

LINEA GUIDA
per la determinazione e valutazione dei parametri di interesse del passaporto biologico dell'atleta.

Presentazione

Gruppo di lavoro

RESPONSABILE DEL PROGETTO

GRUPPO PROMOTORE

Ilaria Bacigalupo, Alessio Crestini, Alessandra Di Pucchio, Eleonora Lacorte, Roberta Pacifici, Ilaria Palmi, Paola Piscopo, Renata Solimini, Nicola Vanacore

COORDINATORI

Roberta Pacifici, Nicola Vanacore

PANEL

GIANFRANCO BELTRAMI (Cardiologo, Fisiatra e Nutrizionista, Medico dello Sport e federale) FIBS

MARCO BERNARDI (Medico dello sport e federale) CIP

MASSIMILIANO BIANCO (Medico dello sport e federale) FPI

PAOLO BORRIONE (Ematologo) Università Foro Italico Roma

FRANCESCO BOTRÈ (Farmacologo. Direttore scientifico del laboratorio antidoping della Federazione Medico Sportiva Italiana) Università La Sapienza Roma

SERGIO CAMELI (Medico dello sport e federale) FIPAV

GIUSEPPE CAPUA (Medico dello sport) Ospedale San Camillo Roma

SAUL COLLINI (Specialista in anesthesiologia e rianimazione, medico federale) CSAI

GIUSEPPE D'ONOFRIO (Ematologo) SIE

ELVIRA DE BLASIS (Medico dello sport e federale) FIH

WALTER DE GIUSTI (Avvocato, segretario generale UIT) UIT

AMATO DE PAULIS (Immunologo, medico federale) FIGC

EMANUELE FABRIZI (Medico federale) FIC

FRANCESCO FAZI (Medico federale) FITAV

ANTONIO FIORE (Medico dello sport, ortopedico e medico federale) FIS

GIUSEPPE FLOTTI (Medico federale) FITA

LUIGI GATTA (Medico generale e dello sport) SIMG

ANTONIO GIANFELICI (Medico dello sport e federale) FIBA-FIPE-FMI

GIANNI MAZZONI (Medico federale) FICK

STEFANO OSELE (Medico federale) FITARCO

ATTILIO PARISI (Medico dello sport e federale) FIPM

MARCO PETRUCCI (Responsabile Sanitario Centro Olimpico Federale) FIJLKAM

MARIO PLEBANI (Specialista in Analisi Cliniche di Laboratorio e Gastroenterologia) SIBIOC

DIEGO FAGGIAN (delegato) (biologo) SIBIOC

ANGELO PIZZI (Medico dello sport e federale) FIHP

FRANCESCO ROMANELLI (Endocrinologo) SIEN

SANDRO SENZAMENO (Medico dello sport e federale) FIP

LUGI SIMONETTO (Medico sportivo e federale) FCI

EMILIO SODANO (Medico federale) FIT

GIOVANNI STAFFILANO (Cardiologo clinico ospedaliero, Infettivologo e Medico dello Sport) UO Cardiologia Popoli

CARLO TRANQUILLI (Medico dello sport e federale) FIDS-FITET

TOMMASO TRENTI (Direttore Dipartimento Medicina di Laboratorio e Anatomia Patologica) Nuovo Ospedale Sant'Agostino Estense

PAOLO TREROTOLI (Professore di Statistica Medica) SISMEC

FERDINANDO TRIPI (Medico dello sport e federale) FIPSAS

Ilaria Bacigalupo, Alessio Crestini, Alessandra Di Pucchio, Eleonora Lacorte, Roberta Pacifici, Ilaria Palmi, Paola Piscopo, Renata Solimini, Nicola Vanacore

VALUTATORI DELLA LETTERATURA

Sara Alessio, Francesco Botré, Giulia Cipriani, Saul Collini, Nino Costantino, Xavier de La Torre, Giuseppe D'Onofrio, Giorgio Galanti, Antonio Gianfelici, Riccardo Lanzano, Fabiana Parisi, Francesco Romanelli, Massimiliano Sansone, Paolo Trerotoli

Ilaria Bacigalupo, Alessio Crestini, Alessandra Di Pucchio, Eleonora Lacorte, Ilaria Palmi, Paola Piscopo, Renata Solimini, Nicola Vanacore

REFEREE

DOCUMENTALISTI

Maurella Della Seta, Letizia Sampaolo

SEGRETERIA TECNICA

Antonella Bacosi, Simonetta Di Carlo, Fabrizio Marzolini

FINANZIAMENTI

Progetto Linea guida italiana sull'uso del passaporto biologico negli atleti

Responsabili

Nicola Vanacore e Ilaria Palmi

Indice

Introduzione generale

Metodi

- Percorso di elaborazione di una linea guida
- Chi ha elaborato la linea guida
- Fasi di sviluppo della linea guida
- Bibliografia
- Grading delle raccomandazioni
- Revisione esterna del documento finale
- Aggiornamento, diffusione, implementazione
- Disponibilità del testo integrale

Quesito 1

- Introduzione
- Analisi delle evidenze
- Sintesi delle evidenze
- Raccomandazioni

Quesito 2

- Introduzione
- Analisi delle evidenze
- Sintesi delle evidenze
- Raccomandazioni

Quesito 3

- Introduzione
- Analisi delle evidenze
- Sintesi delle evidenze
- Raccomandazioni

Quesito 4

- Introduzione
- Analisi delle evidenze
- Sintesi delle evidenze
- Raccomandazioni

Quesito 5

- Introduzione
- Analisi delle evidenze
- Sintesi delle evidenze
- Raccomandazioni

Introduzione generale

La lotta contro il doping nello sport, iniziata formalmente nel 1960 con la nomina da parte del CIO (Comitato Olimpico Internazionale) di un gruppo di esperti del settore per studiare le possibili strategie di contrasto a questa pratica illecita, è culminata nel 1999 con la nascita della WADA, l'Agenzia Mondiale Antidoping creata per volontà del CIO come agenzia internazionale indipendente composta e finanziata in ugual misura dal movimento sportivo e dai rappresentanti governativi dei diversi Stati nel mondo.

In seguito all'entrata in vigore del Codice mondiale antidoping nel gennaio 2004, la WADA è stata incaricata di supervisionare le attività in una serie di settori chiave (WADA, 2018 a), tra i quali si ricordano:

- **Scienza e Medicina.** Ricerca scientifica, pubblicazione dell'elenco annuale delle sostanze e dei metodi vietati e gestione dell'accREDITAMENTO dei laboratori antidoping, delle esenzioni per uso terapeutico (TUE) e del passaporto biologico per l'atleta (ABP).
- **Coordinamento antidoping.** Coordinamento delle attività antidoping a livello globale attraverso il Sistema Centrale di Amministrazione e Gestione antidoping ADAMS (Anti-Doping Administration & Management System). (WADA, 2018 a). Si ricorda che il Codice Mondiale Anti-Doping ("Codice WADA" o il "Codice") costituisce di fatto la spina dorsale della lotta al doping a livello mondiale e serve ad armonizzare e a coordinare tale lotta a detto livello. L'edizione 2015 del Codice – la terza dopo quelle del 2003 e 2007 – è entrata in vigore a partire dal gennaio 2015. Alla stesura del documento finale hanno contribuito i movimenti sportivi, le agenzie regionali o nazionali antidoping, le istituzioni statali o sovranazionali.

La WADA delega di fatto l'attività antidoping sul territorio alle singole nazioni ed alla Organizzazione Nazionale Anti Doping (NADO), controllandone l'operato affinché sia conforme al Codice Mondiale Anti-Doping.

La lotta contro il doping si basa su diverse strategie, tra cui l'analisi diretta di campioni biologici degli atleti e le prove raccolte nel contesto di violazioni non analitiche delle regole antidoping. Combinando queste strategie e cercandone nuove per affrontare le sfide emergenti, la lotta globale contro il doping risulta essere più efficace. (WADA, 2018 a).

Il metodo tradizionale, ovvero il tipico controllo antidoping basato sulla rilevazione diretta di sostanze proibite o dei loro metaboliti in un campione biologico dell'atleta, è un approccio efficace sebbene presenti alcune limitazioni quando ad esempio un atleta utilizza sostanze vietate su base intermittente e/o a basse dosi. Inoltre, la rilevazione analitica diretta delle sostanze doping presenta indubbe difficoltà quando si tratta di discriminare tra una sostanza endogena naturalmente prodotta dall'organismo e la stessa sostanza artificialmente introdotta dall'esterno (Sottas PE, 2012). Alcuni metodi proibiti, come le trasfusioni di sangue autologhe, non sono rilevabili da metodi analitici progettati per identificare la sostanza vietata o i suoi principali metaboliti (Oliveira CD, 2014). Nel corso degli ultimi anni, le pratiche doping vengono sempre più spesso pianificate ad un livello scientifico molto elevato, sfruttando proprio le debolezze dei protocolli antidoping tradizionali. (WADA, 2018 b).

In tale contesto si inserisce il Passaporto Biologico dell'Atleta (ABP), che, al contrario delle metodologie analitiche dirette, mira a rilevare le conseguenze biologiche derivanti dall'uso di sostanze vietate attraverso il monitoraggio (la misura) di diversi marcatori (marker) specifici, in grado di generare un profilo individuale per ciascun atleta sottoposto a monitoraggio. In estrema sintesi, l'ABP monitora nel tempo alcuni parametri ("biomarcatori di doping") che rivelano indirettamente l'effetto che una sostanza vietata per doping induce sull'organismo.

Attualmente, il Passaporto Biologico dell'Atleta è composto di due moduli:

- Il modulo ematologico, introdotto nel dicembre 2009, che mira ad identificare un aumento del trasporto di ossigeno ottenuto attraverso l'uso di agenti stimolanti dell'eritropoiesi (ESA: Erythropoietin Stimulating Agents) o di trasfusione o manipolazione del sangue. Questo modulo considera un gruppo di marcatori di doping ematico che vengono misurati in un campione di sangue dell'atleta.
- Il modulo steroideo, introdotto a gennaio 2014, che mira ad identificare gli steroidi anabolizzanti androgeni di natura endogena (EAAS: endogenous anabolic androgenic steroids) quando somministrati a livello esogeno ed altri agenti anabolizzanti, come i modulatori del recettore androgeno selettivo (SARMS: Selective Androgen Receptor Modulators). Il modulo steroideo considera un gruppo di marcatori di doping steroideo misurato in un campione di urina dell'atleta. (WADA, 2018 b).

La WADA è attualmente impegnata, attraverso il sostegno da parte di esperti e soggetti interessati, a sviluppare ulteriormente l'ABP lavorando all'introduzione di un terzo modulo del passaporto, il modulo endocrino, che mira a rilevare l'abuso dell'ormone della crescita (GH), o, più in generale, dei diversi fattori di crescita (es. IGF-1). L'obiettivo a lungo termine dell'ABP è lo sviluppo di un ampio gruppo di biomarcatori che sfruttino i recenti progressi della chimica

analitica e una migliore comprensione della biologia dei sistemi attraverso l'utilizzo delle moderne discipline biomolecolari (genomica, proteomica, metabolomica).

