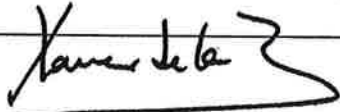


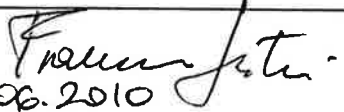
FEDERAZIONE MEDICO SPORTIVA ITALIANA

LABORATORIO ANTIDOPING

SAMPLE CODE: 3511158
INTERNAL LABORATORY CODE: 10E003 A4433

PRESENCE OF
CONTINUOUS ERYTHROPOIETIN RECEPTOR
ACTIVATOR
(CERA)

Reviewed by: 
Date: 10.06.2010

Approved by: 
Date: 10.06.2010

LABORATORIO ANTIDOPING FMSI

LARGO GIULIO ONESTI, 1

00197 ROME, ITALY

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

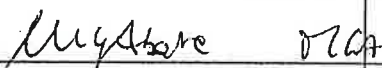
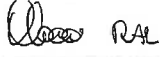

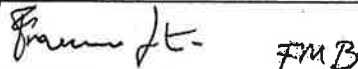
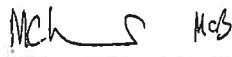


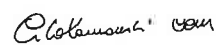
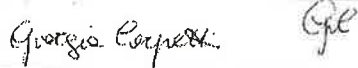


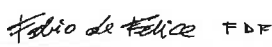
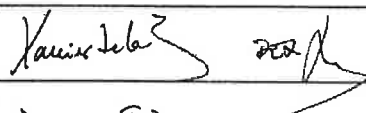
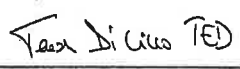
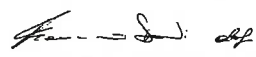
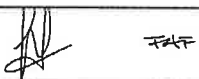
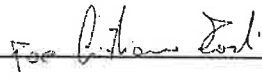
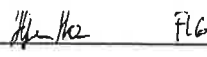


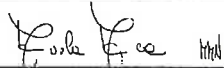

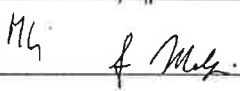
THIS DOCUMENT CONTAINS AUTHENTIC COPIES
OF THE ORIGINAL LABORATORY DOCUMENTATION

TABLE OF CONTENTS

List of Laboratory Staff Involved in the Test	4
Summary of Chain of Custody.....	6
SECTION I: RECEIPT AND HANDLING OF SAMPLES	7
I.1 Documentation of shipping and receipt of intact samples.....	8
I.2 Doping control form	10
I.3 Laboratory sample reception form.....	11
I.4 Documentation Linking Sample Identification Number to Laboratory Identification Number (Laboratory sample registration form).....	12
I.5. Sample chain of custody (Distribution form of aliquots for initial testing procedures)	13
SECTION II: SAMPLE 3511158	
INITIAL TESTING PROCEDURE AND CONFIRMATION RESULTS	14
II.1 Preliminary tests.....	15
II.1.1 Visual inspection.....	15
II.1.2 Preanalysis results	16
II.1.3 Preliminary determinations	17
II.1.4 Preliminary determinations results.....	18
CONTINUOUS ERYTHROPOIETIN RECEPTOR ACTIVATOR (CERA)	
INITIAL TESTING PROCEDURE AND CONFIRMATION RESULTS	19
II.2 Initial testing procedure Test Data.....	20
II.2.1 Initial testing procedure Analysis Test Description	20
II.2.2 Instruments and instrumental conditions	21
II.2.3 Initial testing procedure - Aliquot chain of custody documentation	22
II.2.4 Initial testing procedure Test Results.....	32
II.2.5 Repetition of initial testing procedure – Aliquot chain of custody documentation	35

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

List of Laboratory Staff Involved in the Test

SURNAME NAME	INITIALS	POSITION TITLE	SIGNATURE AND HANDWRITTEN INITIALS	INVOLVED
ABATE MARIA GABRIELLA	MGA	ROUTINE DATA MANAGER SENIOR ANALYST	 MGA	X
ALOCCI ROBERTO	RAL	QUALITY CONTROL MANAGER ANALYST	 RAL	
BARBERINI STEFANO	SBR	TECHNICAL SECRETARIAT	 SBR	X
BOTRÈ FRANCESCO	FMB	SCIENTIFIC DIRECTOR HEAD OF LABORATORY	 FMB	X
BRAGANÒ MARIACRISTINA	MCB	SENIOR ANALYST	 MCB	
CIACCIavicca PIETRO	PCC	ANALYST	 PCC	
CIANCIULLI ALESSANDRO	ACI	ANALYST	 ACI	
COLAMONICI CRISTIANA	CCM	SENIOR ANALYST	 CCM	
CORPETTI GIORGIA	GIC	SENIOR ANALYST	 GIC	X
CURCIO DAVIDE	CUR	SENIOR ANALYST	 CUR	
DE ANGELIS FRANCESCA	FDA	ANALYST	 FDA	X
DE FELICE FABIO	FDF	TECHNICAL SECRETARIAT	 FDF	
DE LA TORRE XAVIER	DEX	DEPUTY SCIENTIFIC DIRECTOR TECHNICAL DIRECTOR	 DEX	X
DI CICCÒ TERESA	TED	ANALYST	 TED	
DONATI FRANCESCO	DOF	SENIOR ANALYST	 DOF	
FOLCHITTO FABRIZIA	FAF	SCIENTIFIC SECRETARIAT MANAGER	 FAF	
FOSCHI CRISTIANO	FOC	TECHNICAL SECRETARIAT	 FOC	
GARRIBBA FLAMINIA	FLG	SENIOR ANALYST	 FLG	
JARDINES DANIEL	DAG	SENIOR ANALYST	 DAG	
LONGO DONATELLA	DLO	SENIOR ANALYST	 DLO	
MANCA MANUELA	MMN	TECHNICAL SECRETARIAT	 MMN	
MAZZARINO MONICA	MMZ	SENIOR ANALYST	 MMZ	
MOLAIONI FRANCESCO	MLJ	SENIOR ANALYST	 MLJ	X

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

Summary of Chain of Custody

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


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

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

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

**SECTION I:
RECEIPT AND HANDLING OF SAMPLES**

I.1 Documentation of shipping and receipt of intact samples



CHAIN OF CUSTODY FORM

IAAF
TESTING AGENCY

FMSI
SAMPLE COLLECTION AGENCY

1. DOPING CONTROL STATION

DOJ NAME: MARA CARTANIGA MASSILLIANO SGRDI OUT OF COUNTRY IN COUNTRY

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

DATE OF SAMPLE: 12 / 01 / 05 TIME: 13:05

2. SAMPLE I.D.

I.D. NO.	UPL		DOWN		HIGH / HIGH THRU OPEN		
	DO	MS	DO	MS	DO	MS	DO
<u>3511158</u>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

3. CHANGE OF STORAGE

STORAGE LOCATION #1: CAMPIONE SPANIVI P. DONDOLI Sesto S. Giovanni

DATE: 01 / 05 / 20 TIME: 13:08

STORAGE CONDITIONS: ROOM TEMPERATURE COOL OTHER

DOJ SIGNATURE: [Signature]

STORAGE LOCATION #2: [Blank]

DATE: [Blank] / [Blank] / [Blank] TIME: [Blank]

STORAGE CONDITIONS: ROOM TEMPERATURE COOL OTHER

STORAGE LOCATION #3: [Blank]

DATE: [Blank] / [Blank] / [Blank] TIME: [Blank]

STORAGE CONDITIONS: ROOM TEMPERATURE COOL OTHER

STORAGE LOCATION #4: [Blank]

DATE: [Blank] / [Blank] / [Blank] TIME: [Blank]

STORAGE CONDITIONS: ROOM TEMPERATURE COOL OTHER

4. TRANSFER TO LABORATORY

THE ORIGINAL STORAGE LOCATION: 19:08 DATE: 01 / 05 / 20 / 10

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

NAME: MASSILLIANO SGRDI SIGNATURE: [Signature] NAME OF THE LABORATORY: ACQUACROSA ROMA

TRANSPORT BY COURIER COURIER NAME: ALBERTO DI GIACI RESPONSIBLE: NT-84322796-2

OTHER BY AIR MAIL? COMMENTS: N.C.

5. RECEIPT BY LABORATORY


NAME OF THE LABORATORY: MOVATION

LOCATION OF THE LABORATORY: LABORATORIO

DATE OF RECEIPT: 01 / 05 / 20 TIME: 08:20

LABORATORY SIGNATURE: [Signature]

PLEASE SEND THIS FORM IMMEDIATELY TO THE IAAF BY FAX +377 83 80 83 05

Completatore SGR SI TESSIERO		Filiale partenza		Filiale arrivo		Data spedizione 01/09/78		Ora 13 08		BOLLA DI CONFERMA				
Mittente: LABORATORIO ANTIDOPING						Destinatario: LABORATORIO ANTIDOPING						Crociare se FERMO DEPOSITO <input type="checkbox"/> ed indicare telefono destinatario		
Via 01013 00134						Tel.		Via 01013 00134				Tel.		
Città 01013						Cip 100		Città Roma				Cip 00134		
Kil. miscelazione 500 ml		Contenuto STRUMENTI PERIMENTI				N. zoll 1		Segnaletti FAAT		P. lordo kg 7		Volume SALETTI POCO <input type="checkbox"/> GRANDI <input type="checkbox"/>		
Prezzi		Costo		Vale		Premio ass.		Inoltri		For. improprie		Alq. IVA - Bolo		
Controllo dog.		Controllo dog.		Controllo dog.		Controllo dog.		Controllo dog.		Controllo dog.		Controllo dog.		
<input type="checkbox"/> CROCIARE SE EFFETTUATO ATTRAVERSO DOMICILIO			<input type="checkbox"/> ESIGERE ABBONAMENTO			<input type="checkbox"/> FATTURAZIONE FINE MISE			<input type="checkbox"/> CROCIARE SE ATRACCO IN		<input type="checkbox"/> CROCIARE SE A/RUBICA		 TNT <small>TNT Global Express S.p.A. Spett.le del recapito</small> <small>Capitale Sociale: Lit. 1.000.000.000</small> <small>Sede Legale: Corso Venezia 13 - 00187 ROMA (RM) (Italia)</small> <small>Reg. Imp. e Imp. Sost. (127/74) 21 - Partita IVA 0271000121</small> <small>ITALIA 541219 - Direzione Provinciale di Roma (RM)</small>	
NUMERO LETTERA DI VETTURA NT 81322796-2														
Firma mittente (per esame al sopralluogo condurre general pi non)						Per recupero contrassegno ciò anticipata (mondo posta allegato)								
						Timbro e firma ricevuta posta ricevuta								

B - COPIA PER DESTINATARIO

1.2 Doping control form

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



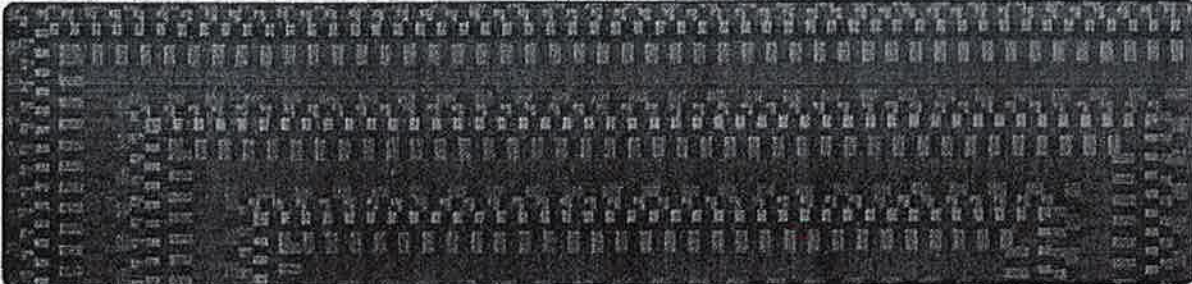
DOPING CONTROL FORM FORMULAIRE DE CONTROLE ANTIDOPAGE

IAAF FMSI

1. ATHLETE INFORMATION • RENSEIGNEMENTS SUR L'ATHLETE

Alab33

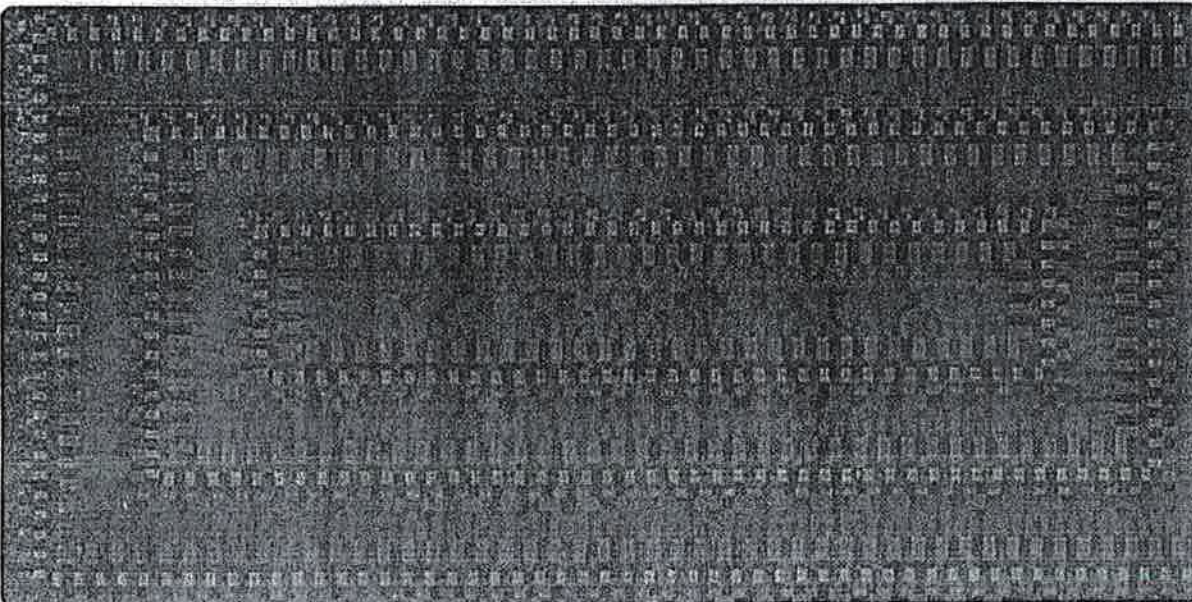
TESTING LOCATION • LIEU DU TEST



2. INFORMATION FOR ANALYSIS • INFORMATIONS POUR L'ANALYSE

IAAF ATHLETICS 3511158 10:42 129 1.025 17:43

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



I.3 Laboratory sample reception form

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

Rif. PG001

DATA DI RICEVIMENTO: 02 05 10	ORA: 8.20	
N° BORSE DI TRASPORTO RICEVUTE: 1		
RICEVUTE TRAMITE :		
<input type="checkbox"/> MEDICO SPORTIVO	COGNOME E NOME	FIRMA
<input checked="" type="checkbox"/> CORRIBERE	IDENTIFICATIVO TNT	N° VETTURA 81322746-2
<input type="checkbox"/> POSTA	IDENTIFICATIVO	N° VETTURA
<input type="checkbox"/> ALTRO	IDENTIFICATIVO /COGNOME E NOME	N° VETTURA /FIRMA
N° CATENA DI CUSTODIA: LA AF 003/2010		
OSSERVAZIONI:		
LA CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI AVVIENE SECONDO QUANTO SPECIFICATO NELLE PG001/PG018		
SIGLA E FIRMA DEL PERSONALE CHE HA EFFETTUATO LA RICEZIONE:		
ML - fM		

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

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

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

RIF. FL046 1008

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

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

1.5. Sample chain of custody (Distribution form of aliquots for initial testing procedures)

FEDERAZIONE MEDICO-SPORTIVA ITALIANA LABORATORIO ANTIDOPING		FOGLIO DI LAVORO		ELT101	
VERBALE DI ASSEGNAZIONE ALIQUOTE - Routine					
			Pag. <u> 1 </u> REV. <u> 10 </u>		

RFI-PG001

Richiesta di distribuzione (data, sigla e firma del richiedente): _____

_____ tecnico

[Handwritten signature]

