193,27	31	214	33810,93	4467018,0	25,2
1		30,3	240,8	3388,90	34	241	18456,39	2182621,0	12,4
A		33,1	386,2	4699,92	33	386	17842,18	2848151,0	16,1
B		33,8	407,5	19993,91	44	408	51344,20	14275650,0	80,6
C		34,1	427,3	23676,82	43	432	50510,68	17710260,0	100,0
D		34,5	448,5	15473,63	41	448	48647,20	10320910,0	58,3

SEIBERSDORF  
LABORATORIES  
1000 VIENNA

8.8.0

### ***II.2.9 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.2.10 Result review**

FEDERAZIONE MEDICO SPORTIVA ITALIANA LABORATORIO ANTIDOPING	FOGLIO DI LAVORO	FL039
VERBALE DI COMUNICAZIONE RISULTATI DI CONFERMA		
Rif. PG001	Pag. 1/1	
CONFERMA PER: MURCERA	Rev. 2	
LOTTO DI ACCETTAZIONE: 10 E 003	CODICE INTERNO: B4433	
DATA: 7/7/10		
VALUTAZIONE/OSSERVAZIONI		
Presenza di mincera		
DOCUMENTAZIONE ALLEGATA		
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	FOGLIO DI LAVORO
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	TRACCIATI DEI CONTROLLI E CAMPIONI (TUTTE LE ALIQUOTE SE QUANTITATIVA)
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	SEQUENZA DI ANALISI STRUMENTALE
<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	CRITERI ISL (TR, RAPPORTI IONI, S/N) (FC009)
<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	FOGLIO DI CALCOLO (ANALISI QUANTITATIVA) (FC _____)
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	COMUNICAZIONE RISULTATI DI CONFERMA iEPO/NESP (FL158)
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	ALTRO _____

(\*) n.a.: non applicabile

RESPONSABILE  
ESECUZIONE PROVA\_\_\_\_\_  
Sigla\_\_\_\_\_  
Firma

## VALUTAZIONE/OSSERVAZIONI DEL DIRETTORE SCIENTIFICO

OK - ottimi risultati dei controlli soddisfatti  
 Inviare i minigolf al laboratorio di Perugia  
 per 2nd opinion

DIRETTORE SCIENTIFICO:

\_\_\_\_\_  
FmB

Sigla

\_\_\_\_\_  
Francesco

Firma

DATA: 7/7/10

## ***II.2.11 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 B4433.



## II.3 Second opinion by AFLD Laboratory (Paris) on the EPO analysis results on sample code 10E003 B4433



agence française de lutte contre le dopage

Département des analyses

110070800141



110070800141

FMSI  
LABORATORIO ANTIDOPING  
Prot. n° 2436 del 08/07/2010

Châtenay-Malabry July 08<sup>th</sup>, 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 10E003B4433 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.4 SDS analysis

### II.4.1 Instrumental conditions for SDS analysis

Operating conditions (for further details please refer to the worksheet FL167):

Focusing:

200 V

120 mA

25 W

time: 55min

First blotting:

40 V

mA adjusted for the gel area

90 W

time: 45 min

Second blotting:

35 V

mA adjusted for the gel area

40 W

time: 10 min

**SDS procedure analysis: original identification of the lanes on the gel (“sequence”)**

- [1] SeeBlue
- [2] Mircera standard (Mir)
- [3] Negative reference sample (Bur)
- [4] 10E003 B4433C (3511158)
- [5] Urinary EPO standard :NIBSC (UEPO)
- [6] Positive reference sample (Usp Mir)
- [7] rhEPO standard (BRP)
- [8] NESP standard
- [9] Urinary EPO standard :NIBSC (UEPO)
- [10] SeeBlue

**II.4.2 Additional evidence**

Worksheet for the SDS-Page procedure

FEDERAZIONE MEDICO SPORTIVA ITALIANA LABORATORIO ANTIDOPING	FOGLIO DI LAVORO	FL 167
SDS PAGE PER LA RICERCA DI ERITROPOIETINA RICOMBINANTE E ANALOGHI		
Rif. MP031 - Allegato	Pag. 1/7	Rev. 0

Data e ora di inizio analisi: 14/06/10 12.10

Lotto di accettazione	Codice campioni preparati	
10E 003	DA: B44B3C	A:
	DA:	A:
	DA:	A:
	DA:	A:
	DA: .	A:

**A- PREPARAZIONE DEL CAMPIONE**

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 <sup>1</sup> [R-172 Lotto 0SS ] e mescolando mediante agitatore elettromagnetico
2 <input checked="" type="checkbox"/>	Prelevare 20 ml di urina <sup>2</sup> (in caso di prelievi inferiori, portare a 20 ml con TRISHCl 50 mM [TRISHCl 50 Lotto 02, ]) e trasferirli in una provetta da 50 ml <u>14/06/10</u>
3 <input checked="" type="checkbox"/>	Aggiungere 400 µl di soluzione Complete (200 µl ogni 10 ml di urina)
4 <input checked="" type="checkbox"/>	Aggiungere 2 ml di TRISHCl 3,75M [TRISHCl 3.75 Lotto 02, ] (1ml ogni 10 ml di urina)
5 <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 risultì nel range, correggerlo con tampone TRISHCl 3,75M [TRISHCl 3.75 Lotto 02, ] <u>14/06/10</u>
6 <input checked="" type="checkbox"/>	Centrifugare per 10 min nella centrifuga refrigerata a 20°C con rotore basculante a 3000 rcf
7 <input checked="" type="checkbox"/>	Applicare alle provette il componente della filtrazione del kit Steriflip, assemblandolo in posizione verticale
8 <input checked="" type="checkbox"/>	Ruotare delicatamente di 180° il Kit assemblato
9 <input checked="" type="checkbox"/>	Collegarlo alla pompa da vuoto per la filtrazione
10 <input checked="" type="checkbox"/>	Trasferire il filtrato nelle provette amicon ultra-15
11 <input checked="" type="checkbox"/>	Centrifugare per 20 min nella centrifuga refrigerata a 20°C con rotore basculante a 3500 rcf
12 <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 02, ] e 400 µl di soluzione Complete (200µl ogni 10 ml di urina)
13 <input checked="" type="checkbox"/>	Centrifugare per 20 min nella centrifuga refrigerata a 20°C con rotore basculante a 3500 rcf
14 <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.
15 <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
16 <input checked="" type="checkbox"/>	Centrifugare a 6200 rpm per 60 min nella centrifuga refrigerata a 17°C con rotore ad angolo fisso
17 <input checked="" type="checkbox"/>	Misurare il volume di ritenuto, trasferirne 20 µl in un pozzetto di una piastra del Quantikine IVD Epo kit
18 <input checked="" type="checkbox"/>	Aggiungere nel pozzetto 80 µl di diluente (fornito nel Quantikine IVD Epo kit)
19 <input checked="" type="checkbox"/>	Mettere ad agitare la piastra con i pozzetti su di un agitatore Delfia Plateshake a circa 600rpm per un'ora o in frigorifero per tutta la notte
20 <input checked="" type="checkbox"/>	Preparare PBS Portare a volume con acqua ultrapura in un matraccio da 1000 ml 5 tavolette di tampone fosfato salino [R-165 Lotto 0B3 <sup>3</sup> ]. Mescolare mediante agitatore elettromagnetico.  Tampone LDS (1x) Mescolare 100 µl di tampone LDS(4x) (R-398) con 40 µl di agente riducente (10x) (R-402) e 260 µl di acqua ultrapura

<sup>1</sup> E' possibile preparare quantità differenti quantità differenti purchè restino invariate le proporzioni.<sup>2</sup> In caso di urina diluita e prelievi maggiori, prelevare le quantità di Complete e di TRISHCl3.75 rispettando i rapporti fra i reattivi.

