

FEDERAZIONE MEDICO SPORTIVA ITALIANA

LABORATORIO ANTIDOPING

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

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

Reviewed by:

Date:

*Xavier de la*  
*27.7.10*

Approved by:

Date:

*Franco Jester*  
*27.07.2010*

LABORATORIO ANTIDOPING FMSI

LARGO GIULIO ONESTI,1

00197 ROME, ITALY

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

THIS DOCUMENT CONTAINS AUTHENTIC COPIES

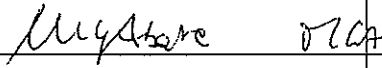
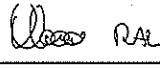

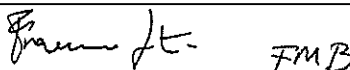
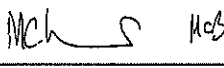

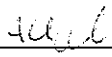
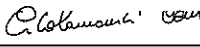
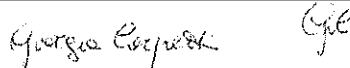

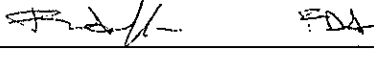
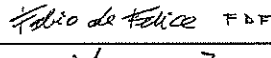
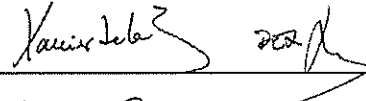

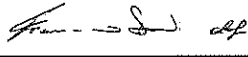

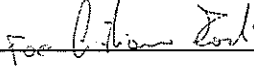
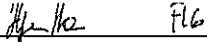
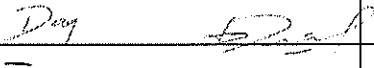
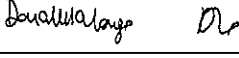
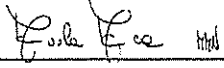

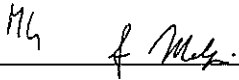
OF THE ORIGINAL LABORATORY DOCUMENTATION

## TABLE OF CONTENTS

List of Laboratory Staff Involved in the Test .....	4
Summary of Chain of Custody.....	6
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. "B" Analysis sample opening forms .....	13
I.6 Sample chain of custody (Distribution forms of new aliquots) .....	18
SECTION II: SAMPLE 3511158 CONFIRMATION PROCEDURE.....	20
II.1 Preliminary tests .....	21
II.1.1 Visual inspection.....	21
II.1.2 Preanalysis results forms .....	22
II.1.3 Preliminary determinations .....	23
II.1.4 Preliminary determinations results.....	24
CONTINUOUS ERYTHROPOIETIN RECEPTOR ACTIVATOR (CERA) CONFIRMATION RESULTS .....	26
II.2 Confirmation Test Data - IEF .....	27
II.2.1 Confirmation procedure IEF Test Description.....	27
II.2.2 Instruments and instrumental conditions .....	28
II.2.3 Confirmation procedure - Aliquot chain of custody documentation.....	30
II.2.4 Confirmation Test Results .....	40
II.2.5 Test Validity Data .....	45
II.2.6 Confirmation IEF conclusions .....	46
II.2.7 Second Confirmation procedure - Aliquot chain of custody documentation....	47

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

## List of Laboratory Staff Involved in the Test

SURNAME NAME	INITIALS	POSITION TITLE	SIGNATURE AND HANDWRITTEN INITIALS	INVOLVED
ABATE MARIA GABRIELLA	MGA	ROUTINE DATA MANAGER SENIOR ANALYST	 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	
CURCIO DAVIDE	CUR	SENIOR ANALYST	 CUR	
DE ANGELIS FRANCESCA	FDA	ANALYST	 FDA	
DE FELICE FABIO	FDL	TECHNICAL SECRETARIAT	 FDL	
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	X
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>Romani Roberto</i> RRM	
SPIRITO ELENA	ESP	QUALITY MANAGER	<i>Elena Spirito</i> ESP	
STEFANUCCI ROBERTA	RST	TECHNICAL SECRETARIAT	<i>Stefanucci Roberta</i> RST	
STRANO ROSSI SABINA	SSR	SENIOR ANALYST	<i>Sabrina Strano</i> SSR	
TURI STEFANIA	TUS	SENIOR ANALYST	<i>Stefania Turi</i> TUS	X
VENDEMIATI DAVIDE	DAV	TECHNICAL SECRETARIAT	<i>David Vende</i> DAV	

## Summary of Chain of Custody

Sample code 3511158 (A+B bottles) was delivered to the laboratory together with 5 other samples (A+B bottles) by TNT and received by MLJ\* on 02/05/2010; samples were registered and visually inspected by SBR on 03/05/2010. Sample 3511158 was identified with internal code 10E003 B4433. The "B" samples were immediately stored in the freezer (-20°C). The "B" analysis started on 14/06/2010 at the presence of Prof. Helge Oftebro, Mr. Stephan Platzer and Mr. Erik Tysse, the "B" sample identified with internal code 10E003 B4433 was visually inspected by FAF.

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

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

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

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

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

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

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



## CHAIN OF CUSTODY FORM

IAAF TESTING AUTHORITY FMSI SAMPLE COLLECTION AGENT

**1. DOPING CONTROL STATION**

DOB NAME: MARIA CATERINA MASSIMILIANO SCORZI  OUT OF COMPETITION  IN COMPETITION

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

AMOUNT OF SAMPLES: 12   DATE: 01/05/2010 TIME: 19:05

**2. SAMPLE I.D.**

NO.	UPL	PLAS	URIN	BLOOD	HGH	HEAR	THANK	SCORES
1	<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"/>
2	<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"/>
3	<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"/>
4	<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"/>
5	<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"/>

3511158

**3. CHANGE OF STORAGE**

STORAGE LOCATION #1: CAMPIONE SAN PIETRO S. GIOVANNI S. GIOVANNI

DATE: 01/05/2010 TIME: 19:08

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

STORAGE LOCATION #2: \_\_\_\_\_

DATE: \_\_\_\_\_ TIME: \_\_\_\_\_

STORAGE CONDITIONS: ROOM TEMPERATURE  COOL  OTHER  SDO SIGNATURE: \_\_\_\_\_

STORAGE LOCATION #3: \_\_\_\_\_

DATE: \_\_\_\_\_ TIME: \_\_\_\_\_

STORAGE CONDITIONS: ROOM TEMPERATURE  COOL  OTHER  SDO SIGNATURE: \_\_\_\_\_

STORAGE LOCATION #4: \_\_\_\_\_

DATE: \_\_\_\_\_ TIME: \_\_\_\_\_

STORAGE CONDITIONS: ROOM TEMPERATURE  COOL  OTHER  SDO SIGNATURE: \_\_\_\_\_

**4. TRANSFER TO LABORATORY**

THE RECIPIENT FROM FINAL STORAGE LOCATION: 19:08 DATE: 01/05/2010

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

NAME: MASSIMILIANO SCORZI SIGNATURE: [Signature] NAME OF THE LABORATORY: ACQUINOSA ROMA

TRANSFER BY COURIER

COURIER NAME: TNT COURIER NO.: NT-81322786-2

WEIGHT SIGNATURE: [Signature] COURIER NAME: ALBERTO DI BLASI CLASS: N.C.

TRANSFER BY OTHER MEANS

**5. RECEIPT BY LABORATORY**

NAME OF THE LABORATORY RECIPIENT: MOVIOMI

POSITION IN THE LABORATORY: LABORANTE

RECEIVED THIS SAMPLE FROM THE SDO ON THE DATE: 02/05/2010 TIME: 08:20

DO THE COOL REMINDER OF THE RECEIVED SAMPLE PERTAIN TO THE SAMPLE CODES LISTED IN 2. ABOVE?  YES  NO

ARE THE VIALS SEALED?  YES  NO

IS THE SAMPLE PACKED?  YES  NO

COMMENTS: \_\_\_\_\_

LABORATORY AUTHORIZED SIGNATURE: [Signature]

PLEASE SEND THIS FORM IMMEDIATELY TO THE IAAF BY FAX +372 91 50 83 05



Consigliatore		Filiale partenza		Filiale arrivo		Data spedizione		Orario		MOLLA DI STABIANNA	
Mittente						Destinatario				Crociare se FERMO DEPOSITO	
Via		Tel		Via		Tel		Città		ed indicare telefono destinatario	
Città		Cap		Città		Cap		N. coli		Segn. coll.	
Pesa		Contenuto		P. fondo kg		Volume		BASTI POCO		GRANDI	
Press		Coma		Viale		Frenzo alla		Incluso		Totale	
CROCIARE SE SPETTATO A DOMICILIO		ESIGERE ASSICURAMENTO		FATTURAZIONE FINE MISE		CROCIARE SE STRACCO 15%		CROCIARE SE 10% P.L.I.E.		TNT	
NUMERO LETTERA DI VETTURA		NT		81322796-2		TNT Global Express S.p.A. Società per azioni con sede in Roma, Viale della Repubblica, 11 - 00144 SAN MARCO (RM) - Italia		Tel. (06) 23 24 30 - Telefax (06) 47 23 619		Pagine internet e fax (06) 23 24 30 - Fax (06) 47 23 619	
Firma mittente per esente ad agevolazione condizioni speciali (se non)		Per recupero contrassegno e/o anticipata emissione porta allegata		Tempi e firma ricevente		2022 Milano					

B - COPIA PER DESTINATARIO

# I.2 Doping control form

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



## DOPING CONTROL FORM FORMULAIRE DE CONTROLE ANTIDOPAGE

IAAF	FORM
GLOBAL AFFILIATION * AFFILIEE DE LA FEDERATION - AFFILIEE COLLECTIVE MONTAGNE ET PATRIMOINE	

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

Alhass

### TESTING LOCATION • LIEU DU TEST

[Large shaded area for handwritten notes]

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

IAAF	ATHLETICS	DATE OF THE TEST / DATE DU CONTROLE	1 / 1	20 / 1	2015	VENUE / LIEU	IAAF-03 / 2015
URINE	A1	IAAF WORLD CODE NUMBER * NUMERO MONDIAL D'IDENTIFICATION	3511158	TIME / HEURE	13:42	OUT OF COMPETITION / EN COMPETITION	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>
EPO	<input checked="" type="checkbox"/>	VOL. UR	125	DIETIC SUPPL. / SUPPL. DIETITIQUE	1025	AT THE TIME OF DOPING CONTROL / CHEZ LE JURY AU MOMENT DU CONTROLE ANTIDOPAGE	17:15
URINE	A/B	BIODATA	[Graphs]	TIME / HEURE	[Graphs]	REMARKS BY BLOOD TRANSFUSION OVER THE LAST 6 MONTHS / REMARQUES DE TRANSFUSION SANGUINE AU COURS DES 6 MOIS PRECEDENTS	
EPO	<input type="checkbox"/>	VOL. SANG	[Graphs]	DIETIC SUPPL. / SUPPL. DIETITIQUE	10	REMARKS BY BLOOD TRANSFUSION OVER THE LAST 6 MONTHS / REMARQUES DE TRANSFUSION SANGUINE AU COURS DES 6 MOIS PRECEDENTS	
BLOOD / SANG	A/B	BIODATA	[Graphs]	TIME / HEURE	[Graphs]	REMARKS BY BLOOD TRANSFUSION OVER THE LAST 6 MONTHS / REMARQUES DE TRANSFUSION SANGUINE AU COURS DES 6 MOIS PRECEDENTS	
DECLARATION OF SIGNATURE / DECLARATION DE SIGNATURE I, the undersigned, declare that the information provided is true and correct. / Je soussigné(e) déclare que les informations fournies sont vraies et correctes. I, the undersigned, declare that the information provided is false and incorrect. / Je soussigné(e) déclare que les informations fournies sont fausses et incorrectes. Signature: _____ Date: _____							

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

[Large shaded area for handwritten notes]

Document ID: IAAF-003-2-001

### I.3 Laboratory sample reception form

FEDERAZIONE MEDICO SPORTIVA ITALIANA LABORATORIO ANTIDOPING	FOGLIO DI LAVORO	FL103
ACCETTAZIONE STRAORDINARIA		
Rif. PG001	Pag. 1/1	Rev. I

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"/> CORRIERE	IDENTIFICATIVO TNT	N° VETTURA 81322796-2	
<input type="checkbox"/> POSTA	IDENTIFICATIVO	N° VETTURA	
<input type="checkbox"/> ALTRO	IDENTIFICATIVO / COGNOME E NOME	N° VETTURA / FIRMA	
N° CATENA DI CUSTODIA	LAFF 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)

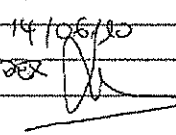

RIF. FL046 1008

FEDERAZIONE MEDICO SPORTIVA ITALIANA LABORATORIO ANTIDOPING		FOGLIO DI LAVORO		FL102	
<b>ACCETTAZIONE E REGISTRAZIONE CAMPIONI</b>					
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>					
<b>PARTE I- ACCETTAZIONE</b>					
DATA DI RICEVIMENTO: <u>02/05/2010</u>		ORA		<u>8.20</u>	
RICEVUTA TRAMITE: <u>CORRIERE</u>					
<b>PARTE II- GARA DI APPARTENENZA</b>					
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>
<b>PARTE III- REGISTRAZIONE CODICI ESTERNI CAMPIONI A E B E ASSEGNAZIONE CODICI DI LABORATORIO</b>					
CAMPIONI A E B		CAMPIONI A E B		CAMPIONI A E B	
CODICE ESTERNO	CODICE INTERNO	CODICE ESTERNO	CODICE INTERNO	CODICE ESTERNO	CODICE INTERNO
[REDACTED]		[REDACTED]		[REDACTED]	
<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>					
<b>IL LOTTO E' STATO ACCETTATO REGOLARMENTE?</b>					
<input checked="" type="checkbox"/> SI		<input type="checkbox"/> NO VEDERE RAPPORTO FL002 RIF. PNC			
		N° _____		PROT _____	
		N° _____		PROT _____	
		N° _____		PROT _____	
CAMPIONI SOSPESI: _____					


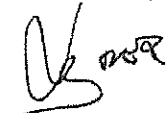
DATA, SIGLA E FIRMA DEL RESPONSABILE ACCETTAZIONE 03/05/2010

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

FEDERAZIONE MEDICO SPORTIVA ITALIANA LABORATORIO ANTIDOPING	FOGLIO DI LAVORO	FL090
NUOVO VERBALE DI APERTURA IN CONTROANALISI		
Rif. PG002-Allegato	Pag. 1/2	Rev. 3

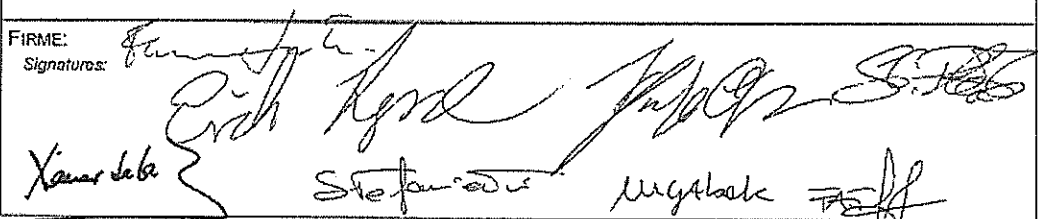
DATA DI CONTROANALISI: 14/06/2010 "B" sample analysis date:	ORA DI INIZIO: 09:00 Start time:
L'APERTURA DEL CAMPIONE "B" SI SVOLGE ALLA PRESENZA DI: People witnessing "B" sample opening:	
COGNOME E NOME Last name and first name	QUALIFICA * Position
TYSSE ERIK	ATHLETE
PLÄTZER STEPHAN	TRAINER
OETEBROKHELGE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

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

FEDERAZIONE MEDICO SPORTIVA ITALIANA LABORATORIO ANTIDOPING	FOGLIO DI LAVORO	FL090
NUOVO VERBALE DI APERTURA IN CONTROANALISI		
Rif. PG002-Allegato		Pag. 2/2 Rev. 3