LOTTO DI ACCETTAZIONE: 10E003

CODICE INTERNO	SEX	0		1		Iva		NB () XI (X) XII		VI	XII	IX	EPO	OSSERVAZIONI	
		ml	ml	ml	ml	ml	ml	ml	ml	ml	ml	ml	ml		
		0,5	200,5		2		2	1	3	50	20				
A4433	M	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	5	
A4433	M	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	5	
OPERATORE (sigla)	Data	Aliquote DA		A		Verif. ID	Ubic. Aliquote	Ubc. "A" RES.		Osservazioni				Aliquotazione	
OS	25/10	AUC29		AUC54		OK	F016	F019		selepp				Man. <input checked="" type="checkbox"/> Gilson <input type="checkbox"/> (SA_____)	
REN	15/10	"		"		OK	F016	F019						Man. <input type="checkbox"/> Gilson <input checked="" type="checkbox"/> (SA002)	
														Man. <input type="checkbox"/> Gilson <input type="checkbox"/> (SA_____)	
														Man. <input type="checkbox"/> Gilson <input type="checkbox"/> (SA_____)	
														Man. <input type="checkbox"/> Gilson <input type="checkbox"/> (SA_____)	

NORINA
USELLA

SECTION II:
SAMPLE 3511158
INITIAL TESTING PROCEDURE AND
CONFIRMATION RESULTS

II.1 Preliminary tests

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

II.1.1 Visual inspection

COLOUR: VISUAL TEST, ACCORDING TO THIS TABLE:

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

SEDIMENT: VISUAL TEST, ACCORDING TO THIS TABLE:

- 0 ABSENT
- + POOR
- ++ ABUNDANT

VOLUME: COMPARISON AGAINST A CALIBRATED BOTTLE

II.1.2 Preanalysis results

FEDERAZIONE MEDICO SPORTIVA ITALIANA LABORATORIO ANTIDOPING	FOGLIO DI LAVORO	FL100
COMUNICAZIONE RISULTATI ESAMI PRELIMINARI		
RIG. PG001		Pag. 1/1 REV. 1
LOTTO DI ACCETTAZIONE N°		<u>10E003</u>
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
[REDACTED]				[REDACTED]
A4433	560	5	0	[REDACTED]
[REDACTED]				[REDACTED]
--				
--				
--				
--				
--				
--				
--				
--				
--				
--				
--				
--				
--				
--				
--				
--				
--				
--				

I CAMPIONI SONO STATI COLLOCATI NEL FRIGO N°: FR019

SONO STATI RISCONTRATI PNC? SI SI - VEDERE RAPPORTO FL002 RIF. PNC N° _____

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

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

II.1.3 Preliminary determinations

pH	Colorimetric determination
Specific gravity	Electronic densimeter

II.1.4 Preliminary determinations results

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

Lotto di accettazione : 10E003

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

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

<input type="checkbox"/> pH (cartina)	Range cartina utilizzata:	6,0-10,0
Cod: R140-019		

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

Responsabile
esecuzione misure pH



Sigla



Firma

05/05/10

Data

Responsabile
esecuzione misure S.G.



Sigla



Firma

05/05/10

Data

**CONTINUOUS ERYTHROPOIETIN RECEPTOR
ACTIVATOR
(CERA)**

**INITIAL TESTING PROCEDURE AND
CONFIRMATION RESULTS**

II.2 Initial testing procedure Test Data

II.2.1 Initial testing procedure Analysis Test Description

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

A brief description of the method is given below:

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

II.2.2 Instruments and instrumental conditions

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

EF 002/003

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

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

Prefocusing:

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

Focusing:

2000 V
25 mA
25 W
4000 Wh

First blotting:

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

Second blotting:

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

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

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

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

Worksheet for the initial testing procedure

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

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

Lotto di accettazione	Codice campioni preparati
10E003	DA: A 4633

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

1 <input checked="" type="checkbox"/>	Pesare 14,71 g di urea [R-181 Lotto 012], 1,75 g di saccarosio [R-306 Lotto 001] e trasferirli in un pallone di reazione da 100 ml posto su un agitatore elettromagnetico
2 <input checked="" type="checkbox"/>	Aggiungere 14,17 ml di acqua ultrapura e 1,89 ml di anfolita 2-4 [R-168 Lotto 001], 1,89 ml di anfolita 4-6 [R-169 Lotto 001] e 4,74 ml di soluzione di bisacrilamide 40% [R-184 Lotto 002]
3 <input checked="" type="checkbox"/>	Tappare il pallone e collegarlo ad una pompa da vuoto per 15 min.
4 <input checked="" type="checkbox"/>	Nel frattempo (durante i 15 minuti): <ol style="list-style-type: none"> detergere le lastre con etanolo assoluto [R-033 Lotto 008] far aderire il Gelbond alla lastra di supporto ponendovi l'opportuna quantità di acqua ultrapura 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 sovrapporre la seconda lastra bloccare le lastre con le apposite pinze
5 <input checked="" type="checkbox"/>	Preparare l'APS sciogliendo in una vial di plastica da 1,5 ml con tappo 100 mg di persolfato d'ammonio [R-179 lotto 002] in 1 ml di acqua ultrapura e agitando manualmente
6 <input checked="" type="checkbox"/>	Aggiungere 31 µl di TEMED [R-180 Lotto 003] e 310 µl di APS nel pallone
7 <input checked="" type="checkbox"/>	Lasciare 30 s in agitazione
8 <input checked="" type="checkbox"/>	Prelevare la soluzione di gel mediante pipetta e trasferirla rapidamente fra le due lastre, avendo cura di non generare bolle d'aria
9 <input checked="" type="checkbox"/>	Lasciare il gel per almeno tre ore nella camera umida

B - PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

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

10/1 <input checked="" type="checkbox"/>	Condizionare il campione a temperatura ambiente e preparare la soluzione Complete portando a volume con acqua ultrapura in un matraccio da 10 ml 5 tavolette di Complete ¹ [R-172 Lotto 158] e mescolando mediante agitatore elettromagnetico
11/1 <input checked="" type="checkbox"/>	Prelevare 20 ml di urina ² (in caso di prelievi inferiori, portare a 20 ml con TRISHCl 50 mM [TRISHCl 50 Lotto 001]) e trasferirli in una provetta da 50 ml - CAS 4/5/10
12/1 <input checked="" type="checkbox"/>	Aggiungere 400 µl di soluzione Complete (200 µl ogni 10 ml di urina)
13/1 <input checked="" type="checkbox"/>	Aggiungere 2 ml di TRISHCl 3,75M [TRISHCl 3.75 Lotto 022] (1ml ogni 10 ml di urina)
14/1 <input checked="" type="checkbox"/>	Controllare il pH con delle strips indicatrici in modo che sia compreso fra 6,8 e 7,9; in caso non risulti nel range, correggerlo con tampone TRISHCl 3,75M [TRISHCl 3.75 Lotto 001] - CAS 4/5/10
15/1 <input checked="" type="checkbox"/>	Centrifugare per 10 min nella centrifuga refrigerata a 20°C con rotore basculante a 3000 rcf

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

² 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"/>	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 <i>6C</i>] e 400 µl di soluzione Complete (200µl ogni 10 ml di urina)
22/I <input checked="" type="checkbox"/>	Centrifugare per 20 min nella centrifuga refrigerata a 20°C con rotore basculante a 3500 rcf
23/I <input checked="" type="checkbox"/>	Nel frattempo lavare le Amicon ultra-4 con 2 ml di acqua ultrapura ponendole a centrifugare a 5000 rpm per 20 min nella centrifuga refrigerata a 17°C con rotore ad angolo fisso.
24/I <input checked="" type="checkbox"/>	Prelevare con una micropipetta dalla parte superiore della Amicon ultra-15 il residuo (circa 120µl) e trasferirlo nelle Amicon ultra-4 precedentemente lavate (anche se si usa il FL162)
25/I <input checked="" type="checkbox"/>	Centrifugare a 6200 rpm per 60 min nella centrifuga refrigerata a 17°C con rotore ad angolo fisso
26/I <input checked="" type="checkbox"/>	Miscelare il volume di ritentato, trasferirlo in una vial di raccolta e conservare in frigorifero (nel caso si intenda utilizzare oltre le 24 h, conservare in congelatore a -20°C)

II (PER TEST DI STABILITÀ)

10/II <input type="checkbox"/>	Centrifugare 0.6 ml di urina per 10 min a 20°C con rotore basculante a 2700 rcf
11/II <input type="checkbox"/>	Mettere 0.5 ml di sovranatante in una provetta Microcon
12/II <input type="checkbox"/>	Aggiungere 20 µl di Pepstatina A e 5 µl di soluzione Complete
13/II <input type="checkbox"/>	Centrifugare a 6200 rpm per 20 min nella centrifuga refrigerata a 17°C con rotore ad angolo fisso, concentrando fino ad un volume approssimativo di 30 µl
14/II <input type="checkbox"/>	Aggiungere 200 µl di tampone acetato 50 mM nel restante campione e mescolare con vortex prima di capovolgerlo
15/II <input type="checkbox"/>	Capovolgere la Microcon e centrifugare a 3000 rpm per 10 min nella centrifuga refrigerata a 17°C con rotore ad angolo fisso
16/II <input type="checkbox"/>	Portare il volume del campione recuperato fino a 0,5 ml con tampone acetato 50 mM
17/II <input type="checkbox"/>	Aggiungere 20 µl di Pepstatina A e 5 µl di soluzione Complete
18/II <input type="checkbox"/>	Incubare per 15 ± 2 min a T ambiente
19/II <input type="checkbox"/>	Aggiungere una miscela di BRP e NESP in modo da ottenere una concentrazione pari a 1.5 volte la concentrazione usata per gli standard di riferimento
20/II <input type="checkbox"/>	Incubare tutta la notte a 37°C
21/II <input type="checkbox"/>	Prendere 20 µl e riscaldarli a 80°C per 3 min
22/II <input type="checkbox"/>	Andare al punto 27 e seguire il procedimento (esclusi i punti 28 e 37)

**C - FOCALIZZAZIONE ISOELETTICA
PREFOCALIZZAZIONE**

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

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

32, <input checked="" type="checkbox"/>	Preparare la soluzione catodica aggiungendo a 1,9 ml di acqua ultrapura 100 µl di soluzione di anfoliti 6-8 [R-170 Lotto <i>007</i>] e 10 µl di RMET ³ [Lotto <i>007</i>]												
33, <input checked="" type="checkbox"/>	Posizionare sui lati più lunghi le strips imbevute rispettivamente della soluzione catodica ed anodica												
34, <input checked="" type="checkbox"/>	<p>Chiudere il supporto e impostare i seguenti parametri:</p> <p>Potenziale: 250 V Corrente: 17 mA (proporzionale alle dimensioni del Gel) Potenza: 17 W Durata: 30 min/ 60min</p> <p>O nel caso la lunghezza del gel sia pari a 25 cm:</p> <p>Potenziale: 250 V Corrente: 25 mA Potenza: 25 W Durata: 30 min/ 60min</p> <p>Completare la seguente tabella con i parametri di inizio e fine corsa:</p> <table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <thead> <tr> <th>Potenziale (V)</th> <th>Corrente (mA)</th> <th>Potenza (W)</th> <th>Tempo (min)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><i>189</i></td> <td><i>25</i></td> <td><i>5</i></td> <td><i>0'</i></td> </tr> <tr> <td><i>250</i></td> <td><i>17,8</i></td> <td><i>4</i></td> <td><i>33'</i></td> </tr> </tbody> </table>	Potenziale (V)	Corrente (mA)	Potenza (W)	Tempo (min)	<i>189</i>	<i>25</i>	<i>5</i>	<i>0'</i>	<i>250</i>	<i>17,8</i>	<i>4</i>	<i>33'</i>
Potenziale (V)	Corrente (mA)	Potenza (W)	Tempo (min)										
<i>189</i>	<i>25</i>	<i>5</i>	<i>0'</i>										
<i>250</i>	<i>17,8</i>	<i>4</i>	<i>33'</i>										
35, <input checked="" type="checkbox"/>	Prelevare gli standard dal congelatore												
36, <input checked="" type="checkbox"/>	<p>Preparare gli standard:</p> <p>MISCELA BRP NESP 1-2 (BRNE1-2) Aggiungere 0,32 – 0,16 ng³ di BRP [BRP Lotto <i>015</i>] a 0,2 – 0,15 ng³ di NESP [NESP Lotto <i>013</i>]</p> <p>MISCELA BRP NIBSC (BRNIB) Aggiungere 0,16 ng³ di BRP [BRP Lotto] a 0,0025 ng³ di NIBSC [NIBSC Lotto]</p> <p>MISCELA NESP NIBSC (NENIB) Aggiungere 0,15 ng³ di NESP [NESP Lotto] a 0,0025³ ng di NIBSC [NIBSC Lotto]</p> <p>SOLUZIONE NIBSC 0,02UI - 0,04UI (NIBSC1-2) Prelevare dalla soluzione standard [NIBSC Lotto <i>011</i>] 10-20 µl, in modo tale da ottenere una soluzione da 0,02-0,04 UI</p> <p>SOLUZIONE MIRCERA (MIR) Prelevare 20 µl dalla soluzione standard di Mircera [MIR Lotto <i>005</i>]</p> <p>SOLUZIONE Dynepo (Dyn) Prelevare 20 µl dalla soluzione standard di Dynepo [Dyn Lotto]</p>												
37a, <input type="checkbox"/>	Scaldare i campioni a 87 °C per 6 min												
37b, <input checked="" type="checkbox"/>	aggiungere quantità sufficiente di urea poco a poco fino a saturazione <i>andare a punto 39</i>												
38, <input type="checkbox"/>	Immergere i campioni precedentemente scaldati, nel bagno refrigerante per 30 s												
39, <input checked="" type="checkbox"/>	<p>Aggiungere: -ai campioni il 10% di Surfacts-amps 80 (Tween 80) [R-166 Lotto <i>011</i>] per volume di ritentato</p> <p>-agli standard (eccetto Mircera) aggiungere 2,2 µl di Surfacts-amps 80 (Tween 80) [R-166 Lotto <i>011</i>] ogni 20 µl</p>												

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

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

FOCALIZZAZIONE

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

Compilare la tabella seguente in base alla sequenza di caricamento:

Posizione	Campione	Volume di ritentato (µl)
1	RIP + NESP	10+10
2	IN E OR ALG 33	44
3		
4		
5		
6		
7		
8		

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

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

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

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

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

Potenziale (V)	Corrente (mA)	Potenza (W)	Potenziale per ora (Vh)	Tempo (min)
333	25	8	1	01
1615	15.5	25	4000	3.15

43 Tagliare due rettangoli di Durapore e Immobilon P e 16 rettangoli di carta da filtro⁶ o simile delle dimensioni di 8 (esatti) x 16,5 cm. Nel caso la lunghezza del gel sia pari a 25 cm, le dimensioni sono 8 x 22,5 cm.

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

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

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

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

RICERCA DI ERITROPOIETINA RICOMBINANTE E ANALOGHI

Rif. MP031 - Allegato

Pag.	6/10
Rev.	9

- 46 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 Immergere un rettangolo della Durapore nella vaschetta contenente GLI-TRIS per almeno 20 minuti e posizionarla sullo Slow mixer.
- 48 Quando la corsa elettroforetica è a circa 3500Vh nel caso lunghezza del gel sia pari a 16,5 cm o 3900Vh nel caso la lunghezza sia pari a 25 cm, appoggiare ai bordi della vaschetta contenente GLI-TRIS i fogli di carta da filtro in due pacchetti da quattro ciascuno⁶, in modo tale che si imbevano di soluzione per capillarità.