FEDERAZIONE MEDICO SPORTIVA ITALIANA LABORATORIO ANTIDOPING	FOGLIO DI LAVORO	FL 167
<b>SDS PAGE PER LA RICERCA DI ERITROPOIETINA RICOMBINANTE E ANALOGHI</b>		
Rif. MP031 - Allegato	Pag. 2/7	Rev. 0

21 ✓	Svuotare i pozzetti e lavarli con PBS
22 ✓	Eluire le proteine legate al pozzetto con 30 µl del tampone LDS (1x) lasciando ad agitare su di un agitatore Delfia Plateshake per qualche minuto
23 ✓	Trasferire l'eluato in una provetta eppendorf e posizionarla a scaldare per 5 min a 95°C sotto agitazione (circa 600 rpm)
24 ✓	Immergere la provetta eppendorf nel bagno refrigerante per 30 s
25 ✓	Prelevare gli standard dal congelatore
26 ✓	Aggiungere 2,5 µl di tampone LDS (4x) [R-398 lotto 502] e 1 µl di agente riducente (10x) [R-402 lotto 502] per 10 µl di standard
27 ✓	Posizionarli a scaldare per 5 min a 95°C
28 ✓	Immergere le vials nel bagno refrigerante per 30 sec

**B - CORSA ELETTROFORETICA**

29 ✓	Preparare Il tampone MOPS (1x) Diluire il tampone MOPS running buffer (20x) [R-400 lotto 402], mescolando 50 ml del tampone MOPS (20x) con 950 ml di acqua ultrapura  Catolita Mescolare 200ml del tampone MOPS (1x) con 500 µl di antiossidante [R-401 lotto 502]
30 ✓	Prendere un NuPAGE 10% Bis-Tris gel 1.5mm* 10 well [R404 lotto 402], estrarlo dalla guaina di impacchettamento, eliminare il solvente e lavarlo con acqua ultrapura (maneggiare il tutto tenendolo per il bordo)
31 ✓	Rimuovere la striscia adesiva dal retro del gel cassetta
32 ✓	Rimuovere il copripozzi e con una pasteur lavare i pozzetti con il tampone MOPS (1x), ruotare in un unico movimento il gel cassetta, rimuovendo il tampone
33 ✓	Ripetere tale operazione due volte. Essere sicuri che non ci siano bolle d'aria nei pozzetti
34 ✓	Assemblare la cella, ponendo il gel cassetto con il lato dei pozzetti rivolto verso il Buffer core. Nel caso si faccia correre solo un gel, si ponga il Buffer Dam (pannello divisorio di plastica) per chiudere la camera contenente il Buffer core (catodo) altrimenti si metta al suo posto il secondo gel cassetto
35 ✓	Riempire la camera contenente il Buffer core con il catolita, coprire i pozzetti. Essere sicuri che il livello del catolita non scenda in quanto la cella non è correttamente assemblata
36 ✓	Prelevare i campioni e gli standard e dispensarli nei pozzetti secondo il seguente schema:  SeeBlue Standard di conferma Bur Campione NIBSC (1 o 2) Usp di conferma BRP <sup>3</sup> NESP NIBSC (1 o 2) SeeBlue  Compilare la tabella seguente in base alla sequenza di caricamento:

<sup>3</sup> Lo schema sopra riportato è indicativo, ad eccezione dello standard di conferma e di quello NIBSC, gli altri possono essere cambiati.

FEDERAZIONE MEDICO SPORTIVA ITALIANA LABORATORIO ANTIDOPING	FOGLIO DI LAVORO	FL 167
SDS PAGE PER LA RICERCA DI ERITROPOIETINA RICOMBINANTE E ANALOGHI		
Rif. MP031 - Allegato	Pag.	3/7
	Rev.	0

Posizione	Campione	Volume di ritenuto ( $\mu$ l)
1	SEE BLUE	20
2	HIB	20
3	BUR	20
4	LOEC03B4433C	20
5	NIBSC	20
6	USP MIR	30
7	BRP	20
8	NESO	20
9	NIBSC	20
10	SEE BLUE	20

37 <input type="checkbox"/>	È sufficiente un solo gel cassetto	
	SI <input checked="" type="checkbox"/> (vai al punto 38)	NO <input type="checkbox"/> Complire la tabella seguente in base alla sequenza di caricamento:

Posizione	Campione	Volume di ritenuto ( $\mu$ l)
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		
9		
10		

38 <input checked="" type="checkbox"/>	Riempire l'anodo con il tampone MOPS (1x), chiudere la cella e collegare gli elettrodi all'alimentatore che deve essere spento.												
39 <input checked="" type="checkbox"/>	Chiudere la cella e impostare i seguenti parametri: Potenziale: 200 V Corrente: 120 mA Potenza: 25 W Tempo: 55 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>162</td> <td>120</td> <td>19.8</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>200</td> <td>83</td> <td>17.2</td> <td>55'</td> </tr> </tbody> </table>	Potenziale (V)	Corrente (mA)	Potenza (W)	Tempo (min)	162	120	19.8	0	200	83	17.2	55'
Potenziale (V)	Corrente (mA)	Potenza (W)	Tempo (min)										
162	120	19.8	0										
200	83	17.2	55'										
40 <input checked="" type="checkbox"/>	Tagliare due rettangoli di Durapore e Immobilon P e 16 rettangoli di carta da filtro o simile delle dimensioni di 8 (esatti) x 7 cm												
41 <input checked="" type="checkbox"/>	Preparare il Tampone Twobin aggiungendo a 7,21 g di Glicina [R-164 Lotto 009] 1,51g di Trizmabase [R-167 Lotto 009], 100 ml di Metanolo e portando a volume con acqua ultrapura in un matraccio da 500 ml												

FEDERAZIONE MEDICO SPORTIVA ITALIANA LABORATORIO ANTIDOPING	FOGLIO DI LAVORO	FL 167
SDS PAGE PER LA RICERCA DI ERITROPOIETINA RICOMBINANTE E ANALOGHI		
Rif. MP031 - Allegato	Pag. 4/7	Rev. 0

42.	Dopo 20 min dall'inizio della corsa, preparare tre vaschette delle dimensioni di 25 x 25 x 8h cm contenenti rispettivamente metanolo [R-038 Lotto 5/3], acqua ultrapura e Tampone Twobin
43.	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 Tampone Twobin per almeno 20 minuti e posizionarla sullo Slow mixer
44.	Immergere un rettangolo della Durapore nella vaschetta contenente Tampone Twobin per almeno 20 minuti e posizionarla sullo Slow mixer
45.	A circa 5 min dalla fine della corsa appoggiare ai bordi della vaschetta contenente Tampone Twobin i fogli di carta da filtro in due pacchetti da quattro ciascuno <sup>4</sup> , in modo tale che si imbevano di soluzione per capillarità