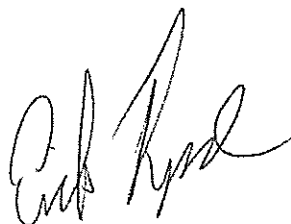
VERIFICA DELLO STATO DEL CAMPIONE "B" "B" SAMPLE CONDITIONS	
CAPSULA ( CONTENITORE ) "B" SE PRESENTE : "B" container if any : LA CAPSULA "B" È SIGILLATA CORRETTAMENTE? <input type="checkbox"/> SI/yes <input type="checkbox"/> NO Is the "B" container properly sealed? IL CODICE CORRISPONDE A QUELLO RIPORTATO SUL VERBALE DI PRELIEVO ? Does "B" container code correspond to the one reported in the dope testing report ? <input type="checkbox"/> SI/yes <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> NON RIPORTATO/not reported	
FLACONE "B": <input checked="" type="checkbox"/> SIGILLO PREVISTO/ seal contemplated <input type="checkbox"/> SIGILLO NON PREVISTO/ seal not contemplated "B" bottle : IL SIGILLO È INTEGRO? <input checked="" type="checkbox"/> SI/yes <input type="checkbox"/> NO Is the "B" bottle seal intact? IL CODICE DEL <input checked="" type="checkbox"/> SIGILLO / <input type="checkbox"/> ETICHETTA CORRISPONDE A QUELLO RIPORTATO SUL VERBALE DI PRELIEVO? Does "B" bottle seal / label code correspond to that reported in the dope testing report? <input checked="" type="checkbox"/> SI/yes <input type="checkbox"/> NO IL FLACONE "B" È CHIUSO CORRETTAMENTE ? <input checked="" type="checkbox"/> SI/yes <input type="checkbox"/> NO Is the "B" bottle properly closed? IL VOLUME È MAGGIORE O UGUALE AL LIMITE MINIMO? <input checked="" type="checkbox"/> SI/yes <input type="checkbox"/> NO Is the sample volume greater than or equal to the minimum limit?	
VOLUME RESIDUO DOPO PRELIEVO ALIQUOTE: <u>2.10</u> ml (OTTENUTO PER CONFRONTO CON UN VOLUME DI RIFERIMENTO) Sample volume after aliquoting (estimated by comparison with a calibrated bottle) IL FLACONE "B" È STATO RISIGILLATO DOPO IL PRELIEVO DELLE ALIQUOTE? <input checked="" type="checkbox"/> SI/yes <input type="checkbox"/> NO Was bottle "B" re-sealed after aliquoting? CODICE DEL NUOVO CONTENITORE: <u>1000892</u> Re-sealing container code IL CAMPIONE È STATO COLLOCATO NELLA CELLA FRIGO/CONGELATORE N° <u>6000</u> Refrigerator N°/Freezer N° ___ contains the re-sealed "B" sample	
SPAZIO RISERVATO ALLA ANNOTAZIONE DI EVENTUALI COMMENTI , RICHIESTE E/O NON-CONFORMITÀ PLEASE, WRITE ALL COMMENTS, NON-CONFORMITY OR REQUESTS INSIDE THIS PLACE	
SEE COMMENTS ON THE ANNEXED DOCUMENT.	
FIRME: Signatures: 	

Comments on B-sample 3511158

Rome, 16th of July 2010

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

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



FEDERAZIONE MEDICO SPORTIVA ITALIANA LABORATORIO ANTIDOPING	FOGLIO DI LAVORO	FL090
NUOVO VERBALE DI APERTURA IN CONTROANALISI		

Rif. PG002-Allegato	Pag. 1/2
	Rev. 3

DATA DI CONTROANALISI: 05/07/2010 <i>"B" sample analysis date:</i>	ORA DI INIZIO: 9.00 <i>Start time:</i>
-----------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------

L'APERTURA DEL CAMPIONE "B" SI SVOLGE ALLA PRESENZA DI:  
*People witnessing "B" sample opening:*

COGNOME E NOME * SEE NOTE 2 <i>Last name and first name</i>	QUALIFICA * <i>Position</i>
TYSSER ERIK	ATLETA
DEFEBRO HELGE	PERITO ATLETA
BOITRE FRANCESCO	DIRETTORE SCIENTIFICO
DE LA TORRE XAVIER	VICE DIRETTORE SCIENTIFICO
ABATE MARIA GABRIELLA	RESPONSABILE QUALITA'
BANBERINI STEFANO	RESPONSABILE APERTURA
<del> </del>	<del> </del>
<del> </del>	<del> </del>
<del> </del>	<del> </del>

(\*) ALLEGARE EVENTUALI DELEGHE DI RAPPRESENTANZA  
*Please, enclose here all the relevant authorizations*

**IDENTIFICAZIONE DEL CAMPIONE**  
*SAMPLE IDENTIFICATION*

GARA: GARA INTERNAZIONALE DI MARCIA 20 KM <i>Competition:</i>	
SVOLTA IN DATA: 01/05/2010 <i>Competition date:</i>	LOCALITA': SESTO SAN GIOVANNI <i>Place:</i>
FEDERAZIONE / SPORT: IAAF / ATHLETICS <i>Federation / Sport:</i>	DATA DI ARRIVO DEL CAMPIONE: 02/05/2010 <i>Sample receipt date:</i>
CODICE CAMPIONE "A": 3511158 <i>Sample "A" code:</i>	CODICE INTERNO ATTRIBUITO: 10E003 A4433 <i>Allocated internal code:</i>
CODICE CAMPIONE "B": 3511158 <i>Sample "B" code:</i>	CODICE INTERNO ATTRIBUITO: 10E003 B4433 <i>Allocated internal code:</i>
CODICE SIGILLO: 1000892 <i>Seal code:</i>	

FARMACO/METABOLITA RICONTRATO IN PRIMA ANALISI: CONTINUOUS ERYTHROPOIETIN RECEPTOR ACTIVATOR  
*Drug/Metabolite focused on first analysis:*

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

SBR RGA FMSB [Signature] [Signature]



FEDERAZIONE MEDICO SPORTIVA ITALIANA LABORATORIO ANTIDOPING	FOGLIO DI LAVORO	FL090
NUOVO VERBALE DI APERTURA IN CONTROANALISI		

Rif. PG002-Allegato

Pag.	2/2
Rev.	3

VERIFICA DELLO STATO DEL CAMPIONE "B"  
"B" SAMPLE CONDITIONS

CAPSULA ( CONTENITORE ) "B" SE PRESENTE :  
"B" container if any :

LA CAPSULA "B" È SIGILLATA CORRETTAMENTE?  SI/yes  NO  
*Is the "B" container properly sealed?*

IL CODICE CORRISPONDE A QUELLO RIPORTATO SUL VERBALE DI PRELIEVO ?  
*Does "B" container code correspond to the one reported in the dope testing report ?*

SI/yes  NO  NON RIPORTATO/not reported

FLACONE "B":  SIGILLO PREVISTO/ seal contemplated  SIGILLO NON PREVISTO/ seal not contemplated  
"B" bottle :

IL SIGILLO È INTEGRO?  SI/yes  NO SBR  
FL 090 (12/06/2010)  
*Is the "B" bottle seal intact?*

IL CODICE DEL  SIGILLO /  ETICHETTA CORRISPONDE A QUELLO RIPORTATO SUL VERBALE DI PRELIEVO?  
*Does "B" bottle seal / label code correspond to that reported in the dope testing report?*  SI/yes  NO

IL FLACONE "B" È CHIUSO CORRETTAMENTE ?  SI/yes  NO  
*Is the "B" bottle properly closed?*

IL VOLUME È MAGGIORE O UGUALE AL LIMITE MINIMO?  SI/yes  NO \* RE-NOTE 1  
*Is the sample volume greater than or equal to the minimum limit?*

VOLUME RESIDUO DOPO PRELIEVO ALIQUOTE: 0 ml (OTTENUTO PER CONFRONTO CON UN VOLUME DI RIFERIMENTO)  
*Sample volume after aliquoting (estimated by comparison with a calibrated bottle)*

IL FLACONE "B" È STATO RISIGILLATO DOPO IL PRELIEVO DELLE ALIQUOTE?  SI/yes  NO  
*Was bottle "B" re-sealed after aliquoting?*

CODICE DEL NUOVO CONTENITORE: 1000978  
*Re-sealing container code*

IL CAMPIONE È STATO COLLOCATO NELLA CELLA FRIGO/CONGELATORE N° C0210  
*Refrigerator N°/Freezer N° C0210 contains the re-sealed "B" sample*

SPAZIO RISERVATO ALLA ANNOTAZIONE DI EVENTUALI COMMENTI , RICHIESTE E/O NON-CONFORMITÀ  
PLEASE, WRITE ALL COMMENTS, NON-CONFORMITY OR REQUESTS INSIDE THIS PLACE

1\* SUFFICIENT (EVEN IF ~~IF~~ < 30 ML) - SINCE IT IS A RE-ANALYSIS OF A "B" SAMPLE - TO START THE PROCESS

2\* THE ANALYSIS STARTED WITHOUT THE PRESENCE OF DR. PERVILLE S. ROBINSON.

FIRME:  
Signatures:

*[Handwritten signatures: Franco Felici, Xaver Leber, Erik Lynne, M. G. S. Robinson]*

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

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

**RICHIESTA DI NUOVE ALIQUOTE**

Codice di laboratorio campione	Aliquote richieste		Analisi da effettuare e screening corrispondente	(*) Codice assegnato a ciascuna aliquota
	N°	Volume (ml)		
10E003B4433	1	2.0	CONF. R.P.O. (CONFIRMATION)	10E003B4433C
10E003B4433	1	0.6	STABILITY TEST	10E003B4433STAB
10E003B4433	1	0.5	PH & DENSITY (SPECIFIC GRAVITY)	10E003B4433PH
10E003B4433	1	2	SUB (STEROID PROFILE)	10E003B4433SUB

RICHIEDENTE

ews  
Sigla

Stefano  
Firma

DATA 14/06/10

**DISTRIBUZIONE DI NUOVE ALIQUOTE**

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

ALIQUOTE DISTRIBUITE     Frigo     Congelatore     Consegnate direttamente a NS\*

CAMPIONI     Frigo     Congelatore caelis     Altro: \_\_\_\_\_

RESPONSABILE DISTRIBUZIONE

ews  
Sigla

Stefano  
Firma

DATA 14/06/10

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

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

X L'ALIQUOTA IDENTIFICATA CON SUB È STATA TRASFERITA NEL FRIGO FR019 14/6/10 PER ANALISI

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

**RICHIESTA DI NUOVE ALIQUOTE**

Codice di laboratorio campione	Aliquote richieste		Analisi da effettuare e screening corrispondente	(*) Codice assegnato a ciascuna aliquota
	N°	Volume (ml)		
10E003B4433	1	10	conf. epa	10E003B4433C
10E003B4433	1	0,6	stability test	10E003B4433STAB
10E003B4433	1	0,5	ph e densità	10E003B4433ph

RICHIEDENTE

TUS  
Sigla

Stefano  
Firma

DATA 5/7/10

**DISTRIBUZIONE DI NUOVE ALIQUOTE**

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

ALIQUOTE DISTRIBUITE  Frigo  Congelatore  Consegnate direttamente a TE

CAMPIONI  Frigo  Congelatore: Coolo  Altro: \_\_\_\_\_

RESPONSABILE DISTRIBUZIONE

els  
Sigla

Stefano  
Firma

DATA 5/7/10

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

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

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

## II.1 Preliminary tests

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

### II.1.1 Visual inspection

**COLOUR:**

**VISUAL TEST, ACCORDING TO THIS TABLE:**

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

**SEDIMENT:**

**VISUAL TEST, ACCORDING TO THIS TABLE:**

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

**VOLUME:**

**COMPARISON AGAINST A CALIBRATED BOTTLE**











**CONTINUOUS ERYTHROPOIETIN RECEPTOR  
ACTIVATOR  
(CERA)  
CONFIRMATION RESULTS**

## II.2 Confirmation Test Data - IEF

### II.2.1 Confirmation procedure IEF Test Description

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

A brief description of the method is given below:

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

## ***II.2.2 Instruments and instrumental conditions***

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

**EF 002/003/004**

**INCUBATOR**

**SLOW MIXER**

**MAGNETIC SHAKER**

**FRIDGE**

**FREEZER**

**VORTEX**

**BALANCE**

**BASCULANT ROTOR REFRIGERATED CENTRIFUGE**

**FIXED ANGLE (34°) ROTOR CENTRIFUGE**

**WATER BATH**

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

Prefocusing:

250 V

25 mA

25 W

time: 30-60 min

Focusing:

2000 V

25 mA

25 W

4000 Wh

First blotting:

40 V

mA adjusted for the gel area

90 W

time: 30 min

Second blotting:

35 V

mA adjusted for the gel area

40 W

time: 10 min

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

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

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

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

Worksheet for the confirmation procedure

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

Data e ora di inizio analisi: 14/06/20 12.20

Lotto di accettazione	Codice campioni preparati
10E003	DA: B4433C + STABILITY TEST
	DA: A:
	DA: A:
	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 027], 1,75 g di saccarosio [R-306 Lotto 002] e trasferirli in un pallone di reazione da 100 ml posto su un agitatore elettromagnetico
2 <input checked="" type="checkbox"/>	Aggiungere 14,17 ml di acqua ultrapura e 1,89 ml di anfolita 2-4 [R-168 Lotto 021], 1,89 ml di anfolita 4-6 [R-169 Lotto 022] 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 type="checkbox"/>	Nel frattempo (durante i 15 minuti): <ul style="list-style-type: none"> <li>a) detergere le lastre con etanolo assoluto [R-033 Lotto 029]</li> <li>b) far aderire il Gelbond alla lastra di supporto ponendovi l'opportuna quantità di acqua ultrapura</li> <li>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</li> <li>d) sovrapporre la seconda lastra</li> <li>e) bloccare le lastre con le apposite pinze</li> </ul>
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 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 <sup>1</sup> [R-172 Lotto 002] e mescolando mediante agitatore elettromagnetico
11/1 <input checked="" type="checkbox"/>	Prelevare 20 ml di urina <sup>2</sup> (in caso di prelievi inferiori, portare a 20 ml con TRISHCl 50 mM [TRISHCl 50 Lotto 001]) e trasferirli in una provetta da 50 ml 228 14/06/10
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 023] 228 14/06/10
15/1 <input checked="" type="checkbox"/>	Centrifugare per 10 min nella centrifuga refrigerata a 20°C con rotore basculante a 3000 rcf

<sup>1</sup> E' possibile preparare quantità differenti purchè restino invariate le proporzioni.<sup>2</sup> In caso di urina diluita e prelievi maggiori, prelevare la 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

16/1	<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 Loto(62) ] e 400 µl di soluzione Complete (200µl ogni 10 ml di urina)
22/1	<input checked="" type="checkbox"/>	Centrifugare per 20 min nella centrifuga refrigerata a 20°C con rotore basculante a 3500 rcf
23/1	<input checked="" type="checkbox"/>	Nel frattempo lavare le Amicon ultra-4 con 2 ml di acqua ultrapura ponendole a centrifugare a 5000 rpm per 20 min nella centrifuga refrigerata a 17°C con rotore ad angolo fisso.
24/1	<input checked="" type="checkbox"/>	Prelevare con una micropipetta dalla parte superiore della Amicon ultra-15 il residuo (circa 120µl) e trasferirlo nelle Amicon ultra-4 precedentemente lavate (anche se si usa il FL162)
25/1	<input checked="" type="checkbox"/>	Centrifugare a 6200 rpm per 60 min nella centrifuga refrigerata a 17°C con rotore ad angolo fisso
26/1	<input checked="" type="checkbox"/>	Misurare il volume di ritentato, trasferirlo in una vial di raccolta e conservare in frigorifero (nel caso si intenda utilizzare oltre le 24 h, conservare in congelatore a -20°C)

II (PER TEST DI STABILITÀ)

10/II	<input checked="" type="checkbox"/>	Centrifugare 0,6 ml di urina per 10 min a 20°C con rotore basculante a 2700 rcf
11/II	<input checked="" type="checkbox"/>	Mettere 0,5 ml di sovrantante in una provetta Microcon
12/II	<input checked="" type="checkbox"/>	Aggiungere 20 µl di Pepstatina A e 5 µl di soluzione Complete
13/II	<input checked="" type="checkbox"/>	Centrifugare a 6200 rpm per 20 min nella centrifuga refrigerata a 17°C con rotore ad angolo fisso, concentrando fino ad un volume approssimativo di 30 µl
14/II	<input checked="" type="checkbox"/>	Aggiungere 200 µl di tampone acetato 50 mM nel restante campione e mescolare con vortex prima di capovolverlo
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 Loto (62) ]
31	<input checked="" type="checkbox"/>	Rimuovere l'eccesso di kerosene con carta da filtro