49 Prolungare la corsa

<p>SI <input type="checkbox"/></p> <p>Al termine della corsa (3600Vh nel caso lunghezza del gel sia pari a 16,5 cm o 4000Vh nel caso la lunghezza sia pari a 25 cm), impostare i seguenti parametri per 10-15 minuti max:</p> <p style="margin-left: 20px;">Potenziale: 2500 V Corrente: 17 mA Potenza: 34 W Potenziale per ora: 500 Vh</p> <p>O nel caso la lunghezza del gel sia pari a 25 cm:</p> <p style="margin-left: 20px;">Potenziale: 2500 V Corrente: 25 mA Potenza: 50 W Potenziale per ora: 500 Vh</p> <p>Completare la seguente tabella con i parametri di inizio e fine corsa:</p> <table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <thead> <tr> <th>Potenziale (V)</th> <th>Corrente (mA)</th> <th>Potenza (W)</th> <th>Potenziale per ora (Vh)</th> <th>Tempo (min)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr> <tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr> <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)																<p>NO <input checked="" type="checkbox"/> andare al punto 60</p>
Potenziale (V)	Corrente (mA)	Potenza (W)	Potenziale per ora (Vh)	Tempo (min)																	

- 50 Eseguire il controllo visivo per verificare l'uniformità della migrazione del rosso metile e se possibile fotografare il gel

D - PRIMO BLOTTING

- 51 E' possibile immergere il gel in una vaschetta contenente Gli-Tris 2 (preparata di fresco pesando 3,02 g di Trizina, 7,21 g di Glicina e portando a un volume pari a 500ml con acqua ultrapura)
- 52 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 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 Sovrapporre quindi un rettangolo di parafilm, facendo pressione con un rullo, per eliminare le bolle d'aria.
- 55 Capovolgere l'insieme (pacchetto, Immobilon P, Durapore e gel) sulla piastra Multiphor II
- 56 Rimuovere il gel dal Gelbond e sovrapporvi rapidamente il secondo pacchetto di carta da filtro
- 57 Sovrapporre quindi un rettangolo di parafilm, facendo pressione con un rullo, per eliminare le bolle d'aria.

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

58	<p>Chiudere il supporto e impostare i seguenti parametri:</p> <p>Potenziale: 40 V Corrente: Area del gel Potenza: 90 W Durata: 30 min</p> <p>Completare la seguente tabella con i parametri di inizio e fine corsa:</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Potenziale (V)</th> <th>Corrente (mA)</th> <th>Potenza (W)</th> <th>Tempo (min)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>9</td> <td>192</td> <td>2</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>22</td> <td>192</td> <td>4</td> <td>30</td> </tr> </tbody> </table>	Potenziale (V)	Corrente (mA)	Potenza (W)	Tempo (min)	9	192	2	5	22	192	4	30
Potenziale (V)	Corrente (mA)	Potenza (W)	Tempo (min)										
9	192	2	5										
22	192	4	30										
59	<p>Preparare PBS e DTT.</p> <p>PBS Portare a volume con acqua ultrapura in un matraccio da 1000 ml 5 tavolette di tampone fosfato salino [R-165 Lotto 037]. Mescolare mediante agitatore elettromagnetico.</p> <p>DTT Portare a volume con PBS in un matraccio da 250 ml 192,8 mg di tiotretolo [R-182 Lotto 022]. Tale soluzione deve essere utilizzata entro trenta minuti dalla preparazione, causa ossidazione.</p>												
60	<p>Al termine della migrazione, dopo aver aperto il supporto</p> <p>Mettere in una vaschetta da 30x 15 x 8 cm 250 ml di DTT e immergervi il rettangolo di Immobilon P (IP1)</p>												
61	Posizionare la vaschetta per 60 minuti in incubatore a 37°C.												
62	<p>Preparare le soluzioni LFM</p> <p>LFM 5% Portare a volume con PBS in un matraccio da 250 ml 12,5 g di latte in polvere a bassi grassi [R-178 Lotto 032]. Agitare con agitatore magnetico.</p> <p>LFM 1% Portare a volume con PBS in un matraccio da 100 ml 1 g di latte in polvere a bassi grassi [R-178 Lotto 032]. Agitare con agitatore magnetico.</p>												
63	Lavare la IP1 con PBS, mettere in una vaschetta da 30x 15 x 8 cm 250 ml di LFM 5% e immergervi il rettangolo di IP1												
64	Posizionare la vaschetta sullo Slow mixer per 60 min												
65	Lavare la IP1 con PBS												
66	<p>Preparare la soluzione Clone AE75A</p> <p>Aggiungere 40 µl di anticorpo anti-lepo [R-173 Lotto 032] a 40 ml di LFM 1%</p>												
67	Mettere in una vaschetta di vetro da 17x 8 cm (dimensioni interne) oppure da 25x 13 cm in caso di gel da 25 cm) 40 ml di soluzione Clone AE75A e immergervi la IP1												
68	Posizionare la vaschetta sullo Slow mixer per 60 min: in caso di tempi superiori, porre lo Slow mixer in frigorifero (in quest'ultimo caso dopo aver tolto la vaschetta dal frigorifero lasciarla ad agitare sullo Slow mixer a T ambiente per circa 20 min)												

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

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

- 69 Preparare le soluzioni:
-PBS

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

E - SECONDO BLOTTING

- 72 Preparare l'acido acetico 0,7%
Portare a volume con acqua ultrapura in un matraccio da 500 ml 3,5 ml di acido acetico [R-003 Lotto 02].
 - 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 33] per 1 minuto, quindi immergerla in quella contenente acqua per 2 minuti e quindi in quella contenente acido acetico 0,7% per almeno 20 minuti
 - 75 Immergere un rettangolo della Durapore nella vaschetta contenente acido acetico allo 0,7% per almeno 20 minuti.
 - 76 5 minuti prima di utilizzarli, appoggiare ai bordi della vaschetta contenente acido acetico 0,7% i fogli di carta da filtro o simile in due pacchetti da quattro ciascuno⁶, in modo tale che si imbevano di soluzione per capillarità
 - 77 Sulla piastra del Nova Blot posizionare il pacchetto da quattro fogli di carta da filtro
 - 78 Lavare la IP1 con PBS e sovrapporla rapidamente al pacchetto
 - 79 Sovrapporre rapidamente la Durapore
 - 80 Sovrapporre rapidamente la Immobilon P (al termine della corsa nominata IP2)
 - 81 Sovrapporre rapidamente il pacchetto da quattro fogli di carta da filtro⁶
 - 82 Sovrapporre quindi un rettangolo di parafilm, facendo pressione con un rullo, per eliminare le bolle d'aria.
 - 83 Chiudere il supporto e impostare i seguenti parametri:
Potenziale: 35 V
Potenza: 40 W
Corrente: 0,8 mA x Area del gel
Durata: 10 min

Completare la seguente tabella con i parametri di inizio e fine corsa:
- | Potenziale (V) | Corrente (mA) | Potenza (W) | Tempo(min) |
|----------------|---------------|-------------|------------|
| 5 | 154 | 1 | 0' |
| 8 | 154 | 1 | 10' |

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

84. <input checked="" type="checkbox"/>	<p>Si è interrotta l'analisi all'incubazione con l'anticorpo primario</p> <p>SI <input type="checkbox"/></p> <p>NO <input checked="" type="checkbox"/> andare al punto 85</p> <p>Preparare la soluzione LFM 1% Portare a volume con PBS in un matraccio da 100 ml 1 g di latte in polvere a bassi grassi [R-178 Lotto C37]. Agitare con agitatore magnetico.</p>
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"/>	<p>Preparare ANTI IgG</p> <p>Aggiungere:</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 26 µl di anticorpo segnato con la biotina Pierce [R-175 Lotto C37] a 40 ml di LFM 1%</p> <p><input type="checkbox"/> 10 µl di anticorpo segnato con la biotina Paris [R-175 Lotto C37] a 40 ml di LFM 1%</p>
89. <input checked="" type="checkbox"/>	Mettere in una vaschetta di vetro da 17x 8 cm (dimensioni interne-opp. da 25x13 in caso di gel da 25 cm) 40 ml di soluzione ANTI IgG e immergervi la IP2
90. <input checked="" type="checkbox"/>	Posizionare la vaschetta sullo Slow mixer per 90 min, in caso di tempi superiori posizionare lo Slow mixer in frigo (in quest'ultimo caso dopo aver tolto la vaschetta dal frigorifero lasciarla ad agitare sullo Slow mixer a T ambiente per circa 20 min)
91. <input checked="" type="checkbox"/>	<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 C37]. Agitare con agitatore magnetico.</p>
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"/>	<p>Si è interrotta l'analisi all'incubazione con l'anticorpo secondario:</p> <p>SI <input checked="" type="checkbox"/></p> <p>NO <input type="checkbox"/> andare al punto 96</p> <p>Preparare la soluzione LFM 1%: Portare a volume con PBS in un matraccio da 100 ml 1 g di latte in polvere a bassi grassi [R-178 Lotto C37]. Agitare con agitatore magnetico.</p>
96. <input checked="" type="checkbox"/>	<p>Preparare la soluzione Perossidasi</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Aggiungere 150 µl di streptavidina perossidasi Pierce [R-174 Lotto C37] a 40 ml di LFM 1%</p> <p><input type="checkbox"/> Aggiungere 20 µl di streptavidina perossidasi Biospa [R-174 Lotto C37] a 40 ml di LFM 1%</p>
97. <input checked="" type="checkbox"/>	Lavare la IP2 con PBS
98. <input checked="" type="checkbox"/>	Mettere in una vaschetta di vetro da 17x 8 cm (dimensioni interne-opp. da 25x13 in caso di gel da 25 cm) 40 ml di soluzione Perossidasi e immergervi la IP2
99. <input checked="" type="checkbox"/>	Posizionare la vaschetta sullo Slow Mixer per almeno un'ora
100. <input checked="" type="checkbox"/>	Lavare in una vaschetta da 30x 15 x 8 cm la IP2 con la soluzione PBS, ponendola sullo Slow Mixer per 1 minuto
101. <input checked="" type="checkbox"/>	Ripetere tale lavaggio per altre due volte
102. <input checked="" type="checkbox"/>	Effettuare tale lavaggio per altre tre volte ponendo la vaschetta sullo Slow Mixer per 10 minuti

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

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

F - RIVELAZIONE MEDIANTE CHEMILUMINESCENZA

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

NO

Si sono verificate non conformità durante lo svolgimento della procedura ?
 SI vedere Rapporto FL053 N° _____

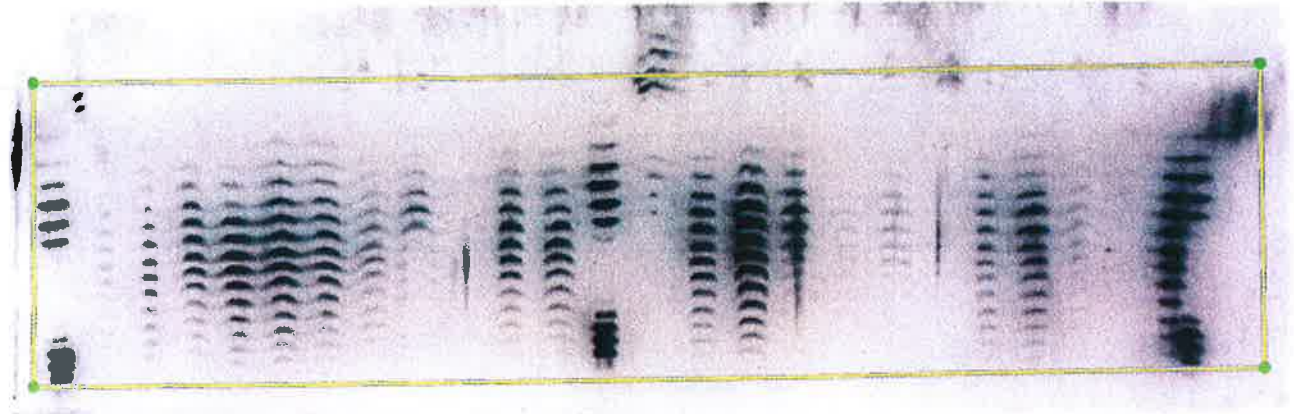
Operatore Sigla e Firma	Data	Operazioni eseguite
<i>AS Siet...</i>	15/10	da punto [1] a punto [2]
<i>AS Siet...</i>	10/8/10	da punto [3] a punto [9]
<i>AS Siet...</i>	11/5/10	da punto [9] a punto [10]
		da punto [] a punto []
		da punto [] a punto []
		da punto [] a punto []
		da punto [] a punto []

II.2.4 Initial testing procedure Test Results

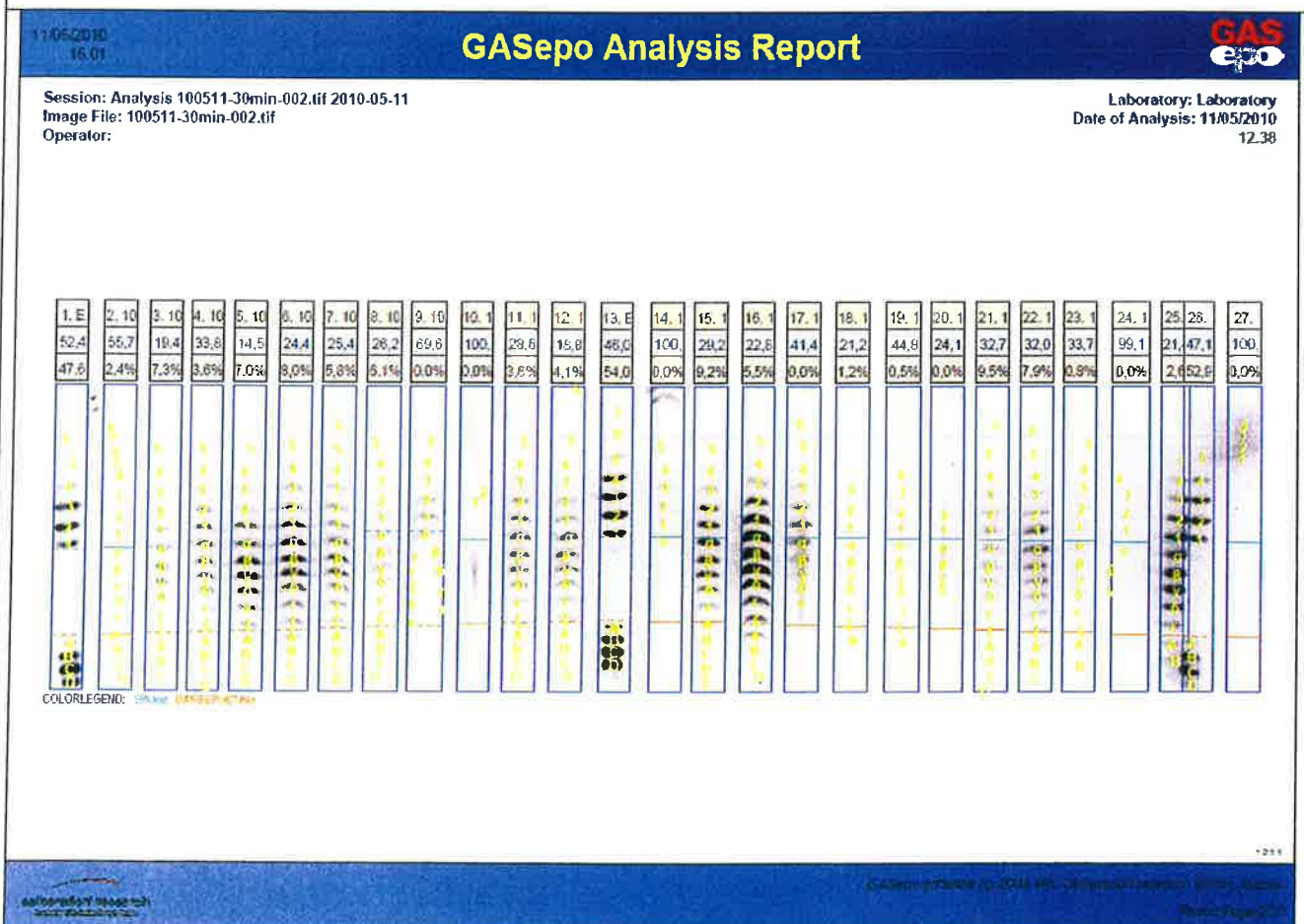
Gel images and data of positive control (BRNE and Mir), negative control (NIBSC), sample internal laboratory code 10E003 A4433 as obtained after the initial testing procedure analysis

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: RHEPO AND NESP STANDARDS (BRNE)