## C-PRIMO BLOTTING

46.	Alla fine della corsa rimuovere il gel cassette dalla cella												
47.	Posizionare il gel cassette su di una superficie piana e inserire con attenzione il coltello per il gel fra le due lastre del gel cassette												
48.	Fare forza con il coltello finché non si rompono i legami che tengono unite le due lastre, rimuovere la lastra alla quale non è adeso il gel												
49.	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)												
50.	Tagliare la parte di gel corrispondente ai pozzetti e la parte opposta sporgente												
51.	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												
52.	Sovrapporre quindi un rettangolo di parafilm, facendo pressione con un rullo, per eliminare le bolle d'aria												
53.	Mettendo il coltello sotto il gel staccarlo dalla lastra e capovolgere l'insieme (pacchetto, Immobilon P, Durapore e gel) sulla piastra Trans Blot SD Semidry Transfer Cell												
54.	Sovrapporre rapidamente il secondo pacchetto di carta da filtro												
55.	Sovrapporre quindi un rettangolo di parafilm, facendo pressione con un rullo, per eliminare le bolle d'aria												
56.	Chiudere il supporto e impostare i seguenti parametri: Potenziale: 40 V Corrente: 1,5 mA x Area del gel Potenza: 90 W Durata: 45 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>10</td> <td>84</td> <td>1</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>26</td> <td>84</td> <td>2</td> <td>45</td> </tr> </tbody> </table>	Potenziale (V)	Corrente (mA)	Potenza (W)	Tempo (min)	10	84	1	1	26	84	2	45
Potenziale (V)	Corrente (mA)	Potenza (W)	Tempo (min)										
10	84	1	1										
26	84	2	45										
57.	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 4/89]. Mescolare mediante agitatore elettromagnetico. DTT Portare a volume con PBS in un matraccio da 250 ml 192,8 mg ditioltretilolo [R-182 Lotto 4/89]. Tale soluzione deve essere utilizzata entro trenta minuti dalla preparazione, causa ossidazione.												
58.	Al 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)												

<sup>4</sup> E' consentito variare il numero dei fogli a seconda dello spessore della carta

FEDERAZIONE MEDICO SPORTIVA ITALIANA LABORATORIO ANTIDOPING	FOGLIO DI LAVORO	FL 167
<b>SDS PAGE PER LA RICERCA DI ERITROPOIETINA RICOMBINANTE E ANALOGHI</b>		
Rif. MP031 - Allegato	Pag. 5/7	Rev. 0

59. <input checked="" type="checkbox"/>	Posizionare la vaschetta per 60 minuti in incubatore a 37°C
60. <input checked="" type="checkbox"/>	<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>
61. <input checked="" type="checkbox"/>	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
62. <input checked="" type="checkbox"/>	Posizionare la vaschetta sullo Slow mixer per 60 min
63. <input checked="" type="checkbox"/>	Lavare la IP1 con PBS
64. <input checked="" type="checkbox"/>	Preparare la soluzione Clone AE75A
	Aggiungere 40 µl di anticorpo antiepo [R-173 Lotto 079] a 40 ml di LFM 1%
65. <input checked="" type="checkbox"/>	Mettere in una vaschetta di vetro da 17x 8 cm 40 ml di soluzione Clone AE75A e immergervi la IP1
66. <input checked="" type="checkbox"/>	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)
67. <input checked="" type="checkbox"/>	<p>Preparare le soluzioni PBS</p> <p>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 032]. Agitare con agitatore magnetico.</p> <p>250 ml di gr LFM 5% <input type="checkbox"/> INK:aggiungere 250 µl di Indian ink [R-177 Lotto ] a 250 ml di LFM 5% precedentemente preparato</p>
68. <input checked="" type="checkbox"/>	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
69. <input checked="" type="checkbox"/>	Effettuare tale lavaggio per altre tre volte ponendo la vaschetta sullo Slow mixer per 10 minuti

**D-SECONDO BLOTTING**

70. <input checked="" type="checkbox"/>	Preparare l'acido acetico 0,7% Portare a volume con acqua ultrapura in un matraccio da 500 ml 3,6 ml di acido acetico [R-003 Lotto 02]
71. <input checked="" type="checkbox"/>	Preparare tre vaschette delle dimensioni di 25 x 25 x 8h cm contenenti rispettivamente metanolo, acqua ultrapura e acido acetico 0,7%
72. <input checked="" type="checkbox"/>	Immergere un rettangolo della Immobilon P nella vaschetta contenente metanolo [R-038 Lotto 031] 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
73. <input checked="" type="checkbox"/>	Immergere un rettangolo della Durapore nella vaschetta contenente acido acetico allo 0,7% per almeno 20 minuti
74. <input checked="" type="checkbox"/>	Dieci 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 <sup>4</sup> , in modo tale che si imbevano di soluzione per capillarità
75. <input checked="" type="checkbox"/>	Sulla piastra del Nova Blot posizionare il pacchetto da quattro fogli di carta da filtro

FEDERAZIONE MEDICO SPORTIVA ITALIANA LABORATORIO ANTIDOPING		FOGLIO DI LAVORO	FL 167
SDS PAGE PER LA RICERCA DI ERITROPOIETINA RICOMBINANTE E ANALOGHI			
Rif. MP031 - Allegato	Pag.	6/7	
	Rev.	0	
76 <input checked="" type="checkbox"/>	Lavare la IP1 con PBS e sovrapporla rapidamente al pacchetto		
77 <input checked="" type="checkbox"/>	Sovrapporre rapidamente la Durapore		
78 <input checked="" type="checkbox"/>	Sovrapporre rapidamente la Immobilon P (al termine della corsa nominata IP2)		
79 <input checked="" type="checkbox"/>	Sovrapporre rapidamente il pacchetto da quattro fogli di carta da filtro <sup>4</sup>		
80 <input checked="" type="checkbox"/>	Sovrapporre quindi un rettangolo di parafilm, facendo pressione con un rullo, per eliminare le bolle d'aria		
81 <input checked="" type="checkbox"/>	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)
	6	50	1
	6	50	10
82 <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 83	
	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.		
83 <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)		
84 <input checked="" type="checkbox"/>	Posizionare la vaschetta sullo Slow mixer per 60 min.		
85 <input checked="" type="checkbox"/>	Lavare la IP2 con PBS		
86 <input checked="" type="checkbox"/>	Preparare ANTI IgG Aggiungere: <input checked="" type="checkbox"/> 26 µl di anticorpo segnato con la biotina Pierce [R-175 Lotto cf 3 ] 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%		
87 <input checked="" type="checkbox"/>	Mettere in una vaschetta di vetro da 17x 8 cm (dimensioni interne) 40 ml di soluzione ANTI IgG e immergervi la IP2		
88 <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 farla ad agitare sullo Slow mixer a T ambiente per circa 20 min)		
89 <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 032 ]. Agitare con agitatore magnetico.		
90 <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		
91 <input checked="" type="checkbox"/>	Ripetere tale lavaggio altre due volte		
92 <input checked="" type="checkbox"/>	Effettuare tale lavaggio per altre tre volte ponendo la vaschetta sullo Slow Mixer per 12 minuti		
93 <input checked="" type="checkbox"/>	Si è interrotta l'analisi all'incubazione con l'anticorpo secondario		
	SÌ <input type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/> andare al punto 94	