FEDERAZIONE MEDICO SPORTIVA ITALIANA LABORATORIO ANTIDOPING	FOGLIO DI LAVORO	FL119
<b>RICERCA DI ERITROPOIETINA RICOMBINANTE E ANALOGHI</b>		
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>008</i> ] e 10 µl di RMET <sup>3</sup> [Lotto <i>008</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"/>	Chiudere il supporto e impostare i seguenti parametri: Potenziale: 250 V Corrente: 17 mA (proporzionale alle dimensioni del Gel) Potenza: 17 W Durata: 30 min/ 60min O nel caso la lunghezza del gel sia pari a 25 cm: Potenziale: 250 V Corrente: 25 mA Potenza: 25 W Durata: 30 min/ 60min Completare la seguente tabella con i parametri di inizio e fine corsa: <table border="1" style="margin-left: 20px;"> <thead> <tr> <th>Potenziale (V)</th> <th>Corrente (mA)</th> <th>Potenza (W)</th> <th>Tempo (min)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;"><i>200</i></td> <td style="text-align: center;"><i>25</i></td> <td style="text-align: center;"><i>5</i></td> <td style="text-align: center;"><i>0'</i></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;"><i>250</i></td> <td style="text-align: center;"><i>16.5</i></td> <td style="text-align: center;"><i>4</i></td> <td style="text-align: center;"><i>40'</i></td> </tr> </tbody> </table>			Potenziale (V)	Corrente (mA)	Potenza (W)	Tempo (min)	<i>200</i>	<i>25</i>	<i>5</i>	<i>0'</i>	<i>250</i>	<i>16.5</i>	<i>4</i>	<i>40'</i>
Potenziale (V)	Corrente (mA)	Potenza (W)	Tempo (min)												
<i>200</i>	<i>25</i>	<i>5</i>	<i>0'</i>												
<i>250</i>	<i>16.5</i>	<i>4</i>	<i>40'</i>												
35 <input checked="" type="checkbox"/>	Prelevare gli standard dal congelatore														
36 <input checked="" type="checkbox"/>	Preparare gli standard: MISCELA BRP NESP 1-2 (BRNE1-2) Aggiungere 0,32 – 0,16 ng <sup>3</sup> di BRP [BRP Lotto <i>004</i> ] a 0,2 – 0,15ng <sup>3</sup> di NESP [NESP Lotto <i>013</i> ] MISCELA BRP NIBSC (BRNIB) Aggiungere 0,16 ng <sup>3</sup> di BRP [BRP Lotto ] a 0,0025 ng <sup>3</sup> di NIBSC [NIBSC Lotto ] MISCELA NESP NIBSC (NENIB) Aggiungere 0,15 ng <sup>3</sup> di NESP [NESP Lotto ] a 0,0025 <sup>3</sup> ng di NIBSC [NIBSC Lotto ] SOLUZIONE NIBSC 0,02UI - 0,04UI (NIBSC1- 2) Prelevare dalla soluzione standard [NIBSC Lotto <i>004</i> ] 10-20 µl, in modo tale da ottenere una soluzione da 0,02-0,04 UI SOLUZIONE MIRCERA (MIR) Prelevare 20 µl dalla soluzione standard di Mircera [MIR Lotto <i>005</i> ] SOLUZIONE Dynepo (Dyn) Prelevare 20 µl dalla soluzione standard di Dynepo [Dyn Lotto ]														
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>andato a punto 39</i>												
38 <input type="checkbox"/>	Immergere i campioni precedentemente scaldati, nel bagno refrigerante per 30 s														
39 <input checked="" type="checkbox"/>	Aggiungere: -ai campioni il 10% di Surfact-amps 80 (Tween 80) [R-166 Lotto <i>001</i> ] per volume di ritentato -agli standard (eccetto Mircera) aggiungere 2,2 µl di Surfact-amps 80 (Tween 80) [R-166 Lotto <i>001</i> ] ogni 20 µl														

<sup>3</sup> 1 UI = 8 ng. E' consentito variare le quantità purchè la concentrazione raggiunta non superi quella corrispondente a 3 volte il LOD. E' consentito variare il volume di RMET purchè il rapporto fra il volume della soluzione di 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 strips<sup>1</sup> secondo il seguente schema:</p> <p>BRNIB NENIB Dyn<sup>5</sup> MIR NIBSC (1 o 2) BRNE (1 o 2) Bur<sup>5</sup> USPrEPO<sup>5</sup> CAMPIONI BRNE (1 o 2) NENIB BRNIB</p> <p>Oppure nel caso la lunghezza del gel sia pari a 25 cm:</p> <p>NIBSC (1 o 2) BRNE (1 o 2) Bur<sup>5</sup> USPrEPO<sup>5</sup> CAMPIONI BRNE (1 o 2) CAMPIONI BRNE (1 o 2) CAMPIONI NIBSC (1 o 2) BRNE (1 o 2) NIBSC (1 o 2) Dyn<sup>5</sup> MIR</p>

Compilare la tabella seguente in base alla sequenza di caricamento:

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

<sup>1</sup> Quantitativo massimo per ogni strip/pozzetto: 20  $\mu$ l; in caso di volumi superiori, sovrapporre un'altra strip e ripetere l'operazione. La posizione degli standard può anche essere variata, purchè i campioni restino in posizione centrale. La sequenza descritta è indicativa.  
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	106003 B 4433C	30
11	N.B.S.C	20
12	106003 B 4433 STAB	40
13	N.B.S.C	20
14	HUR	20
15	RRP + NESP	1000
16		
17		
18		
19		
20		
21		
22		
23		
24		
25		
26		
27		
28		
29		
30		

- 42/  Chiudere il supporto e impostare i seguenti parametri:  
 Potenziale: 2000 V  
 Corrente: 17 mA  
 Potenza: 17 W  
 Potenziale per ora: 3600 Vh  
 O nel caso la lunghezza del gel sia pari a 25 cm:  
 Potenziale: 2000 V  
 Corrente: 25 mA  
 Potenza: 25 W  
 Potenziale per ora: 4000 Vh  
 Completare la seguente tabella con i parametri di inizio e fine corsa:
- | Potenziale (V) | Corrente (mA) | Potenza (W) | Potenziale per ora (Vh) | Tempo (min) |
|----------------|---------------|-------------|-------------------------|-------------|
| 367            | 25            | 9           | 1                       | 0'          |
| 1561           | 15.8          | 25          | 4000                    | 3.5         |
- 43/  Tagliare due rettangoli di Durapore e Immobilon P e 16 rettangoli di carta da filtro<sup>6</sup> o simile delle dimensioni di 8 (esatti) x 16,5 cm. Nel caso la lunghezza del gel sia pari a 25 cm, le dimensioni sono 8 x 22,5 cm.
- 44/  Preparare GLI-TRIS aggiungendo a 7,21 g di Glicina [R-164 Lotto 009 ] 1,51g di Trizbase [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 SA3 ], acqua ultrapura e GLI-TRIS

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

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

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

**D - PRIMO BLOTTING**

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

FEDERAZIONE MEDICO SPORTIVA ITALIANA LABORATORIO ANTIDOPING	FOGLIO DI LAVORO	FL119
<b>RICERCA DI ERITROPOIETINA RICOMBINANTE E ANALOGHI</b>		
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>20</td> <td>132</td> <td>1</td> <td>0'</td> </tr> <tr> <td>21</td> <td>132</td> <td>3</td> <td>30'</td> </tr> </tbody> </table>	Potenziale (V)	Corrente (mA)	Potenza (W)	Tempo (min)	20	132	1	0'	21	132	3	30'
Potenziale (V)	Corrente (mA)	Potenza (W)	Tempo (min)										
20	132	1	0'										
21	132	3	30'										
59 <input checked="" type="checkbox"/>	<p>Preparare PBS e DTT.</p> <p><b>PBS</b> Portare a volume con acqua ultrapura in un matraccio da 1000 ml 5 tavolette di tampone fosfato salino [R-165 Lotto 039]. Mescolare mediante agitatore elettromagnetico.</p> <p><b>DTT</b> Portare a volume con PBS in un matraccio da 250 ml 192,8 mg diotiotreitolo [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"/>	Posizionare la vaschetta per 60 minuti in incubatore a 37°C.												
62 <input checked="" type="checkbox"/>	<p>Preparare le soluzioni LFM</p> <p><b>LFM 5%</b> 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><b>LFM 1%</b> 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"/>	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 <input checked="" type="checkbox"/>	Posizionare la vaschetta sullo Slow mixer per 60 min												
65 <input checked="" type="checkbox"/>	Lavare la IP1 con PBS												
66 <input checked="" type="checkbox"/>	<p>Preparare la soluzione Clone AE75A</p> <p>Aggiungere 40 µl<sup>2</sup> di anticorpo antiipo [R-173 Lotto 049] a 40 ml di LFM 1%</p>												
67 <input checked="" type="checkbox"/>	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 <input checked="" type="checkbox"/>	Posizionare la vaschetta sullo Slow mixer per 60 min: in caso di tempi superiori, porre lo Slow mixer in frigorifero (in quest'ultimo caso dopo aver tolto la vaschetta dal frigorifero lasciarla ad agitare sullo Slow mixer a T ambiente per circa 20 min)												

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

FEDERAZIONE MEDICO SPORTIVA ITALIANA LABORATORIO ANTIDOPING	FOGLIO DI LAVORO	FL119
<b>RICERCA DI ERITROPOIETINA RICOMBINANTE E ANALOGHI</b>		
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 031]. 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 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 ciascuno<sup>6</sup>, in modo tale che si imbevano di soluzione per capillarità
- 77  Sulla piastra del Nova Blot posizionare il pacchetto da quattro fogli di carta da filtro
- 78  Lavare la IP1 con PBS e sovrapporla rapidamente al pacchetto
- 79  Sovrapporre rapidamente la Durapore
- 80  Sovrapporre rapidamente la Immobilon P (al termine della corsa nominata IP2)
- 81  Sovrapporre rapidamente il pacchetto da quattro fogli di carta da filtro<sup>6</sup>
- 82  Sovrapporre quindi un rettangolo di parafilm, facendo pressione con un rullo, per eliminare le bolle d'aria.
- 83  Chiudere il supporto e impostare i seguenti parametri:  
Potenziale: 35 V  
Potenza: 40 W  
Corrente: 0,8 mA x Area del gel  
Durata: 10 min  
  
Completare la seguente tabella con i parametri di inizio e fine corsa:

Potenziale (V)	Corrente (mA)	Potenza (W)	Tempo(min)
6	100	1	0'
6	100	1	10'

FEDERAZIONE MEDICO SPORTIVA ITALIANA LABORATORIO ANTIDOPING	FOGLIO DI LAVORO	FL119
<b>RICERCA DI ERITROPOIETINA RICOMBINANTE E ANALOGHI</b>		
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 <del>034</del> ]. 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 type="checkbox"/>	Preparare ANTI IgG Aggiungere: <input checked="" type="checkbox"/> 26 µl di anticorpo segnato con la biotina Pierce [R-175 Lotto <del>034</del> ] a 40 ml di LFM 1% <input type="checkbox"/> 10 µl di anticorpo segnato con la biotina Paris [R-175 Lotto <del>034</del> ] 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 a T ambiente per circa 20 min)
91 <input 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 <del>034</del> ]. 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 <del>034</del> ]. 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 <del>034</del> ] a 40 ml di LFM 1% <input type="checkbox"/> Aggiungere 20 µl di streptavidina perossidasi Biospa [R-174 Lotto <del>034</del> ] 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 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
<b>RICERCA DI ERITROPOIETINA RICOMBINANTE E ANALOGHI</b>		
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>02</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 ] in 25 ml di CovA [R-176 A Lotto ]?
104 <input checked="" type="checkbox"/>	Mettere in una vaschetta di vetro da 17x 8 cm (dimensioni interne-oppure da 25x 13 in caso di gel da 25 cm) la soluzione Covalight preparata al punto precedente e immergervi la IP2
105 <input checked="" type="checkbox"/>	Agitare la vaschetta per qualche secondo

**F - RIVELAZIONE MEDIANTE CHEMILUMINESCENZA**

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

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

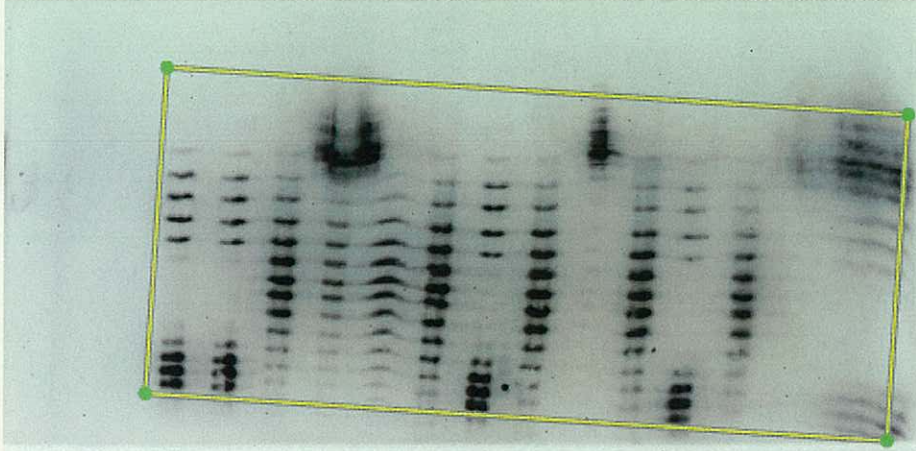
Operatore Sigla e Firma	Data	Operazioni eseguite
<i>CUS Stefania</i>	<i>14/6/10</i>	da punto [1] a punto [20] e da [10] a [20]
<i>CUS Stefania</i>	<i>15/6/10</i>	da punto [20] a punto [9] e [11] e [22]
<i>CUS Stefania</i>	<i>16/6/10</i>	da punto [9] a punto [10]
		da punto [ ] a punto [ ]
		da punto [ ] a punto [ ]
		da punto [ ] a punto [ ]
		da punto [ ] a punto [ ]

### II.2.4 Confirmation Test Results

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

TOTAL IMAGE OF THE GEL

THE RECTANGLE INDICATES THE AREA SELECTED FOR PROCESSING THE DENSITOMETRY DATA



GENERAL VIEW OF ALL THE PROCESSED LANES

16/06/2010  
12.46

## GASepo Analysis Report

Session: Analysis 100616-30min cam.tif 2010-06-16  
 Image File: 100616-30min cam.tif  
 Operator:

Laboratory: F.M.S.I.- Laboratorio Antidoping Roma  
 Date of Analysis: 16/06/2010  
 12.05

1. uEPO + NESP	2. uEPO + NESP	3. uEPO	4. Usp Mir	5. Bur	6. uEPO	7. Bur Stab	8. uEPO	9. 10E003 B4433C	10. uEPO	11. 10E003 B4433Stab	12. uEPO	13. Mir	14. uEPO + NESP
34,5%	30,5%	26,9%	79,9%	25,0%	27,7%	29,5%	26,7%	95,8%	28,1%	19,7%	26,4%	100,0%	49,8%
65,3%	69,5%	5,2%	2,2%	9,8%	8,6%	70,5%	6,7%	0,7%	8,1%	80,3%	8,7%	0,0%	50,2%

COLORLEGEND: EPo DARDEPOETINα

SEIBERSDORF  
LABORATORIES

GASepo software (c) 2004-2009, Seibersdorf Labor GmbH  
 Report Page 2/17



**POSITIVE CONTROL: RHEPO AND NESP STANDARDS (BRNE)**

16/06/2010  
12.49

## GASepo Analysis Report

Session: Analysis 100616-30min cam.tif 2010-06-16  
Image File: 100616-30min cam.tif  
Operator:

Laboratory: F.M.S.I.- Laboratorio Antidoping Roma  
Date of Analysis: 16/06/2010  
12.05

1. rEPO + NESP

34,5%
65,3%

Lane #1: rEPO + NESP									
Name	Comment	Cent X	Cent Y	Cent Z	Max X	Max Y	Max Z	Volume Abs	Volume nMax
5		17,9	79,4	325,61	19	80	1133,39	184620,7	4,9
4		19,5	103,9	1692,20	21	104	7266,06	896864,2	23,7
3		18,4	124,4	2506,56	24	123	11320,50	1195631,0	31,6
2		19,2	146,8	3148,87	19	147	15757,98	1634265,0	43,3
1		19,8	166,3	2060,66	22	186	10551,79	919055,2	24,3
α		20,7	250,7	92,95	27	251	363,84	35228,5	0,9
A		20,9	267,6	1396,86	24	267	4312,96	656523,6	17,4
B		21,7	281,8	5772,32	27	282	21680,16	2510961,0	66,5
C		22,1	294,7	9374,62	26	295	33053,02	3777971,0	100,0
D		22,4	307,5	4453,40	27	307	15969,18	2204432,0	58,3

GASepo software (c) 2004-2010 - Seibersdorf Labor GmbH  
Report Page 5/17

**NEGATIVE CONTROL: URINARY EPO STANDARD :NIBSC (UEPO)**

16/06/2010  
12.49

## GASepo Analysis Report

Session: Analysis 100616-30min cam.tif 2010-06-16  
Image File: 100616-30min cam.tif  
Operator:

Laboratory: F.M.S.I.- Laboratorio Antidoping Roma  
Date of Analysis: 16/06/2010  
12.05