Attualmente la WADA integra l'ABP nel quadro più ampio di un robusto programma antidoping con lo scopo di:

- 1) Individuare e sottoporre gli atleti a specifici test analitici mediante un'interpretazione intelligente e tempestiva dei dati del passaporto;
- 2) Perseguire le eventuali violazioni delle norme antidoping (ADRV) conformemente all'articolo 2.2 (uso o tentato uso da parte di un atleta di una sostanza proibita o di un metodo proibito) del codice mondiale antidoping. Relativamente alla violazione dell'articolo 2.2. del Codice, la WADA, nell'Athlete Biological Passport Operating Guidelines versione 6.0 (WADA, 2017) afferma che l'ABP può essere utilizzato per perseguire una violazione della normativa antidoping essenzialmente valutando i cambiamenti dei marcatori biologici di doping raccolti nel corso della carriera sportiva di un atleta, senza necessariamente contare sull'individuazione analitica della sostanza vietata o di un metodo proibito.

I processi relativi all'ABP sono amministrati e gestiti dall' Unità di gestione del passaporto biologico dell'atleta (APMU - Athlete Passport Management Unit) per conto o all'interno di una ADO (Anti Doping Organization – Organizzazione Anti-Doping). (WADA, 2017 a).

A livello operativo, una volta che i risultati analitici relativi ai marcatori biologici selezionati per i due moduli dell'ABP sono inseriti in ADAMS, essi vengono automaticamente elaborati dal modello ADAPTIVE. Questo modello calcola, per ciascun atleta sottoposto a monitoraggio, un range di valori attesi entro il quale deve rientrare la sequenza di risultati analitici raccolti per quell'atleta, assumendo che esso si trovi in una condizione fisiologica normale.

I valori anomali corrispondono a valori al di fuori di un intervallo del 99%, ovvero da un limite inferiore che corrisponde allo 0,5° percentile ad un limite superiore che corrisponde al 99,5° percentile per i marcatori presi in esame (1 possibilità su 100 che il risultato sia dovuto alla normale variazione fisiologica). Per identificare un risultato atipico nel passaporto ematologico o steroideo (Atypical Passport Finding –ATPF), è stata fissata una specificità del 99%. In caso di deviazioni di una sequenza di valori (sequenza atipica), l'intervallo applicato è 99,9% (1 possibilità su 1000 o meno che il risultato sia dovuto ad una normale variazione fisiologica). Un ATPF è un risultato generato dal modello ADAPTIVE in ADAMS che identifica o il (i) valore (i) di un (i) marcatore (i) al di fuori del range intra-individuale dell'atleta oppure una sequenza longitudinale di valori dei marcatori in esame al di fuori degli intervalli previsti (deviazioni di sequenza), assumendo una normale condizione fisiologica dell'atleta. Un ATPF richiede sempre una ulteriore valutazione e revisione. (WADA, 2017 b). Di fronte ad un risultato atipico dell'ABP, o quando l'APMU ritiene altrimenti giustificata la revisione di un dato analitico, un esperto nominato dalla WADA conduce una prima valutazione e stila un rapporto sulla base delle informazioni in quel momento disponibili. Quando il primo rapporto fornisce una indicazione di "probabile doping" (likely doping), il passaporto viene sottoposto alla valutazione di tre esperti, compreso l'esperto che ha condotto la valutazione iniziale. Quindi, qualora ci sia il consenso da parte dei tre esperti per una indicazione di "probabile doping", si procede con la creazione di un pacchetto di documentazione (che include la catena di custodia, il verbale di prelievo, la registrazione della temperatura dei campioni durante trasporto e conservazione, e tutti i dati analitici a disposizione) sull'ABP per l'atleta attenzionato.

Se l'opinione degli esperti circa l'indicazione di "probabile doping" viene confermata dopo la revisione di tutte le informazioni disponibili, compreso il pacchetto di documentazione sull'ABP, l'APMU segnala all'ADO l'indicazione di esito avverso per il Passaporto Biologico (Adverse Passport Finding- APF). L'atleta viene quindi informato dell'APF affinché abbia l'opportunità di fornire adeguate spiegazioni a riguardo. Se a seguito delle spiegazioni fornite, gli esperti non ritengono valide le giustificazioni fornite dall'atleta, questi viene accusato di violazione del regolamento antidoping (ADRV) dall'ADO che da pertanto inizio ai procedimenti disciplinari a suo carico. (WADA, 2017 a).

Occorre ricordare che il modulo ematologico del Passaporto Biologico genera un risultato atipico quando il valore dell'ultimo test che valuta la concentrazione dell'emoglobina (HGB) e/o l'OFF-score (OFFS) cade al di fuori dell'intervallo intra-individuale atteso. Inoltre, è considerato un risultato atipico un profilo longitudinale (composto da- e fino a- gli ultimi 20 valori validi di HGB e/o OFFS) che si discosta dagli intervalli previsti dal modello ADAPTIVE (sequenza atipica o sequenza ATPF). Il modulo steroideo del passaporto biologico, invece, genera un risultato atipico quando almeno uno tra i valori dei rapporti T/E, A/T, A/Etio 5 α Adiol/5 β Adiol o 5 α Adiol/E non rientri nell'intervallo intra-individuale previsto. Anche il "profilo steroideo longitudinale" (composto da- e fino a- gli ultimi 20 valori validi di uno di questi cinque rapporti) è considerato atipico quando si discosta dagli intervalli previsti dal modello ADAPTIVE (sequenza atipica o sequenza ATPF). Per il modulo steroideo, tuttavia, quando il modello ADAPTIVE identifica un valore atipico a causa di un elevato rapporto T/E, si richiede che il laboratorio antidoping che ha eseguito le analisi iniziali proceda ad un test di conferma che includa necessariamente l'utilizzo della GC-C-IRMS (gas cromatografia/spettrometria di massa isotopica) (WADA, 2017 a).

Secondo tutto quanto sopra esposto, è facile intuire come l'intero processo che porta alla sanzione di un atleta per violazione del regolamento antidoping (ADRV), è un procedimento complesso, che parte da un segnale di allerta

generato dal modello statistico ADAPTIVE per un risultato analitico atipico o per una sequenza analitica atipica. Di qui, l'intervento di un esperto prima, e quello di tre esperti poi, danno via ad una fase che assume le caratteristiche di un procedimento forense. Viene data all'atleta la possibilità di deporre una memoria difensiva, di portare tutta la documentazione che ritiene necessaria a giustificare il risultato analitico atipico. Solo successivamente, una volta confermato il risultato atipico, l'ADO dà inizio al procedimento disciplinare a carico dell'atleta attenzionato.

Pertanto, se da una parte risulta possibile e di estremo interesse ricercare e valutare le evidenze della letteratura scientifica a sostegno della parte iniziale del procedimento dell'ABP, ovvero quella che porta i due moduli attualmente implementati dalla WADA ad identificare un risultato o una sequenza atipici, non risulta poi altrettanto fattibile proporre adeguato sostegno alla seconda parte del processo, ovvero quella più strettamente forense. L'analisi del processo che porta all'identificazione dei risultati o delle sequenze atipiche è, quindi, l'obiettivo della presente Linea Guida, che è stata strutturata in modo da raccogliere, sistematizzare e valutare le evidenze a supporto del modello statistico ADAPTIVE su cui si basa il sistema di allerta dell'ABP e i diversi elementi costituenti i due moduli ematologico e steroideo contenuti nelle Athlete Biological Passport Operating Guidelines, versione 6.0 (gennaio 2017) della WADA. La metodologia standardizzata di sviluppo delle LG è stata, quindi, adattata alla peculiarità dell'argomento, tenendo conto della difficoltà intrinseca, anche per vincoli etici, di disegnare studi analitici validi sull'argomento. Si è scelto, pertanto, di non utilizzare l'approccio GRADE, in quanto non applicabile e limitante in questo contesto, privilegiando un'analisi più dettagliata e narrativa delle evidenze, per consentire una maggiore integrazione tra i risultati delle evidenze e la discussione con i rappresentanti del panel che hanno potuto così apportare un più rilevante contributo nella contestualizzazione di ciascuna evidenza e ciascuna raccomandazione al contesto in cui viene applicata. Si è voluto, inoltre, valorizzare tale integrazione e rendere il più trasparente possibile il processo di elaborazione delle raccomandazioni, riportando non solo la valutazione narrativa delle evidenze, ma anche la sintesi delle evidenze e della loro discussione con i membri del panel.

Bibliografia

Oliveira CD, Bairros AV, Yonamine M. Blood doping: risks to athletes' health and strategies for detection. *Subst Use Misuse*. 2014;49(9):1168-81.

Sottas PE, Vernec A. Current implementation and future of the Athlete Biological Passport. *Bioanalysis*. 2012;4(13):1645-52

WADA 2017 a. Athlete Biological Passport. Operating Guidelines. Version 6.0. January 2017. (Disponibile online all'indirizzo:
https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/guidelines_abp_v6_2017_jan_en_final.pdf)

WADA 2017 b. International Standard. Testing and Investigation. January 2017. (Disponibile on-line all'indirizzo:
https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/2016-09-30_-_isti_final_january_2017.pdf)

WADA 2018 a. World anti-doping agency. website: <https://www.wada-ama.org/en/what-we-do/the-code> (consultato il: 12/02/2018)

WADA 2018 b. World anti-doping agency. website: <https://www.wada-ama.org/en/questions-answers/athlete-biological-passport> (consultato il: 12/02/2018)

Metodi

Percorso di elaborazione di una linea guida

Chi ha elaborato la linea guida

L'elaborazione del documento ha coinvolto diversi gruppi di lavoro:

- il panel multidisciplinare e multiprofessionale ha definito i quesiti, discusso le prove di efficacia e formulato le raccomandazioni;
- i documentalisti del Settore documentazione dell'Istituto superiore di sanità hanno utilizzato, ove possibile, le strategie di ricerca elaborate per la linea guida originaria, per interrogare le basi di dati bibliografiche sulla base dei quesiti e in accordo con le indicazioni del panel;
- un gruppo di professionisti clinici e metodologi ha analizzato criticamente gli studi, dai quali ha estratto i dati rilevanti, inserendoli in tabelle di sintesi delle prove;
- un comitato di scrittura ha predisposto i documenti intermedi e redatto il testo definitivo della linea guida.

Fasi di sviluppo della linea guida

Il processo seguito per l'elaborazione della presente linea guida è coerente con quello definito nel Manuale metodologico del Sistema nazionale per le linee guida dell'Istituto superiore di sanità (SNLG-ISS).

Le diverse fasi sono descritte nei paragrafi seguenti.