FEDERAZIONE MEDICO SPORTIVA ITALIANA LABORATORIO ANTIDOPING	FOGLIO DI LAVORO	FL 167
SDS PAGE PER LA RICERCA DI ERITROPOIETINA RICOMBINANTE E ANALOGHI		
Rif. MP031 - Allegato	Pag. 7/7	Rev. 0

	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 34]. Agitare con agitatore magnetico.	
94 <input checked="" type="checkbox"/>	Preparare la soluzione Perossidasi <input checked="" type="checkbox"/> Aggiungere 150 µl di streptavidina perossidasi Pierce [R-174 Lotto 8] 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%	
95 <input checked="" type="checkbox"/>	Lavare la IP2 con PBS	
96 <input checked="" type="checkbox"/>	Mettere in una vaschetta di vetro da 17x 8 cm (dimensioni interne) 40 ml di soluzione Perossidasi e immergervi la IP2	
97 <input checked="" type="checkbox"/>	Posizionare la vaschetta sullo Slow Mixer per almeno un'ora	
98 <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	
99 <input checked="" type="checkbox"/>	Ripetere tale lavaggio per altre due volte	
100 <input checked="" type="checkbox"/>	Effettuare tale lavaggio per altre tre volte ponendo la vaschetta sullo Slow Mixer per 10 minuti	
101 <input checked="" type="checkbox"/>	Preparare <input checked="" type="checkbox"/> subito prima di utilizzarla la soluzione Covalight, mescolando uguali volumi (10 ml + 10 ml) delle due soluzioni West Pico Pierce [R-176 Lotto 2]; <input type="checkbox"/> 10 minuti prima del suo utilizzo la soluzione Covalight, conservandola al buio; aggiungendo 10 gocce di CovB [R-176 B Lotto ] in 10 ml di CovA [R-176 A Lotto ].	
102 <input checked="" type="checkbox"/>	Mettere in una vaschetta di vetro da 17x 8 cm (dimensioni interne) la soluzione Covalight preparata al punto precedente e immergervi la IP2	
103 <input checked="" type="checkbox"/>	Agitare la vaschetta per qualche secondo	

**F – RIVELAZIONE MEDIANTE CHEMILUMINESCENZA**

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

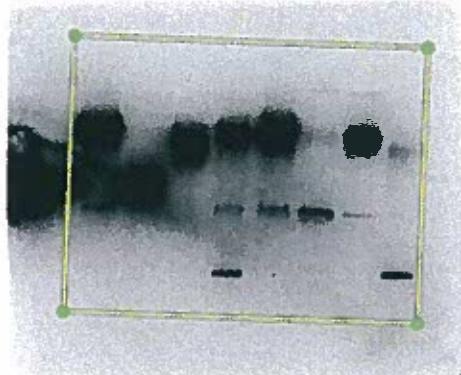
 NOSi sono verificate non conformità durante lo svolgimento della procedura ?  
 SI vedere Rapporto FL053 N° \_\_\_\_\_

Operatore Sigla e Firma	Data	Operazioni eseguite
<i>Ces Sforza</i>	16/6/10	da punto [ ] a punto [ ]
<i>Ces Sforza</i>	16/6/10	da punto [ ] a punto [ ]
<i>Ces Sforza</i>	16/6/10	da punto [ ] a punto [ ]
		da punto [ ] a punto [ ]
		da punto [ ] a punto [ ]
		da punto [ ] a punto [ ]

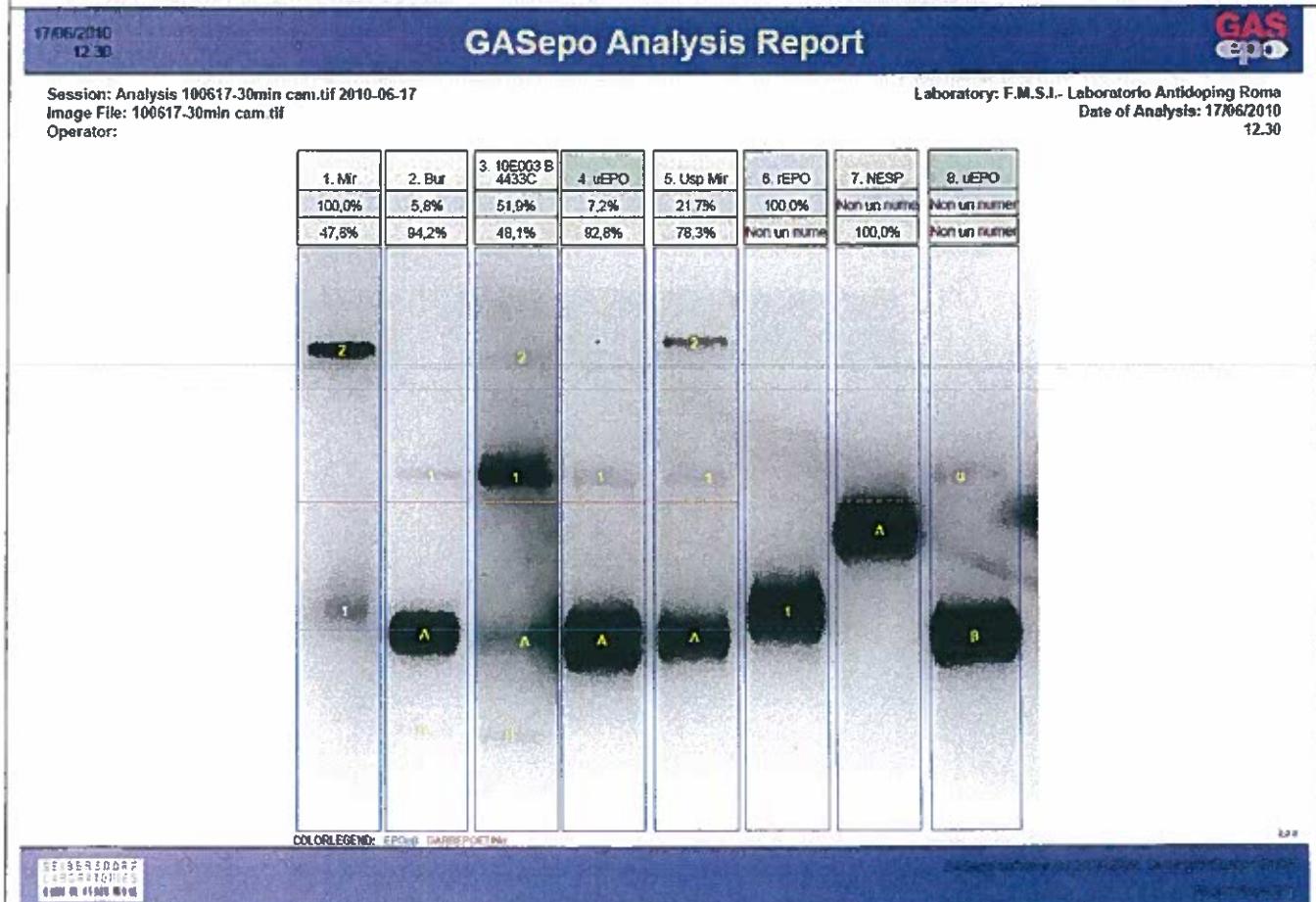
### II.4.3 SDS-Page results

**Gel images and data of positive control standards (BRP, Nesp and Mir), negative control standard (NIBSC), sample internal laboratory code 10E003 B443, positive reference sample (UspMir) and negative reference sample (Bur).**