11/05/2010
16:01

GASepo Analysis Report

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

Laboratory: Laboratory
Date of Analysis: 11/05/2010
12:38

1. EPOαβ + Darba

52,4%
47,6%

Lane #1: EPOαβ + Darba									
Name	Comment	CentX	CentY	Volume Abs	Volume nSum	Volume nMax	Height Abs	Height nSum	Height nMax
6		11,8	55,1	328,2	0,3	1,7	3,3	0,4	2,1
5		19,7	81,7	377,2	0,4	1,9	5,6	0,7	3,5
4		15,7	106,0	4203,0	4,3	21,4	33,3	4,1	21,0
3		17,0	127,0	14262,3	14,7	72,6	119,3	14,8	75,3
2		15,1	148,3	17856,3	18,4	90,9	124,2	15,4	78,4
1		16,4	166,8	12997,6	13,4	66,1	108,9	13,5	68,8
A		20,7	268,1	3477,8	3,6	17,7	28,7	3,6	18,1
B		18,7	282,6	12791,5	13,2	65,1	114,1	14,1	72,0
C		20,2	295,9	19662,7	20,3	100,0	158,4	19,6	100,0
D		20,9	309,0	9688,2	9,9	48,8	97,3	12,0	61,4

NEGATIVE CONTROL: URINARY EPO STANDARD (NIBSC)

11/05/2010
16:02

GASepo Analysis Report

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

Laboratory: Laboratory
Date of Analysis: 11/05/2010
12:38

25. Nibsc

21,4%
2,6%

Lane #25: Nibsc									
Name	Comment	CentX	CentY	Volume Abs	Volume nSum	Volume nMax	Height Abs	Height nSum	Height nMax
5		22,0	76,4	113,5	0,1	0,6	3,1	0,4	1,9
4		19,6	97,1	975,1	1,2	5,5	15,1	1,7	9,2
3		19,5	116,3	1850,7	2,0	9,3	25,9	3,0	15,9
2		19,0	138,1	4724,0	5,7	26,7	84,2	7,3	39,3
1		17,9	156,9	10267,3	12,4	58,1	126,3	14,4	77,4
α		17,6	175,5	11701,9	14,2	66,3	129,6	14,8	79,4
β		18,8	194,8	17662,4	21,4	100,0	153,0	17,5	93,7
γ		18,3	211,4	17557,9	21,2	99,4	163,3	18,7	100,0
δ		15,1	229,2	10103,2	12,2	57,2	101,9	11,7	62,4
ε		14,3	247,6	5776,0	7,0	32,7	50,9	5,8	31,1
A		12,6	268,0	1861,3	2,3	10,5	29,8	3,4	18,3
B		15,7	284,6	305,2	0,4	1,7	11,5	1,3	7,0

POSITIVE CONTROL: MIRCERA (MIR)

11/05/2010
16.02

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

GASepo Analysis Report

GAS
epo

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

27. Mir

100.0%

0.0%

Lane #27: Mir									
Name	Comment	CentX	CentY	Volume Abs	Volume nSum	Volume nMax	Height Abs	Height nSum	Height nMax
4		17,4	37,9	1927,1	2396,8	59,6	19,7	621,3	78,2
3		14,4	48,6	2906,5	3615,0	88,4	25,2	794,4	100,0
2		15,1	62,1	3288,5	4090,0	100,0	21,1	667,8	84,1
1		14,4	73,7	3137,2	3901,9	95,4	23,0	727,8	91,8

GASepo software (c) 2003-2007 Laboratorio Antidoping - FMSI
Report Page 26/27

SAMPLE INTERNAL LABORATORY CODE 10E003 A4433

11/05/2010
16.01

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

GASepo Analysis Report

GAS
epo

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

2 10E003 A4433

55.7%

2.4%

Lane #2: 10E003 A4433									
Name	Comment	CentX	CentY	Volume Abs	Volume nSum	Volume nMax	Height Abs	Height nSum	Height nMax
8		8,0	44,3	161,4	1,7	8,3	3,0	2,8	21,9
7		10,9	55,5	382,4	4,0	19,8	4,3	4,1	32,0
6		13,9	69,5	1936,1	20,0	100,0	12,1	11,8	88,5
5		15,1	81,2	1000,6	10,3	51,7	10,1	9,7	75,2
4		18,3	93,9	621,2	6,4	32,1	5,6	5,4	41,6
3		18,2	115,1	515,9	5,3	26,6	6,1	5,8	45,2
2		17,9	137,0	710,6	7,3	39,7	9,8	9,4	72,4
1		17,6	155,0	1138,4	11,8	59,8	13,5	12,9	100,0
α		17,9	173,5	1242,8	12,8	64,2	12,5	12,0	93,1
β		17,9	191,9	1365,5	14,1	70,5	12,1	11,6	89,6
γ		17,7	207,5	1280,0	13,2	68,1	13,2	12,7	97,8
δ		19,8	223,3	529,0	5,5	27,4	5,8	5,6	42,9
ε		19,4	241,1	442,3	4,6	22,6	4,2	4,1	31,5
A		17,0	260,0	188,4	1,9	9,7	2,0	1,9	14,8
B		19,3	275,1	87,6	0,9	4,5	1,5	1,4	10,8
C		23,4	290,8	4,8	0,0	0,2	0,3	0,3	2,6
D		25,8	305,3	1,1	0,0	0,1	0,1	0,1	0,9

GASepo software (c) 2003-2007 Laboratorio Antidoping - FMSI
Report Page 27/27

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

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

Worksheet for the repeated testing procedure

FEDERAZIONE MEDICO SPORTIVA ITALIANA LABORATORIO ANTIDOPING		FOGLIO DI LAVORO	FL119
RICERCA DI ERITROPOIETINA RICOMBINANTE E ANALOGHI			
Rif. MP031 - Allegato		Pag. 1/10	Rev. 9
Data e ora di inizio analisi: 11/05/10 ore 8,20			
Lotto di accettazione		Codice campioni preparati	
10E003		DA: 44033R4	
		DA: 44033R4	
A - PREPARAZIONE DEL GEL 17 X8 X 0,1CM			
1 <input checked="" type="checkbox"/>	Pesare 14,71 g di urea [R-181 Lotto 017], 1,75 g di saccarosio [R-306 Lotto 004] e trasferirli in un pallone di reazione da 100 ml posto su un agitatore elettromagnetico		
2 <input checked="" type="checkbox"/>	Aggiungere 14,17 ml di acqua ultrapura e 1,89 ml di anfolita 2-4 [R-168 Lotto 041], 1,89ml di anfolita 4-6 [R-169 Lotto 041] e 4,74 ml di soluzione di bisacrilamide 40% [R-184 Lotto 008]		
3 <input checked="" type="checkbox"/>	Tappare il pallone e collegarlo ad una pompa da vuoto per 15 min.		
4 <input checked="" type="checkbox"/>	Nel frattempo (durante i 15 minuti): a) detergere le lastre con etanolo assoluto [R-033 Lotto 025] b) far aderire il Gelbond alla lastra di supporto ponendovi l'opportuna quantità di acqua ultrapura c) eliminare le eventuali bolle d'aria e l'acqua in eccesso ponendo sul Gelbond un foglio di carta da filtro e facendo pressione con un rullo d) sovrapporre la seconda lastra e) bloccare le lastre con le apposite pinze		
5 <input checked="" type="checkbox"/>	Preparare l'APS sciogliendo in una viat di plastica da 1,5 ml con tappo 100 mg di persolfato d'ammonio [R-179 lotto 002] in 1 ml di acqua ultrapura e agitando manualmente		
6 <input checked="" type="checkbox"/>	Aggiungere 31 µl di TEMED [R-180 Lotto 003] e 310 µl di APS nel pallone		
7 <input checked="" type="checkbox"/>	Lasciare 30 s in agitazione		
8 <input checked="" type="checkbox"/>	Prelevare la soluzione di gel mediante pipetta e trasferirla rapidamente fra le due lastre, avendo cura di non generare bolle d'aria		
9 <input checked="" type="checkbox"/>	Lasciare il gel per almeno tre ore nella camera umida		
B- PREPARAZIONE DEL CAMPIONE			
<input checked="" type="checkbox"/> I per screening e conferma (non SDS PAGE) <input type="checkbox"/> A (per la purificazione per immunoaffinità) andare al FL162			
10 <input checked="" type="checkbox"/>	Condizionare il campione a temperatura ambiente e preparare la soluzione Complete portando a volume con acqua ultrapura in un matraccio da 10 ml 5 tavolette di Complete ¹ [R-172 Lotto 056] e mescolando mediante agitatore elettromagnetico		
11 <input checked="" type="checkbox"/>	Prelevare 20 ml di urina ² (in caso di prelievi inferiori, portare a 20 ml con TRISHCI 50 mM [TRISHCI 50-Lotto ---]) e trasferirli in una provetta da 50 ml Gel 11/05/10		
12 <input checked="" type="checkbox"/>	Aggiungere 400 µl di soluzione Complete (200 µl ogni 10 ml di urina)		
13 <input checked="" type="checkbox"/>	Aggiungere 2 ml di TRISHCI 3,75M [TRISHCI 3.75 Lotto ---] (1ml ogni 10 ml di urina)		
14 <input checked="" type="checkbox"/>	Controllare il pH con delle strips indicatrici in modo che sia compreso fra 6,8 e 7,9; in caso non risulti nel range, correggerlo con tamponi TRISHCI 3,75M [TRISHCI 3.75-Lotto ---] Gel 11/05/10		
15 <input checked="" type="checkbox"/>	Centrifugare per 10 min nella centrifuga refrigerata a 20°C con rotore basculante a 3000 rcf		

¹ E' possibile preparare quantità differenti purchè restino invariate le proporzioni.
² In caso di urina diluita e prelievi maggiori, prelevare le quantità di Complete e di TRISHCI 3.75 rispettando i rapporti fra i reattivi.

* Caccato notastato ricevuto

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

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

□ II (PER TEST DI STABILITÀ)

10/II <input type="checkbox"/>	Centrifugare 0,6 ml di urina per 10 min a 20°C con rotore basculante a 2700 rcf
11/II <input type="checkbox"/>	Mettere 0,5 ml di sovrantante in una provetta Microcon
12/II <input type="checkbox"/>	Aggiungere 20 µl di Pepstatina A e 5 µl di soluzione Complete
13/II <input type="checkbox"/>	Centrifugare a 6200 rpm per 20 min nella centrifuga refrigerata a 17°C con rotore ad angolo fisso, concentrando fino ad un volume approssimativo di 30 µl
14/II <input type="checkbox"/>	Aggiungere 200 µl di tampone acetato 50 mM nel restante campione e mescolare con vortex prima di capovolgerlo
15/II <input type="checkbox"/>	Capovolgere la Microcon e centrifugare a 3000 rpm per 10 min nella centrifuga refrigerata a 17°C con rotore ad angolo fisso
16/II <input type="checkbox"/>	Portare il volume del campione recuperato fino a 0,5 ml con tampone acetato 50 mM
17/II <input type="checkbox"/>	Aggiungere 20 µl di Pepstatina A e 5 µl di soluzione Complete
18/II <input type="checkbox"/>	Incubare per 15 ± 2 min a T ambiente
19/II <input type="checkbox"/>	Aggiungere una miscela di BRP e NESP in modo da ottenere una concentrazione pari a 1,5 volte la concentrazione usata per gli standard di riferimento
20/II <input type="checkbox"/>	Incubare tutta la notte a 37°C
21/II <input type="checkbox"/>	Prendere 20 µl e riscaldarli a 80°C per 3 min
22/II <input type="checkbox"/>	Andare al punto 27 e seguire il procedimento (esclusi i punti 28 e 37)

**C - FOCALIZZAZIONE 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 anfoliti 6-8 [R-170 Lotto 007] e 10 µl di RMET [Lotto 007]												
33 <input checked="" type="checkbox"/>	Posizionare sui lati più lunghi le strips imbevute rispettivamente della soluzione catodica ed anodica												
34 <input checked="" type="checkbox"/>	<p>Chiudere il supporto e impostare i seguenti parametri:</p> <p>Potenziale: 250 V Corrente: 17 mA (proporzionale alle dimensioni del Gel) Potenza: 17 W Durata: 30 min/ 60min</p> <p>O nel caso la lunghezza del gel sia pari a 25 cm:</p> <p>Potenziale: 250 V Corrente: 25 mA Potenza: 25 W Durata: 30 min/ 60min</p> <p>Completare la seguente tabella con i parametri di inizio e fine corsa:</p> <table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <thead> <tr> <th>Potenziale (V)</th> <th>Corrente (mA)</th> <th>Potenza (W)</th> <th>Tempo (min)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>250</td> <td>25</td> <td>5</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>250</td> <td>13,4</td> <td>3</td> <td>55'</td> </tr> </tbody> </table>	Potenziale (V)	Corrente (mA)	Potenza (W)	Tempo (min)	250	25	5	0	250	13,4	3	55'
Potenziale (V)	Corrente (mA)	Potenza (W)	Tempo (min)										
250	25	5	0										
250	13,4	3	55'										
35 <input checked="" type="checkbox"/>	Prelevare gli standard dal congelatore												
36 <input checked="" type="checkbox"/>	<p>Preparare gli standard:</p> <p>MISCELA BRP NESP 1-2 (BRNE1-2) Aggiungere 0,32 – 0,16 ng³ di BRP [BRP Lotto 015] a 0,2 – 0,15ng³ di NESP [NESP Lotto 013]</p> <p>MISCELA BRP NIBSC (BRNIB) Aggiungere 0,16 ng³ di BRP [BRP Lotto] a 0,0025 ng³ di NIBSC [NIBSC Lotto]</p> <p>MISCELA NESP NIBSC (NENIB) Aggiungere 0,15 ng³ di NESP [NESP Lotto] a 0,0025³ ng di NIBSC [NIBSC Lotto]</p> <p>SOLUZIONE NIBSC 0,02UI - 0,04UI (NIBSC1- 2) Prelevare dalla soluzione standard [NIBSC Lotto 011] 10-20 µl, in modo tale da ottenere una soluzione da 0,02-0,04 UI</p> <p>SOLUZIONE MIRCERA (MIR) Prelevare 20 µl dalla soluzione standard di Mircera [MIR Lotto 005]</p> <p>SOLUZIONE Dynepo (Dyn) Prelevare 20 µl dalla soluzione standard di Dynepo [Dyn Lotto]</p>												
37a <input type="checkbox"/>	Scaldare i campioni a 87 °C per 6 min												
37b <input checked="" type="checkbox"/>	aggiungere quantità sufficiente di urea poco a poco fino a saturazione andare a punto 39												
38 <input type="checkbox"/>	Immergere i campioni precedentemente scaldati, nel bagno refrigerante per 30 s												
39 <input checked="" type="checkbox"/>	<p>Aggiungere: -ai campioni il 10% di Surfactants-amps 80 (Tween 80) [R-166 Lotto 004] per volume di ritentato</p> <p>-agli standard (eccetto Mircera) aggiungere 2,2 µl di Surfactants-amps 80 (Tween 80) [R-166 Lotto 004] ogni 20 µl</p>												

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

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

FOCALIZZAZIONE

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

Compilare la tabella seguente in base alla sequenza di caricamento:

Posizione	Campione	Volume di ritentato (µl)
1	BRP+NE SP	16+10
2		
3	10E003A 64 33 R	77
4		
5		
6		
7		
8		

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

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

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

9		
10		
11		
12		
13		
14	BPP+DESP	15+10
15		
16		
17		
18		
19		
20		
21		
22		
23	WISC	20
24	MIR	20
25	BPP+DESP	15+10
26		
27		
28		
29		
30		

- 42 Chiudere il supporto e impostare i seguenti parametri:
 Potenziale: 2000 V
 Corrente: 17 mA
 Potenza: 17 W
 Potenziale per ora: 3600 Vh
 O nel caso la lunghezza del gel sia pari a 25 cm:
 Potenziale: 2000 V
 Corrente: 25 mA
 Potenza: 25 W
 Potenziale per ora: 4000 Vh
 Completare la seguente tabella con i parametri di inizio e fine corsa:
- | Potenziale (V) | Corrente (mA) | Potenza (W) | Potenziale per ora (Vh) | Tempo (min) |
|----------------|---------------|-------------|-------------------------|-------------|
| 226 | 25 | 11 | 2 | 0 |
| 1556 | 15 | 25 | 4000 | 3808 |
- 43 Tagliare due rettangoli di Durapore e Immobilon P e 16 rettangoli di carta da filtro⁶ o simile delle dimensioni di 8 (esatti) x 16,5 cm. Nel caso la lunghezza del gel sia pari a 25 cm, le dimensioni sono 8 x 22,5 cm.
- 44 Preparare GLI-TRIS aggiungendo a 7,21 g di Glicina [R-164 Lotto 209] 1,51g di Trizmabase [R-167 Lotto 209] e portando a volume con acqua ultrapura in un matraccio da 500 ml.
- 45 Quando il potenziale ha raggiunto circa 2800 Vh, preparare tre vaschette delle dimensioni di 25 x 25 x 8h cm contenenti rispettivamente metanolo [R-038 Lotto 593], acqua ultrapura e GLI-TRIS

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

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

- 46 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 Immergere un rettangolo della Durapore nella vaschetta contenente GLI-TRIS per almeno 20 minuti e posizionarla sullo Slow mixer.
- 48 Quando la corsa elettroforetica è a circa 3500Vh nel caso lunghezza del gel sia pari a 16,5 cm o 3900Vh nel caso la lunghezza sia pari a 25 cm, appoggiare ai bordi della vaschetta contenente GLI-TRIS i fogli di carta da filtro in due pacchetti da quattro ciascuno⁶, in modo tale che si imbevano di soluzione per capillarità.