Gruppo promotore

Il gruppo promotore, costituito da metodologi, biologi ed esperti in doping dell'Istituto Superiore di Sanità, ha inoltrato esplicita richiesta per la produzione di una linea guida sull'uso del Passaporto Biologico negli atleti al SNLG-ISS.

Successivamente, il gruppo si è riunito presso l'Istituto superiore di sanità, assieme al responsabile del progetto e ai coordinatori, per decidere se procedere all'elaborazione di una nuova linea guida o adottare e aggiornare un documento già esistente.

In quella sede è stato concordato di procedere con la stesura di un nuovo documento, in quanto non sono risultati esistenti altri documenti sull'argomento.

Il gruppo ha inoltre identificato le società scientifiche maggiormente coinvolte nella attività di contrasto al doping, le più importanti associazioni e federazioni sportive e ha segnalato alcuni nomi di esperti indipendenti di comprovata professionalità ed esperienza.

Sulla base di tale elenco è stata definita la composizione del panel multidisciplinare che si è occupato dell'elaborazione della linea guida.

Costituzione del panel multidisciplinare di esperti

Il panel multidisciplinare, costituito sulla base delle indicazioni del gruppo promotore, include i rappresentanti delle principali società scientifiche, associazioni e federazioni sportive ed esperti indipendenti, affiancati da esperti di EBM (*evidence-based medicine*, medicina basata sulle prove di efficacia) e di metodologia di sviluppo di linee guida e documenti analoghi. Più precisamente sono state coinvolte le seguenti figure professionali: 13 medici dello sport e federeali, 8 medici federali, 3 medici dello sport, 2 ematologi, 1 farmacologo, 1 endocrinologo, 4 biologi, 1 statistico medico, 1 responsabile sanitario, 1 specialista in analisi cliniche, 1 dirigente di dipartimento di medicina di laboratorio, 1 avvocato, 4 esperti di doping, 2 epidemiologi e metodologi esperti di linee guida.

Tutti i membri del panel hanno sottoscritto una dichiarazione di eventuale conflitto di interessi e la condivisione della metodologia di elaborazione di una linea guida del Sistema nazionale per le linee guida dell'Istituto superiore di sanità. Il panel si è riunito in 2 occasioni (14/12/2015 e 18/01/2018) e ha svolto la propria attività via email e telefonica, per consentire a tutti di condividere il materiale utilizzato per l'elaborazione del documento.

In occasione del primo incontro è stata illustrata e condivisa la metodologia del SNLG, sono stati condivisi i quesiti da includere nel documento, e sono state concordate le modalità di elaborazione della linea guida.

Nel corso della seconda riunione sono state illustrate le prove reperite a sostegno dei 5 quesiti, sono state discusse le conclusioni e sono state concordate le relative raccomandazioni.

Definizione dei quesiti

Il panel multidisciplinare ha formulato i seguenti quesiti:

Quesito 1

Qual è l'utilità (in termini di efficacia, sensibilità, specificità) del metodo ADAPTIVE come sistema di allerta per il contrasto del doping e per la tutela della salute degli atleti?

Quesito 2

Modulo ematologico

2a. I parametri inclusi nel modulo ematologico delle LG operative della WADA sono sufficienti e adeguati per stabilire il profilo ematologico degli atleti?

2b. Il metodo di analisi del modulo ematologico è più utile (in termini di efficacia, sensibilità, specificità) dei metodi diretti come metodo di contrasto del doping?

Quesito 3

Modulo steroideo

3a. I parametri inclusi nel modulo steroideo delle LG operative della WADA sono sufficienti e adeguati per stabilire il profilo steroideo, con finalità antidoping, degli atleti?

3b. Il metodo di analisi del modulo steroideo è più utile (in termini di efficacia, sensibilità, specificità) dei metodi diretti come metodo di contrasto del doping?

Quesito 4

Qual è l'utilità (in termini di efficacia, sensibilità, specificità) del passaporto biologico come metodo di contrasto del doping?

Quesito 5

Esistono evidenze a supporto dell'introduzione nel passaporto biologico di ulteriori esami/moduli attualmente non inclusi nel documento della WADA (es. ormoni peptidici, fattori di crescita, ecc.)?

Criteria di inclusione/esclusione e strategie di ricerca

A partire dai quesiti clinici predisposti, è stato elaborato filtri di ricerca specifici per quesito utilizzati per l'interrogazione delle banche dati Cochrane, Medline, Embase.

Il core set di parole chiave utilizzare per la strategia di ricerca è il seguente:

"biological passport", "athlete(s) passport", "doping", "doping control", "doping analy*", "prohibited substance*", "performance enhance/enhancing/enhancer(s)", "masking agent*", "athlete(s)", "athletic", "exercise", "exertion", "sport*", "athletic perform*", "competition*", "cheat/cheating", "competitive", "world anti-doping agency"

Sono stati inclusi studi di qualsiasi disegno (es. diagnostici, RCT, osservazionali) e revisioni sistematiche pubblicati in inglese e in italiano, fino a dicembre 2016. Sono stati inclusi anche eventuali ulteriori studi rilevanti individuati tramite bibliografia degli studi inclusi e segnalazione da parte dei componenti del panel.

Dall'interrogazione delle banche dati sono stati generati elenchi di titoli e abstract per ciascun quesito, sottoposti a screening per la valutazione della pertinenza. La successiva analisi dei full text degli studi selezionati ha prodotto un'ulteriore selezione. Gli studi inclusi sono stati sottoposti a una valutazione qualitativa e l'estrazione dei dati è stata effettuata da professionisti appositamente formati mediante corsi dedicati. La valutazione qualitativa è stata eseguita con il supporto di checklist metodologiche validate e le informazioni estratte sono state sintetizzate in tabelle specifiche per quesito e per disegno di studio.

Tutti i documenti intermedi sono disponibili previa richiesta al SNLG.

Grading delle raccomandazioni

L'argomento di questa linea guida e la natura delle prove raccolte dalla letteratura hanno indotto il panel a non adottare un sistema di grading strutturato. Il gruppo di lavoro ha infatti deciso di definire ciascuno studio, al termine della valutazione qualitativa, come ad alto rischio di bias o a basso rischio di bias e di definire successivamente le raccomandazioni come forti o deboli in base al livello delle evidenze sulla cui base sono formulate. La forza della raccomandazione, ovvero l'intensità con la quale si raccomanda una determinata procedura, è stata espressa a parole, nella formulazione ("wording") della raccomandazione. Questo perché si è ritenuto che un'accurata formulazione del testo può permettere di esplicitare ugualmente (o meglio) la forza delle raccomandazioni, evitando la schematizzazione e salvaguardando eventuali limitazioni di ambiti di applicazione o altre sfumature.

Per gli stessi motivi si è inoltre ritenuto opportuno riportare per esteso il percorso di valutazione e la discussione all'interno della quale è maturata l'elaborazione delle raccomandazioni.

Revisione esterna del documento finale

Il documento definitivo condiviso dal panel è stato inviato a due esperti esterni con il mandato esplicito di valutare la leggibilità e la chiarezza del testo, nonché la rilevanza e l'applicabilità delle raccomandazioni. Il gruppo dei revisori è composto da (in corso di definizione).

Aggiornamento, diffusione, implementazione

In considerazione della continua evoluzione delle conoscenze medico scientifiche, l'aggiornamento del documento è previsto entro 3 anni (marzo 2021).

Saranno adottate modalità multiple di diffusione del documento, che includeranno i seguenti approcci:

- diffusione dell'iniziativa sui media e sulla stampa;
- invii postali agli assessorati regionali alla sanità;
- pubblicazioni sul sito SNLG-ISS e sui siti internet di società scientifiche, agenzie sanitarie, eccetera;
- pubblicazioni scientifiche;
- presentazione a congressi nazionali e internazionali.

Disponibilità del testo integrale

Il testo integrale della linea guida è disponibile sul sito SNLG-ISS (<http://www.snlg-iss.it>).

I documenti intermedi di lavoro sono disponibili previa richiesta alla segreteria scientifica.

Quesito 1

Qual è l'utilità (in termini di efficacia, sensibilità, specificità) del modello ADAPTIVE come sistema di allerta per il contrasto del doping e per la tutela della salute degli atleti?

Studi reperiti tramite strategia di ricerca	245
Studi selezionati e letti in full text	17
Studi inclusi	*

*il numero di articoli inclusi sarà definito dopo la revisione aperta e la peer review

Background

Il passaporto biologico dell'atleta (APB) (Cazzola 2000, Malcovati 2003) raccoglie le informazioni longitudinali del singolo individuo riguardanti i marker indiretti del doping.

Il metodo ADAPTIVE è un metodo statistico, basato su un approccio bayesiano, che può essere utilizzato per individuare gli atleti che hanno fatto uso di doping, a partire dalle informazioni dell'APB.

Invece di focalizzarsi sulla ricerca di sostanze esogene, i marker indiretti del doping rappresentano una valida alternativa in quanto la modifica dei parametri biologici costituisce un indicatore dell'uso del doping dell'atleta.

Contrariamente al diagramma causale, il teorema di Bayes parte dall'effetto (marker alterato) per risalire alla causa (doping). Un approccio longitudinale è utile quando la variabilità intra-individuale è minore di quella inter-individuale. Dal punto di vista statistico, la variabilità inter individuale viene eliminata in quanto ogni atleta diventa il riferimento di se stesso.

L'idea è quella di usare le conoscenze a priori della variazione inter-individuale del parametro (distribuzione a priori) misurato su una popolazione di atleti di riferimento, che si assume non abbiano fatto uso di doping, e progressivamente integrare le informazioni dell'individuo e ottenere la probabilità che la misura del marker indichi la presenza di doping (distribuzione a posteriori).

Questo modello prevede che ogni nuova misura individuale del marker al tempo t viene confrontato con un range critico ottenuto al tempo $t-1$. Il range critico al tempo 0 è costruito sulla distribuzione a priori basata sulla popolazione di riferimento e non sull'individuo.

Ci sono 2 tipi di analisi sequenziali che possono essere effettuate con il metodo ADAPTIVE:

1. analisi di una specifica misura come funzione dei valori precedenti
2. analisi di una sequenza completa confrontata con una sequenza di controllo.

Per il primo metodo, prima di iniziare ad utilizzare il modello, devono essere definite una o più misure basali di riferimento per caratterizzare l'atleta. Per massimizzare la sensibilità, tali misure devono essere prese in momenti in cui il soggetto non è dopato, quindi è preferibile registrare questi valori in momenti in cui l'atleta è fuori competizione.