TOTAL IMAGE OF THE GEL THE RECTANGLE INDICATES THE AREA SELECTED FOR PROCESSING THE DENSITOMETRY DATA



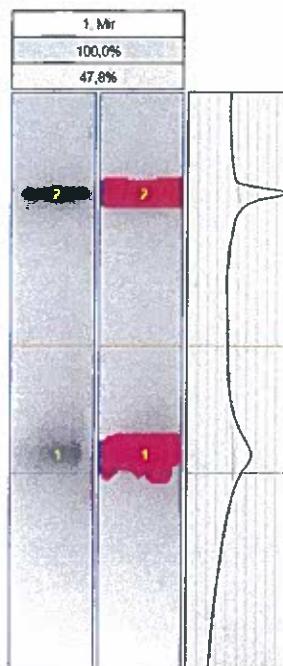
GENERAL VIEW OF ALL THE PROCESSED LANES



## POSITIVE CONTROL: MIR STANDARD

17/06/2010  
12.30

## GASepo Analysis Report

Session: Analysis 100617-30min.cam.tif 2010-06-17  
Image File: 100617-30min.cam.tif  
Operator:Laboratory: F.M.S.I.- Laboratorio Antidoping Roma  
Date of Analysis: 17/06/2010  
12.30

Lane #1: Mir									
Name	Comment	Cent X	Cent Y	Cent Z	Max X	Max Y	Max Z	Volume Abs	Volume nMax
2		20,1	47,1	7653,03	25	40	28637,36	3832629,0	100,0
1		21,4	167,8	5000,26	32	157	10879,88	3595189,0	91,4

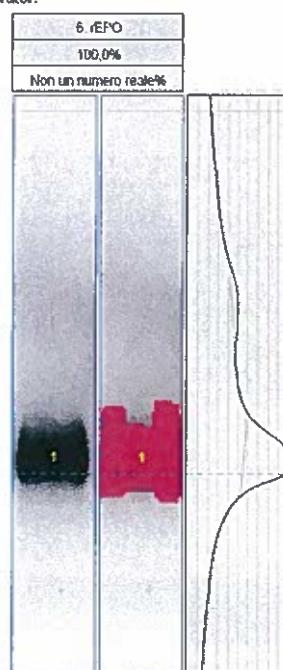
SEIVERSDORF  
LABORATORIES  
GMBH & CO KG

GASepo Analysis Report 2010-06-17 12.30 100617-30min.cam.tif

## POSITIVE CONTROL: BRP STANDARD

17/06/2010  
12.30

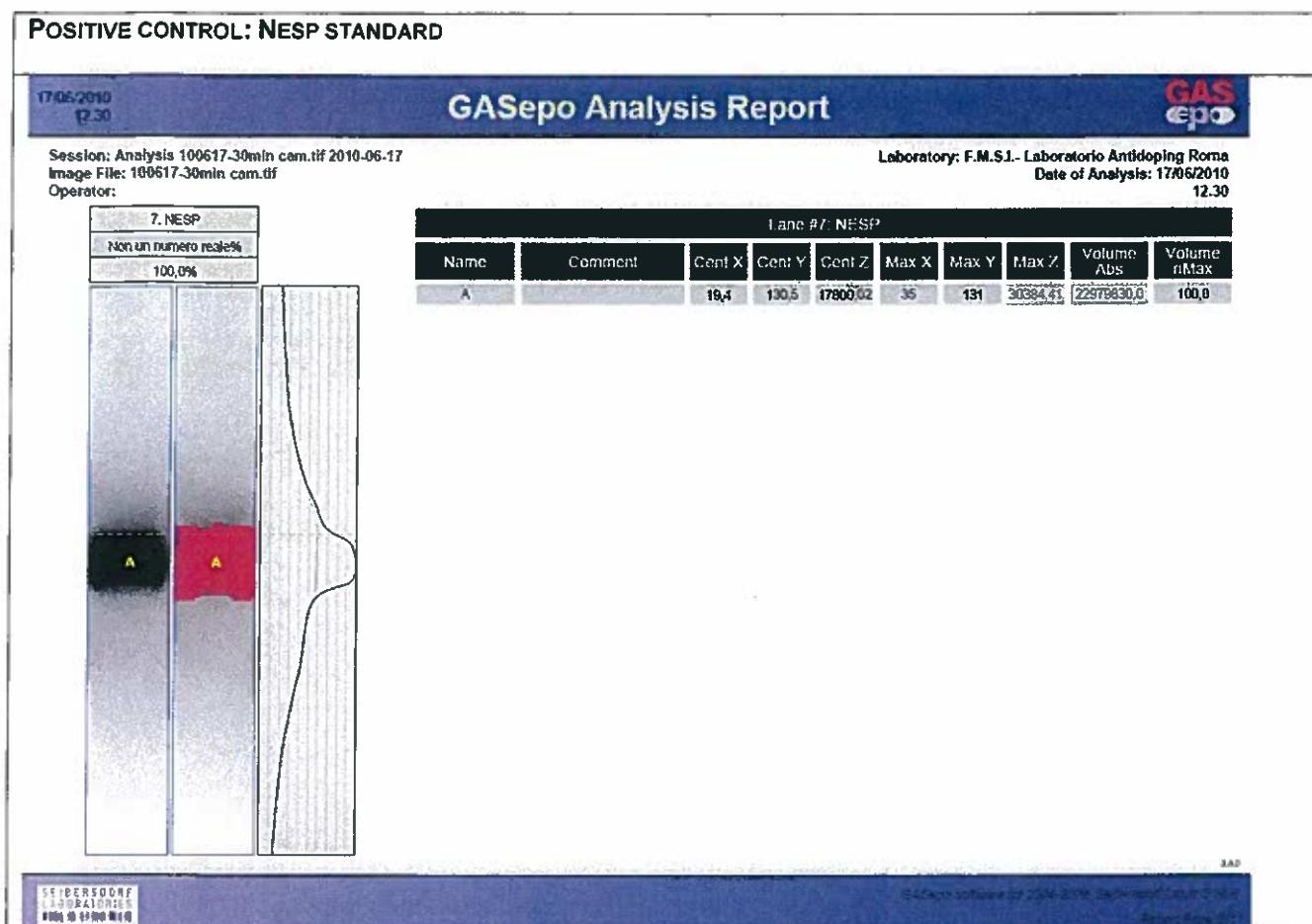
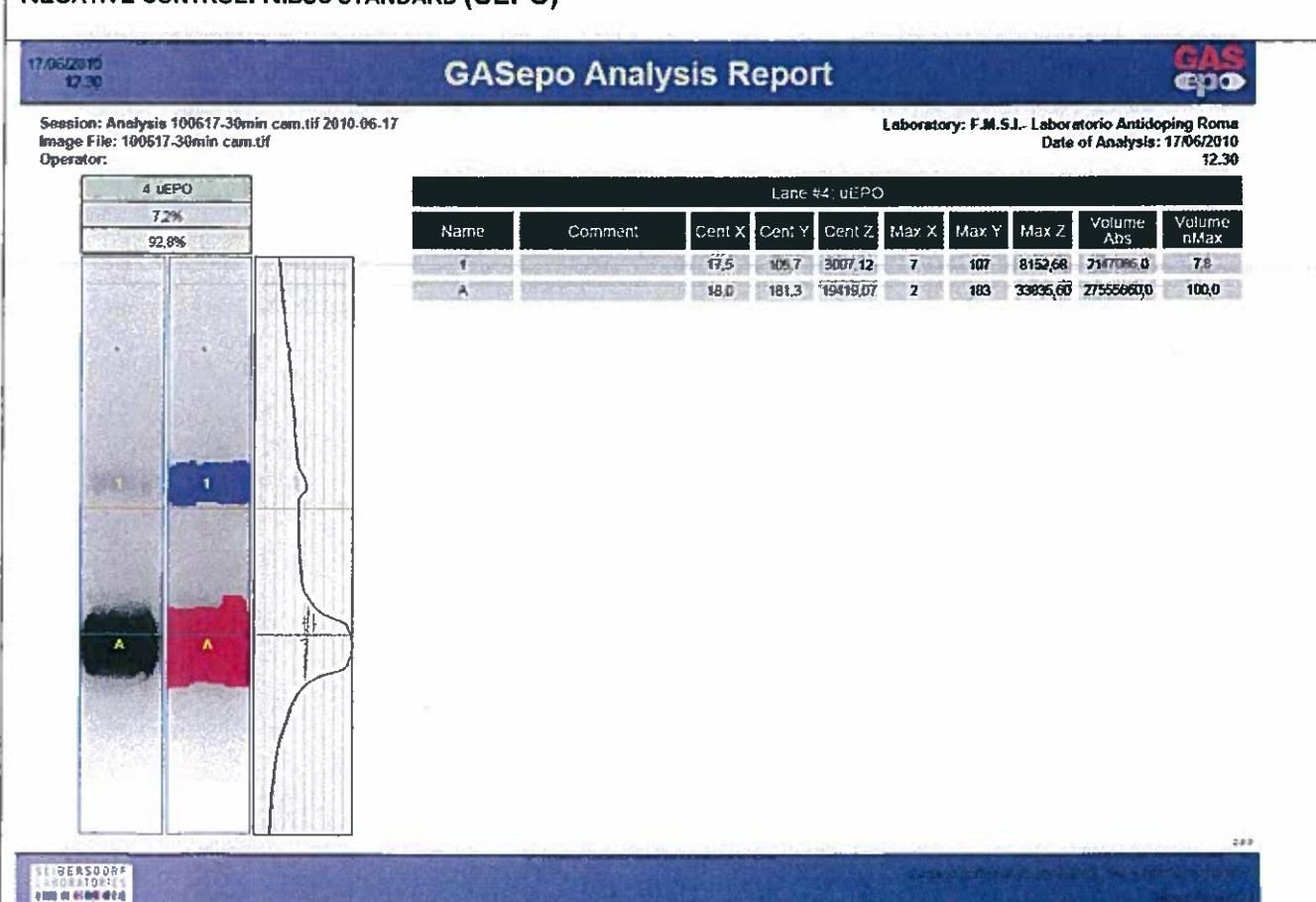
## GASepo Analysis Report