3. uEPO

26,9%
5,2%

Lane #3: uEPO									
Name	Comment	Cent X	Cent Y	Cent Z	Max X	Max Y	Max Z	Volume Abs	Volume nMax
5		22,6	76,1	213,05	37	72	824,65	131241,3	5,3
4		21,3	99,8	446,42	28	100	2050,11	249994,7	10,2
3		21,0	119,8	1095,58	27	121	6239,37	585040,1	23,8
2		20,7	142,4	1955,03	25	142	8708,09	1004887,0	40,9
1		20,8	162,3	3121,16	26	163	16474,02	1666700,0	67,9
α		20,5	181,6	4228,54	25	182	19648,18	2346842,0	95,5
β		21,2	199,7	4972,33	27	200	23778,50	2456329,0	100,0
γ		20,6	214,7	4587,96	25	215	19767,03	2284806,0	93,0
δ		21,0	232,1	2889,53	26	232	12601,31	1496775,0	60,9
ε		21,1	250,0	1316,00	25	250	5625,07	625098,3	25,4
A		21,5	267,7	694,69	29	268	3668,81	358462,2	14,6
B		21,1	284,2	433,39	24	284	1836,86	216261,2	8,8
C		19,6	299,5	194,57	14	300	946,63	98259,8	4,0
D		18,6	314,8	72,45	14	315	453,89	25502,4	1,0

GASepo software (c) 2004-2010 - Seibersdorf Labor GmbH  
Report Page 5/17

**POSITIVE CONTROL: MIRCERA (MIR)**

16/06/2010  
12.49

## GASepo Analysis Report

Session: Analysis 100616-30min cam.tif 2010-06-16  
Image File: 100616-30min cam.tif  
Operator:

Laboratory: F.M.S.I.- Laboratorio Antidoping Roma  
Date of Analysis: 16/06/2010  
12.05

13. Mir

100,0%

0,0%

Lane #13: Mir									
Name	Comment	Cent X	Cent Y	Cent Z	Max X	Max Y	Max Z	Volume Abs	Volume nMax
5		40,4	30,7	1343,80	43	32	2684,89	225757,5	22,6
5+4		26,6	31,3	750,62	43	32	2684,89	374558,8	37,5
4		5,8	32,2	449,55	0	40	1373,55	148801,3	14,9
3		21,5	48,2	1625,02	43	48	5050,84	999389,3	100,0
2		20,4	60,1	1762,24	43	55	3941,50	997426,1	99,8
1		14,8	73,3	665,95	13	74	2018,19	362941,9	36,3

GASepo software (c) 2004-2009, Seibersdorf Labor GmbH  
Report Page 13 of 17

**SAMPLE INTERNAL LABORATORY CODE 10E003 B4433**

16/06/2010  
12.49

## GASepo Analysis Report

Session: Analysis 100616-30min cam.tif 2010-06-16  
Image File: 100616-30min cam.tif  
Operator:

Laboratory: F.M.S.I.- Laboratorio Antidoping Roma  
Date of Analysis: 16/06/2010  
12.05

9. 10E003 B4433C

95,8%

0,7%

Lane #9: 10E003 B4433C									
Name	Comment	Cent X	Cent Y	Cent Z	Max X	Max Y	Max Z	Volume Abs	Volume nMax
11		14,3	2,9	103,70	15	2	483,95	18251,9	0,6
10		19,6	13,5	960,77	19	12	2738,61	210408,2	6,9
9		19,9	24,4	2812,70	23	25	6029,99	812870,9	26,8
8		19,8	37,3	5704,91	22	35	12961,25	1814163,0	59,8
7		19,0	46,6	7612,85	23	48	15263,61	1248507,0	41,1
6		20,9	55,9	5728,41	25	54	19726,12	3036057,0	100,0
5		19,8	67,1	3471,40	16	67	7840,27	912977,2	30,1
4		21,5	79,7	560,29	16	81	1581,22	287426,8	9,5
3		21,2	104,4	76,06	19	105	304,34	27610,2	0,9
2		24,8	129,5	102,22	22	129	483,37	51010,0	1,7
1		23,7	150,5	136,15	20	150	660,56	76379,5	2,5
α		24,2	171,0	161,69	19	171	628,25	90872,5	3,0
β		19,4	191,7	180,81	21	192	633,18	79737,0	2,6
γ		19,5	206,6	172,63	16	207	649,12	72504,6	2,4
δ		17,4	224,3	97,84	16	224	347,80	42268,0	1,4
ε		18,2	244,2	76,63	17	244	202,78	25902,2	0,9
A		13,0	264,7	76,83	12	265	281,06	30732,1	1,0
B		14,6	281,8	78,93	14	282	275,66	22572,6	0,7
C		21,3	297,1	20,98	19	298	75,41	2748,7	0,1
D		29,3	310,8	53,68	29	312	206,71	3220,9	0,1

GASepo software (c) 2004-2009, Seibersdorf Labor GmbH  
Report Page 13 of 17

SAMPLE INTERNAL LABORATORY CODE 10E003 B4433: STABILITY TEST

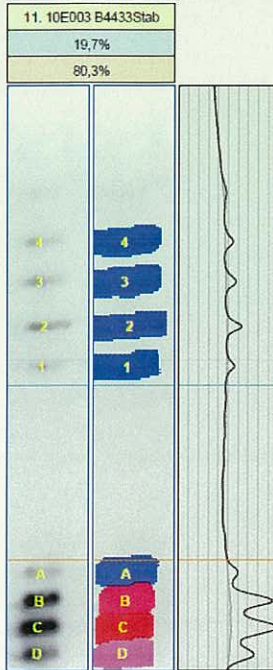
16/06/2010  
12.49

**GASepo Analysis Report**



Session: Analysis 100616-30min cam.tif 2010-06-16  
Image File: 100616-30min cam.tif  
Operator:

Laboratory: F.M.S.I.- Laboratorio Antidoping Roma  
Date of Analysis: 16/06/2010  
12.05



Lane #11: 10E003 B4433Stab										
Name	Comment	Cent X	Cent Y	Cent Z	Max X	Max Y	Max Z	Volume Abs	Volume nMax	
4		16,7	84,7	644,46	13	85	3015,80	366053,4	13,0	
3		17,0	106,6	807,76	14	107	3550,22	474154,5	16,8	
2		19,6	131,3	1014,46	16	132	4913,66	570124,0	20,2	
1		18,3	153,2	591,75	19	154	4694,39	305935,5	10,9	
A		17,9	266,3	1019,53	12	266	3542,29	511805,1	18,2	
B		17,5	281,5	5055,41	13	283	17880,22	2239546,0	79,5	
C		16,5	295,9	5980,14	12	297	15421,47	2816645,0	100,0	
D		16,1	310,2	2911,65	13	311	9176,50	1420883,0	50,4	



POSITIVE REFERENCE SAMPLE (USPMIR)

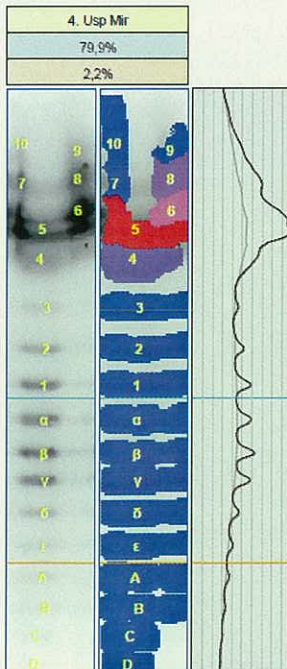
16/06/2010  
12.49

**GASepo Analysis Report**



Session: Analysis 100616-30min cam.tif 2010-06-16  
Image File: 100616-30min cam.tif  
Operator:

Laboratory: F.M.S.I.- Laboratorio Antidoping Roma  
Date of Analysis: 16/06/2010  
12.05



Lane #4: Usp Mir										
Name	Comment	Cent X	Cent Y	Cent Z	Max X	Max Y	Max Z	Volume Abs	Volume nMax	
10		7,1	29,5	1362,57	7	41	4459,51	693549,7	12,9	
10 + 9		21,6	31,1	1727,00	36	40	5569,63	1314245,0	24,4	
9		37,8	32,9	2463,08	36	40	5569,63	620695,1	11,5	
8		38,0	48,8	5132,42	38	51	9282,46	2011908,0	37,3	
8 + 7		27,8	49,6	4959,20	38	51	9282,46	3044046,0	56,4	
7		8,0	51,1	4653,33	7	50	9198,40	1033038,0	19,1	
6		38,4	66,4	8957,29	37	70	16192,84	2740930,0	50,8	
5		19,0	76,0	6978,62	6	78	18552,63	5394475,0	100,0	
4		17,5	92,4	2238,04	7	85	7701,50	1705389,0	31,8	
3		21,6	119,2	342,91	18	120	1365,65	243467,5	4,5	
2		21,0	141,4	769,08	24	142	3255,20	532966,8	9,9	
1		20,0	161,3	1174,10	20	163	5741,29	808954,9	15,0	
α		20,0	180,5	1148,73	24	180	5271,56	863847,6	16,0	
β		20,0	198,9	1493,27	24	198	6901,06	997507,1	18,5	
γ		20,7	213,7	1323,85	24	213	6201,04	921401,9	17,1	
δ		20,3	231,6	673,62	22	232	2777,60	460758,8	8,5	
ε		20,2	249,7	421,22	22	250	1837,50	286430,1	5,3	
A		19,4	267,2	302,52	23	267	1530,48	230218,3	4,3	
B		21,5	283,9	187,73	9	284	766,50	134041,5	2,5	
C		16,7	299,0	123,88	23	299	521,38	61322,6	1,1	
D		15,4	314,2	52,72	9	314	265,83	17660,2	0,3	



**NEGATIVE REFERENCE SAMPLE(BUR)**

16/06/2010  
12.49

## GASepo Analysis Report

Session: Analysis 100616-30min cam.tif 2010-06-16  
Image File: 100616-30min cam.tif  
Operator:

Laboratory: F.M.S.I.- Laboratorio Antidoping Roma  
Date of Analysis: 16/06/2010  
12.05

5. Bur

25,0%
9,8%

Lane #5: Bur									
Name	Comment	Cent X	Cent Y	Cent Z	Max X	Max Y	Max Z	Volume Abs	Volume nMax
4		19,3	90,8	212,31	5	88	1134,29	116135,1	6,2
3		16,7	112,1	538,00	17	111	1868,53	344317,2	18,4
2		16,2	135,2	1210,56	15	134	5903,85	778388,3	41,5
1		16,4	156,5	2224,68	13	157	11652,88	1377074,0	73,5
α		16,2	176,1	2547,43	15	176	12163,87	1663470,0	88,8
β		16,5	193,4	3007,20	13	193	16685,72	1873488,0	100,0
γ		15,7	208,4	2428,63	10	209	11503,55	1522748,0	81,3
δ		16,0	226,0	1601,30	11	226	7518,97	1047250,0	55,9
ε		16,1	244,3	1078,46	2	238	7619,29	711785,1	38,0
A		15,9	263,2	755,48	13	263	4735,01	484262,9	25,8
B		16,2	280,1	505,40	12	279	2424,93	318404,6	17,0
C		14,8	296,5	240,46	10	296	1222,27	144759,3	7,7
D		13,7	311,7	160,31	11	311	608,02	75186,2	4,0

GASepo software © 2004-2009, Seibersdorf Labor GmbH

Report Page 2/17

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

16/06/2010  
12.49

## GASepo Analysis Report

Session: Analysis 100616-30min cam.tif 2010-06-16  
Image File: 100616-30min cam.tif  
Operator:

Laboratory: F.M.S.I.- Laboratorio Antidoping Roma  
Date of Analysis: 16/06/2010  
12.05

7. Bur Stab

29,5%
70,5%

Lane #7: Bur Stab									
Name	Comment	Cent X	Cent Y	Cent Z	Max X	Max Y	Max Z	Volume Abs	Volume nMax
5		20,7	68,4	300,98	25	68	1116,37	153500,7	3,7
4		20,9	94,3	1455,68	15	94	6686,96	756855,2	18,2
3		20,6	115,8	2255,29	15	116	11277,11	1159219,0	27,9
2		20,4	140,6	2986,94	17	141	18186,03	1391914,0	33,6
1		21,0	161,7	1675,73	16	162	8636,98	780891,6	18,8
A		18,5	268,2	1857,94	13	268	7959,87	821207,9	19,8
B		17,7	283,0	6085,47	13	284	22500,02	2744547,0	66,2
C		16,5	296,9	9736,94	10	297	37074,67	4147938,0	100,0
D		16,2	310,4	5391,70	10	311	21302,91	2426264,0	58,5

GASepo software © 2004-2009, Seibersdorf Labor GmbH

Report Page 3/17

### ***II.2.5 Test Validity Data***

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

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

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

***Sample code 10E003 B4433 shows an IEF profile compatible with presence of CERA, but the WADA criteria for reference standards were not completely fulfilled, so we decided, according to our internal procedures, to perform a new IEF analysis. A SDS-PAGE analysis was also performed in parallel to obtain "additional evidence".***

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

Worksheet for the second confirmation procedure

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

Data e ora di inizio analisi: 5/4/10 10.05

Lotto di accettazione	Codice campioni preparati
10E003	DA: 84433C-1 Stabilità A:
	DA: A:
	DA: A:
	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 <i>C18</i> ], 1,75 g di saccarosio [R-306 Lotto <i>C03</i> ] 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 <i>C42</i> ], 1,89 ml di anfolita 4-6 [R-169 Lotto <i>C42</i> ] e 4,74 ml di soluzione di bisacrilamide 40% [R-184 Lotto <i>C03</i> ]
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"> <li>detergere le lastre con etanolo assoluto [R-033 Lotto <i>C30</i> ]</li> <li>far aderire il Gelbond alla lastra di supporto ponendovi l'opportuna quantità di acqua ultrapura</li> <li>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</li> <li>sovrapporre la seconda lastra</li> <li>bloccare le lastre con le apposite pinze</li> </ol>
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 <i>C22</i> ] in 1 ml di acqua ultrapura e agitando manualmente
6 <input checked="" type="checkbox"/>	Aggiungere 31 µl di TEMED [R-180 Lotto <i>C03</i> ] e 310 µl di APS nel pallone
7 <input 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

1 per screening e conferma (non SDS PAGE)  1 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 <sup>1</sup> [R-172 Lotto <i>C59</i> ] e mescolando mediante agitatore elettromagnetico
11 <input checked="" type="checkbox"/>	Prelevare 20 ml di urina <sup>2</sup> (in caso di prelievi inferiori, portare a 20 ml con TRISHCl 50 mM [TRISHCl 50 Lotto <i>U03</i> ]) e trasferirli in una provetta da 50 ml
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 TRISHCl 3,75M [TRISHCl 3.75 Lotto <i>C24</i> ] (1ml ogni 10 ml di urina)
14 <input checked="" type="checkbox"/>	Controllare il pH con delle strips indicatrici in modo che sia compreso fra 6,8 e 7,9; in caso non risulti nel range, correggerlo con tampone TRISHCl 3,75M [TRISHCl 3.75 Lotto <i>C24</i> ] - <i>C05 S17 10</i>
15 <input checked="" type="checkbox"/>	Centrifugare per 10 min nella centrifuga refrigerata a 20°C con rotore basculante a 3000 rcf

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

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

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

16/II <input checked="" type="checkbox"/>	Applicare alle provette il componente della filtrazione del kit Steriflip, assemblandolo in posizione verticale
17/II <input checked="" type="checkbox"/>	Ruotare delicatamente di 180° il Kit assemblato
18/II <input checked="" type="checkbox"/>	Collegarlo alla pompa da vuoto per la filtrazione
19/II <input checked="" type="checkbox"/>	Trasferire il filtrato nelle provette amicon ultra-15
20/II <input checked="" type="checkbox"/>	Centrifugare per 20 min nella centrifuga refrigerata a 20°C con rotore basculante a 3500 rcf
21/II <input checked="" type="checkbox"/>	Eliminare il filtrato e lavare il filtro riempiendo la parte superiore della Amicon ultra-15 con TRISHCl 50 mM [TRISHCl 50 Lotto 163] e 400 µl di soluzione Complete (200µl ogni 10 ml di urina)
22/II <input checked="" type="checkbox"/>	Centrifugare per 20 min nella centrifuga refrigerata a 20°C con rotore basculante a 3500 rcf
23/II <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/II <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/II <input checked="" type="checkbox"/>	Centrifugare a 6200 rpm per 60 min nella centrifuga refrigerata a 17°C con rotore ad angolo fisso
26/II <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 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
<b>RICERCA DI ERITROPOIETINA RICOMBINANTE E ANALOGHI</b>		
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 $\alpha\beta$ ] e 10 µl di RMET [Lotto $\alpha\gamma$ ]												
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="margin-left: 20px;"> <thead> <tr> <th>Potenziale (V)</th> <th>Corrente (mA)</th> <th>Potenza (W)</th> <th>Tempo (min)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">195</td> <td style="text-align: center;">25</td> <td style="text-align: center;">5</td> <td style="text-align: center;">5</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">250</td> <td style="text-align: center;">16.5</td> <td style="text-align: center;">4</td> <td style="text-align: center;">39'</td> </tr> </tbody> </table>	Potenziale (V)	Corrente (mA)	Potenza (W)	Tempo (min)	195	25	5	5	250	16.5	4	39'
Potenziale (V)	Corrente (mA)	Potenza (W)	Tempo (min)											
195	25	5	5											
250	16.5	4	39'											
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 ng<sup>3</sup> di BRP [BRP Lotto <math>\alpha\delta</math>] a 0,2 - 0,15ng<sup>3</sup> di NESP [NESP Lotto <math>\alpha\epsilon</math>]</p> <p>MISCELA BRP NIBSC (BRNIB) Aggiungere 0,16 ng<sup>3</sup> di BRP [BRP Lotto ] a 0,0025 ng<sup>3</sup> di NIBSC [NIBSC Lotto ]</p> <p>MISCELA NESP NIBSC (NENIB) Aggiungere 0,15 ng<sup>3</sup> di NESP [NESP Lotto ] a 0,0025<sup>3</sup> ng di NIBSC [NIBSC Lotto ]</p> <p>SOLUZIONE NIBSC 0,02UI - 0,04UI (NIBSC1-2) Prelevare dalla soluzione standard [NIBSC Lotto <math>\alpha\zeta</math>] 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 <math>\alpha\eta</math>]</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 <math>\alpha\theta</math>] per volume di ritentato</p> <p>-agli standard (eccetto Mircera) aggiungere 2,2 µl di Surfacts-amps 80 (Tween 80) [R-166 Lotto <math>\alpha\theta</math>] ogni 20 µl</p>												