Inoltre, nel primo metodo, un profilo individuale è definito anormale se eccede almeno una volta un valore soglia di specificità (solitamente del 99% o 99.9%, che equivale ad una scelta di α di 1/100 o 1/1000) della distribuzione, mentre nel secondo metodo, una sequenza è definita anomala se superiore alla soglia di specificità del 99.9% rispetto alla distribuzione delle sequenze di riferimento. In caso di valori anomali, i risultati dei test dell'atleta vengono rivisti da un panel di 3 esperti che decide se l'anomalia nei valori del marcatore è un segnale di presenza di doping o è dovuto ad altri fattori. La scelta finale del tasso di falsi positivi, α , è correlata alla proporzione, o prevalenza, di positivi nella popolazione, prima dell'applicazione del test. Un modo per ottenere una stima della prevalenza di atleti che hanno fatto uso di doping in una popolazione può essere ottenuta testando un grande numero di atleti prima di una competizione internazionale. In questo modo è possibile determinare un valore di cut-off, non come funzione dei falsi positivi desiderati, ma piuttosto come funzione della probabilità che un atleta sia effettivamente dopato in caso di test positivo (valore predittivo positivo).

In questo metodo, quindi, il tasso di falsi positivi, α , non dipende dal numero dei test effettuati e, rispetto ad altri metodi, soprattutto quelli basati su un cut-off di popolazione, consente, fissando una specificità bassa, di ottenere un'alta sensibilità. Se la prevalenza è sottostimata, anche la sensibilità diminuisce.

Tutti i marcatori indiretti di doping hanno una loro variabilità intrinseca, associata a fattori di origine biologica (fattori eterogenei) o dovuti all'attività dell'atleta (fattori confondenti). Nel modello bayesiano è possibile tener conto di queste caratteristiche, le quali vengono distinte in fattori fissi (genere, etnia e sport) e fattori tempo dipendenti (età, altitudine, strumento di rilevazione altitudine). L'ipotesi è che questi fattori siano indipendenti tra di loro e che quindi, possano avere un effetto additivo sulla distribuzione a priori del singolo marcatore.

Sebbene i valori dei diversi marcatori siano ottenuti da protocolli analitici differenti, è possibile comunque analizzare i risultati in modo combinato per ottenere un marcatore più sensibile, creando quindi i cosiddetti marcatori multiparametrici, ottenuti dalla combinazione di più marcatori. **(Sottas 2010 – libro)**

Analisi delle evidenze

In uno studio del 2003 (**Malcovati 2003**) gli autori intendono quantificare le componenti della variazione biologica inter- ed intra-individuale e definire gli intervalli di riferimento per alcuni parametri ematologici. Lo studio ha arruolato 923 calciatori professionisti. Per la valutazione delle componenti della varianza inter- e intra-individuale è stata utilizzata una metodologia di analisi della varianza a più livelli ed numero di osservazioni uguale per soggetto sulle variabili emoglobina, ematocrito, percentuale dei reticulociti e conta assoluta, ferritina sierica e recettore solubile della transferrina, che ha dimostrato che la varianza tra-soggetti è l'origine significativamente maggiore di variabilità. Il 95° percentile del coefficiente di variazione delle distribuzioni dell'emoglobina e dell'ematocrito calcolato in atleti con indici eritropoietici all'interno degli intervalli di riferimento della popolazione e con più di tre misurazioni effettuate, era rispettivamente del 4.44% e 4.45% per le due variabili. Quindi, aumenti che superino il 10% in questi parametri dovrebbero essere considerati anomali. Una stima della variazione intra-individuale relativamente stabile poteva essere ottenuta dopo 5 misure ripetute. Inoltre, utilizzando un sistema di punteggi basato sul numero di parametri che cadono fuori dagli intervalli di riferimento intra-individuali (ematocrito ed emoglobina) e di popolazione (conta dei reticulociti, ferritina sierica e recettore solubile della transferrina), applicato ai valori di un trial randomizzato controllato di somministrazione di rEPO svolto in Australia, è stato dimostrato che con il controllo di tre variabili (ematocrito, emoglobina e conta dei reticulociti) era possibile ottenere una sensibilità del 66% che poteva salire al 77% considerando tutte le cinque variabili valutate dallo studio. **BASSO RISCHIO DI BIAS**

Uno studio del 2006 (**Sharpe 2006**) ha incluso 4 coorti di atleti professionisti arruolati volontariamente per un numero complessivo di 1122 soggetti, e 2 coorti di controlli, per un totale di 12 soggetti. L'obiettivo dello studio era verificare se confrontando i valori ematologici di un atleta in un determinato punto nel tempo con una serie di valori dello stesso atleta misurati in tempi precedenti, piuttosto che con un singolo valore soglia calcolato su una popolazione di riferimento, era possibile aumentare la capacità di identificare l'eventuale abuso di eritropoietina. Lo studio ha considerato due marcatori, Hb e OFF-hr, e per ciascuno ha calcolato una variante dello z-score (ovvero la differenza tra il valore corrente e la media di tutti i valori precedenti, diviso la radice quadrata della varianza moltiplicata per 1 più 1 su n), rinominata "third generation (3G) approach". Il modello 3G è risultato in grado di distinguere la variabilità nei parametri determinata dall'uso di eritropoietina, rispetto alla normale variabilità fisiologica degli stessi parametri. Nello studio, la sensibilità è stata espressa come la percentuale di soggetti che eccede la soglia prefissata. Sono state proposte 2 soglie di alpha: la prima è un cut-off di 1 su 100 fissato come soglia per identificare i sospetti che devono poi fare un test mirato o un follow-up medico, la seconda è 1 su 1000 per identificare i soggetti "no-start". Nelle 4 coorti analizzate, 22 atleti su 1122 hanno riportato valori di Hb che eccedevano la soglia di sospetto, 0 atleti hanno riportato valori di Hb che eccedevano la soglia di no start, 68 atleti hanno riportato valori di OFF-hr che superavano la soglia di sospetto e 6 atleti hanno riportato valori di OFF-hr che superavano la soglia di no start. Per la combinazione dei 2 marker, 83 atleti hanno riportato valori che superavano la soglia di sospetti e 6 di no start. Tra i 12 controlli, 0 su 12 eccedono la soglia dei sospetti per Hb mentre per OFF-hr 4 eccedono la soglia dei sospetti e 0 la regola no start. Per la combinazione, 4 eccedono la soglia dei sospetti e 0 la no-start. Complessivamente, la combinazione dei 2 marcatori ha prodotto un aumento della sensibilità. Pur non essendo uno studio che indaga specificamente il modello attualmente utilizzato all'interno del passaporto biologico WADA, è stato deciso di includerlo comunque perché dimostra, per la prima volta, la superiorità di un modello longitudinale rispetto al confronto con uno standard di popolazione. **BASSO RISCHIO DI BIAS**

Uno studio del 2007 (**Sottas 2007**) confronta quattro metodi per la rilevazione delle variazioni nel rapporto T/E utilizzato come misura per identificare l'abuso di testosterone negli atleti elite. Nello specifico, i quattro metodi analizzati sono lo Z-score tradizionale, il modello 3G utilizzato da Sharpe (**Sharpe 2006**), la procedura in 3 step approvata dalla WADA, e il metodo bayesiano ADAPTIVE. Per confrontare la performance delle diverse procedure sono stati utilizzati i dati provenienti da due precedenti studi, specificamente un trial che arruolava 8 atleti a cui somministrava testosterone e 9 atleti cui somministrava placebo, e uno studio osservazionale che arruolava 11 atleti professionisti non dopati. La distribuzione a priori del modello ADAPTIVE è stata costruita utilizzando sia i dati dei 20 atleti non dopati dei due studi, sia dati dalla letteratura. In presenza di una singola misurazione individuale, il metodo ADAPTIVE è risultato simile al modello 3G, mentre lo z-score tradizionale non tiene in considerazione la possibilità che il valore iniziale possa essere ottenuto da un individuo con ampia varianza. In presenza, invece, di un numero di misurazioni individuali elevato, il metodo ADAPTIVE è simile allo Z-score, mentre il modello 3G non tiene in considerazione la possibilità che il soggetto

possa avere un basso coefficiente di variazione. I due metodi, quindi, possono essere considerati come casi particolari del metodo bayesiano ADAPTIVE. Sono stati poi confrontati il numero dei falsi positivi ottenuti su una serie di misurazione su 20 soggetti di controllo e i veri positivi ottenuti su una serie di misurazione su 8 soggetti trattati con testosterone. Fissando una specificità di 0.999 (alpha 1/1000), lo z-score ha riportato l'1.6% di falsi positivi e il 56% di veri positivi, il modello 3G ha riportato 0 falsi positivi e il 37% di veri positivi, ADAPTIVE ha riportato 0 falsi positivi e il 49% di veri positivi, i primi 2 step della procedura WADA (T/E>4 e CV<30%, no IRMS) non hanno riportato alcun falso positivo e il 36% di veri positivi. Assumendo, invece, un alpha 1/100, lo z-score ha riportato il 4% di falsi positivi e il 58% di veri positivi, il modello 3G ha riportato lo 0% di falsi positivi e il 45% di veri positivi, mentre ADAPTIVE ha riportato lo 0.55% di falsi positivi e il 57% di veri positivi. L'assunzione a priori della scelta di alpha dipende strettamente dalla prevalenza di positivi nella popolazione, che deve essere conosciuta prima dell'applicazione del test. In conclusione, a parità di specificità, il modello ADAPTIVE è risultato avere la migliore combinazione di veri positivi e falsi positivi. **BASSO RISCHIO DI BIAS**

Uno studio del 2008 (**Sottas 2008**) aveva come obiettivo confrontare cinque metodi di identificazione dell'abuso di testosterone in un campione di atleti professionisti. Nello specifico, lo studio confrontava l'accuratezza, in termini di sensibilità e specificità, dell'analisi del T/E utilizzando un valore di cut-off fissato a 4 per identificare un valore anomalo, l'analisi IRMS, un test del coefficiente di variazione (CV) con un cut-off stabilito al 30%, il test Extreme Studentized Deviate (ESD) e il metodo bayesiano ADAPTIVE. Per i metodi ESD e ADAPTIVE, un risultato veniva considerato sospetto se $1/1,000 \leq p\text{-value} \leq 1/30,000$ e positivo se $p\text{-value} < 1/30,000$. Lo studio ha utilizzato i dati provenienti da due trial che arruolavano rispettivamente 22 atleti professionisti e 17 atleti amatoriali. Le distribuzioni a priori da utilizzare per il modello ADAPTIVE, invece, sono state tratte da un precedente articolo. L'analisi del T/E con il valore di cut-off fissato a 4 è risultata avere un valore predittivo positivo (VPP) del 59% e una specificità inferiore al metodo ADAPTIVE, che a sua volta è risultato avere un VPP vicino al 100% in caso di alpha 1/1000 e un VPP del 96% in caso di alpha 1/100. In conclusione, il modello ADAPTIVE è risultato avere una maggiore sensibilità unita ad una buona capacità di ridurre la frequenza di falsi positivi. **BASSO RISCHIO DI BIAS**