Session: Analysis 100617-30min.cam.tif 2010-06-17  
Image File: 100617-30min.cam.tif  
Operator:Laboratory: F.M.S.I.- Laboratorio Antidoping Roma  
Date of Analysis: 17/06/2010  
12.30

Lane #6: rEPO									
Name	Comment	Cent X	Cent Y	Cent Z	Max X	Max Y	Max Z	Volume Abs	Volume nMax
1		19,1	168,3	15668,92	33	167	34347,02	23581720,0	100,0

SEIVERSDORF  
LABORATORIES  
GMBH & CO KG

GASepo Analysis Report 2010-06-17 12.30 100617-30min.cam.tif

**POSITIVE CONTROL: NESP STANDARD****NEGATIVE CONTROL: NIBSC STANDARD (UEPO)**

**SAMPLE INTERNAL LABORATORY CODE 10E003 B4433**17/06/2010  
12:30**GASepo Analysis Report****GAS  
epo**

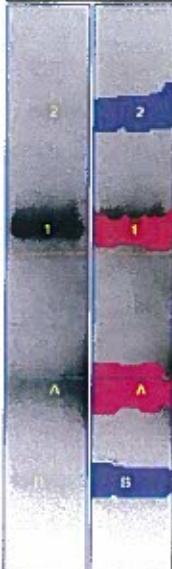
Session: Analysis 100617-30min.cam.tif 2010-06-17  
 Image File: 100617-30min.cam.tif  
 Operator:

Laboratory: F.M.S.I.- Laboratorio Antidoping Roma  
 Date of Analysis: 17/06/2010  
 12:30

3. 10E003 B4433C

51,9%

48,1%



Lane #3: 10E003 B4433C

Name	Comment	Cent X	Cent Y	Cent Z	Max X	Max Y	Max Z	Volume Abs	Volume nMax
2		21,5	80,1	594,34	31	50	2245,31	38800,7	12,8
1		19,1	106,0	5562,41	32	107	12549,85	3042416,0	100,0
A		22,9	181,5	3301,58	37	185	13622,88	2680884,0	88,1
B		16,8	225,2	932,76	13	225	3006,14	496028,1	16,4

17/06/2010  
12:30**GASepo Analysis Report****GAS  
epo**

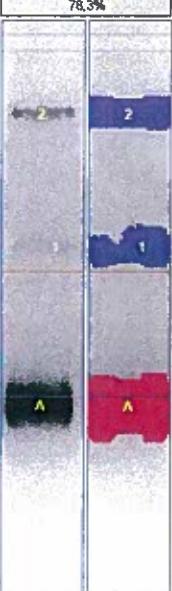
Session: Analysis 100617-30min.cam.tif 2010-06-17  
 Image File: 100617-30min.cam.tif  
 Operator:

Laboratory: F.M.S.I.- Laboratorio Antidoping Roma  
 Date of Analysis: 17/06/2010  
 12:30