49 Prolungare la corsa

SI NO andare al punto 50

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:

Potenziale (V)	Corrente (mA)	Potenza (W)	Potenziale per ora (Vh)	Tempo (min)

- 50 Eseguire il controllo visivo per verificare l'uniformità della migrazione del rosso metile e se possibile fotografare il gel

D - PRIMO BLOTTING

- 51 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 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 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 Sovrapporre quindi un rettangolo di parafilm, facendo pressione con un rullo, per eliminare le bolle d'aria.
- 55 Capovolgere l'insieme (pacchetto, Immobilon P, Durapore e gel) sulla piastra Multiphor II
- 56 Rimuovere il gel dal Gelbond e sovrapporvi rapidamente il secondo pacchetto di carta da filtro
- 57 Sovrapporre quindi un rettangolo di parafilm, facendo pressione con un rullo, per eliminare le bolle d'aria.

FEDERAZIONE MEDICO SPORTIVA ITALIANA LABORATORIO ANTIDOPING	FOGLIO DI LAVORO	FL119
RICERCA DI ERITROPOIETINA RICOMBINANTE E ANALOGHI		
Rif. MPO31 - Allegato		Pag. 7/10
		Rev. 9

58	<p>Chiudere il supporto e impostare i seguenti parametri:</p> <p>Potenziale: 40 V Corrente: Area del gel Potenza: 90 W Durata: 30 min</p> <p>Completare la seguente tabella con i parametri di inizio e fine corsa:</p> <table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <thead> <tr> <th>Potenziale (V)</th> <th>Corrente (mA)</th> <th>Potenza (W)</th> <th>Tempo (min)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>5</td> <td>150</td> <td>2</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>45</td> <td>130</td> <td>3</td> <td>30</td> </tr> </tbody> </table>	Potenziale (V)	Corrente (mA)	Potenza (W)	Tempo (min)	5	150	2	5	45	130	3	30
Potenziale (V)	Corrente (mA)	Potenza (W)	Tempo (min)										
5	150	2	5										
45	130	3	30										
59	<p>Preparare PBS e DTT.</p> <p>PBS Portare a volume con acqua ultrapura in un matraccio da 1000 ml 5 tavolette di tampone fosfato salino [R-165 Lotto 087]. Mescolare mediante agitatore elettromagnetico.</p> <p>DTT Portare a volume con PBS in un matraccio da 250 ml 192,8 mg ditiotreitolo [R-182 Lotto 021]. Tale soluzione deve essere utilizzata entro trenta minuti dalla preparazione, causa ossidazione.</p>												
60	<p>Al termine della migrazione, dopo aver aperto il supporto</p> <p>Mettere in una vaschetta da 30x 15 x 8 cm 250 ml di DTT e immergervi il rettangolo di Immobilon P (IP1)</p>												
61	<p>Posizionare la vaschetta per 60 minuti in incubatore a 37°C.</p>												
62	<p>Preparare le soluzioni LFM</p> <p>LFM 5% Portare a volume con PBS in un matraccio da 250 ml 12,5 g di latte in polvere a bassi grassi [R-178 Lotto 037]. Agitare con agitatore magnetico.</p> <p>LFM 1% Portare a volume con PBS in un matraccio da 100 ml 1 g di latte in polvere a bassi grassi [R-176 Lotto 037]. Agitare con agitatore magnetico.</p>												
63	<p>Lavare la IP1 con PBS, mettere in una vaschetta da 30x 15 x 8 cm 250 ml di LFM 5% e immergervi il rettangolo di IP1</p>												
64	<p>Posizionare la vaschetta sullo Slow mixer per 60 min</p>												
65	<p>Lavare la IP1 con PBS</p>												
66	<p>Preparare la soluzione Cione AE75A</p> <p>Aggiungere 40 µl⁷ di anticorpo antiipo [R-173 Lotto 077] a 40 ml di LFM 1%</p>												
67	<p>Mettere in una vaschetta di vetro da 17x 8 cm (dimensioni interne-oppure da 25x 13 cm in caso di gel da 25 cm) 40 ml di soluzione Cione AE75A e immergervi la IP1</p>												
68	<p>Posizionare la vaschetta sullo Slow mixer per 60 min: in caso di tempi superiori, porre lo Slow mixer in frigorifero (in quest'ultimo caso dopo aver tolto la vaschetta dal frigorifero lasciarla ad agitare sullo Slow mixer a T ambiente per circa 20 min)</p>												

⁷ Nel caso di vaschette di dimensioni interne 25x 13 cm, considerare un volume totale di 50 ml 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 557]. Agitare con agitatore magnetico.
-250 ml di:
 LFM 6%
 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 042]
 - 73 Preparare tre vaschette delle dimensioni di 25 x 25 x 8 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 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 Immergere un rettangolo della Durapore nella vaschetta contenente acido acetico allo 0,7% per almeno 20 minuti.
 - 76 5 minuti prima di utilizzarli, appoggiare ai bordi della vaschetta contenente acido acetico 0,7% i fogli di carta da filtro o simile in due pacchetti da quattro ciascuno⁶, in modo tale che si imbevano di soluzione per capillarità
 - 77 Sulla piastra del Nova Blot posizionare il pacchetto da quattro fogli di carta da filtro
 - 78 Lavare la IP1 con PBS e sovrapporre rapidamente al pacchetto
 - 79 Sovrapporre rapidamente la Durapore
 - 80 Sovrapporre rapidamente la Immobilon P (al termine della corsa nominata IP2)
 - 81 Sovrapporre rapidamente il pacchetto da quattro fogli di carta da filtro⁶
 - 82 Sovrapporre quindi un rettangolo di parafilm, facendo pressione con un rullo, per eliminare le bolle d'aria.
 - 83 Chiudere il supporto e impostare i seguenti parametri:
Potenziale: 35 V
Potenza: 40 W
Corrente: 0,8 mA x Area del gel
Durata: 10 min

Completare la seguente tabella con i parametri di inizio e fine corsa:
- | Potenziale (V) | Corrente (mA) | Potenza (W) | Tempo(min) |
|----------------|---------------|-------------|------------|
| 5 | 154 | 1 | 0 |
| 8 | 154 | 1 | 10 |

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

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

103	Preparare <input checked="" type="checkbox"/> subito prima di utilizzarla la soluzione Covalight, mescolando uguali volumi (15 ml + 15 ml) ² delle due soluzioni West Pico Pierce [R-176 Lotto <u>248</u>]; <input type="checkbox"/> 10 minuti prima del suo utilizzo la soluzione Covalight, conservandola al buio; aggiungendo 25 gocce di CovB [R-176 B Lotto] in 25 ml di CovA [R-176 A Lotto].
104	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	Esporta per: <input type="checkbox"/> 1 minuto <input checked="" type="checkbox"/> 5 minuti <input type="checkbox"/> 10 minuti <input checked="" type="checkbox"/> 15 minuti <input type="checkbox"/> 30 minuti

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

Operatore Sigla e Firma	Data	Operazioni eseguite
<i>[Firma]</i>	11/05/10	da punto [2] a punto [31]
<i>[Firma]</i>	12/05/10	da punto [7] a punto [8]
<i>[Firma]</i>	13/05/10	da punto [9] a punto [10]
		da punto [] a punto []
		da punto [] a punto []
		da punto [] a punto []
		da punto [] a punto []

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

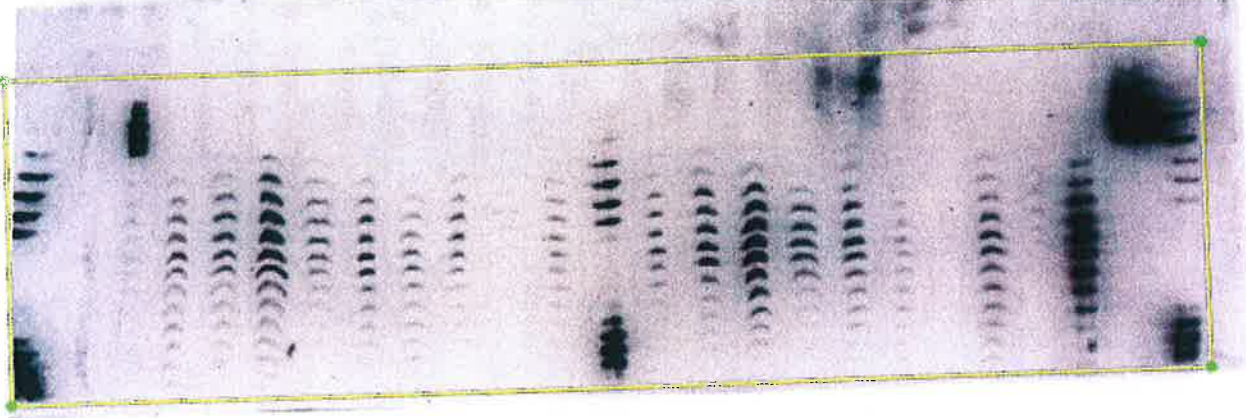
- [1] rhEPO and NESP standards (BRNE)
- [2] Routine sample
- [3] 10E003 A4433R (repeated)
- [4-12] Routine samples
- [13] rhEPO and NESP standards (BRNE)
- [14-22] Routine samples
- [23] urinary EPO standard (NIBSC)
- [24] Mircera standard (Mir)
- [25] rhEPO and NESP standards (BRNE)

II.2.6 Repetition of initial testing procedure Test Results

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

TOTAL IMAGE OF THE GEL

THE RECTANGLE INDICATES THE AREA SELECTED FOR PROCESSING THE DENSITOMETRY DATA



GENERAL VIEW OF ALL THE PROCESSED LANES

13/05/2010
15:14

GASepo Analysis Report



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

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

1. EPC	2. 10E	3. 10E4. ICE	5. 10E	6. 10	7. 10	8. 10	9. 10	10. 1	11. 10	12. 1	13. E	14. 1	15. 1	16. 1	17. 1	18. 1	19. 1	20. 1	21. 1	22. 1	23. N	24. M	25. E	
44.0%	0.0%	96.2%	22.9%	32.2%	40.3	39.6	27.8	15.5	39.8	90.9%	36.4	33.1%	35.2	32.7	15.1	21.2	26.0	15.1	6.2%	14.9	62.2	15.6	100.0	27.9
55.3%	54.8%	0.0%	10.6%	5.9%	3.0%	1.1%	5.6%	17.4	2.4%	1.0%	1.0%	65.1%	0.9%	3.9%	6.4%	3.2%	10.1	21.8	3.8%	19.1	0.0%	9.6%	0.0%	71.6

COLORLEGEND: SPOT DARKENING

POSITIVE CONTROL: RHEPO AND NESP STANDARDS (BRNE)

13/05/2010
15.14

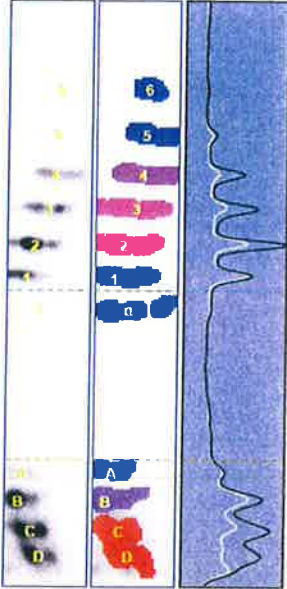
Session: Analysis 100513_30min_002.tif 2010-05-13
Image File: 100513_30min_002.tif
Operator:

GASepo Analysis Report

GAS
epo

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

1. EPOαβ + Darbα	
44,0%	
55,3%	



Lane #1: EPOαβ + Darbα									
Name	Comment	CentX	CentY	Volume Abs	Volume nSum	Volume nMax	Height Abs	Height nSum	Height nMax
6		29,3	51,5	126,9	0,2	0,7	2,5	0,4	1,6
5		27,9	77,9	1666,8	2,6	8,9	21,3	3,5	13,8
4		26,3	101,5	8390,4	13,3	44,6	57,5	9,4	37,2
3		22,5	121,9	10449,0	16,5	56,5	87,4	14,3	56,5
2		15,2	143,0	12855,3	20,4	88,3	154,7	25,3	100,0
1		10,8	162,7	2103,8	3,3	11,2	35,5	5,8	23,0
α		18,6	180,5	586,3	0,9	3,1	3,9	0,8	2,5
A		10,0	276,3	630,4	1,0	3,3	16,3	2,7	10,5
B		7,0	292,6	7056,5	11,2	37,5	89,4	14,6	57,8
C		14,4	310,6	18231,8	28,9	96,8	106,8	17,4	69,0
D		19,6	324,8	18631,1	29,8	100,0	116,1	19,0	75,1

NEGATIVE CONTROL: URINARY EPO STANDARD (NIBSC)

13/05/2010
15.17

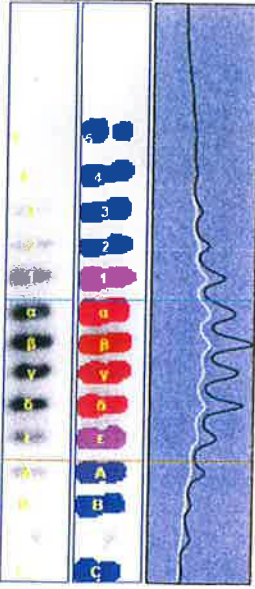
Session: Analysis 100513_30min_002.tif 2010-05-13
Image File: 100513_30min_002.tif
Operator:

GASepo Analysis Report

GAS
epo

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

23. Nibsc	
15,6%	
9,6%	



Lane #23: Nibsc									
Name	Comment	CentX	CentY	Volume Abs	Volume nSum	Volume nMax	Height Abs	Height nSum	Height nMax
5		4,2	80,2	0,7	0,0	0,0	0,1	0,0	0,1
4		9,7	102,8	178,8	0,3	1,8	1,9	0,5	2,2
3		13,9	122,9	1467,3	2,7	14,5	9,2	2,5	10,6
2		14,6	143,7	2094,6	3,9	20,7	18,2	4,9	21,0
1		14,0	162,9	4654,6	8,7	45,9	26,4	7,1	30,4
α		14,4	183,4	8297,0	15,4	81,8	38,4	10,3	44,4
β		14,9	201,8	10142,6	18,9	100,0	73,1	19,6	84,4
γ		15,2	219,1	8767,1	16,3	86,4	55,7	14,9	64,3
δ		13,9	238,4	8261,5	15,4	81,5	85,6	23,2	100,0
ε		13,9	257,8	4712,1	8,8	46,5	29,1	7,8	33,6
A		14,2	278,1	3160,4	5,9	31,2	20,7	5,5	23,9
B		12,9	297,3	1301,8	2,4	12,8	9,6	2,6	11,1
C		12,4	336,3	699,0	1,3	6,9	4,5	1,2	5,2

POSITIVE CONTROL: MIRCERA (MIR)

13/05/2010
15:17

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

GASepo Analysis Report

Laboratory: Laboratory
Date of Analysis: 13/05/2010
14:38

24. Mir
100.0%
0.0%

Lane #24: Mir									
Name	Comment	CentX	CentY	Volume Abs	Volume nSum	Volume nMax	Height Abs	Height nSum	Height nMax
6		17,8	27,7	1640,1	3,3	9,8	8,3	2,4	7,2
5		19,0	44,9	4868,2	9,7	29,2	26,5	7,8	23,0
4		19,9	61,8	10160,2	20,2	61,0	53,3	15,7	46,4
3		20,8	77,4	16664,7	33,2	100,0	115,0	33,8	100,0
2		20,0	86,4	13708,4	27,3	82,3	91,8	25,8	79,2
1		26,1	96,4	2823,0	5,8	17,5	41,2	12,1	35,8

12/1

GASepo software © 2004-2008 Agilent Technologies, Inc. All rights reserved. See the Agilent website for more information.