Uno studio pilota (**van Renterghem 2010**) valuta l'accuratezza di nuovi possibili marcatori di DHT e DHEA su campioni prelevati da 6 volontari sani, confrontandone le performance rispetto a cut-off di popolazione e utilizzando il modello ADAPTIVE. Sulla base dei risultati dei 24 marcatori in studio e dei 552 rapporti generati dal loro incrocio, lo studio calcola la sensibilità di ciascun marcatore, sia per i cut-off di popolazione che per il modello ADAPTIVE, fissando una specificità del 99% a priori. I cut-off di popolazione sono stati calcolati utilizzando 2014 campioni di atleti maschi risultati negativi ai test antidoping. I valori di sensibilità ottenuti con l'approccio di popolazione sono risultati compresi tra il 10% e il 16% per il DHT, tra il 7.5% e il 29.5% per il DHEA. L'uso del modello ADAPTIVE ha prodotto un aumento significativo della sensibilità per tutti i marcatori, fino a valori tra 42.1% e 46.8% per il DHT e tra 23.0% e 43.2% per il DHEA. In conclusione, l'applicazione del modello ADAPTIVE è in grado di aumentare la sensibilità dei test per la rilevazione sia di DHT che di DHEA. **ALTO RISCHIO DI BIAS**

Uno studio del 2011 (**Morkeberg 2011**) confronta 3 modelli per il controllo del doping utilizzando 4 marcatori ematologici. I 3 modelli confrontati sono il modello 3G elaborato da Sharpe et al (**Sharpe 2006**), il modello del passaporto dell'atleta (athlete passport – AP) e l'approccio assolutista, ovvero un modello basato su cut-off di popolazione (**Sallet 2008**), mentre i 4 marcatori indiretti considerati sono Hb, OFF-hr, Hbmass e Hbmr. Per Hb e OFF-hr sono stati utilizzati tutti e tre i modelli, mentre per Hbmass e Hbmr solamente i modelli G3 e AP perché il modello assolutista non forniva dei valori di cut-off per questi marcatori. Lo studio ha arruolato 44 uomini sani, non atleti professionisti, di cui 15 controlli e 29 sottoposti ad autotrasfusioni di sangue conservato liquido oppure congelato. Dei 29 soggetti sottoposti ad autotrasfusione, 8 hanno ricevuto 1 sacca di sangue, congelato (F1) o liquido (L1), mentre 21 hanno ricevuto 3 sacche di sangue liquido (L3) o congelato (F3). I valori dei marcatori sono stati raccolti subito prima della trasfusione e 1, 3, 7, 14, 21 e 28 giorni dopo la trasfusione. La sensibilità di ognuno dei modelli è stata valutata utilizzando una coppia di valori composta da un valore pre-trasfusione e uno tra i 6 valori post-trasfusione. Per costruire i valori di riferimento per i modelli 3G e AP sono stati utilizzati i dati provenienti da una popolazione di 60 atleti tedeschi professionisti. L'approccio assolutista è risultato il più sensibile, con un valore di sensibilità dell'80% per Hb e del 67% per l'OFF-hr, mentre i valori di sensibilità del modello G3 sono risultati del 10% per l'Hb e del 26% per l'OFF-hr, e i valori di sensibilità del modello AP sono risultati del 10% per l'Hb e del 18% per l'OFF-hr. Per quanto riguarda i valori di specificità, invece, il modello assolutista ha mostrato un tasso di falsi positivi (FP) maggiore (20% per l'Hb e del 5% per l'OFF-hr), rispetto agli altri 2 modelli in studio, che hanno riportato un tasso di FP dello 0% per entrambi i marcatori. La sensibilità dei modelli è risultata essere correlata sia con la quantità di sangue trasfusa, sia con il tempo trascorso a seguito della trasfusione, con i valori di sensibilità per l'Hbmr maggiori nel gruppo che ha ricevuto 3 sacche di sangue (71% con il modello 3G e 61% con il modello AP), e i valori di sensibilità di Hbmass maggiori durante i primi 3 giorni dopo la

trasfusione. In conclusione, i modelli AP e 3G si sono dimostrati entrambi superiori al modello assolutista, che, avendo mostrato una bassa specificità, non appare utile come strumento nel controllo anti-doping. **BASSO RISCHIO DI BIAS**

Uno studio del 2012 (**Pottgiesser 2012**) indagava l'utilità di includere l'emoglobina totale (tHb) nel modello ADAPTIVE. La valutazione veniva fatta su un campione di 22 volontari sani, di cui 11 controlli e 11 a cui vengono somministrate fino a 4 autotrasfusioni. Per entrambi i gruppi in studio sono state raccolte informazioni sui marcatori tHb e OFF mass e inserite separatamente in un modello ADAPTIVE. Lo studio ha considerato come anomali i valori di tHb o OFFmass che eccedevano la soglia individuale del 99% o 99.9%, o una sequenza di tHb o OFFmass superiore al 99.9%. Considerando una soglia individuale del 99% e una soglia del 99.9% per la sequenza, la sensibilità è risultata dell'82% per tHb, dell'82% per OFFmass, del 55% per sequenza di tHb e del 64% per sequenza OFFmass, mentre la specificità è risultata del 90% per tHb, del 100% per OFFmass, del 100% per sequenza di tHb e del 100% per sequenza OFFmass. Il VPP è risultato del 90% per tHb, del 100% per OFFmass, del 100% per sequenza di tHb e del 100% per sequenza OFFmass, mentre il VPN è risultato dell'82% per tHb, del 91% per OFFmass, del 67% per sequenza di tHb e del 71% per sequenza OFFmass. I risultati hanno mostrato che utilizzando i dati della tHb in combinazione con quelli dell'OFF mass, fissando una specificità del 99%, la sensibilità aumenta da 82% a 92%. Lo studio sottolinea anche che i principali limiti dell'utilizzo della tHb come marcatore all'interno del modello ADAPTIVE sono che, per raggiungere la miglior sensibilità, è necessario che un esperto stabilisca il timing dei test, e la difficoltà di rilevare l'eventuale tossicità della CO. È necessario, quindi, perfezionare il metodo per rilevare la tHb per poterla inserire nel passaporto biologico. **ALTO RISCHIO DI BIAS**

Uno studio del 2016 (**Alladio 2016**) generalizza il modello bayesiano a più di un marcatore, partendo dal presupposto che uno dei limiti del modello bayesiano classico (ADAPTIVE) è quello di considerare le informazioni fornite da un singolo marcatore per valutare presenza o assenza di doping. Lo studio utilizza come popolazione di riferimento 96 volontari sani su cui viene stimato, attraverso l'analisi delle componenti principali, il primo intervallo di confidenza bayesiano multidimensionale utilizzato per confrontare la prima misurazione dei singoli soggetti. Le misurazioni dei singoli soggetti si riferiscono ad una serie di rilevazioni di 13 marcatori analizzati in 6 volontari. Utilizzando l'analisi in componenti principali, per ognuna delle 6 serie di misurazioni sono stati costruiti gli intervalli di confidenza bayesiani multidimensionali al 95% per ognuno dei 6 soggetti. Per valutare la sensibilità e specificità del modello per i 6 soggetti è stato usato il test Hotelling's T^2 . Il modello fornisce lo 0% di falsi positivi (solo 2 misurazioni false positive per un soggetto). In questo metodo, il tasso di falsi positivi descrive il numero di campioni di urine prelevate da alcuni individui che sono state classificate come appartenenti ad un altro individuo mentre i falsi negativi indicano, il numero di campioni appartenenti ad altri individui che vengono attribuiti ad un altro atleta. Lo studio evidenzia che, in alcuni casi, il modello "multidimensionale" è in grado di identificare i soggetti che hanno fatto uso di doping con una maggiore accuratezza rispetto al modello bayesiano univariato ADAPTIVE. **ALTO RISCHIO DI BIAS**

Uno studio del 2016 (**Baume 2016**) riporta i risultati di una valutazione longitudinale del profilo steroideo di 879 giocatori di calcio testati tra il 2008 e il 2013 dalla UEFA. Lo studio considera i risultati di un totale di 4195 campioni di urine analizzati da 12 laboratori europei accreditati WADA. I risultati dei test delle urine per il marcatore T/E sono stati analizzati applicando due diversi approcci statistici, il modello ADAPTIVE e il coefficiente di variazione (CV). I profili longitudinali di 5 atleti sono stati presi ad esempio per illustrare il possibile effetto di fattori genetici, specificamente il gene codificante l'enzima UGT2B17, sul rapporto T/E, il possibile peso dell'uso di diverse tecniche di laboratorio su variazioni nel profilo del marcatore, e il possibile peso dell'assenza di informazioni genetiche per poter confermare l'identità del atleta che ha fornito il campione. L'applicazione del modello ADAPTIVE nell'analisi dei profili dell'intero campione ha individuato un 5.0% di giocatori con almeno un risultato anomalo nel rapporto T/E ed un 7.7% di giocatori con un profilo T/E anomalo. Il modello CV si è dimostrato meno sensibile nell'individuare l'uso di doping, sebbene possa essere considerato un'alternativa al modello ADAPTIVE. I risultati di questo studio hanno portato la UEFA a decidere di introdurre il modello steroideo urinario dell'ABP a partire da settembre 2015. **BASSO RISCHIO DI BIAS**

Confondenti

Tre studi analizzano l'influenza del polimorfismo UGT2B17 sui parametri del modulo steroideo dell'ABP e la necessità di inserire tale informazione nel modello ADAPTIVE per aumentarne la sensibilità.