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

FEDERAZIONE MEDICO SPORTIVA ITALIANA LABORATORIO ANTIDOPING	FOGLIO DI LAVORO	FL119
<b>RICERCA DI ERITROPOIETINA RICOMBINANTE E ANALOGHI</b>		
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 type="checkbox"/>	<p>Prelevare i campioni e gli standard e posizionarli sulle strips<sup>4</sup> secondo il seguente schema:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>BRNIB</li> <li>NENIB</li> <li>Dyn<sup>5</sup></li> <li>MIR</li> <li>NIBSC (1 o 2)</li> <li>BRNE (1 o 2)</li> <li>Bur<sup>5</sup></li> <li>USPrEPO<sup>5</sup></li> <li>CAMPIONI</li> <li>BRNE (1 o 2)</li> <li>NENIB</li> <li>BRNIB</li> </ul> <p>Oppure nel caso la lunghezza del gel sia pari a 25 cm:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>NIBSC (1 o 2)</li> <li>BRNE (1 o 2)</li> <li>Bur<sup>5</sup></li> <li>USPrEPO<sup>5</sup></li> <li>CAMPIONI</li> <li>BRNE (1 o 2)</li> <li>CAMPIONI</li> <li>BRNE (1 o 2)</li> <li>CAMPIONI</li> <li>NIBSC (1 o 2)</li> <li>BRNE (1 o 2)</li> <li>NIBSC (1 o 2)</li> <li>Dyn<sup>5</sup></li> <li>MIR</li> </ul>

Compilare la tabella seguente in base alla sequenza di caricamento:

Posizione	Campione	Volume di ritentato (µl)
1	MIR	20
2	NIBSC	20
3	BRP + NESP	16+10
4	BRP + NESP	16+10
5	NIBSC	20
6	USP MIR	27
7	Bur	20
8	NIBSC	20

<sup>4</sup> Quantitativo massimo per ogni strip/pozzetto: 20 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.

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

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

9	BUR STAB	40
10	NIBSC	20
11	IOE003 B4433C	55
12	NIBSC	20
13	IOE003 B443387A	40
14	NIBSC	20
15	MIR	20
16	BRP + NESP	10+10
17		
18		
19		
20		
21		
22		
23		
24		
25		
26		
27		
28		
29		
30		

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

Potenziale (V)	Corrente (mA)	Potenza (W)	Potenziale per ora (Vh)	Tempo (min)
317	25	9	1	0'
1539	16,2	25	4000	3 h 10'

43  Tagliare due rettangoli di Durapore e Immobilon P e 16 rettangoli di carta da filtro<sup>6</sup> o simile delle dimensioni di 8 (esatti) x 16,5 cm. Nel caso la lunghezza del gel sia pari a 25 cm, le dimensioni sono 8 x 22,5 cm.

44  Preparare GLI-TRIS aggiungendo a 7,21 g di Glicina [R-164 Lotto 009 ] 1,51g di Trizmabase [R-167 Lotto 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 594], acqua ultrapura e GLI-TRIS

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

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

- 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<sup>6</sup>, in modo tale che si imbevano di soluzione per capillarità.

49 <input type="checkbox"/>	Prolungare la corsa																
	SI <input type="checkbox"/>	NO <input checked="" type="checkbox"/> 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:																
	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 15%;">Potenziale (V)</th> <th style="width: 15%;">Corrente (mA)</th> <th style="width: 15%;">Potenza (W)</th> <th style="width: 15%;">Potenziale per ora (Vh)</th> <th style="width: 15%;">Tempo (min)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td> </td> <td> </td> <td> </td> <td> </td> <td> </td> </tr> <tr> <td> </td> <td> </td> <td> </td> <td> </td> <td> </td> </tr> </tbody> </table>	Potenziale (V)	Corrente (mA)	Potenza (W)	Potenziale per ora (Vh)	Tempo (min)											
Potenziale (V)	Corrente (mA)	Potenza (W)	Potenziale per ora (Vh)	Tempo (min)													

- 50  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>40</td> <td>132</td> <td>1</td> <td>0'</td> </tr> <tr> <td>21</td> <td>132</td> <td>3</td> <td>30'</td> </tr> </tbody> </table>	Potenziale (V)	Corrente (mA)	Potenza (W)	Tempo (min)	40	132	1	0'	21	132	3	30'
Potenziale (V)	Corrente (mA)	Potenza (W)	Tempo (min)										
40	132	1	0'										
21	132	3	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 090]. 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"/>	Posizionare la vaschetta per 60 minuti in incubatore a 37°C.												
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"/>	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 <input checked="" type="checkbox"/>	Posizionare la vaschetta sullo Slow mixer per 60 min												
65 <input checked="" type="checkbox"/>	Lavare la IP1 con PBS												
66 <input checked="" type="checkbox"/>	<p>Preparare la soluzione Clone AE75A</p> <p>Aggiungere 40 µl<sup>7</sup> di anticorpo antiipo [R-173 Lotto 052] a 40 ml di LFM 1%</p>												
67 <input checked="" type="checkbox"/>	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 <input checked="" type="checkbox"/>	Posizionare la vaschetta sullo Slow mixer per 60 min: in caso di tempi superiori, porre lo Slow mixer in frigorifero (in quest'ultimo caso dopo aver tolto la vaschetta dal frigorifero lasciarla ad agitare sullo Slow mixer a T ambiente per circa 20 min)												

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

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

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

**E - SECONDO BLOTTING**

72 <input checked="" type="checkbox"/>	Preparare l'acido acetico 0,7% Portare a volume con acqua ultrapura in un matraccio da 500 ml 3,5 ml di acido acetico [R-003 Lotto 012].												
73 <input checked="" type="checkbox"/>	Preparare tre vaschette delle dimensioni di 25 x 25 x 8 cm contenenti rispettivamente metanolo, acqua ultrapura e acido acetico 0,7%												
74 <input checked="" type="checkbox"/>	Immergere un rettangolo della Immobilon P nella vaschetta contenente metanolo [R-038 Lotto 394] 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 <input checked="" type="checkbox"/>	Immergere un rettangolo della Durapore nella vaschetta contenente acido acetico allo 0,7% per almeno 20 minuti.												
76 <input checked="" type="checkbox"/>	5 minuti prima di utilizzarli, appoggiare ai bordi della vaschetta contenente acido acetico 0,7% i fogli di carta da filtro o simile in due pacchetti da quattro ciascuno <sup>6</sup> , in modo tale che si imbevano di soluzione per capillarità												
77 <input checked="" type="checkbox"/>	Sulla piastra del Nova Blot posizionare il pacchetto da quattro fogli di carta da filtro												
78 <input checked="" type="checkbox"/>	Lavare la IP1 con PBS e sovrapporla rapidamente al pacchetto												
79 <input checked="" type="checkbox"/>	Sovrapporre rapidamente la Durapore												
80 <input checked="" type="checkbox"/>	Sovrapporre rapidamente la Immobilon P (al termine della corsa nominata IP2)												
81 <input checked="" type="checkbox"/>	Sovrapporre rapidamente il pacchetto da quattro fogli di carta da filtro <sup>6</sup>												
82 <input checked="" type="checkbox"/>	Sovrapporre quindi un rettangolo di parafilm, facendo pressione con un rullo, per eliminare le bolle d'aria.												
83 <input checked="" type="checkbox"/>	<p>Chiudere il supporto e impostare i seguenti parametri:</p> <p>Potenziale: 35 V Potenza: 40 W Corrente: 0,8 mA x Area del gel Durata: 10 min</p> <p>Completare la seguente tabella con i parametri di inizio e fine corsa:</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 25%;">Potenziale (V)</th> <th style="width: 25%;">Corrente (mA)</th> <th style="width: 25%;">Potenza (W)</th> <th style="width: 25%;">Tempo (min)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">6</td> <td style="text-align: center;">100</td> <td style="text-align: center;">1</td> <td style="text-align: center;">10</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">6</td> <td style="text-align: center;">100</td> <td style="text-align: center;">1</td> <td style="text-align: center;">10</td> </tr> </tbody> </table>	Potenziale (V)	Corrente (mA)	Potenza (W)	Tempo (min)	6	100	1	10	6	100	1	10
Potenziale (V)	Corrente (mA)	Potenza (W)	Tempo (min)										
6	100	1	10										
6	100	1	10										

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

84 <input type="checkbox"/>	Si è interrotta l'analisi all'incubazione con l'anticorpo primario	
	SI <input type="checkbox"/>	NO <input checked="" type="checkbox"/> andare al punto 85
	Preparare la soluzione LFM 1% Portare a volume con PBS in un matraccio da 100 ml 1 g di latte in polvere a bassi grassi [R-178 Lotto     ]. Agitare con agitatore magnetico.	
85 <input checked="" type="checkbox"/>	Al termine della seconda migrazione aprire il supporto, prelevare il rettangolo di IP2 e immergerlo in una vaschetta da 30x 15 x 8 cm 250 ml di LFM 5% (oppure INK); immergere la IP1 in una vaschetta contenente PBS e conservarla in frigo fino al termine dell'analisi.	
86 <input checked="" type="checkbox"/>	Posizionare la vaschetta sullo Slow mixer per 60 min.	
87 <input checked="" type="checkbox"/>	Lavare la IP2 con PBS	
88 <input checked="" type="checkbox"/>	Preparare ANTI IgG Aggiungere: <input checked="" type="checkbox"/> 26 µl di anticorpo segnato con la biotina Pierce [R-175 Lotto <i>03</i> ] a 40 ml di LFM 1% <input type="checkbox"/> 10 µl di anticorpo segnato con la biotina Paris [R-175 Lotto     ] a 40 ml di LFM 1%	
89 <input checked="" type="checkbox"/>	Mettere in una vaschetta di vetro da 17x 8 cm (dimensioni interne-opp. da 25x13 in caso di gel da 25 cm) 40 ml di soluzione ANTI IgG e immergervi la IP2	
90 <input checked="" type="checkbox"/>	Posizionare la vaschetta sullo Slow mixer per 90 min, in caso di tempi superiori posizionare lo Slow mixer in frigo (in quest'ultimo caso dopo aver tolto la vaschetta dal frigorifero lasciarla ad agitare sullo Slow mixer a T ambiente per circa 20 min)	
91 <input checked="" type="checkbox"/>	Preparare le soluzioni PBS  la soluzione LFM 0,5% Portare a volume con PBS in un matraccio da 2000 ml 10 g di latte in polvere a bassi grassi [R-178 Lotto <i>03</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>03</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>03</i> ] 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
<b>RICERCA DI ERITROPOIETINA RICOMBINANTE E ANALOGHI</b>		
Rif. MP031 - Allegato	Pag. 10/10	Rev. 9

103 <input checked="" type="checkbox"/>	Preparare <input checked="" type="checkbox"/> subito prima di utilizzarla la soluzione Covalight, mescolando uguali volumi (15 ml + 15 ml) delle due soluzioni West Pico Pierce [R-176 Lotto <u>CL9</u> ]; <input type="checkbox"/> 10 minuti prima del suo utilizzo la soluzione Covalight, conservandola al buio; aggiungendo 25 gocce di CovB [R-176 B Lotto ] in 25 ml di CovA [R-176 A Lotto ].
104 <input checked="" type="checkbox"/>	Mettere in una vaschetta di vetro da 17x 8 cm (dimensioni interne-oppure da 25x 13 in caso di gel da 25 cm) la soluzione Covalight preparata al punto precedente e immergervi la IP2
105 <input checked="" type="checkbox"/>	Agitare la vaschetta per qualche secondo

**F - RIVELAZIONE MEDIANTE CHEMILUMINESCENZA**

106 <input checked="" type="checkbox"/>	Posizionare la IP2 nel rivelatore.
107 <input 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 checked="" type="checkbox"/> 30 minuti

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

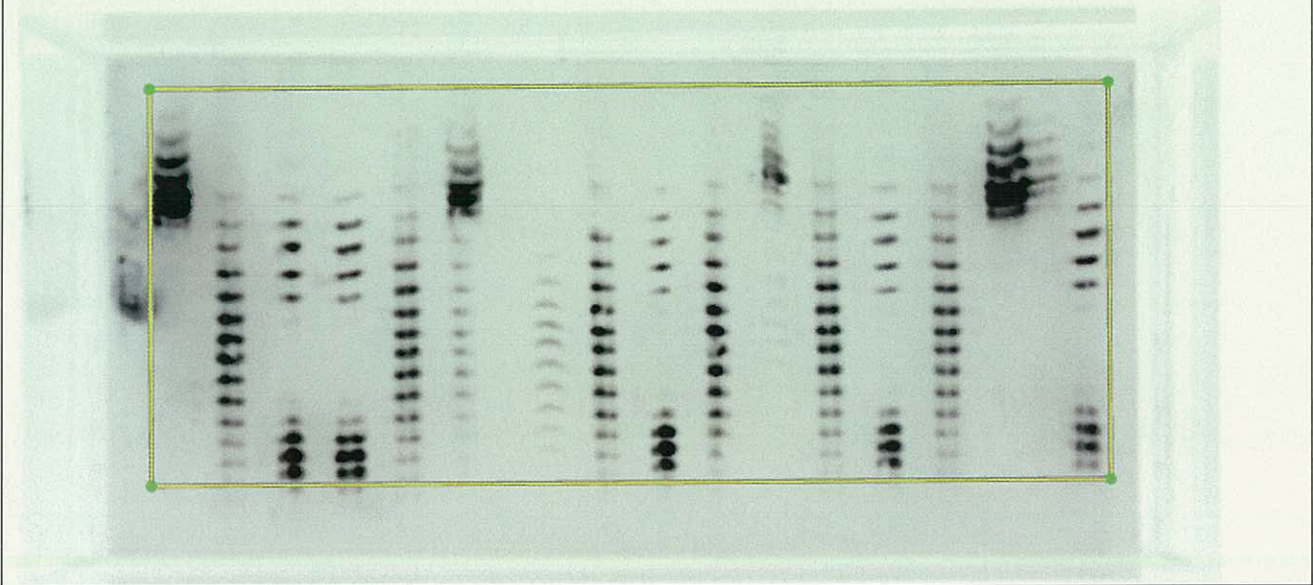
Operatore Sigla e Firma	Data	Operazioni eseguite
<u>CS Stefania</u>	<u>5/7/10</u>	da punto [1] a punto [2] e da [3] a [4]
<u>CS Stefania</u>	<u>6/7/10</u>	da punto [2] a punto [3] e [4] e [5]
<u>CS Stefania</u>	<u>7/7/10</u>	da punto [3] a punto [4]
		da punto [ ] a punto [ ]
		da punto [ ] a punto [ ]
		da punto [ ] a punto [ ]
		da punto [ ] a punto [ ]



### II.2.8 Second Confirmation Test Results

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

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



GENERAL VIEW OF ALL THE PROCESSED LANES

07/07/2010  
12.26

## GASepo Analysis Report

GAS  
epo

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

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

1. Mir	2. uEPO	3. rEPO + NESP	4. rEPO + NESP	5. uEPO	6. Usp Mir	7. Bur	8. uEPO	9. Bur St ab	10. uEPO	11. 10E003 B4433 C	12. uEPO	13. 10E003 B4433 lab	14. uEPO	15. Mir	16. rEPO + NESP
100,0%	26,5%	37,3%	35,0%	28,4%	86,8%	17,2%	26,0%	23,1%	26,2%	92,6%	29,2%	35,4%	34,1%	100,0%	52,4%
0,0%	9,5%	62,7%	65,0%	12,7%	1,8%	11,9%	13,8%	76,9%	11,9%	1,4%	9,6%	64,6%	10,9%	0,0%	47,6%

COLORLEGEND: EPOep (green), DARBEPOCTINA (red)