SAMPLE INTERNAL LABORATORY CODE 10E003 A4433

13/05/2010
15:15

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

GASepo Analysis Report

Laboratory: Laboratory
Date of Analysis: 13/05/2010
14:38

3. 10E003 A4433R
98.2%
0.0%

Lane #3: 10E003 A4433R									
Name	Comment	CentX	CentY	Volume Abs	Volume nSum	Volume nMax	Height Abs	Height nSum	Height nMax
9		36,4	0,6	12,3	0,0	0,1	1,3	0,3	0,7
8		29,2	13,0	211,6	0,5	1,2	2,8	0,7	1,4
7		23,6	29,4	3205,9	7,3	18,1	43,6	10,8	21,8
6		23,4	37,4	5075,5	11,6	28,7	51,8	12,6	25,9
5		20,2	51,8	17706,4	40,5	100,0	189,8	46,6	100,0
4		21,0	67,0	14281,9	32,7	80,7	93,0	22,6	46,6
3		19,7	78,0	7980,7	18,3	45,1	60,8	19,7	40,4
2		12,9	132,8	659,3	1,5	3,7	6,5	1,6	3,3
1		13,2	152,3	904,1	2,1	5,1	8,8	2,1	4,4
α		11,9	171,7	664,2	1,5	3,8	5,2	1,3	2,6
β		11,3	181,7	821,3	1,9	4,6	6,1	1,5	3,0
γ		9,6	208,5	407,1	0,9	2,3	4,2	1,0	2,1
δ		3,1	226,2	78,7	0,2	0,4	2,2	0,5	1,1

12/1

GASepo software © 2004-2008 Agilent Technologies, Inc. All rights reserved. See the Agilent website for more information.

II.2.7 Test Validity Data

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

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

II.3 Confirmation Test Data

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

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

II.3.1 Confirmation test description

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

II.3.2 Instruments and instrumental conditions

Same as in the initial testing procedure.

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

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

II.3.3 Confirmation Aliquot Chain of Custody Documentation

Aliquots request for confirmation

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)		
10E003A4433	1	20	conf. 4A	10E003A4433C
10E003A4433	1	0.6	Test stabilizzati	10E003A4433SMB

RICHIEDENTE AS Stefania
Sigla Firma

DATA 12/05/2010

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 ME
 CAMPIONI Frigo Congelatore: frigo Altro: _____

RESPONSABILE DISTRIBUZIONE AS Stefania
Sigla Firma

DATA 12/05/2010

(*) 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.

Flow diagram for confirmation

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

Data e ora di inizio analisi: 20/5/10 9.20

Lotto di accettazione	Codice campioni preparati
10E003	DA: AGU.BBC + Test stabilita
	DA: A:
	DA: A:
	DA: A:
	DA: A:

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

1 <input checked="" type="checkbox"/>	Pesare 14,71 g di urea [R-181 Lotto 024], 1,75 g di saccarosio [R-306 Lotto 020] e trasferirli in un pallone di reazione da 100 ml posto su un agitatore elettromagnetico
2 <input checked="" type="checkbox"/>	Aggiungere 14,17 ml di acqua ultrapura e 1,89 ml di anfolita 2-4 [R-168 Lotto 022], 1,89 ml di anfolita 4-6 [R-169 Lotto 021] e 4,74 ml di soluzione di bisacrilamide 40% [R-184 Lotto 028]
3 <input checked="" type="checkbox"/>	Tappare il pallone e collegarlo ad una pompa da vuoto per 15 min.
4 <input checked="" type="checkbox"/>	Nel frattempo (durante i 15 minuti): <ol style="list-style-type: none"> detergere le lastre con etanolo assoluto [R-033 Lotto 029] far aderire il Gelbond alla lastra di supporto ponendovi l'opportuna quantità di acqua ultrapura 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 sovrapporre la seconda lastra bloccare le lastre con le apposite pinze
5 <input checked="" type="checkbox"/>	Preparare l'APS sciogliendo in una vial di plastica da 1,5 ml con tappo 100 mg di persolfato d'ammonio [R-179 lotto 022] in 1 ml di acqua ultrapura e agitando manualmente
6 <input checked="" type="checkbox"/>	Aggiungere 31 µl di TEMED [R-180 Lotto 023] e 310 µl di APS nel pallone
7 <input checked="" type="checkbox"/>	Lasciare 30 s in agitazione
8 <input checked="" type="checkbox"/>	Prelevare la soluzione di gel mediante pipetta e trasferirla rapidamente fra le due lastre, avendo cura di non generare bolle d'aria
9 <input checked="" type="checkbox"/>	Lasciare il gel per almeno tre ore nella camera umida

B - PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

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

10/1 <input checked="" type="checkbox"/>	Condizionare il campione a temperatura ambiente e preparare la soluzione Complete portando a volume con acqua ultrapura in un matraccio da 10 ml 5 tavolette di Complete ¹ [R-172 Lotto: 58] e mescolando mediante agitatore elettromagnetico
11/1 <input checked="" type="checkbox"/>	Prelevare 20 ml di urina ² (in caso di prelievi inferiori, portare a 20 ml con TRISHCl 50 mM [TRISHCl 50 Lotto _____]) e trasferirli in una provetta da 50 ml - euS 20/5/10
12/1 <input checked="" type="checkbox"/>	Aggiungere 400 µl di soluzione Complete (200 µl ogni 10 ml di urina)
13/1 <input checked="" type="checkbox"/>	Aggiungere 2 ml di TRISHCl 3,75M [TRISHCl 3.75 Lotto 023], (1ml ogni 10 ml di urina)
14/1 <input checked="" type="checkbox"/>	Controllare il pH con delle strips indicatrici in modo che sia compreso fra 6,8 e 7,9; in caso non risulti nel range, correggerlo con tampone TRISHCl 3,75M [TRISHCl 3.75 Lotto _____] - euS 20/5/10
15/1 <input checked="" type="checkbox"/>	Centrifugare per 10 min nella centrifuga refrigerata a 20°C con rotore basculante a 3000 rcf

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

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

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

16/1 <input checked="" type="checkbox"/>	Applicare alle provette il componente della filtrazione del kit Steriflip, assemblandolo in posizione verticale
17/1 <input checked="" type="checkbox"/>	Ruotare delicatamente di 180° il Kit assemblato
18/1 <input checked="" type="checkbox"/>	Collegarlo alla pompa da vuoto per la filtrazione
19/1 <input checked="" type="checkbox"/>	Trasferire il filtrato nelle provette amicon ultra-15
20/1 <input checked="" type="checkbox"/>	Centrifugare per 20 min nella centrifuga refrigerata a 20°C con rotore basculante a 3500 rcf
21/1 <input checked="" type="checkbox"/>	Eliminare il filtrato e lavare il filtro riempiendo la parte superiore della Amicon ultra-15 con TRISHCl 50 mM [TRISHCl 50 Lotto <i>306</i>] e 400 µl di soluzione Complete (200 µl ogni 10 ml di urina)
22/1 <input checked="" type="checkbox"/>	Centrifugare per 20 min nella centrifuga refrigerata a 20°C con rotore basculante a 3500 rcf
23/1 <input checked="" type="checkbox"/>	Nel frattempo lavare le Amicon ultra-4 con 2 ml di acqua ultrapura ponendole a centrifugare a 5000 rpm per 20 min nella centrifuga refrigerata a 17°C con rotore ad angolo fisso.
24/1 <input checked="" type="checkbox"/>	Prelevare con una micropipetta dalla parte superiore della Amicon ultra-15 il residuo (circa 120 µl) e trasferirlo nelle Amicon ultra-4 precedentemente lavate (anche se si usa il FL162)
25/1 <input checked="" type="checkbox"/>	Centrifugare a 6200 rpm per 60 min nella centrifuga refrigerata a 17°C con rotore ad angolo fisso
26/1 <input checked="" type="checkbox"/>	Misurare il volume di ritentato, trasferirlo in una vial di raccolta e conservare in frigorifero (nel caso si intenda utilizzare oltre le 24 h, conservare in congelatore a -20°C)

II (PER TEST DI STABILITÀ)

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

**C - FOCALIZZAZIONE ISOELETTRICA
PREFOCALIZZAZIONE**

27 <input checked="" type="checkbox"/>	Accendere il refrigerante, impostando la temperatura a 8-10°C
28 <input checked="" type="checkbox"/>	Prelevare i campioni trattati dal frigo
29 <input checked="" type="checkbox"/>	Prelevare il Gelbond e tagliarlo di lunghezza pari a 16,5 cm utilizzando la parte più omogenea o lasciarlo tal quale
30 <input checked="" type="checkbox"/>	Posizionarlo sulla piastra del Multiphor II, già bagnata con kerosene [R-171 Lotto <i>306</i>]
31 <input checked="" type="checkbox"/>	Rimuovere l'eccesso di kerosene con carta da filtro

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

32	Preparare la soluzione catodica agglungendo a 1,9 ml di acqua ultrapura 100 µl di soluzione di anfoliti 6-8 [R-170 Lotto 007] e 10 µl di RMET ³ [Lotto 007]												
33	Posizionare sui lati più lunghi le strips imbevute rispettivamente della soluzione catodica ed anodica												
34	<p>Chudere il supporto e impostare i seguenti parametri:</p> <p>Potenziale: 250 V Corrente: 17 mA (proporzionale alle dimensioni del Gel) Potenza: 17 W Durata: 30 min/ 60min</p> <p>O nel caso la lunghezza del gel sia pari a 25 cm:</p> <p>Potenziale: 250 V Corrente: 25 mA Potenza: 25 W Durata: 30 min/ 60min</p> <p>Completare la seguente tabella con i parametri di inizio e fine corsa:</p> <table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <thead> <tr> <th>Potenziale (V)</th> <th>Corrente (mA)</th> <th>Potenza (W)</th> <th>Tempo (min)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>200</td> <td>25</td> <td>5</td> <td>01</td> </tr> <tr> <td>250</td> <td>14,9</td> <td>4</td> <td>50'</td> </tr> </tbody> </table>	Potenziale (V)	Corrente (mA)	Potenza (W)	Tempo (min)	200	25	5	01	250	14,9	4	50'
Potenziale (V)	Corrente (mA)	Potenza (W)	Tempo (min)										
200	25	5	01										
250	14,9	4	50'										
35	Prelevare gli standard dal congelatore												
36	<p>Preparare gli standard:</p> <p>MISCELA BRP NESP 1-2 (BRNE1-2) Aggiungere 0,32 – 0,16 ng³ di BRP [BRP Lotto 006] a 0,2 – 0,15ng³ di NESP [NESP Lotto 013]</p> <p>MISCELA BRP NIBSC (BRNIB) Aggiungere 0,16 ng³ di BRP [BRP Lotto] a 0,0025 ng³ di NIBSC [NIBSC Lotto]</p> <p>MISCELA NESP NIBSC (NENIB) Aggiungere 0,15 ng³ di NESP [NESP Lotto] a 0,0025³ ng di NIBSC [NIBSC Lotto]</p> <p>SOLUZIONE NIBSC 0,02UI - 0,04UI (NIBSC1- 2) Prelevare dalla soluzione standard [NIBSC Lotto 004] 10-20 µl, in modo tale da ottenere una soluzione da 0,02-0,04 UI</p> <p>SOLUZIONE MIRCERA (MIR) Prelevare 20 µl dalla soluzione standard di Mircera [MIR Lotto 005]</p> <p>SOLUZIONE Dynepo (Dyn) Prelevare 20 µl dalla soluzione standard di Dynepo [Dyn Lotto]</p>												
37a	Scaldare 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>												
38	Immergere i campioni precedentemente scaldati, nel bagno refrigerante per 30 s												
39	<p>Aggiungere: -ai campioni il 10% di Surfacts-amps 80 (Tween 80) [R-166 Lotto 004] per volume di ritentato</p> <p>-agli standard (eccetto Mircera) aggiungere 2,2 µl di Surfacts-amps 80 (Tween 80) [R-166 Lotto 004] ogni 20 µl</p>												

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

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

FOCALIZZAZIONE

40 <input 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 posizzionarli sulle strips⁴ secondo il seguente schema:</p> <p>BRNIB NENIB Dyn⁵ MIR NIBSC (1 o 2) BRNE (1 o 2) Bur⁵ USPrEPO⁵ CAMPIONI BRNE (1 o 2) NENIB BRNIB</p> <p>Oppure nel caso la lunghezza del gel sia pari a 25 cm:</p> <p>NIBSC (1 o 2) BRNE (1 o 2) Bur⁵ USPrEPO⁵ CAMPIONI BRNE (1 o 2) CAMPIONI BRNE (1 o 2) CAMPIONI NIBSC (1 o 2) BRNE (1 o 2) NIBSC (1 o 2) Dyn⁵ MIR</p>

Compilare la tabella seguente in base alla sequenza di caricamento:

Posizione	Campione	Volume di ritentato (µl)
1	BRP + NENB	16 + 80
2	MIR	20
3	USP MIR	22
4	BUR	18
5	IOE003 A U 33 S1A8	40
6	████████████████████	████████████████████
7	NIBSC	20
8	IOE003 A U 33 C	22

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

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

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

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

Handwritten notes in the table:
 Row 9: *WASC*
 Row 14: *BSP + NESP*
 Row 26: *BSP + NESP*
 Column 3 (rows 14, 26): *16+10*

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

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

43. Tagliare due rettangoli di Durapore e Immobilon P e 16 rettangoli di carta da filtro⁶ o simile delle dimensioni di 8 (esatti) x 16,5 cm. Nel caso la lunghezza del gel sia pari a 25 cm, le dimensioni sono 8 x 22,5 cm.

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

45. Quando il potenziale ha raggiunto circa 2800 Vh, preparare tre vaschette delle dimensioni di 25 x 25 x 8h cm contenenti rispettivamente metanolo [R-038 Lotto 093], acqua ultrapura e GLI-TRIS

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

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

46. 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. Immergere un rettangolo della Durapore nella vaschetta contenente GLI-TRIS per almeno 20 minuti e posizionarla sullo Slow mixer.

48. Quando la corsa elettroforetica è a circa 3500Vh nel caso lunghezza del gel sia pari a 16,5 cm o 3900Vh nel caso la lunghezza sia pari a 25 cm, appoggiare ai bordi della vaschetta contenente GLI-TRIS i fogli di carta da filtro in due pacchetti da quattro ciascuno, in modo tale che si imbevano di soluzione per capillarità.

49. Prolungare la corsa

SI NO andare al punto 50

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:

Potenziale (V)	Corrente (mA)	Potenza (W)	Potenziale per ora (Vh)	Tempo (min)

50. Eseguire il controllo visivo per verificare l'uniformità della migrazione del rosso metile e se possibile fotografare il gel

D - PRIMO BLOTTING

51. 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. 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. 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. Sovrapporre quindi un rettangolo di parafilm, facendo pressione con un rullo, per eliminare le bolle d'aria.