Il primo studio (**Schulze 2009**) valuta se l'aggiunta di informazioni sul genotipo UGT2B17 è in grado di aumentare la sensibilità e specificità del rapporto T/E all'interno del modello bayesiano ADAPTIVE. Lo studio ha utilizzato campioni prelevati da 55 soggetti prima e dopo somministrazione di T intramuscolo. I risultati delle analisi dei profili individuali con il modello bayesiano hanno mostrato che l'aggiunta di informazioni sul genotipo UGT2B17 riduceva il tempo di individuazione di positività a 3 giorni dopo somministrazione di T, rispetto ai 13 giorni necessari in assenza di informazioni sul genotipo. Introducendo nell'analisi con il modello bayesiano due valori noti di T/E a baseline e le informazioni sul genotipo UGT è stato osservato un aumento significativo della sensibilità del test. **BASSO RISCHIO DI BIAS**

Il secondo studio (**Okano 2012**), oltre a riportare la distribuzione del genotipo UGT2B17 in una popolazione di atleti giapponesi e ne valuta la potenziale influenza sul loro profilo steroideo, analizza l'applicabilità del profilo steroideo individuale in volontarie giapponesi a seguito di somministrazione di testosterone enantato (TE). A seguito di somministrazione di TE nessuna delle volontarie con mutazione del gene UGT2B17 in omozigosi (del/del) ha riportato livelli di T superiori al valore di cut-off di positività stabilito dalla WADA ($T > 4$). Applicando, invece, il profilo individuale tutte le volontarie del/del hanno mostrato aumenti significativi nelle concentrazioni urinarie di T. In conclusione, lo studio dimostra che, in presenza di polimorfismi del gene UGT2B17 l'uso del modello ADAPTIVE aumenta la sensibilità dei test per l'identificazione di abuso di T. **BASSO RISCHIO DI BIAS**

Il terzo studio (**Strahm 2015**) valuta la sensibilità dell'ABP nell'identificare soggetti che hanno fatto uso di T, anche in relazione al genotipo UGT2B17. Lo studio arruola 25 volontari, cui sono state somministrate 3 dosi di T enantato (125 mg, 200mg e 500mg). I risultati dello studio hanno mostrato un'ampia variabilità inter-individuale dei livelli di T/E, dovuta principalmente al genotipo UGT2B17. La AUC media dei soggetti senza mutazione (ins/ins) o con mutazione in eterozigosi (del/ins) per tutte le dosi è risultata significativamente maggiore rispetto a quella dei soggetti con mutazione in omozigosi (del/del). Nessun soggetto del/del ha riportato livelli di T superiori al cut-off di positività di popolazione ($T > 4$), mentre, analizzando i dati con il modello ADAPTIVE, sono tutti risultati avere un profilo anomalo. In conclusione, lo studio mostra che l'uso del modello ADAPTIVE con almeno 2 valori di baseline permette di identificare l'abuso di T in soggetti con mutazione in omozigosi del gene UGT2B17, laddove l'uso di cut-off di popolazione non è in grado di rilevare alcuna anomalia. **BASSO RISCHIO DI BIAS**

Sintesi delle evidenze

Per quanto riguarda l'utilizzo di marcatori indiretti nell'ambito dei sistemi di allerta anti doping, i modelli longitudinali appaiono avere una migliore capacità di individuare gli atleti che hanno fatto uso di doping rispetto ai modelli basati su cut-off di popolazione, soprattutto per i marcatori con una variabilità intra individuale minore rispetto a quella inter-individuale (**Sharpe 2006, Sottas 2007**). Tra questo tipo di modelli, fissando un livello di specificità a priori, il modello ADAPTIVE ha, quasi sempre, dimostrato di avere la sensibilità più alta, rispetto agli altri modelli indagati (es. z-score, 3G, ecc.), nell'individuare valori anomali nelle sequenze di dati dei singoli atleti (**Sottas 2007, Sottas 2008, Morkeberg 2011**). Nei casi in cui il valore di sensibilità del modello ADAPTIVE è risultato inferiore agli altri modelli in studio, il tasso di falsi positivi (in termini di allerta) è comunque risultato il più basso tra quelli riportati, e nell'ambito dei sistemi di allerta anti doping, è prioritario ottenere il minor numero di falsi positivi.

Il modello ADAPTIVE, come tutti i modelli longitudinali, si basa sulla valutazione delle variazioni nel tempo di marcatori biologici di un atleta. Questi marcatori, come ogni altro parametro biologico individuale, sono soggetti ad una variabilità dovuta sia a fattori endogeni (es. età, genere, etnia, ecc.) che a fattori esogeni (es. altitudine, doping, ecc.). Alcuni studi hanno indagato il peso e l'effetto di diversi fattori esogeni e/o endogeni su specifici marcatori inseriti nel modello ADAPTIVE ed hanno dimostrato che inserire nel modello tali informazioni ne migliora significativamente la sensibilità (**Sottas 2010, Schulze 2009, Okano 2012, Strahm 2015, Berman 2014**).

Una delle potenziali limitazioni dei modelli longitudinali è di essere univariati, ovvero di valutare ciascun marcatore singolarmente. Ciò può rischiare di fornire una visione parziale o incompleta della situazione dell'atleta, considerata anche la velocità con cui si evolvono i sistemi di doping e i metodi per mascherarlo. Per questo motivo, la ricerca ha cominciato a considerare se e come la combinazione di due o più parametri può aumentare la sensibilità del modello ADAPTIVE. Ad esempio, considerare la combinazione di due modelli univariati ADAPTIVE per due marcatori aumenta significativamente la sensibilità del modello rispetto alla valutazione degli stessi marcatori presi singolarmente (**Pottgiesser 2012**), e generalizzare il modello univariato a più di un marcatore, creando un modello "multidimensionale", aumenta significativamente l'accuratezza del modello nell'identificare i soggetti che hanno fatto uso di doping (**Alladio 2016**).

In conclusione, per quanto scarse, le evidenze disponibili sembrano indicare che il modello ADAPTIVE è il modello longitudinale con la maggiore accuratezza nell'identificare soggetti che hanno potenzialmente fatto uso di doping, minimizzando il numero di falsi positivi. Il modello richiede, però, che siano tenute in considerazione tutte le possibili variabili confondenti o interazioni in grado di modificare l'interpretazione dei marcatori considerati. Inoltre, per migliorare ulteriormente l'accuratezza del modello, è necessario esplorare ulteriormente possibili modalità per combinare più marcatori.

Raccomandazioni

L'uso di un modello longitudinale si è dimostrato più efficace, in termini di sensibilità e specificità, rispetto ai modelli basati su cut-off di popolazione, nell'identificare valori alterati all'interno di un sistema di allerta

per il contrasto del doping, soprattutto in caso di marcatori indiretti con una variabilità intra individuale minore rispetto a quella inter-individuale.

Tra i modelli longitudinali studiati, il modello ADAPTIVE si è mostrato il più efficace in termini di sensibilità e specificità, nell'identificare valori alterati all'interno di un sistema di allerta per il contrasto del doping.

Confondenti

Nell'utilizzo del modello ADAPTIVE come sistema di allerta per il contrasto del doping, si raccomanda di individuare e includere nel modello tutte le potenziali variabili confondenti (o di interazione) e verificarne l'eventuale effetto combinato (es. additivo, moltiplicativo, ecc.).

Raccomandazioni di ricerca

Recenti studi hanno dimostrato che utilizzando un modello multidimensionale, che include e analizza contemporaneamente i valori diversi marcatori, può risultare più accurato rispetto al modello univariato ADAPTIVE. Le evidenze, però, non sono ancora sufficienti per formulare una raccomandazione solida, ma sono necessari ulteriori studi per valutare la migliore modalità per combinare i valori di più marcatori al fine di aumentare l'accuratezza del modello ADAPTIVE nell'identificare valori alterati all'interno di un sistema di allerta per il contrasto del doping.

Bibliografia

Alladio E, Caruso R, Gerace E, Amante E, Salomone A, Vincenti M. Application of multivariate statistics to the Steroidal Module of the Athlete Biological Passport: A proof of concept study. *Anal Chim Acta*. 2016 May 30;922:19-29.

Baume N, Geyer H, Vouillamoz M, Gridale R, Earl M, Aguilera R, Cowan DA, Ericsson M, Gmeiner G, Kwiatkowska D, Kioukia-Fougia N, Molina A, Ruivo J, Segura J, Van Eenoo P, Jan N, Robinson N, Saugy M. Evaluation of longitudinal steroid profiles from male football players in UEFA competitions between 2008 and 2013. *Drug Test Anal*. 2016 Jul;8(7):603-12.

Bermon S, Garnier PY, Hirschberg AL, Robinson N, Giraud S, Nicoli R, Baume N, Saugy M, Fénelichel P, Bruce SJ, Henry H, Dollé G, Ritzen M. Serum androgen levels in elite female athletes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014 Nov;99(11):4328-35.

Cazzola M. A global strategy for prevention and detection of blood doping with erythropoietin and related drugs. *Haematologica*. 2000;85:561-3.

Malcovati L, Pascutto C, Cazzola M. Hematologic passport for athletes competing in endurance sports: a feasibility study. *Haematologica*. 2003;88:570-81.

Mørkeberg J, Sharpe K, Belhage B, Damsgaard R, Schmidt W, Prommer N, Gore CJ, Ashenden MJ. Detecting autologous blood transfusions: a comparison of three passport approaches and four blood markers. *Scand J Med Sci Sports*. 2011 Apr;21(2):235-43.

Okano M, Ueda T, Nishitani Y, Kano H, Ikekita A, Kageyama S. UDP-glucuronosyltransferase 2B17 genotyping in Japanese athletes and evaluation of the current sports drug testing for detecting testosterone misuse. *Drug Test Anal*. 2013 Mar;5(3):166-81

Sallet P, Brunet-Guedj E, Mornex R, Baverel G. Study of a new indirect method based on absolute norms of variation to detect autologous blood transfusion. *Int J Hematol*. 2008 Nov;88(4):362-8.

Sharpe K, Ashenden MJ, Schumacher YO. A third generation approach to detect erythropoietin abuse in athletes. *Haematologica*. 2006 Mar;91(3):356-63.

Schulze JJ, Lundmark J, Garle M, Ekström L, Sottas PE, Rane A. Substantial advantage of a combined Bayesian and genotyping approach in testosterone doping tests. *Steroids*. 2009 Mar;74(3):365-8.

Sottas PE, Baume N, Saudan C, Schweizer C, Kamber M, Saugy M. Bayesian detection of abnormal values in longitudinal biomarkers with an application to T/E ratio. *Biostatistics*. 2007 Apr;8(2):285-96.

Sottas PE, Robinson N, Saugy M. The athlete's biological passport and indirect markers of blood doping. *Handb Exp Pharmacol*. 2010;(195):305-26.

Sottas PE, Saudan C, Schweizer C, Baume N, Mangin P, Saugy M. From population- to subject-based limits of T/E ratio to detect testosterone abuse in elite sports. *Forensic Sci Int*. 2008 Jan 30;174(2-3):166-72.

Strahm E, Mullen JE, Garevik N, Ericsson M, Schulze JJ, Rane A, Ekstroem L. Dose-dependent testosterone sensitivity of the steroidal passport and GC-C-IRMS analysis in relation to the UGT2B17 deletion polymorphism. *Drug Testing and Analysis* (2015), 7(11-12), 1063-1070.

Pottgiesser T, Ehteler T, Sottas PE, Umhau M, Schumacher YO. Hemoglobin mass and biological passport for the detection of autologous blood doping. *Med Sci Sports Exerc*. 2012 May;44(5):835-43.

Van Renterghem P, Van Eenoo P, Sottas P-E, Saugy M, Delbeke F. Subject-based steroid profiling and the determination of novel biomarkers for DHT and DHEA misuse in sports. *Drug Testing and Analysis* (2010), 2(11-12), 582-588.

Quesito 2

Modulo ematologico

2a. I parametri inclusi nel modulo ematologico delle LG operative della WADA sono sufficienti e adeguati per stabilire il profilo ematologico degli atleti?

2b. Il metodo di analisi del modulo ematologico è più utile (in termini di efficacia, sensibilità, specificità) dei metodi diretti come metodo di contrasto del doping?