SEIBERSDORF  
LABORATORIES  
BORN IN 1988

GASepo software (c) 2004-2009 - Seibersdorf Labor GmbH  
 Report Page 2/10

**POSITIVE CONTROL: RHEPO AND NESP STANDARDS (BRNE)**

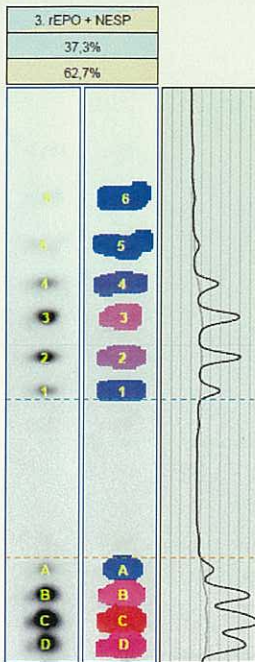
07/07/2010  
12.26

**GASepo Analysis Report**



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

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



Lane #3: rEPO + NESP									
Name	Comment	Cent X	Cent Y	Cent Z	Max X	Max Y	Max Z	Volume Abs	Volume nMax
6		33,1	89,1	564,89	35	90	1977,24	480153,0	2,8
5		29,6	128,1	1263,89	23	128	4811,30	1164042,0	6,8
4		30,9	159,2	5633,53	32	159	22805,06	4146277,0	24,1
3		32,4	186,2	13985,88	38	184	49715,60	8727189,0	50,7
2		31,1	218,9	11813,34	36	218	49666,36	7643234,0	44,4
1		31,2	246,3	5838,08	31	246	24691,61	3713019,0	21,6
A		32,1	391,4	4877,36	31	391	16205,64	2672792,0	15,5
B		32,5	411,9	17667,39	27	412	48364,71	11389020,0	66,1
C		32,3	432,5	22490,24	27	428	47818,46	17227520,0	100,0
D		33,1	451,7	16563,31	29	450	45312,65	12124340,0	70,4

SEIBERSDORF  
LABORATORIES  
BAMM IN ROMA NIBSC

GASepo software (c) 2004-2009, Seibersdorf Labor GmbH  
Report Page 2/10

**NEGATIVE CONTROL: URINARY EPO STANDARD: NIBSC (UEPO)**

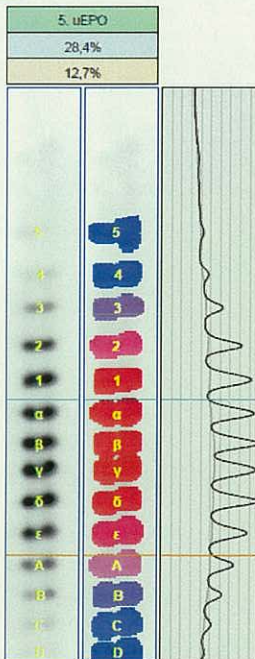
07/07/2010  
12.26

**GASepo Analysis Report**



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

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



Lane #5: uEPO									
Name	Comment	Cent X	Cent Y	Cent Z	Max X	Max Y	Max Z	Volume Abs	Volume nMax
5		25,2	116,9	872,02	17	118	3167,67	787429,7	9,7
4		27,5	151,9	1408,48	34	151	5088,76	1115518,0	13,7
3		26,7	179,2	3839,74	33	179	11992,09	2864448,0	35,2
2		26,0	210,2	7383,71	33	210	22981,83	5559932,0	68,4
1		26,7	238,3	10337,78	34	238	33184,98	7877391,0	96,9
α		26,6	265,2	9385,98	35	265	28822,24	7809138,0	96,1
β		26,7	289,8	10291,03	18	290	32711,49	7667402,0	94,6
γ		27,2	311,6	10264,53	37	309	33991,35	8129507,0	100,0
δ		27,2	337,0	10153,82	18	338	34730,41	7767669,0	95,5
ε		26,9	362,8	7705,58	19	364	24930,33	6310873,0	77,6
A		27,0	388,9	5019,37	35	388	16902,45	4090788,0	50,3
B		28,5	413,5	3106,44	36	413	11879,19	2339149,0	28,8
C		27,4	437,7	1562,82	35	437	5297,18	1322232,0	16,3
D		28,3	460,2	587,14	36	460	1949,85	402775,8	5,0

SEIBERSDORF  
LABORATORIES  
BAMM IN ROMA NIBSC

GASepo software (c) 2004-2009, Seibersdorf Labor GmbH  
Report Page 7/10

**POSITIVE CONTROL: MIRCERA STANDARD(MIR)**

07/07/2010  
12.26

## GASepo Analysis Report

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

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

1. Mir

100,0%

0,0%

Lane #1: Mir										
Name	Comment	Cent X	Cent Y	Cent Z	Max X	Max Y	Max Z	Volume Abs	Volume nMax	
8		26,2	30,5	690,00	15	33	2317,33	758999,2	2,7	
7		25,0	60,2	3592,29	14	62	10715,51	4167058,0	14,9	
6		25,2	84,3	13434,58	14	86	37414,26	14509350,0	51,7	
5		25,3	106,8	23454,34	38	107	45436,63	25143060,0	89,7	
4		26,2	124,9	29861,36	38	123	44823,81	28039820,0	100,0	
3		26,3	141,0	27159,23	38	132	44434,09	27295030,0	97,3	
2		8,4	155,8	12021,50	8	156	27456,45	3678581,0	13,1	
2 + 1		20,4	156,1	9809,30	8	156	27456,45	5728634,0	20,4	
1		41,9	156,7	7374,29	41	151	19991,31	2050053,0	7,3	

GASepo software (c) 2004-2009, Seibersdorf Labor GmbH

Report Page 31/31

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

07/07/2010  
12.26

## GASepo Analysis Report

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

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

11. 10E003 B4433C

92,6%

1,4%

Lane #11: 10E003 B4433C										
Name	Comment	Cent X	Cent Y	Cent Z	Max X	Max Y	Max Z	Volume Abs	Volume nMax	
9		26,8	48,0	2089,05	32	58	5452,53	1142708,0	9,6	
8		26,1	62,8	4489,35	30	64	8603,66	2047145,0	17,1	
7		28,0	83,6	9571,25	34	97	20877,24	7092300,0	59,3	
6		31,2	107,0	15178,27	37	111	39609,86	11960480,0	100,0	
5		31,8	123,4	7859,36	34	118	16277,99	2184903,0	18,3	
4		29,7	142,0	1835,11	35	143	7231,27	1539655,0	12,9	
3		30,9	168,2	256,98	36	160	1070,51	153929,0	1,3	
2		29,3	201,1	308,23	32	202	1088,36	200964,9	1,7	
1		29,5	228,5	584,90	33	229	1894,38	476691,0	4,0	
α		30,0	255,2	417,84	30	255	1383,00	271598,7	2,3	
β		28,0	281,2	598,86	25	280	2186,47	454533,8	3,8	
γ		30,2	302,0	599,16	33	302	1947,87	454160,8	3,8	
δ		27,8	325,2	359,16	34	326	1150,72	368139,1	3,1	
ε		30,5	354,7	188,61	33	353	689,47	207094,9	1,7	
A		29,9	379,4	272,64	23	378	840,81	212388,0	1,8	
B		25,6	404,6	209,81	37	404	665,51	188200,3	1,6	

GASepo software (c) 2004-2009, Seibersdorf Labor GmbH

Report Page 13/19

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

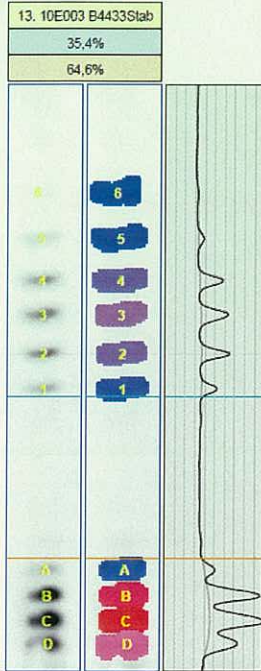
07/07/2010  
12.26

**GASepo Analysis Report**



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

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



Lane #13: 10E003 B4433Slab									
Name	Comment	Cent X	Cent Y	Cent Z	Max X	Max Y	Max Z	Volume Abs	Volume nMax
6		24,0	86,2	370,08	30	86	1169,12	305886,2	2,5
5		26,9	122,7	1300,41	28	123	4509,27	1035122,0	8,5
4		27,0	156,2	5050,97	30	156	19657,45	3783179,0	31,2
3		27,6	183,6	6671,38	32	183	22312,09	4930151,0	40,6
2		28,5	214,6	6394,22	32	214	25555,04	4290520,0	35,3
1		28,8	242,6	3579,37	31	243	14264,43	2512718,0	20,7
A		31,1	386,3	3095,01	34	386	10380,57	1881768,0	15,5
B		32,3	406,8	14666,14	39	407	49557,05	9811646,0	80,8
C		32,4	426,9	16673,60	31	430	49685,09	12138380,0	100,0
D		33,3	445,3	8503,22	36	445	34915,70	6938630,0	57,2



**POSITIVE REFERENCE SAMPLE: USPMIR**

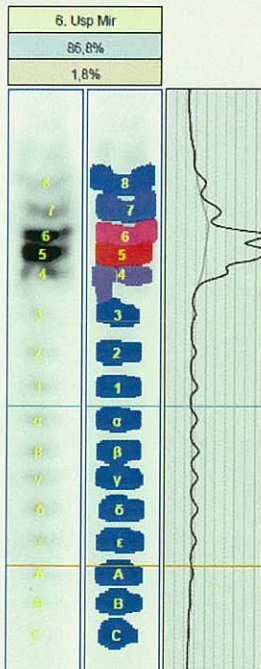
07/07/2010  
12.26

**GASepo Analysis Report**



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

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



Lane #6: Usp Mir									
Name	Comment	Cent X	Cent Y	Cent Z	Max X	Max Y	Max Z	Volume Abs	Volume nMax
8		29,9	73,9	2523,26	41	74	9866,44	2561108,0	10,9
7		34,2	96,2	5279,21	39	99	19882,00	5258094,0	22,3
6		30,2	116,7	20888,40	39	116	51170,03	16355610,0	69,5
5		27,5	131,4	29821,69	39	130	50830,84	23529310,0	100,0
4		27,4	146,9	8516,70	34	147	29229,74	7554310,0	32,1
3		24,4	179,6	1148,89	22	179	5436,89	714609,1	3,0
2		23,8	210,1	1661,88	21	211	6382,09	1083545,0	4,6
1		24,9	237,8	2325,56	26	239	8564,92	1423245,0	6,0
α		24,1	264,2	2385,56	21	263	8437,31	1593552,0	6,8
β		24,7	289,6	2807,57	23	290	11136,36	1737884,0	7,4
γ		24,8	310,9	2244,58	24	311	9090,18	1483670,0	6,3
δ		26,6	335,9	2503,84	24	336	10189,86	1682579,0	7,2
ε		27,2	361,3	1788,08	24	361	6855,89	1199804,0	5,1
A		26,3	387,3	960,57	24	388	3557,90	657028,9	2,8
B		26,1	410,5	527,41	25	411	1979,30	343873,2	1,5
C		24,8	436,2	328,88	24	436	1125,05	197656,8	0,8



**NEGATIVE REFERENCE SAMPLE (BUR)**

07/07/2010  
12.26

## GASepo Analysis Report

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

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

7. Bur
17,2%
11,9%

Lane #7: Bur									
Name	Comment	Cent X	Cent Y	Cent Z	Max X	Max Y	Max Z	Volume Abs	Volume nMax
5		26,4	104,8	148,01	24	104	547,14	124328,6	5,3
4		21,1	142,3	213,70	20	139	720,23	215832,8	9,1
3		25,6	170,2	373,34	27	169	1336,49	456600,8	19,3
2		28,1	200,5	683,41	33	200	2592,80	724415,2	30,7
1		27,5	229,6	1425,69	29	229	5132,21	1240352,0	52,5
α		27,1	256,4	2091,64	21	256	7004,49	1794630,0	76,0
β		28,6	279,8	2579,37	29	279	9797,27	2244051,0	95,0
γ		29,8	301,1	2448,15	36	301	8971,06	2362466,0	100,0
δ		29,8	326,3	1966,77	32	325	7073,37	2004134,0	84,8
ε		29,5	352,4	1846,69	35	352	6132,20	1673103,0	70,8
ζ		30,4	378,5	1428,99	30	377	5063,69	1316102,0	55,7
A		29,9	403,3	1034,30	35	403	3743,61	980514,5	41,5
B		29,7	427,7	587,65	35	427	2228,63	631728,9	26,7
C		32,9	451,1	296,04	30	450	1008,84	304922,3	12,9

GASepo software (c) 2004-2009, Seibersdorf Labor GmbH

Page 3 of 18

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

07/07/2010  
12.26

## GASepo Analysis Report

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

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

9. Bur Stab
23,1%
76,9%

Lane #9: Bur Stab									
Name	Comment	Cent X	Cent Y	Cent Z	Max X	Max Y	Max Z	Volume Abs	Volume nMax
6		29,6	85,2	285,94	32	85	795,89	211307,4	1,2
5		29,1	122,2	1011,86	32	123	4380,65	717411,2	4,1
4		28,7	155,2	3517,49	31	155	14930,21	2546659,0	14,4
3		28,5	183,5	4915,82	30	184	20616,19	3445989,0	19,5
2		29,5	213,4	7193,27	31	214	33810,93	4467018,0	25,2
1		30,3	240,8	3388,90	34	241	16456,39	2192621,0	12,4
A		33,1	386,2	4699,92	33	386	17842,19	2848151,0	16,1
B		33,8	407,5	19993,91	44	408	51344,20	14275650,0	80,6
C		34,1	427,3	23676,82	43	432	50510,68	17710260,0	100,0
D		34,5	446,5	15473,63	41	448	48647,20	10320910,0	58,3

GASepo software (c) 2004-2009, Seibersdorf Labor GmbH

Page 11 of 19

### ***II.2.9 Test Validity Data***

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

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

**II.2.10 Result review**

FEDERAZIONE MEDICO SPORTIVA ITALIANA LABORATORIO ANTIDOPING	FOGLIO DI LAVORO	FL039
<b>VERBALE DI COMUNICAZIONE RISULTATI DI CONFERMA</b>		

Rif. PG001	Pag. 1/1
	Rev. 2

LOTTO DI ACCETTAZIONE: <u>10E003</u>	CODICE INTERNO: <u>B4433</u>
CONFERMA PER: <u>MIRCIERA</u>	DATA: <u>7/7/10</u>

VALUTAZIONE/OSSERVAZIONI
<u>Presenza di miniera</u>

n.a.*	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 type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> ALTRO _____

(\* n.a. : non applicabile)

RESPONSABILE	<u>ces</u>	<u>Stefanini</u>
ESECUZIONE PROVA	Sigla	Firma

=====

VALUTAZIONE/OSSERVAZIONI DEL DIRETTORE SCIENTIFICO

<u>OK - criteri interni di portate soddisfatte. Inviare immagini al laboratorio di Parigi per 2nd opinion.</u>

DIRETTORE SCIENTIFICO:	<u>FMSI</u>	<u>[Firma]</u>
	Sigla	Firma

DATA: 7/7/10

### ***II.2.11 Conclusions***

Data were evaluated according to the WADA technical document TD2009EPO.