55. Capovolgere l'insieme (pacchetto, Immobilon P, Durapore e gel) sulla piastra Multiphor II

56. Rimuovere il gel dal Gelbond e sovrapporvi rapidamente il secondo pacchetto di carta da filtro

57. Sovrapporre quindi un rettangolo di parafilm, facendo pressione con un rullo, per eliminare le bolle d'aria.

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

58. <input checked="" type="checkbox"/>	<p>Chiudere il supporto e impostare i seguenti parametri:</p> <p>Potenziale: 40 V Corrente: Area del gel Potenza: 90 W Durata: 30 min</p> <p>Completare la seguente tabella con i parametri di inizio e fine corsa:</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Potenziale (V)</th> <th>Corrente (mA)</th> <th>Potenza (W)</th> <th>Tempo (min)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>10</td> <td>192</td> <td>2</td> <td>0'</td> </tr> <tr> <td>21</td> <td>192</td> <td>4</td> <td>30'</td> </tr> </tbody> </table>	Potenziale (V)	Corrente (mA)	Potenza (W)	Tempo (min)	10	192	2	0'	21	192	4	30'
Potenziale (V)	Corrente (mA)	Potenza (W)	Tempo (min)										
10	192	2	0'										
21	192	4	30'										
59. <input checked="" type="checkbox"/>	<p>Preparare PBS e DTT.</p> <p>PBS Portare a volume con acqua ultrapura in un matraccio da 1000 ml 5 tavolette di tampone fosfato salino [R-165 Lotto 026]. Mescolare mediante agitatore elettromagnetico.</p> <p>DTT Portare a volume con PBS in un matraccio da 250 ml 192,8 mg ditiotreitolo [R-182 Lotto 023]. Tale soluzione deve essere utilizzata entro trenta minuti dalla preparazione, causa ossidazione.</p>												
60. <input checked="" type="checkbox"/>	<p>Al termine della migrazione, dopo aver aperto il supporto</p> <p>Mettere in una vaschetta da 30x 15 x 8 cm 250 ml di DTT e immergervi il rettangolo di Immobilon P (IP1)</p>												
61. <input checked="" type="checkbox"/>	<p>Posizionare la vaschetta per 60 minuti in incubatore a 37°C.</p>												
62. <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>												
63. <input checked="" type="checkbox"/>	<p>Lavare la IP1 con PBS, mettere in una vaschetta da 30x 15 x 8 cm 250 ml di LFM 5% e immergervi il rettangolo di IP1</p>												
64. <input checked="" type="checkbox"/>	<p>Posizionare la vaschetta sullo Slow mixer per 60 min</p>												
65. <input checked="" type="checkbox"/>	<p>Lavare la IP1 con PBS</p>												
66. <input checked="" type="checkbox"/>	<p>Preparare la soluzione Clone AE75A</p> <p>Aggiungere 40 µl di anticorpo antiipo [R-173 Lotto 023] a 40 ml di LFM 1%</p>												
67. <input checked="" type="checkbox"/>	<p>Mettere in una vaschetta di vetro da 17x 8 cm (dimensioni interne-oppure da 25x 13 cm in caso di gel da 25 cm) 40 ml di soluzione Clone AE75A e immergervi la IP1</p>												
68. <input checked="" type="checkbox"/>	<p>Posizionare la vaschetta sullo Slow mixer per 60 min: in caso di tempi superiori, porre lo Slow mixer in frigorifero (in quest'ultimo caso dopo aver tolto la vaschetta dal frigorifero lasciarla ad agitare sullo Slow mixer a T ambiente per circa 20 min)</p>												

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

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

- 69 Preparare le soluzioni:
 -PBS

 -LFM 0,5%
 Portare a volume con PBS in un matraccio da 2000 ml 10 g di latte in polvere a bassi grassi [R-176 Lotto *037*]. Agitare con agitatore magnetico.
 -250 ml di:
 LFM 5%
 INK: aggiungere 250 µl di Indian Ink [R-177 Lotto] a 250 ml di LFM 5% precedentemente preparato
- 70 Lavare in una vaschetta da 30x 15 x 8 cm la IP1 con la soluzione LFM 0,5%, ponendola sullo Slow mixer per 1 minuto
- 71 Effettuare tale lavaggio per altre tre volte ponendo la vaschetta sullo Slow mixer per 10 minuti

E - SECONDO BLOTTING

- 72 Preparare l'acido acetico 0,7%
 Portare a volume con acqua ultrapura in un matraccio da 500 ml 3,5 ml di acido acetico [R-003 Lotto *03*].
- 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-036 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 Immergere un rettangolo della Durapore nella vaschetta contenente acido acetico allo 0,7% per almeno 20 minuti.
- 76 5 minuti prima di utilizzarli, appoggiare ai bordi della vaschetta contenente acido acetico 0,7% i fogli di carta da filtro o simile in due pacchetti da quattro ciascuno⁶, in modo tale che si imbevano di soluzione per capillarità
- 77 Sulla piastra del Nova Blot posizionare il pacchetto da quattro fogli di carta da filtro
- 78 Lavare la IP1 con PBS e sovrapporla rapidamente al pacchetto
- 79 Sovrapporre rapidamente la Durapore
- 80 Sovrapporre rapidamente la Immobilon P (al termine della corsa nominata (P2)
- 81 Sovrapporre rapidamente il pacchetto da quattro fogli di carta da filtro⁶
- 82 Sovrapporre quindi un rettangolo di parafilm, facendo pressione con un rullo, per eliminare le bolle d'aria.
- 83 Chiudere il supporto e impostare i seguenti parametri:
 Potenziale: 35 V
 Potenza: 40 W
 Corrente: 0,8 mA x Area del gel
 Durata: 10 min

 Completare la seguente tabella con i parametri di inizio e fine corsa:

Potenziale (V)	Corrente (mA)	Potenza (W)	Tempo(min)
<i>Y</i>	<i>150</i>	<i>1</i>	<i>0</i>
<i>Y</i>	<i>150</i>	<i>1</i>	<i>10</i>

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

84 <input checked="" type="checkbox"/>	Si è interrotta l'analisi all'incubazione con l'anticorpo primario
	SI <input type="checkbox"/> NO <input checked="" type="checkbox"/> andare al punto 85
	Preparare la soluzione LFM 1% Portare a volume con PBS in un matraccio da 100 ml 1 g di latte in polvere a bassi grassi [R-178 Lotto <i>037</i>]. Agitare con agitatore magnetico.
85 <input checked="" type="checkbox"/>	Al termine della seconda migrazione aprire il supporto, prelevare il rettangolo di IP2 e immergerlo in una vaschetta da 30x 15 x 8 cm 250 ml di LFM 5% (oppure INK); immergere la IP1 in una vaschetta contenente PBS e conservarla in frigo fino al termine dell'analisi.
86 <input checked="" type="checkbox"/>	Posizionare la vaschetta sullo Slow mixer per 60 min.
87 <input checked="" type="checkbox"/>	Lavare la IP2 con PBS
88 <input checked="" type="checkbox"/>	Preparare ANTI IgG Aggiungere: <input checked="" type="checkbox"/> 26 µl di anticorpo segnato con la biotina Pierce [R-175 Lotto <i>037</i>] a 40 ml di LFM 1% <input type="checkbox"/> 10 µl di anticorpo segnato con la biotina Paris [R-175 Lotto <i>037</i>] a 40 ml di LFM 1%
89 <input checked="" type="checkbox"/>	Mettere in una vaschetta di vetro da 17x 8 cm (dimensioni interne-opp. da 25x13 in caso di gel da 25 cm) 40 ml di soluzione ANTI IgG e immergervi la IP2
90 <input checked="" type="checkbox"/>	Posizionare la vaschetta sullo Slow mixer per 90 min, in caso di tempi superiori posizionare lo Slow mixer in frigo (in quest'ultimo caso dopo aver tolto la vaschetta dal frigorifero lasciarla ad agitare sullo Slow mixer a T ambiente per circa 20 min)
91 <input checked="" type="checkbox"/>	Preparare le soluzioni PBS la soluzione LFM 0,5% Portare a volume con PBS in un matraccio da 2000 ml 10 g di latte in polvere a bassi grassi [R-178 Lotto <i>037</i>]. 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 <i>037</i>]. 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 <i>037</i>] a 40 ml di LFM 1% <input type="checkbox"/> Aggiungere 20 µl di streptavidina perossidasi Biospa [R-174 Lotto <i>037</i>] a 40 ml di LFM 1%
97 <input checked="" type="checkbox"/>	Lavare la IP2 con PBS
98 <input checked="" type="checkbox"/>	Mettere in una vaschetta di vetro da 17x 8 cm (dimensioni interne-opp. da 25x13 in caso di gel da 25 cm) 40 ml di soluzione Perossidasi e immergervi la IP2
99 <input checked="" type="checkbox"/>	Posizionare la vaschetta sullo Slow Mixer per almeno un'ora
100 <input checked="" type="checkbox"/>	Lavare in una vaschetta da 30x 15 x 8 cm la IP2 con la soluzione PBS, ponendola sullo Slow Mixer per 1 minuto
101 <input checked="" type="checkbox"/>	Ripetere tale lavaggio per altre due volte
102 <input checked="" type="checkbox"/>	Effettuare tale lavaggio per altre tre volte ponendo la vaschetta sullo Slow Mixer per 10 minuti

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

103. <input checked="" type="checkbox"/>	Preparare <input checked="" type="checkbox"/> subito prima di utilizzarla la soluzione Covalight, mescolando uguali volumi (15 ml + 15 ml) delle due soluzioni West Pico Pierce [R-176 Lotto <i>21, 7</i>]; <input type="checkbox"/> 10 minuti prima del suo utilizzo la soluzione Covalight, conservandola al buio; aggiungendo 25 gocce di CovB [R-176 B Lotto <i>21, 7</i>] in 25 ml di CovA [R-176 A Lotto <i>21, 7</i>].
104. <input checked="" type="checkbox"/>	Mettere in una vaschetta di vetro da 17x 8 cm (dimensioni interne-oppure da 25x 13 in caso di gel da 25 cm) la soluzione Covalight preparata al punto precedente e immergervi la IP2
105. <input checked="" type="checkbox"/>	Agitare la vaschetta per qualche secondo

F - RIVELAZIONE MEDIANTE CHEMILUMINESCENZA

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

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

Operatore Sigla e Firma	Data	Operazioni eseguite
<i>cos S. P. ...</i>	<i>20/5/10</i>	da punto [] a punto [21] e da [10] a [20/11]
<i>cos S. P. ...</i>	<i>21/5/10</i>	da punto [21] a punto [21] e [22]
<i>cos S. P. ...</i>	<i>22/5/10</i>	da punto [R1] a punto [10]
		da punto [] a punto []
		da punto [] a punto []
		da punto [] a punto []
		da punto [] a punto []

II.3.4 Confirmation Test Results

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

TOTAL IMAGE OF THE GEL

THE RECTANGLE INDICATES THE AREA SELECTED FOR PROCESSING THE DENSITOMETRY DATA



GENERAL VIEW OF ALL THE PROCESSED LANES

22/05/2010
13:38
GASepo Analysis Report

Laboratory: Laboratory
Date of Analysis: 22/05/2010
 13:27

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

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

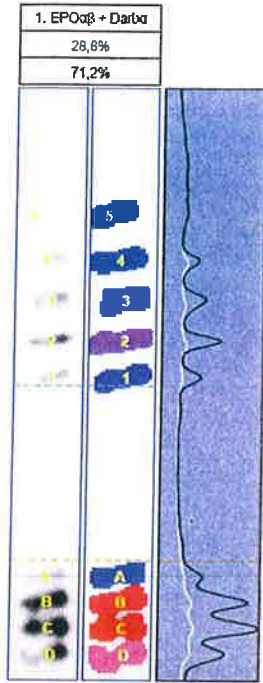
GASepo software v2.2004.007 - Laboratorio Antidoping - FMSI - Roma
 Page 2/22

POSITIVE CONTROL: RHEPO AND NESP STANDARDS (BRNE)

22/05/2010 13:39 **GASepo Analysis Report**

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

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



Lane #1: EPOαβ + Darbα									
Name	Comment	CentX	CentY	Volume Abs	Volume nSum	Volume nMax	Height Abs	Height nSum	Height nMax
5		9,5	68,8	159,8	0,2	0,5	2,8	0,4	1,6
4		16,2	83,1	3780,3	3,9	15,0	33,4	4,4	18,3
3		19,3	114,8	7648,5	7,8	30,3	62,5	8,2	34,3
2		19,0	136,8	9870,9	10,1	39,1	100,5	13,2	55,2
1		20,1	156,9	5943,3	8,1	23,6	51,7	6,8	28,4
A		18,7	265,0	6415,2	6,6	25,4	42,3	5,6	23,3
B		19,0	278,8	21840,1	22,5	87,0	146,5	19,3	80,5
C		20,0	293,0	25226,6	25,9	100,0	182,1	24,0	100,0
D		21,2	307,8	14168,9	14,5	56,2	124,9	16,4	66,6

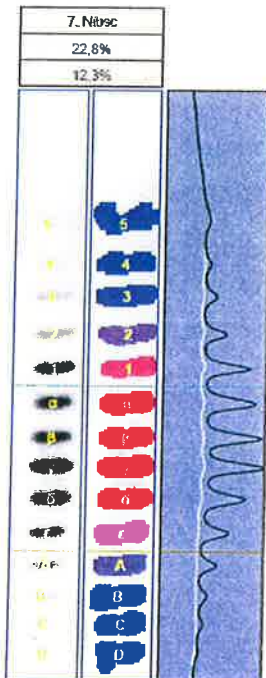
GASepo software v. 2004-07-07. Development: www.gas.epo.org

NEGATIVE CONTROL: URINARY EPO STANDARD (NIBSC)

22/05/2010 13:39 **GASepo Analysis Report**

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

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



Lane #7: Nibsc									
Name	Comment	CentX	CentY	Volume Abs	Volume nSum	Volume nMax	Height Abs	Height nSum	Height nMax
5		16,5	72,9	115,7	0,2	1,1	2,3	0,4	2,5
4		18,3	94,7	1219,7	1,8	11,8	9,3	1,8	10,3
3		19,1	112,6	2628,6	4,0	25,4	18,6	3,2	20,6
2		20,4	133,4	3814,4	5,7	36,9	32,2	5,5	35,7
1		21,0	151,8	7310,7	11,0	70,8	71,0	12,2	78,7
α		20,5	170,9	9763,1	14,7	94,5	79,9	13,8	68,6
β		20,1	189,9	9639,7	14,5	83,3	90,2	15,5	100,0
γ		20,3	205,8	10332,6	15,6	100,0	88,7	15,3	98,3
δ		20,5	223,1	7899,7	11,9	76,5	73,0	12,6	80,9
ε		18,9	241,3	5389,9	8,1	52,2	42,9	7,4	47,5
A		18,6	259,0	3443,2	5,2	33,3	30,6	5,3	33,9
B		17,4	275,9	2441,5	3,7	23,6	16,8	2,9	18,7
C		19,1	290,5	1465,0	2,2	14,2	11,1	1,9	12,3
D		18,7	307,2	818,5	1,2	7,9	7,3	1,3	8,1

GASepo software v. 2004-07-07. Development: www.gas.epo.org

POSITIVE CONTROL: MIRCERA (MIR)

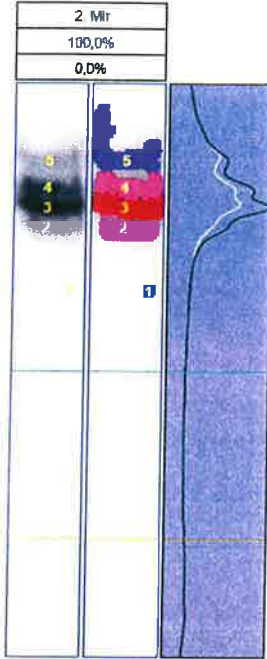
22/05/2010
13:39

GASePo Analysis Report



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

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



Lane #2: Mir									
Name	Comment	CentX	CentY	Volume Abs	Volume nSum	Volume nMax	Height Abs	Height nSum	Height nMax
5		18,2	42,9	5034,2	16,5	34,5	21,3	14,6	31,7
4		17,5	57,8	8927,5	29,3	61,2	38,2	26,1	56,9
3		17,5	69,3	14586,8	47,9	100,0	67,1	45,9	100,0
2		17,1	80,7	6886,6	22,6	47,2	40,0	27,3	59,5
1		30,4	116,3	31,8	0,1	0,2	1,1	0,7	1,6