Studi reperiti tramite strategia di ricerca	1415
Studi selezionati e letti in full text	38
Studi inclusi	*

Background

In tutti gli sport di resistenza (es. ciclismo, maratona), la capacità dell'organismo di trasportare efficacemente ossigeno in grado di sostenere il lavoro muscolare nel tempo, è un fattore chiave in grado di influenzare in modo determinante la performance sportiva. Per questo motivo, a partire dagli anni '70 gli atleti hanno iniziato ad utilizzare la trasfusione di sangue come metodo, legale in quegli anni, per aumentare la loro resistenza. L'utilizzo delle emotrasfusioni, tuttavia, richiede la disponibilità di una logistica tale da limitarne la diffusione del metodo nella popolazione sportiva. Nei primi anni '80, tuttavia, viene sviluppata la prima eritropoietina ricombinante umana (rhEPO), la quale entra di fatto in commercio nel 1989 come farmaco in grado di migliorare sensibilmente la qualità della vita di pazienti affetti da patologie oncologiche, malattie croniche a carico dei reni, malattie infettive (es. AIDS) etc., ovvero tutte quelle condizioni in cui viene richiesta una stimolazione dell'eritropoiesi a causa di anemie severe. Con lo sviluppo dell'rhEPO, storicamente il primo Agente Stimolante l'Eritropoiesi (ESA), il miglioramento della performance sportiva attraverso l'aumento della massa dei globuli rossi è diventato un target facilmente raggiungibile, tanto da diffondersi rapidamente nella maggior parte degli sport di resistenza. Occorre ricordare che l'eritropoietina è un ormone naturalmente prodotto dall'organismo umano, soprattutto a livello renale, ed ha la funzione di regolare l'eritropoiesi. L'rhEPO (e le EPO di seconda e terza generazione, quali la darbepoietina ed il CERA, l'attivatore continuo del recettore dell'eritropoietina) risulta difficilmente distinguibile dall'eritropoietina naturale, dalla quale si differenzia sostanzialmente per alcuni residui glicosidici che caratterizzano le catene laterali della molecola ricombinante. Così, i metodi analitici volti al riconoscimento dell'rhEPO, sfruttano essenzialmente tecniche separative elettroforetiche quali la isoelettrofocalizzazione (IEF), o l'SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis, ossia elettroforesi su gel di poliaccrilammide in presenza di sodio dodecil solfato). Alcuni limiti connessi all'applicazione di queste metodiche analitiche sono dovuti sia alla scarsa permeabilità del glomerulo renale alle epoetine di terza generazione (che hanno legati a sé polimeri di glicole metossipoli-etilenico), ma anche all'emivita della sostanza da ricercare: poche ore (4-8) per l'rhEPO, poco più di un giorno (24-26 ore) per la darbepoietina, circa una settimana per le EPO di terza generazione. Recentemente (**Mokerberg 2014**) una tecnica analitica mista di tipo cromatografico e immunologico (MAIIA, Membrane Assisted Isoform ImmunoAssay), ha rilevato la somministrazione di microdosi di rhEPO (10 UI/Kg) fino a 12 ore dopo il trattamento.

Tra gli anni '90 e 2000, quando ancora le tecniche elettroforetiche per la determinazione dell'rhEPO non erano ancora ritenute sufficientemente robuste e affidabili, alcuni ricercatori studiarono gli effetti dell'rhEPO (ma anche delle emotrasfusioni), su alcuni marcatori ematici in grado di fotografare lo stato del sistema eritropoietico al momento del prelievo del campione: emoglobina (Hb), ematocrito (Hct) e reticolociti (valore assoluto e percentuale). Sulla base delle variazioni di questi marcatori, a metà degli anni '90 alcune Federazioni sportive introdussero il "no-start rule", ovvero il divieto per un atleta di prendere parte ad una competizione sportiva qualora i propri valori di ematocrito ed emoglobina superassero un valore massimo stabilito (ematocrito >50% ed emoglobina >17 g/dl): si trattava del primo passo verso l'applicazione di un "metodo indiretto" per la rilevazione del doping ematico, ovvero l'applicazione del principio secondo il quale un atleta non veniva fermato perché trovato "positivo" alla sostanza, ma perché erano visibili sul suo corpo gli "effetti" legati all'uso di quella sostanza. Successivamente, è stato sviluppato un nuovo metodo che utilizza un algoritmo capace di combinare diversi marcatori (tra cui emoglobina e reticolociti) in grado di fornire una indicazione sullo stato del sistema eritropoietico al momento del test: è il caso ad esempio dell'OFF score (ovvero la formula $Hb [g/L] - 60 * \sqrt{Ret[\%]}$), che aumenta quando l'EPO viene interrotto ma il numero dei globuli rossi è elevato mentre il sistema eritropoietico viene soppresso (Schumaker 2012, Gore 2003). Alcuni di questi marcatori, inizialmente sviluppati per il rilevamento degli ESA, si sono rivelati sensibili ad altri tipi di manipolazione del sangue che aumentano la massa dei globuli rossi, come appunto la emotrasfusione.

I limiti legati ad un utilizzo dei marcatori indiretti per la determinazione del doping ematico risiedono nel fatto che essi sfruttano intervalli di riferimento (o range) di popolazione. Questi range risentono di una elevata variabilità interindividuale, che può essere drasticamente ridotta adottando il principio secondo cui ogni atleta può diventare il riferimento di se stesso (ovvero dovrebbero essere applicati degli intervalli di riferimento individuali al posto dei range di popolazione).

Abbracciando questo principio, a partire dagli anni 2000 la ricerca legata alla lotta al doping inizia a sviluppare intervalli di riferimento intraindividuali per i marcatori di doping ematico, con la contestuale evoluzione dell'approccio longitudinale alla lotta al doping effettuata attraverso la raccolta sistematica di una serie di risultati analitici (passaporto biologico dell'atleta). Attualmente, l'ultimo documento della WADA sulle procedure operative legate all'implementazione del passaporto biologico-modulo ematologico (WADA 2017), riconosce i seguenti marcatori:

- ematocrito
- emoglobina
- conta degli eritrociti
- reticolociti (%)
- conta dei reticolociti
- volume corpuscolare medio (MCV)
- emoglobina corpuscolare media (MCH)
- concentrazione media dell'emoglobina corpuscolare (MCHC)
- ampiezza della distribuzione eritrocitaria-deviazione standard (RDW-SD)
- frazione dei reticolociti immaturi (IRF)
- OFF-hr score
- Abnormal Blood Profile Score (ABPS).

Stime di prevalenza

Tre studi riportano una stima della prevalenza di segnalazioni per doping in atleti di diverse discipline sportive.

Il primo studio, del 2003 (**Stray-Gundersen 2003**), riporta una stima della prevalenza di profili ematologici anomali tra gli atleti professionisti di sci di fondo partecipanti al Campionato mondiale di Sci del 2001. Tra tutti gli atleti analizzati, che avevano terminato la gara tra i primi 50 posti, il 17% è risultato avere un profilo ematologico significativamente anomalo, mentre il 19% ha riportato un profilo anomalo. Tra gli atleti vincitori di almeno una medaglia, il 50% ha riportato un profilo ematologico significativamente anomalo, mentre il 33% degli atleti classificati tra il 4° e il 10° posto ha riportato un profilo anomalo. Solo il 3% degli sciatori classificati tra il 41° e il 50° posto ha riportato un profilo ematologico anomalo. In conclusione, lo studio sottolinea che le strategie antidoping in vigore al 2003 non erano in grado di identificare l'abuso di sostanze dopanti, né sembravano essere un'efficace strategia deterrente all'uso di doping. **BASSO RISCHIO DI BIAS**

Il secondo studio (**Sottas 2011**) analizza i dati di 2737 atleti professionisti durante e al di fuori delle competizioni atletiche internazionali. I risultati hanno mostrato una media del 14% di risultati alterati nella popolazione complessiva degli atleti analizzati, con un range dall'1% al 48% in sottogruppi di atleti. È stata, inoltre, osservata, come atteso in base a precedenti studi, una differenza significativa tra gli atleti che praticavano sport di resistenza e gli atleti che praticavano sport leggeri, con l'etnia come maggiore fattore di eterogeneità. I risultati delle analisi hanno inoltre mostrato la presenza di casi di policitemia secondaria, a sottolineare i rischi di salute associati alla manipolazione ematologica. **BASSO RISCHIO DI BIAS**

Il terzo studio (**Zorzoli 2012**) ha valutato i profili ematologici di più di 800 attivi tra il 2008 e il 2010 al fine di identificare l'utilizzo di stimolanti eritropoietici a fini di doping. Un totale di 26 atleti sono stati trovati con un profilo ematologico alterato dovuto ad abuso di ESA, nello specifico 10 nel 2008, 8 nel 2009 e 8 nel 2010, rispetto ai 3 segnalati nel 2007 (1 per ESA e 2 per HBT), anno precedente all'introduzione dell'ABP. Lo studio mostra come l'introduzione dell'ABP abbia determinato un aumento significativo delle segnalazioni per doping. **BASSO RISCHIO DI BIAS**

Analisi delle evidenze

Utilità dei parametri inclusi nel modulo ematologico

Diversi autori hanno valutato la capacità di alcuni parametri ematologici inclusi in diversi modelli statistici (tra cui l'ON-model, per rilevare l'uso corrente di rhEPO e l'OFF-model, per rilevare l'uso precedente di rhEPO, interrotto da un breve periodo di tempo), di identificare gli atleti che hanno fatto uso di eritropoietina.