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

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

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



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



Département des analyses

110070800141



110070800141


FMSI  
LABORATORIO ANTIDOPING  
Prot. n° 0436 del. 08/07/2010

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

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

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

Best regards,



Dr Françoise LASNE  
Director

## II.4 SDS analysis

### *II.4.1 Instrumental conditions for SDS analysis*

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

Focusing:

200 V

120 mA

25 W

time: 55min

First blotting:

40 V

mA adjusted for the gel area

90 W

time: 45 min

Second blotting:

35 V

mA adjusted for the gel area

40 W

time: 10 min

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

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

**II.4.2 Additional evidence**

## Worksheet for the SDS-Page procedure

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

Data e ora di inizio analisi: 14/06/10 12,10

Lotto di accettazione	Codice campioni preparati	
10E003	DA: BU433C	A:
	DA:	A:
	DA:	A:
	DA:	A:
	DA:	A:

## A- PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

1 <input checked="" type="checkbox"/>	Condizionare il campione a temperatura ambiente e preparare la soluzione Complete portando a volume con acqua ultrapura in un matraccio da 10 ml 5 tavolette di Complete <sup>1</sup> [R-172 Lotto 058] e mescolando mediante agitatore elettromagnetico
2 <input checked="" type="checkbox"/>	Prelevare 20 ml di urina <sup>2</sup> (in caso di prelievi inferiori, portare a 20 ml con TRISHCl 50 mM [TRISHCl 50 Lotto ---]) e trasferirli in una provetta da 50 ml -es 14/06/10
3 <input checked="" type="checkbox"/>	Aggiungere 400 µl di soluzione Complete (200 µl ogni 10 ml di urina)
4 <input checked="" type="checkbox"/>	Aggiungere 2 ml di TRISHCl 3,75M [TRISHCl 3.75 Lotto 023] (1ml ogni 10 ml di urina)
5 <input checked="" type="checkbox"/>	Controllare il pH con delle strips indicatrici in modo che sia compreso fra 6,8 e 7,9; in caso non risulti nel range, correggerlo con tampone TRISHCl 3,75M [TRISHCl 3.75 Lotto ---] -es 14/06/10
6 <input checked="" type="checkbox"/>	Centrifugare per 10 min nella centrifuga refrigerata a 20°C con rotore basculante a 3000 rcf
7 <input checked="" type="checkbox"/>	Applicare alle provette il componente della filtrazione del kit Steriflip, assemblandolo in posizione verticale
8 <input checked="" type="checkbox"/>	Ruotare delicatamente di 180° il Kit assemblato
9 <input checked="" type="checkbox"/>	Collegarlo alla pompa da vuoto per la filtrazione
10 <input checked="" type="checkbox"/>	Trasferire il filtrato nelle provette amicon ultra-15
11 <input checked="" type="checkbox"/>	Centrifugare per 20 min nella centrifuga refrigerata a 20°C con rotore basculante a 3500 rcf
12 <input checked="" type="checkbox"/>	Eliminare il filtrato e lavare il filtro riempiendo la parte superiore della Amicon ultra-15 con TRISHCl 50 mM [TRISHCl 50 Lotto 102] e 400 µl di soluzione Complete (200µl ogni 10 ml di urina)
13 <input checked="" type="checkbox"/>	Centrifugare per 20 min nella centrifuga refrigerata a 20°C con rotore basculante a 3500 rcf
14 <input checked="" type="checkbox"/>	Nel frattempo lavare le Amicon ultra-4 con 2 ml di acqua ultrapura ponendole a centrifugare a 5000 rpm per 20 min nella centrifuga refrigerata a 17°C con rotore ad angolo fisso.
15 <input checked="" type="checkbox"/>	Prelevare con una micropipetta dalla parte superiore della Amicon ultra-15 il residuo (circa 120µl) e trasferirlo nelle Amicon ultra-4 precedentemente lavate
16 <input checked="" type="checkbox"/>	Centrifugare a 6200 rpm per 60 min nella centrifuga refrigerata a 17°C con rotore ad angolo fisso
17 <input checked="" type="checkbox"/>	Misurare il volume di ritentato, trasferirne 20 µl in un pozzetto di una piastra del Quantikine IVD Epo kit
18 <input checked="" type="checkbox"/>	Aggiungere nel pozzetto 80 µl di diluente (fornito nel Quantikine IVD Epo kit)
19 <input checked="" type="checkbox"/>	Mettere ad agitare la piastra con i pozzetti su di un agitatore Delfia Plateshake a circa 600rpm per un'ora o in frigorifero per tutta la notte
20 <input checked="" type="checkbox"/>	Preparare PBS Portare a volume con acqua ultrapura in un matraccio da 1000 ml 5 tavolette di tampone fosfato salino [R-165 Lotto 054], Mescolare mediante agitatore elettromagnetico.  Tampone LDS (1x) Mescolare 100 µl di tampone LDS(4x) (R-398) con 40 µl di agente riducente (10x) (R-402) e 260 µl di acqua ultrapura

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

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

21 <input checked="" type="checkbox"/>	Svuotare i pozzetti e lavarli con PBS
22 <input checked="" type="checkbox"/>	Eluire le proteine legate al pozzetto con 30 µl del tampone LDS (1x) lasciando ad agitare su di un agitatore Delfia Plateshake per qualche minuto
23 <input checked="" type="checkbox"/>	Trasferire l'eluato in una provetta eppendorf e posizionarla a scaldare per 5 min a 95°C sotto agitazione (circa 600 rpm)
24 <input checked="" type="checkbox"/>	Immergere la provetta eppendorf nel bagno refrigerante per 30 s
25 <input checked="" type="checkbox"/>	Prelevare gli standard dal congelatore
26 <input checked="" type="checkbox"/>	Aggiungere 2,5 µl di tampone LDS (4x) [(R-398 lotto 002 )] e 1 µl di agente riducente (10x) [R-402 lotto 002 ] per 10 µl di standard
27 <input checked="" type="checkbox"/>	Posizionarli a scaldare per 5 min a 95°C
28 <input checked="" type="checkbox"/>	Immergere le vials nel bagno refrigerante per 30 sec

## B- CORSA ELETTROFORETICA

29 <input checked="" type="checkbox"/>	Preparare Il tampone MOPS (1x) Diluire il tampone MOPS running buffer (20x) [R-400 lotto 002 ], mescolando 50 ml del tampone MOPS (20x) con 950 ml di acqua ultrapura  Catalita Mescolare 200ml del tampone MOPS (1x) con 500 µl di antiossidante [R-401 lotto 002 ]
30 <input checked="" type="checkbox"/>	Prendere un NuPAGE 10% Bis-Tris gel 1.5mm* 10 well [R404 lotto 002 ], estrarlo dalla guaina di impacchettamento, eliminare il solvente e lavarlo con acqua ultrapura (maneggiare il tutto tenendolo per il bordo)
31 <input checked="" type="checkbox"/>	Rimuovere la striscia adesiva dal retro del gel cassette
32 <input checked="" type="checkbox"/>	Rimuovere il copripozzetti e con una pasteur lavare i pozzetti con il tampone MOPS (1x), ruotare in un unico movimento il gel cassette, rimuovendo il tampone
33 <input checked="" type="checkbox"/>	Ripetere tale operazione due volte. Essere sicuri che non ci siano bolle d'aria nei pozzetti
34 <input checked="" type="checkbox"/>	Assemblare la cella, ponendo il gel cassette con il lato dei pozzetti rivolto verso il Buffer core. Nel caso si faccia correre solo un gel, si ponga il Buffer Dam (pannello divisorio di plastica) per chiudere la camera contenente il Buffer core (catodo) altrimenti si metta al suo posto il secondo gel cassette
35 <input checked="" type="checkbox"/>	Riempire la camera contenente il Buffer core con il catalita, coprire i pozzetti. Essere sicuri che il livello del catalita non scenda in quanto la cella non è correttamente assemblata
36 <input checked="" type="checkbox"/>	Prelevare i campioni e gli standard e dispensarli nei pozzetti secondo il seguente schema:  SeeBlue Standard di conferma Bur Campione NIBSC (1 o 2) Usp di conferma BRP <sup>3</sup> NESP NIBSC (1 o 2) SeeBlue  Compilare la tabella seguente in base alla sequenza di caricamento:

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

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

Posizione	Campione	Volume di ritentato (µl)
1	SEE BLUE	20
2	H12	20
3	PUR	20
4	BOEM3BU433C	20
5	N18SC	20
6	USPH12	20
7	BRP	20
8	NESD	20
9	N18SC	20
10	SEE BLUE	20

37  È sufficiente un solo gel cassette  
 SI (vai al punto 38)       NO Compilare la tabella seguente in base alla sequenza di caricamento:

Posizione	Campione	Volume di ritentato (µl)
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		
9		
10		

38  Riempire l'anodo con il tampone MOPS (1x), chiudere la cella e collegare gli elettrodi all'alimentatore che deve essere spento.

39  Chiudere la cella e impostare i seguenti parametri:  
 Potenziale: 200 V  
 Corrente: 120 mA  
 Potenza: 25 W  
 Tempo: 55 min

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

Potenziale (V)	Corrente (mA)	Potenza (W)	Tempo (min)
167	120	19,8	0
200	83	17,2	55'

40  Tagliare due rettangoli di Durapore e Immobilon P e 16 rettangoli di carta da filtro\* o simile delle dimensioni di 8 (esatti) x 7 cm

41  Preparare il Tampone Twobin aggiungendo a 7,21 g di Glicina [R-164 Lotto 009 ] 1,51g di Trizmabase [R-167 Lotto 009 ], 100 ml di Metanolo e portando a volume con acqua ultrapura in un matraccio da 500 ml

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

42 <input checked="" type="checkbox"/>	Dopo 20 min dall'inizio della corsa, preparare tre vaschette delle dimensioni di 25 x 25 x 8h cm contenenti rispettivamente metanolo [R-038 Lotto 873], acqua ultrapura e Tampone Twobin
43 <input checked="" type="checkbox"/>	Immergere un rettangolo della Immobilon P nella vaschetta contenente metanolo per 1 minuto, quindi immergerla in quella contenente acqua per 2 minuti e quindi in quella contenente Tampone Twobin per almeno 20 minuti e posizionarla sullo Slow mixer
44 <input checked="" type="checkbox"/>	Immergere un rettangolo della Durapore nella vaschetta contenente Tampone Twobin per almeno 20 minuti e posizionarla sullo Slow mixer
45 <input checked="" type="checkbox"/>	A circa 5 min dalla fine della corsa appoggiare ai bordi della vaschetta contenente Tampone Twobin i fogli di carta da filtro in due pacchetti da quattro ciascuno <sup>4</sup> , in modo tale che si imbevano di soluzione per capillarità

C-PRIMO BLOTTING

46 <input checked="" type="checkbox"/>	Alla fine della corsa rimuovere il gel cassette dalla cella												
47 <input checked="" type="checkbox"/>	Posizionare il gel cassette su di una superficie piana e inserire con attenzione il coltello per il gel tra le due lastre del gel cassette												
48 <input checked="" type="checkbox"/>	Fare forza con il coltello finchè non si rompono i legami che tengono unite le due lastre, rimuovere la lastra alla quale non è adeso il gel												
49 <input type="checkbox"/>	E' possibile immergere il gel in una vaschetta contenente Gli-Tris 2 (preparata di fresco pesando 3,02 g di Trizma, 7,21 g di Glicina e portando a un volume pari a 500ml con acqua ultrapura)												
50 <input checked="" type="checkbox"/>	Tagliare la parte di gel corrispondente ai pozzetti e la parte opposta sporgente												
51 <input checked="" type="checkbox"/>	Prelevare dalla vaschetta il rettangolo della Durapore e sovrapporlo rapidamente al Gel e analogamente sovrapporvi il rettangolo della Immobilon P e quindi un pacchetto di carta da filtro prelevati dalle vaschette												
52 <input checked="" type="checkbox"/>	Sovrapporre quindi un rettangolo di parafilm, facendo pressione con un rullo, per eliminare le bolle d'aria												
53 <input checked="" type="checkbox"/>	Mettendo il coltello sotto il gel staccarlo dalla lastra e capovolgere l'insieme (pacchetto, Immobilon P, Durapore e gel) sulla piastra Trans Blot SD Semidry Transfer Cell												
54 <input checked="" type="checkbox"/>	Sovrapporre rapidamente il secondo pacchetto di carta da filtro												
55 <input checked="" type="checkbox"/>	Sovrapporre quindi un rettangolo di parafilm, facendo pressione con un rullo, per eliminare le bolle d'aria												
56 <input checked="" type="checkbox"/>	<p>Chiudere il supporto e impostare i seguenti parametri:</p> <p>Potenziale: 40 V Corrente: 1,5 mA x Area del gel Potenza: 90 W Durata: 45 min</p> <p>Completare la seguente tabella con i parametri di inizio e fine corsa:</p> <table border="1" style="margin-left: 20px;"> <thead> <tr> <th>Potenziale (V)</th> <th>Corrente (mA)</th> <th>Potenza (W)</th> <th>Tempo (min)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>10</td> <td>84</td> <td>1</td> <td>1'</td> </tr> <tr> <td>26</td> <td>84</td> <td>2</td> <td>45'</td> </tr> </tbody> </table>	Potenziale (V)	Corrente (mA)	Potenza (W)	Tempo (min)	10	84	1	1'	26	84	2	45'
Potenziale (V)	Corrente (mA)	Potenza (W)	Tempo (min)										
10	84	1	1'										
26	84	2	45'										
57 <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 839]. 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 877]. Tale soluzione deve essere utilizzata entro trenta minuti dalla preparazione, causa ossidazione.</p>												
58 <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>												

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

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

59 <input checked="" type="checkbox"/>	Posizionare la vaschetta per 60 minuti in incubatore a 37°C.
60 <input checked="" type="checkbox"/>	Preparare le soluzioni LFM LFM 5% Portare a volume con PBS in un matraccio da 250 ml 12,5 g di latte in polvere a bassi grassi [R-178 Lotto 037]. Agitare con agitatore magnetico.  LFM 1% Portare a volume con PBS in un matraccio da 100 ml 1 g di latte in polvere a bassi grassi [R-178 Lotto 037]. Agitare con agitatore magnetico.
61 <input checked="" type="checkbox"/>	Lavare la IP1 con PBS, mettere in una vaschetta da 30x 15 x 8 cm 250 ml di LFM 5% e immergervi il rettangolo di IP1
62 <input checked="" type="checkbox"/>	Posizionare la vaschetta sullo Slow mixer per 60 min
63 <input checked="" type="checkbox"/>	Lavare la IP1 con PBS
64 <input checked="" type="checkbox"/>	Preparare la soluzione Clone AE75A Aggiungere 40 µl di anticorpo antiipo [R-173 Lotto 077] a 40 ml di LFM 1%
65 <input checked="" type="checkbox"/>	Mettere in una vaschetta di vetro da 17x 8 cm 40 ml di soluzione Clone AE75A e immergervi la IP1
66 <input checked="" type="checkbox"/>	Posizionare la vaschetta sullo Slow mixer per 60 min; in caso di tempi superiori, porre lo Slow mixer in frigorifero (in quest'ultimo caso dopo aver tolto la vaschetta dal frigorifero lasciarla ad agitare sullo Slow mixer a T ambiente per circa 20 min)
67 <input checked="" type="checkbox"/>	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 037]. Agitare con agitatore magnetico.  250 ml di <input checked="" type="checkbox"/> LFM 5% <input type="checkbox"/> INK:aggiungere 250 µl di Indian ink [R-177 Lotto ] a 250 ml di LFM 5% precedentemente preparato
68 <input checked="" type="checkbox"/>	Lavare in una vaschetta da 30x 15 x 8 cm la IP1 con la soluzione LFM 0,5%, ponendola sullo Slow mixer per 1 minuto
69 <input checked="" type="checkbox"/>	Effettuare tale lavaggio per altre tre volte ponendo la vaschetta sullo Slow mixer per 10 minuti

## D-SECOND BLOTTING

70 <input checked="" type="checkbox"/>	Preparare l'acido acetico 0,7% Portare a volume con acqua ultrapura in un matraccio da 500 ml 3,5 ml di acido acetico [R-003 Lotto 03 ]
71 <input checked="" type="checkbox"/>	Preparare tre vaschette delle dimensioni di 25 x 25 x 8 cm contenenti rispettivamente metanolo, acqua ultrapura e acido acetico 0,7%
72 <input checked="" type="checkbox"/>	Immergere un rettangolo della Immobilon P nella vaschetta contenente metanolo [R-038 Lotto 031] per 1 minuto, quindi immergerla in quella contenente acqua per 2 minuti e quindi in quella contenente acido acetico 0,7% per almeno 20 minuti
73 <input checked="" type="checkbox"/>	Immergere un rettangolo della Durapore nella vaschetta contenente acido acetico allo 0,7% per almeno 20 minuti
74 <input checked="" type="checkbox"/>	Dieci minuti prima di utilizzarli, appoggiare ai bordi della vaschetta contenente acido acetico 0,7% i fogli di carta da filtro o simile in due pacchetti da quattro ciascuno <sup>4</sup> , in modo tale che si imbevano di soluzione per capillarità
75 <input checked="" type="checkbox"/>	Sulla piastra del Nova Blot posizionare il pacchetto da quattro fogli di carta da filtro

FEDERAZIONE MEDICO SPORTIVA ITALIANA LABORATORIO ANTIDOPING	FOGLIO DI LAVORO	FL 167
SDS PAGE PER LA RICERCA DI ERITROPOIETINA RICOMBINANTE E ANALOGHI		
Rif. MP031 - Allegato		Pag. 6/7
		Rev. 0