12.1.1

SAMPLE INTERNAL LABORATORY CODE 0910E003 A4433: CONFIRMATION

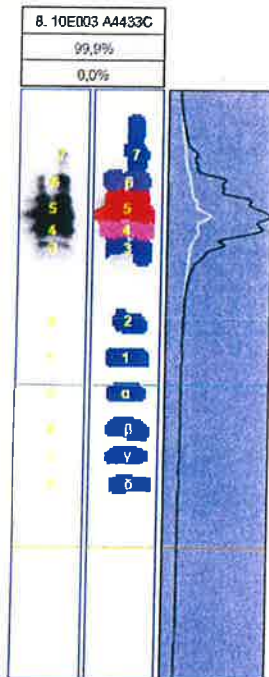
22/05/2010
13:39

GASePo Analysis Report



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

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



Lane #8: 10E003 A4433C									
Name	Comment	CentX	CentY	Volume Abs	Volume nSum	Volume nMax	Height Abs	Height nSum	Height nMax
7		21,7	34,9	8102,8	6,4	13,7	109,3	14,9	54,4
6		18,2	50,2	19416,8	15,4	32,9	196,7	26,8	98,0
5		17,4	64,6	59066,7	47,0	100,0	200,8	27,4	100,0
4		17,4	76,7	32938,6	28,2	55,8	192,9	26,3	96,8
3		18,1	86,4	13730,6	18,9	23,2	134,3	18,3	66,9
2		18,9	126,4	274,7	0,2	0,5	2,8	0,4	1,4
1		18,0	146,1	172,6	0,1	0,3	2,3	0,3	1,2
α		18,4	165,9	99,0	0,1	0,2	1,5	0,2	0,8
β		20,1	184,9	37,0	0,0	0,1	0,9	0,1	0,5
γ		20,0	199,9	25,8	0,0	0,0	0,9	0,1	0,5
δ		20,7	215,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

12.1.1

SAMPLE INTERNAL LABORATORY CODE 0910E003 A4433: STABILITY TEST

22/05/2010
13:39

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

GASepo Analysis Report

GAS
epo

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

5. 10E003 A4433Slab	
27,2%	
72,8%	

Lane #5: 10E003 A4433Slab									
Name	Comment	CentX	CentY	Volume Abs	Volume nSum	Volume nMax	Height Abs	Height nSum	Height nMax
6		20,4	47,8	209,4	0,3	0,9	1,7	0,2	0,9
5		18,2	73,8	960,5	1,2	4,2	8,9	1,2	4,8
4		17,9	96,8	3794,0	4,6	16,6	38,7	5,0	19,8
3		19,2	116,6	6786,4	8,2	29,7	69,2	9,5	37,3
2		19,8	137,3	6784,9	8,2	29,6	77,3	10,6	41,8
1		19,1	156,7	3618,5	4,4	15,8	38,0	5,2	20,4
A		21,5	280,1	4486,2	5,4	19,6	39,1	5,4	21,1
B		21,3	275,0	16395,1	19,9	71,6	138,9	19,0	74,8
C		21,3	287,9	22883,8	27,8	100,0	185,6	25,5	100,0
D		20,7	301,6	13566,5	16,5	59,3	107,6	14,8	58,0
E		18,1	316,1	1912,1	2,3	8,4	17,7	2,4	9,5

POSITIVE REFERENCE SAMPLE (USPMir)

22/05/2010
13:36

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

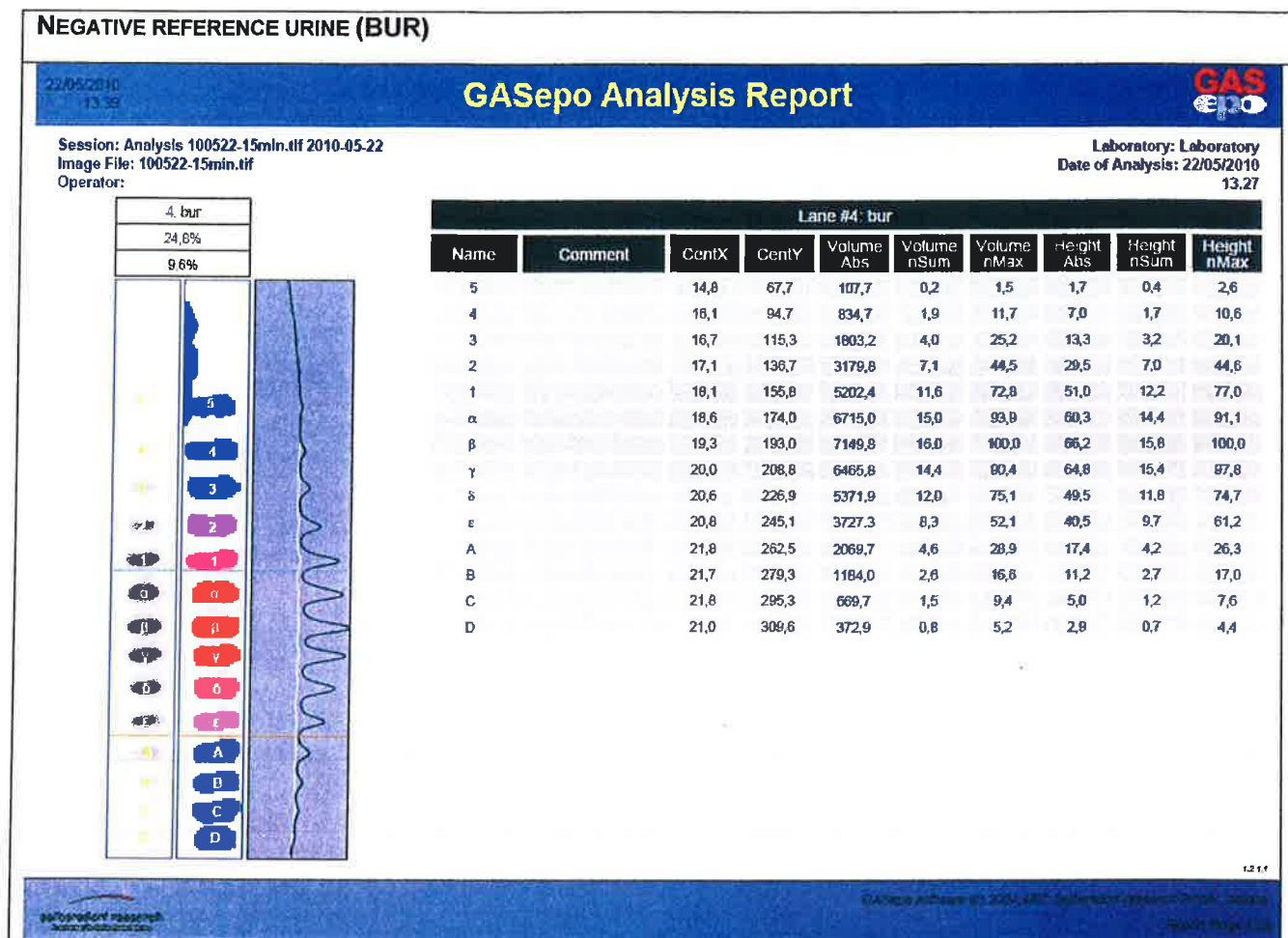
GASepo Analysis Report

GAS
epo

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

3. Usp Mir	
64,7%	
4,1%	

Lane #3: Usp Mir									
Name	Comment	CentX	CentY	Volume Abs	Volume nSum	Volume nMax	Height Abs	Height nSum	Height nMax
9		22,0	13,1	354,8	0,7	3,0	3,1	0,7	3,3
8		21,8	31,0	1228,6	2,3	10,5	10,1	2,4	10,8
7		19,1	46,6	3315,1	6,1	28,4	28,9	7,0	31,0
6		18,8	61,2	4921,1	9,1	42,2	42,8	10,4	45,9
5		16,9	71,9	11667,0	21,5	100,0	93,2	22,6	100,0
4		15,1	83,0	6497,7	12,0	55,7	40,9	9,9	43,9
3		17,6	113,6	1435,1	2,6	12,3	7,7	1,9	8,3
2		18,5	135,7	2084,9	3,8	17,9	11,9	2,9	12,8
1		19,5	155,1	3527,2	6,5	30,2	26,7	6,5	28,7
a		20,2	174,2	3706,5	6,8	31,8	26,0	6,3	27,9
B		20,8	193,0	3968,0	7,3	34,0	31,3	7,6	33,6
γ		21,1	208,7	3807,0	7,0	32,5	29,0	7,2	32,1
δ		21,4	226,9	3373,5	6,2	28,9	26,7	6,5	28,6
e		21,6	245,6	2077,4	3,8	17,8	16,5	4,0	17,7
A		22,5	263,3	1043,6	1,9	8,9	7,7	1,9	8,3
B		23,2	280,0	601,1	1,1	5,2	4,8	1,2	5,2
C		23,8	296,0	368,5	0,7	3,2	3,0	0,7	3,2
D		23,3	311,3	203,6	0,4	1,7	1,8	0,4	2,0



II.3.5 Test Validity Data

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

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

II.3.6 Result review

FEDERAZIONE MEDICO SPORTIVA ITALIANA LABORATORIO ANTIDOPING	FOGLIO DI LAVORO	FL039
VERBALE DI COMUNICAZIONE RISULTATI DI CONFERMA		

Rif. PG001	Pag.	1/1
	Rev.	2

LOTTO DI ACCETTAZIONE: JOECO3	CODICE INTERNO: A4433
CONFERMA PER: MERCERA	DATA: 22/5/10

VALUTAZIONE/OSSERVAZIONI
PRESENZA DI MERCERA SECONDO CRITERI DI POSITIVITÀ INTERNI;

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 (EPO/NESP) (FL158)
<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> ALTRO <u>FL010</u>

(*) n.a. : non applicabile

RESPONSABILE
ESECUZIONE PROVA

eos

Sigla

Stefano

Firma

=====

VALUTAZIONE/OSSERVAZIONI DEL DIRETTORE SCIENTIFICO

OK - criteri interni di positività soddisfatti. Lavoro consegnato al lab di Parigi per 2nd opinion

DIRETTORE SCIENTIFICO:

[Signature]

Sigla

[Signature]

Firma

DATA: 22/5/10

II.3.7 Conclusions

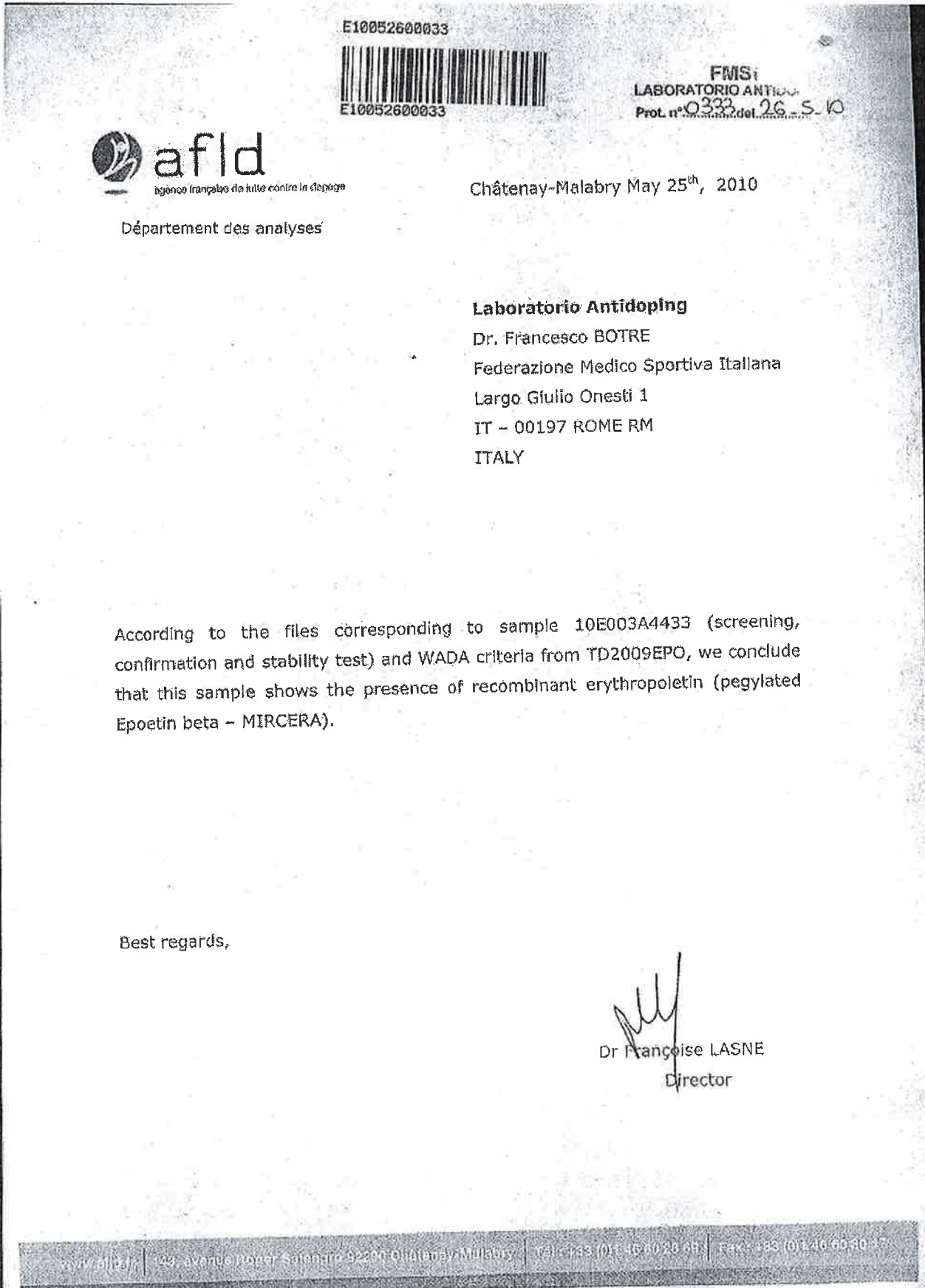
Data were evaluated according to the WADA technical document TD2009EPO.

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

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

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

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



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

Prof. 1725/DEX/rst

Data/Date 26/05/2010

RAPPORTO DI PROVA SUPPLEMENTARE AL / SUPPLEMENTARY TEST REPORT TO / PROT. 1512/FMR/SLX
RISERVATA PERSONALE/CONFIDENTIAL

A/To:	IAAF				
Att.ne/Attention:	Dr. G. DOLLE				
Indirizzo/Address:	BP 350, 98007				
GAP Città Nazionale/PC Place Country:	MONACO CEDEX				
LOTTO DI ACCETTAZIONE/RECEIPT BATCH:	10E003	CATENA DI CUSTODIA/TEST MISSION CODE:		IAAF 03/2010	
RICHIEDENTE /RICHIEDENTE:	FIDAL	FEDERAZIONE /FEDERATION	IAAF		
SPORT-GARA/SPORT-EVENT:	ATHLETICS - GARA INT.LE DI MARCIA 20 KM - IAAF		LUOGO /PLACE:	SESTO SAN GIOVANNI	
DATA DELLA GARA DATE OF EVENT:	01/05/2010	DATA/ORA DI ARRIVO CAMPIONI: RECEIPT OF SAMPLES	02/05/10 - 8.20		
INIZIO ANALISI: START OF ANALYSIS	03/05/2010	FINE ANALISI: END OF ANALYSIS	26/05/2010		
TIPO DI CAMPIONE/TYPE OF SAMPLE:	URINA/URINE	TIPO DI TEST: TYPE OF TEST:	IN COMPETIZIONE CON EPO/INESP/IN COMPETITION WITH EPO/INESP		
CODICI DEI CAMPIONI ANALIZZATI/SAMPLE CODES					
CODICE INTERNO INTERNAL CODE	CODICE ESTERNO EXTERNAL CODE	SESSO GENDER	CODICE INTERNO INTERNAL CODE	CODICE ESTERNO EXTERNAL CODE	SESSO GENDER
A4433	3511158	M	--	--	--

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

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

RISULTATI/RESULTS:

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

Adverse Analytical Finding

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

- CONTINUOUS ERYTHROPOIETIN RECEPTOR ACTIVATOR (CERA)

NOTE, PARERI ED INTERPRETAZIONI /NOTES, OPINIONS AND INTERPRETATIONS

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

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

CC: WADA (ADAMS)

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

Page 1/ 1