5. Usp Mir

21,7%

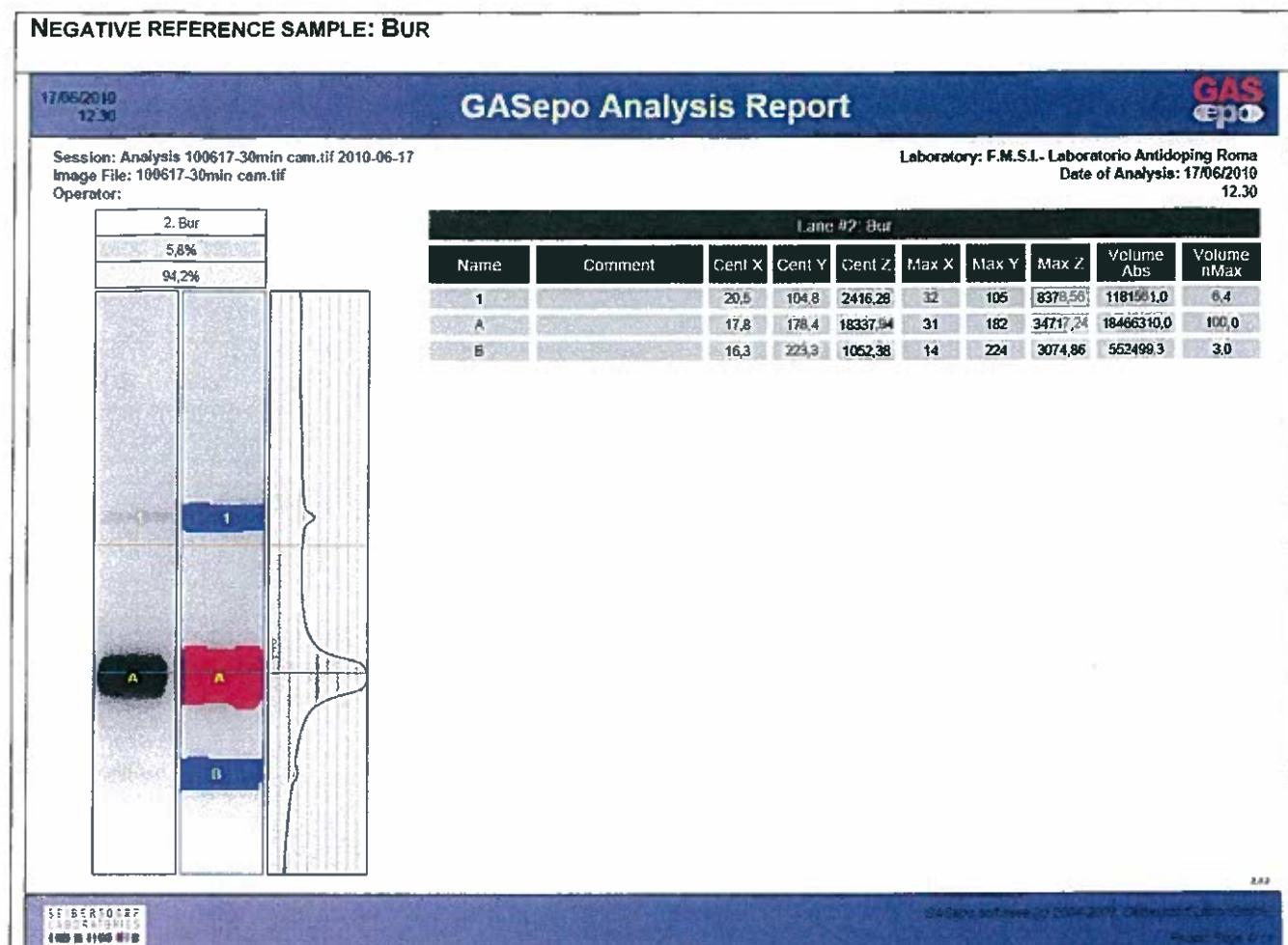
78,3%



Lane #5: Usp Mir

Name	Comment	Cent X	Cent Y	Cent Z	Max X	Max Y	Max Z	Volume Abs	Volume nMax
2		18,2	43,7	5612,49	6	44	23574,92	3194221,0	18,0
1		24,7	105,9	3031,98	31	107	9109,66	1716102,0	9,8
A		18,1	180,3	16318,72	31	181	36126,10	17526310,0	100,0

17/06/2010  
12:30

**NEGATIVE REFERENCE SAMPLE: BUR****Conclusions:**

The additional evidence obtained by the SDS analysis supported the results obtained by IEF.

## 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.

2197/FMB/sbr

Data/Date 08/07/2010

RISERVATA PERSONALE/CONFIDENTIAL

Al To:	I.A.A.F.
Att.ne/Attention:	Dr. G. DOLLE'
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 /REQUESTER:	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:	01/06/2010	DATA/HORA DI ARRIVO CAMPIONI: RECEIPT OF SAMPLES	02/05/10	- 8.20	
INIZIO ANALISI: START OF ANALYSIS	14/06/2010	FINE ANALISI: END OF ANALYSIS	07/07/2010 *		
TIPO DI CAMPIONE/TYPE OF SAMPLE:	URINARURINE	TIPO DI TEST: TYPE OF TEST:	IN COMPETIZIONE CON EPO/NESP/IN COMPETITION WITH EPO/NEP		
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
B4433	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:

Adverse Analytical Finding

Le analisi effettuate sul campione B sopra riportato hanno confermato la presenza di / The complete analysis of the B sample confirmed the presence of

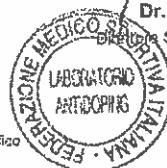
- CONTINUOUS ERYTHROPOIETIN RECEPTOR ACTIVATOR (CERA)

#### NOTE, PARERI ED INTERPRETAZIONI /NOTES, OPINIONS AND INTERPRETATIONS

\* Conferma esterna in accordo con quanto previsto dalla normativa WADA ricevuta in data 08/07/2010 / External confirmation according to the Wada rules received on 08/07/2010

CC: WADA (ADMAS)

Vietata 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



Dr. Francesco Bettar  
Direttore Scientifico/Scientific Director

Page 1/1

## **APPENDIX 6**





FEDERAZIONE MEDICO SPORTIVA ITALIANA

LABORATORIO ANTIDOPING

**SAMPLE CODE: 3511158  
INTERNAL LABORATORY CODE: 10E003 A/B4433**

**SUPPLEMENT TO THE DOCUMENTATION PACKAGE**

**STEROID PROFILE**

Reviewed by:	Xavier de la
Date:	02/11/2010

Approved by:	François J. T.
Date:	Nov 2nd 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**

Summary .....	3
I.1 Steroid profile of the "A" sample (date: 5/05/2010) .....	4
I.2 Steroid profile of the "A" sample (date: 15/06/2010) .....	5
I.3 Steroid profile of the "B" sample (date: 15/06/2010) .....	6