76 <input checked="" type="checkbox"/>	Lavare la IP1 con PBS e sovrapporla rapidamente al pacchetto												
77 <input checked="" type="checkbox"/>	Sovrapporre rapidamente la Durapore												
78 <input checked="" type="checkbox"/>	Sovrapporre rapidamente la Immobilon P (al termine della corsa nominata IP2)												
79 <input checked="" type="checkbox"/>	Sovrapporre rapidamente il pacchetto da quattro fogli di carta da filtro <sup>4</sup>												
80 <input checked="" type="checkbox"/>	Sovrapporre quindi un rettangolo di parafilm, facendo pressione con un rullo, per eliminare le bolle d'aria												
81 <input checked="" type="checkbox"/>	<p>Chiudere il supporto e impostare i seguenti parametri:</p> <p>Potenziale: 35 V Potenza: 40 W Corrente: 0,8 mA x Area del gel Durata: 10 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>6</td> <td>50</td> <td>1</td> <td>0'</td> </tr> <tr> <td>6</td> <td>50</td> <td>1</td> <td>10'</td> </tr> </tbody> </table>	Potenziale (V)	Corrente (mA)	Potenza (W)	Tempo(min)	6	50	1	0'	6	50	1	10'
Potenziale (V)	Corrente (mA)	Potenza (W)	Tempo(min)										
6	50	1	0'										
6	50	1	10'										
82 <input checked="" type="checkbox"/>	<p>Si è interrotta l'analisi all'incubazione con l'anticorpo primario</p> <p>SI <input type="checkbox"/> NO <input checked="" type="checkbox"/> andare al punto 83</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     ]. Agitare con agitatore magnetico.</p>												
83 <input checked="" type="checkbox"/>	Al termine della seconda migrazione aprire il supporto, prelevare il rettangolo di IP2 e immergerlo in una vaschetta da 30x 15 x 8 cm 250 ml di LFM 5% (oppure INK)												
84 <input checked="" type="checkbox"/>	Posizionare la vaschetta sullo Slow mixer per 60 min.												
85 <input checked="" type="checkbox"/>	Lavare la IP2 con PBS												
86 <input checked="" type="checkbox"/>	<p>Preparare ANTI IgG</p> <p>Aggiungere:</p> <p><input type="checkbox"/> 26 µl di anticorpo segnato con la biotina Pierce [R-175 Lotto     ] a 40 ml di LFM 1%</p> <p><input type="checkbox"/> 10 µl di anticorpo segnato con la biotina Paris [R-175 Lotto     ] a 40 ml di LFM 1%</p>												
87 <input checked="" type="checkbox"/>	Mettere in una vaschetta di vetro da 17x 8 cm (dimensioni interne) 40 ml di soluzione ANTI IgG e immergervi la IP2												
88 <input checked="" type="checkbox"/>	Posizionare la vaschetta sullo Slow mixer per 90 min, in caso di tempi superiori posizionare lo Slow mixer in frigo (in quest'ultimo caso dopo aver tolto la vaschetta dal frigorifero lasciarla ad agitare sullo Slow mixer a T ambiente per circa 20 min)												
89 <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     ]. Agitare con agitatore magnetico.</p>												
90 <input checked="" type="checkbox"/>	Lavare in una vaschetta da 30x 15 x 8 cm la IP2 con la soluzione LFM 0,5%, ponendola sullo Slow mixer per 1 minuto												
91 <input checked="" type="checkbox"/>	Ripetere tale lavaggio altre due volte												
92 <input checked="" type="checkbox"/>	Effettuare tale lavaggio per altre tre volte ponendo la vaschetta sullo Slow Mixer per 12 minuti.												
93 <input checked="" type="checkbox"/>	<p>Si è interrotta l'analisi all'incubazione con l'anticorpo secondario</p> <p>SI <input checked="" type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> andare al punto 94</p>												



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

	Preparare la soluzione LFM 1% Portare a volume con PBS in un matraccio da 100 ml 1 g di latte in polvere a bassi grassi [R-178 Lotto 034]. Agitare con agitatore magnetico.
94. <input checked="" type="checkbox"/>	Preparare la soluzione Perossidasi <input checked="" type="checkbox"/> Aggiungere 150 µl di streptavidina perossidasi Pierce [R-174 Lotto 028] a 40 ml di LFM 1% <input type="checkbox"/> Aggiungere 20 µl di streptavidina perossidasi Biospa [R-174 Lotto ] a 40 ml di LFM 1%
95. <input checked="" type="checkbox"/>	Lavare la IP2 con PBS
96. <input checked="" type="checkbox"/>	Mettere in una vaschetta di vetro da 17x 8 cm (dimensioni interne) 40 ml di soluzione Perossidasi e immergervi la IP2
97. <input checked="" type="checkbox"/>	Posizionare la vaschetta sullo Slow Mixer per almeno un'ora
98. <input checked="" type="checkbox"/>	Lavare in una vaschetta da 30x 15 x 8 cm la IP2 con la soluzione PBS, ponendola sullo Slow Mixer per 1 minuto
99. <input checked="" type="checkbox"/>	Ripetere tale lavaggio per altre due volte
100. <input checked="" type="checkbox"/>	Effettuare tale lavaggio per altre tre volte ponendo la vaschetta sullo Slow Mixer per 10 minuti
101. <input checked="" type="checkbox"/>	Preparare <input checked="" type="checkbox"/> subito prima di utilizzarla la soluzione Covalight, mescolando uguali volumi (10 ml + 10 ml) delle due soluzioni West Pico Pierce [R-176 Lotto 042]; <input type="checkbox"/> 10 minuti prima del suo utilizzo la soluzione Covalight, conservandola al buio; aggiungendo 10 gocce di CovB [R-176 B Lotto ] in 10 ml di CovA [R-176 A Lotto ] <sup>1</sup> .
102. <input checked="" type="checkbox"/>	Mettere in una vaschetta di vetro da 17x 8 cm (dimensioni interne) la soluzione Covalight preparata al punto precedente e immergervi la IP2
103. <input checked="" type="checkbox"/>	Agitare la vaschetta per qualche secondo

F – RIVELAZIONE MEDIANTE CHEMILUMINESCENZA

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

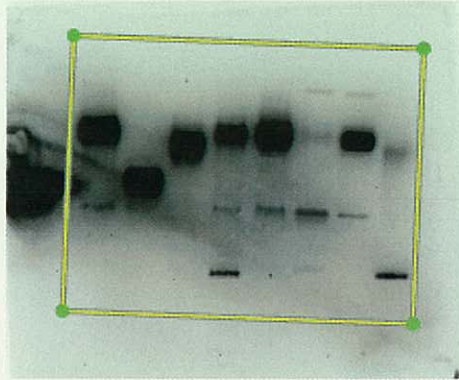
NO  SI vedere Rapporto FL053 N° \_\_\_\_\_  
 Si sono verificate non conformità durante lo svolgimento della procedura ?

Operatore Sigla e Firma	Data	Operazioni eseguite
cus Stefanian	16/6/10	da punto [ 1 ] a punto [ 16 ]
cus Stefanian	16/6/10	da punto [ 17 ] a punto [ 33 ]
cus Stefanian	16/6/10	da punto [ 34 ] a punto [ 105 ]
		da punto [ ] a punto [ ]
		da punto [ ] a punto [ ]
		da punto [ ] a punto [ ]

### II.4.3 SDS-Page results

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

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



#### GENERAL VIEW OF ALL THE PROCESSED LANES

17/06/2010  
12.30

### GASepo Analysis Report



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

Laboratory: F.M.S.I.- Laboratorio Antidoping Roma  
Date of Analysis: 17/06/2010  
12.30

1. Mir	2. Bur	3. 10E003 B 4433C	4. uEPO	5. Usp Mir	6. rEPO	7. NESP	8. uEPO
100,0%	5,8%	51,9%	7,2%	21,7%	100,0%	Non un numer	Non un numer
47,8%	94,2%	48,1%	92,8%	78,3%	Non un numer	100,0%	Non un numer

COLORLEGEND: EPOrB DARBEPECTINr

2.0.0



GASepo software (c) 2004-2009, Seibersdorf Labor GmbH  
Report Page 2/4

**POSITIVE CONTROL: MIR STANDARD**

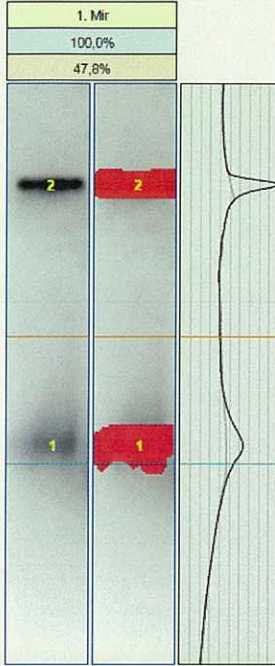
17/06/2010  
12.30

**GASepo Analysis Report**



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

Laboratory: F.M.S.I.- Laboratorio Antidoping Roma  
Date of Analysis: 17/06/2010  
12.30



Lane #1: Mir									
Name	Comment	Cent X	Cent Y	Cent Z	Max X	Max Y	Max Z	Volume Abs	Volume nMax
2		20,1	47,1	7651,03	25	46	28637,38	3932629,0	100,0
1		21,4	167,8	5000,26	32	167	10879,88	3595189,0	91,4

SEIBERSDORF  
LABORATORIES

GASepo software (c) 2004-2010, Seibersdorf Labor GmbH

Report Page 3/31

**POSITIVE CONTROL: BRP STANDARD**

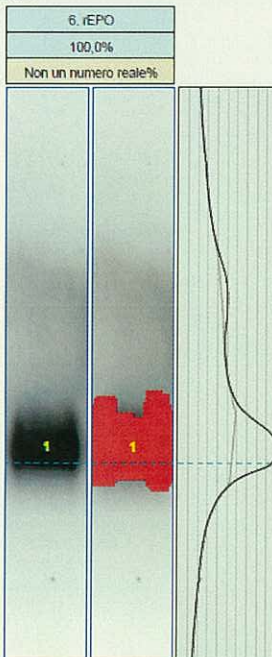
17/06/2010  
12.30

**GASepo Analysis Report**



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

Laboratory: F.M.S.I.- Laboratorio Antidoping Roma  
Date of Analysis: 17/06/2010  
12.30



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

SEIBERSDORF  
LABORATORIES

GASepo software (c) 2004-2010, Seibersdorf Labor GmbH

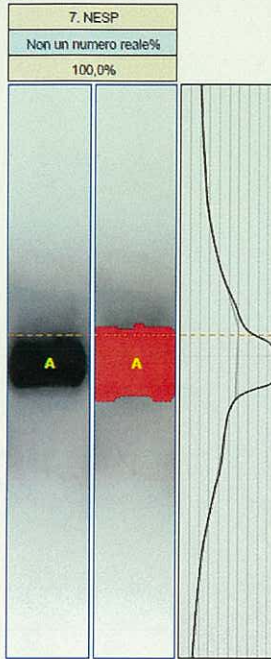
Report Page 4/31

**POSITIVE CONTROL: NESP STANDARD**

17/06/2010 12.30 **GASepo Analysis Report** 

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

Laboratory: F.M.S.I.- Laboratorio Antidoping Roma  
 Date of Analysis: 17/06/2010 12.30



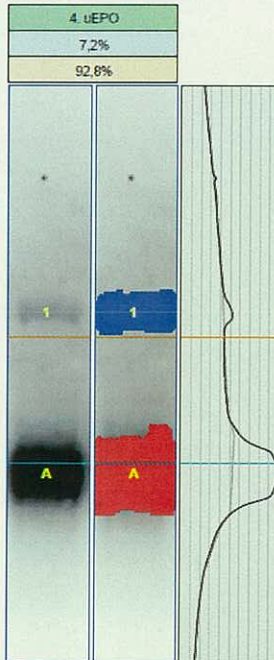
Lane #7: NESP									
Name	Comment	Cent X	Cent Y	Cent Z	Max X	Max Y	Max Z	Volume Abs	Volume nMax
A		19,4	130,5	17800,02	35	131	30384,41	22979830,0	100,0

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

17/06/2010 12.30 **GASepo Analysis Report** 

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

Laboratory: F.M.S.I.- Laboratorio Antidoping Roma  
 Date of Analysis: 17/06/2010 12.30



Lane #4: uEPO									
Name	Comment	Cent X	Cent Y	Cent Z	Max X	Max Y	Max Z	Volume Abs	Volume nMax
1		17,5	105,7	3007,12	7	107	8152,68	2147086,0	7,8
A		18,0	181,3	19419,07	2	183	33835,60	27555660,0	100,0

**SAMPLE INTERNAL LABORATORY CODE 10E003 B4433**

17/06/2010  
12.30

## GASepo Analysis Report

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

Laboratory: F.M.S.I.- Laboratorio Antidoping Roma  
Date of Analysis: 17/06/2010  
12.30

3. 10E003 B4433C

51,9%
48,1%

Lane #3: 10E003 B4433C

Name	Comment	Cent X	Cent Y	Cent Z	Max X	Max Y	Max Z	Volume Abs	Volume nMax
2		21,5	50,1	594,34	31	50	2245,31	388697,7	12,8
1		19,1	106,0	5582,41	32	107	12549,85	3042416,0	100,0
A		22,9	181,5	3301,58	37	185	13822,88	2680884,0	88,1
B		15,9	225,2	932,76	13	225	3008,14	495028,1	16,4

GASepo software (c) 2004-2009, Seibersdorf Labor GmbH

Report Page 2/11

**POSITIVE REFERENCE SAMPLE: USP MIR**

17/06/2010  
12.30

## GASepo Analysis Report

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

Laboratory: F.M.S.I.- Laboratorio Antidoping Roma  
Date of Analysis: 17/06/2010  
12.30

5. Usp Mir

21,7%
78,3%

Lane #5: Usp Mir

Name	Comment	Cent X	Cent Y	Cent Z	Max X	Max Y	Max Z	Volume Abs	Volume nMax
2		18,2	43,7	5612,49	6	44	23574,92	3154220,0	18,0
1		24,7	105,9	3031,98	31	107	9103,66	1716102,0	9,8
A		18,1	180,3	16318,72	31	181	36126,10	17526310,0	100,0

GASepo software (c) 2004-2009, Seibersdorf Labor GmbH

Report Page 2/11

**NEGATIVE REFERENCE SAMPLE: BUR**

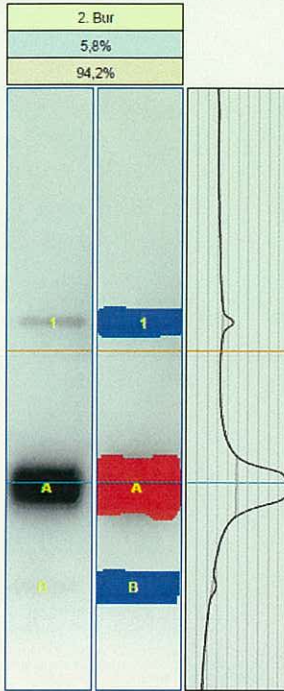
17/06/2010  
12.30

**GASepo Analysis Report**



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

Laboratory: F.M.S.I.- Laboratorio Antidoping Roma  
Date of Analysis: 17/06/2010  
12.30



Lane #2: Bur									
Name	Comment	Cent X	Cent Y	Cent Z	Max X	Max Y	Max Z	Volume Abs	Volume nMax
1		20,5	104,8	2416,28	32	105	8378,56	1181561,0	6,4
A		17,8	178,4	18337,94	31	182	34717,24	18466310,0	100,0
B		16,3	223,3	1052,38	14	224	3074,86	552499,3	3,0



**Conclusions:**

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

# II.5 Test Report



FEDERAZIONE MEDICO SPORTIVA ITALIANA  
LABORATORIO ANTIDOPING FMSI

## RAPPORTO DI PROVA TEST REPORT

Largo Giulio Onesti, 1  
00197 Roma  
Tel:+39.06.36859600  
Fax:+39.06.3078971

Prot. 2197/FMB/sbr

Data/Date 08/07/2010

**RISERVATA PERSONALE/CONFIDENTIAL**

ATto:	IAAF
Att.no/Attention:	Dr. G. DOLLE
Indirizzo/Address:	BP 359, 98007
CAP Città Nazione/PC Place Country:	MONACO CEDEX

LOTTO DI ACCETTAZIONE/RECEIPT BATCH:	10E003	CATENA DI CUSTODIA/TEST MISSION CODE:	IAAF 03/2010
RICHIEDENTE /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	14/06/2010	FINE ANALISI: END OF ANALYSIS	07/07/2010 *
TIPO DI CAMPIONE/TYPE OF SAMPLE:	URINA/URINE	TIPO DI TEST TYPE OF TEST:	IN COMPETIZIONE CON EPO/NESP/IN COMPETITION WITH EPO/NESP

**CODICI DEI CAMPIONI ANALIZZATI/SAMPLE CODES**

CODICE INTERNO INTERNAL CODE	CODICE ESTERNO EXTERNAL CODE	SESSO GENDER	CODICE INTERNO INTERNAL CODE	CODICE ESTERNO EXTERNAL CODE	SESSO GENDER
B4433	3511158	M	--	--	--
--	--	--	--	--	--
--	--	--	--	--	--

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

I risultati analitici si riferiscono esclusivamente ai campioni sottoposti a prova/The analytical results refer exclusively to the samples included in the report.

Il campionamento è a cura del cliente/The client is responsible for the sampling

**RISULTATI/RESULTS:**

Adverso Analytical Finding

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

- CONTINUOUS ERYTHROPOIETIN RECEPTOR ACTIVATOR (CERA)

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

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

CC: WADA (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



*Dr. Francesco Botre*  
Dr. Francesco Botre  
Direttore Scientifico/Scientific Director