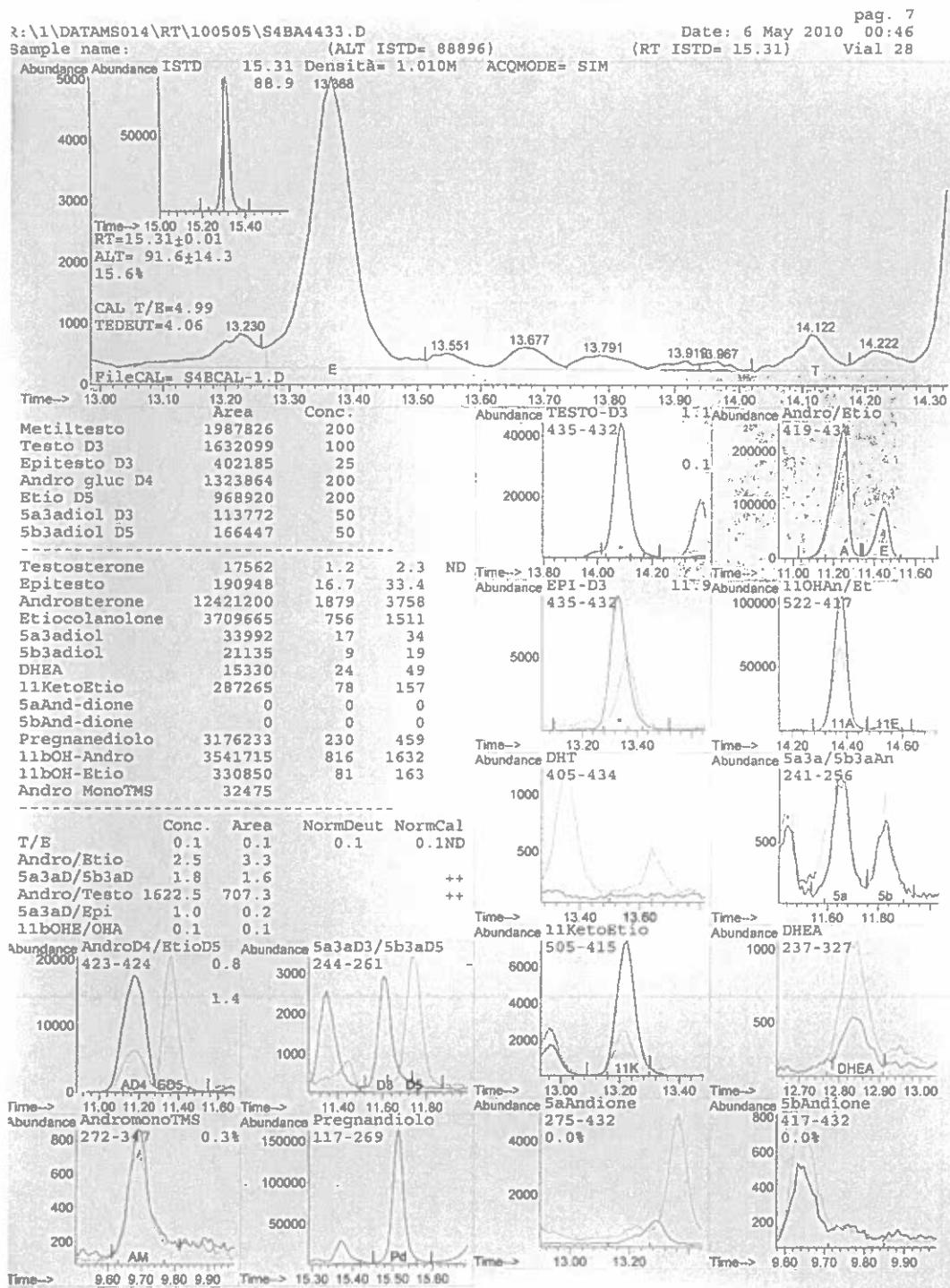
## Summary

On request of the Athlete, and as indicated on the Documentation Package, on the occasion of the "B" analysis of sample code 3511158, the steroid profile of both the "A" and the "B" samples has been performed.

The results presented in this document refer to (1.1) the steroid profile of the "A" sample originally obtained during the initial testing analysis of the "A" sample and to (1.2) and (1.3) the steroid profile of the "A" and the "B" samples obtained during the "B" sample analysis, respectively.

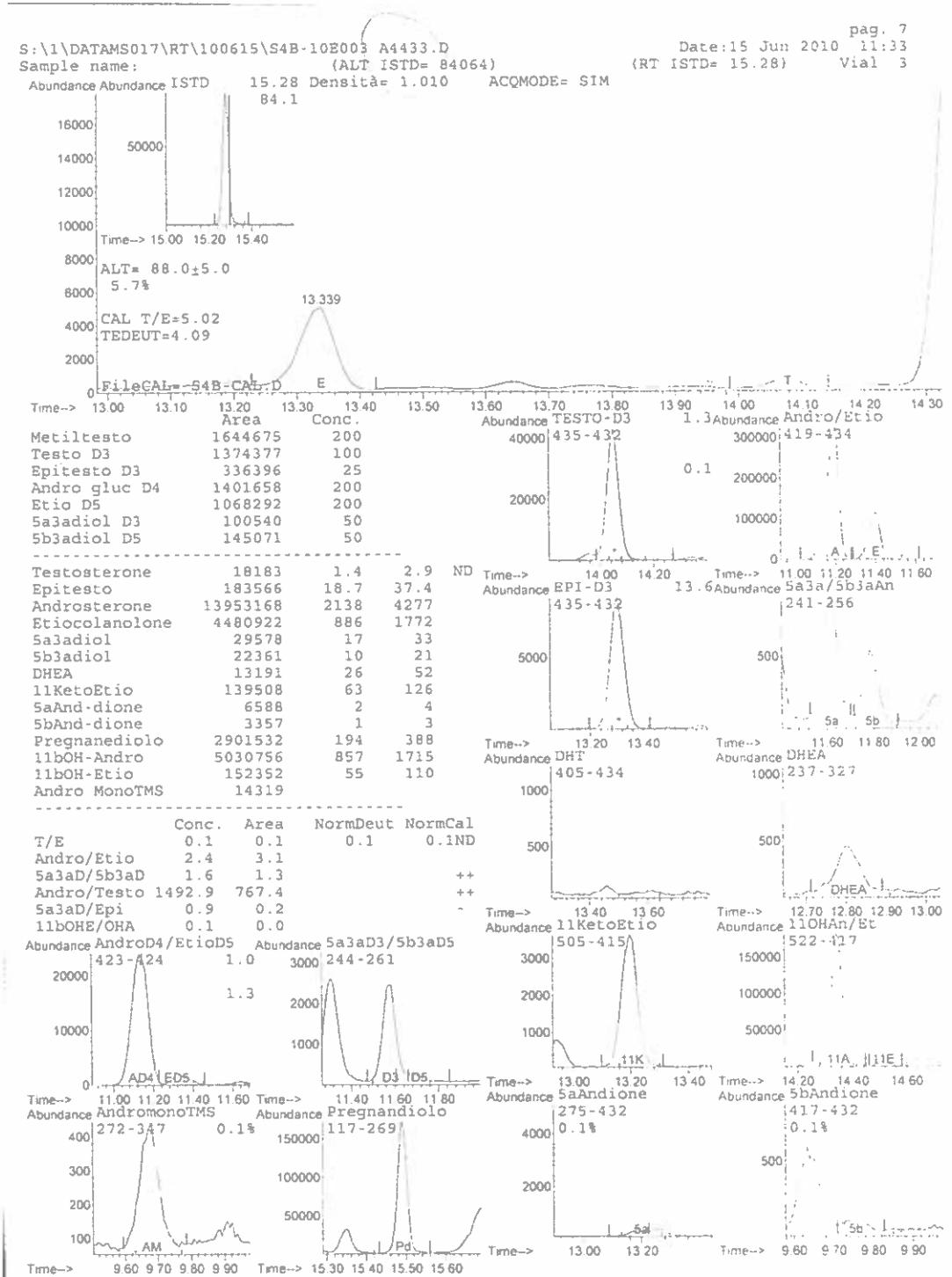


## I.1 Steroid profile of the “A” sample (date: 06/05/2010)





## I.2 Steroid profile of the “A” sample (date: 15/06/2010)





### I.3 Steroid profile of the “B” sample (date: 15/06/2010)