In un articolo del 2006 (**Sharpe 2006**) gli autori hanno voluto verificare se attraverso il calcolo di una baseline individuale di un atleta attraverso un singolo prelievo ematico, applicando un valore di variabilità universale (ottenuto da quattro coorti di atleti maschi professionisti francesi, tedeschi, italiani e di varie nazionalità che hanno compreso 3584 osservazioni da 1122 atleti per Hb e 3527 osservazioni da 1120 atleti per OFF-hr), è possibile definire delle soglie attese con cui comparare i successivi prelievi ematici che siano in grado di identificare variazioni anomale dei parametri emoglobina (z-score) ed OFF-score. La sensibilità dell'approccio è stata valutata applicando i valori di variabilità universale ottenuti dai dati dei trial Canberra ed Oslo (in totale 49 atleti dilettanti a 37 dei quali era somministrata eritropoietina) che utilizzavano due diversi protocolli di somministrazione della sostanza proibita. Mentre circa la metà dei soggetti che avevano ricevuto rHuEpo nel trial Canberra hanno dimostrato valori di Hb o ematocrito in eccesso rispetto alle soglie di stop, la stessa percentuale di soggetti riceventi che superavano la soglia di arresto dalle competizioni risultava inferiore (4,4% per l'emoglobina, 13,1% ematocrito) nel trial Oslo a causa delle differenze nel protocollo di somministrazione dell'eritropoietina. Gli autori calcolano che adottando le soglie da loro individuate solo un campione su mille da atleti non dopati le supererebbe. L'uso di soglie di sospetto proposto in questo articolo potrebbe inoltre permettere di adottare pratiche più mirate di controlli approfondendo ed estendendo i parametri ematologici indagati. **BASSO RISCHIO DI BIAS**

Un recente studio (**Bejder 2015**) riporta i risultati di un trial randomizzato con un disegno crossover, in cui gli autori hanno valutato la sensibilità del modello ADAPTIVE del passaporto biologico dell'atleta nell'individuare l'utilizzo a fini di doping sportivo di dosi normali di eritropoietina somministrate per periodi di tempo lunghi o di dosi elevate per periodi brevi. Come ulteriore obiettivo dello studio si è cercato di comprendere se l'applicazione della percentuale di reticolociti (%Ret) come marcatore di profili atipici del sangue migliorasse la sensibilità del passaporto. Lo studio ha arruolato 20 soggetti maschi allenati (attività minima di 3-4 ore a settimana) con un'età media di $25,5 \pm 5,2$ anni e un VO_2 di $52,8 \pm 4,0$ mL/min/Kg. Il protocollo di somministrazione prevedeva una fase di trattamento con una dose di eritropoietina ricombinante umana normale (5000 IU dose) per 7 giorni alternati in due settimane seguita da 5 settimane di intervallo a cui seguiva una seconda fase di somministrazione di rHuEpo a dosaggio maggiore (30,000 IU) per i primi 3 giorni in due settimane, seguita da 5 settimane di intervallo, e da 2 settimane di somministrazione del placebo. I cambiamenti di sette variabili (concentrazione di emoglobina [Hb], ematocrito, conta dei globuli rossi, volume medio corpuscolare, emoglobina corpuscolare media, concentrazione dell'emoglobina corpuscolare media, e conta dei reticolociti (ret%)), erano analizzati con il modello statistico ADAPTIVE dopo i trattamenti con rHuEPO. I risultati hanno mostrato che %Ret risultava significativamente più alta rispetto al placebo nei giorni 4 e 11, mentre diminuiva al venticinquesimo giorno dopo trattamento con dosi elevate di eritropoietina. Negli stessi giorni il trattamento con dosi normali produceva lo stesso profilo di variazioni mostrato nella fase descritta precedentemente. Nei giorni 4 e 11 del trattamento con dose elevata o normale di eritropoietina il punteggio OFF-hr si è dimostrato significativamente inferiore rispetto al placebo, mentre era più elevato al 25 giorno. Conseguentemente nel modello ABP si producevano profili atipici in seguito alla somministrazione di eritropoietina a dosi normali o elevate nei giorni 4,11 e 25. L'inclusione di %Ret come marcatore per profili atipici in aggiunta alle variabili [Hb] e OFF-hr la sensibilità del modello ADAPTIVE aumentava due volte nel giorno 11 sia per il dosaggio normale che elevato di eritropoietina. Lo studio ha dimostrato che circa il 30% dei soggetti trattati con eritropoietina a dosi normali o elevate presentavano profili anomali al passaporto biologico e che l'utilizzo della variabile %Ret aumentava la sensibilità del metodo. **BASSO RISCHIO DI BIAS**

Alcuni lavori hanno messo in evidenza alcune criticità legate ai parametri ematologici inclusi nell'ABP.

Un articolo del 2011 (**Ashenden 2011**) analizza la capacità dei parametri ematologici analizzati tramite il software ABP di individuare i soggetti trattati con micodosi di rhEPO. Lo studio è stato condotto su 10 soggetti sani con un'età media di 31.3 ± 6.9 anni, un'altezza media di 180.8 ± 7.2 cm e un peso medio di 79.8 ± 8.4 kg, che partecipavano regolarmente a sport di resistenza (almeno 3 sessioni di >2 ore a settimana). Tutti i soggetti arruolati sono stati sottoposti a trattamento con dosi standardizzate di rhEPO (20 IU/kg per 4 settimane, seguite da 30 IU/kg per 4 settimane). I risultati sono stati analizzati tramite il software ABP. Nessun valore individuale è risultato anomalo per tutta la durata dello studio. Due soli valori sono risultati vicini ma non superiori al percentile del 99.9%. Il valore di Hb, per quanto tendente ad aumentare al termine della fase di trattamento non ha mostrato differenze statisticamente significative rispetto a baseline. Il valore di OFF score alla fine del trattamento è risultato significativamente più alto rispetto al valore in fase 1, vicino alla significatività rispetto al valore in fase 2, ma non significativamente diverso dai valori a baseline. Il valore di Ret% ha mostrato una tendenza ad aumentare durante la fase 1, in coincidenza con l'inizio del trattamento, ma, alla fine del trattamento, non ha mostrato variazioni significative rispetto a baseline. In conclusione, il software ABP non si è dimostrato in grado di identificare l'uso di rHuEPO alle dosi somministrate nello studio, mostrando, quindi, una ridotta sensibilità nell'individuare microdosi di rHuEPO. **BASSO RISCHIO DI BIAS**

Uno studio del 2010 (**Bornø 2010**) l'efficacia e la sensibilità dell'ABP nell'identificare la somministrazione di rHuEpo in dosaggi sufficienti a migliorare le performance, ma con una frequenza di iniezioni inferiore. Le analisi sono state effettuate su 400 campioni di sangue prelevati da 24 soggetti sani, moderatamente allenati, suddivisi in 3 gruppi (G1, G2 e G3) da 8 soggetti ciascuno. Ai gruppi G1 (età media 23 ± 3 anni, altezza media 181 ± 7 cm, peso medio 77 ± 5 kg) e G2 (età media 25 ± 4 anni, altezza media 183 ± 6 cm, peso medio 79 ± 7 kg) è stata somministrata una dose media di 65 ± 5 IU/kg BW di rHuEPO per un periodo di 4 settimane, con 2 settimane di "boosting" (4 iniezioni a settimana) seguite da 2 settimane di "mantenimento" (1 iniezione a settimana) e da 3 settimane di washout. Il G3 (età media 27 ± 7 anni, altezza media 180 ± 4 cm, peso medio 83 ± 7 kg) è stato trattato con 60 ± 4 IU/kg BW di rHuEPO per 10 settimane, con 3 settimane di "boosting" seguite da 7 settimane di "mantenimento" e poi da 1 settimana di washout. L'efficacia e sensibilità dei parametri [Hb], Ret%, OFFhr score, Hbz score e OFFz score sono state calcolate utilizzando le soglie di cut-off stabilite dalla WADA per determinare il sospetto di doping. Complessivamente, il 58% dei soggetti ha riportato almeno un valore anomalo. Un totale di 7 dei 24 volontari hanno riportato valori di [Hb] anomali, mentre 8 soggetti hanno riportato valori di Ret% superiori ai cut-off. Il cut-off di Ret% si è mostrato particolarmente sensibile nel periodo di "boosting", con una sensibilità del 12.0% (n. 8/24), mentre il cut-off di [Hb] si è mostrato più sensibile nelle fasi di "mantenimento" e di washout, con una sensibilità rispettivamente del 16.2% e del 15.6%. L'OFFhr score ha mostrato una sensibilità del 5.6% durante la fase di washout, in cui solo 3 soggetti hanno riportato valori anomali. Dieci soggetti hanno, invece, riportato valori anomali di OFFz score, con una sensibilità dell'OFFz score dell'11.1% durante il periodo di washout. I parametri considerati si sono mostrati maggiormente efficaci quando utilizzati in combinazione. In conclusione, per quanto l'ABP si sia dimostrato più efficace delle altre misure antidoping utilizzate, il 42% dei soggetti trattati non ha comunque riportato alcun valore anomalo, dimostrando una sua ridotta sensibilità nell'identificare rHuEPO se somministrato con una frequenza inferiore al consueto. **BASSO RISCHIO DI BIAS**

Un recente studio (**Clark 2017**) ha valutato la sensibilità dell'ABP, e in particolare dell'OFF score, nel determinare se un regime di microdosi di rHuEPO fosse in grado di mascherare un precedente periodo di trattamento con alte dosi di rHuEPO. Lo studio ha analizzato campioni prelevati da 24 atleti amatoriali, 19 maschi e 5 femmine con un'età media di 32.7 ± 9.0 anni, un'altezza media di 177.8 ± 9.7 cm e un peso medio di 76.6 ± 10.9 kg, randomizzati ed assegnati in doppio cieco a quattro bracci di trattamento. Nel primo braccio (HIGH) sono stati inclusi 8 soggetti (2F e 6M) ai quali è stata somministrata rHuEPO ad alto dosaggio (250UI/Kg) 3 volte a settimana per 2 settimane seguite da 4 settimane di washout. Nel secondo braccio (COMB) sono stati inclusi 8 soggetti (0F e 8M) ai quali è stata somministrata rHuEPO ad alto dosaggio (250UI/Kg) 3 volte a settimana per 2 settimane seguite da rHuEPO a basso dosaggio (10UI/kg) 3 volte/settimana per 3 settimane. Ai 4 soggetti (1F e 3M) inclusi nel terzo braccio (HIGH-placebo) e ai 4 soggetti (2F e 2M) inclusi nel quarto braccio (COMB-placebo) è stata somministrata soluzione salina secondo le stesse modalità previste nei bracci HIGH e COMB. Entrambi i regimi di trattamento con EPO hanno determinato un'alterazione dei parametri dell'ABP. Nei gruppi trattati è stato osservato un aumento di [Hb] dopo 2 settimane di alte dosi e i valori sono rimasti elevati anche dopo 3 e 4 settimane di washout. In entrambi i gruppi trattati è stato osservato un aumento dei valori di Ret% rispetto a baseline dopo alte dosi, l'aumento è rimasto visibile anche dopo 1 settimana di microdosi, ma i valori sono scesi al di sotto della baseline durante il periodo di washout. I valori di OFF score a seguito di alte dosi sono risultati inferiori a baseline per entrambi i gruppi trattati, ma sono risultati superiori a baseline in tutte le misurazioni successive eccetto la prima settimana di microdosi nel gruppo COMB. Il 75% dei soggetti nei gruppi HIGH e COMB ha mostrato valori sospetti dopo il periodo di trattamento ad alte dosi, e il 56% di questi risultati è stato considerato anomalo. A 3 settimane dalla sospensione di trattamento ad alte dosi solo il 19% dei soggetti ha mostrato valori sospetti, dei quali il 13% sono stati considerati anomali. La sensibilità del parametro Ret% è risultata maggiore rispetto a [Hb] e OFF score a seguito del periodo di trattamento ad alte dosi, con il 94% e l'88% dei trattati segnalati come rispettivamente sospetti e anomali, e una sensibilità del 100% durante il periodo di washout. La sensibilità del parametro OFF score è risultata leggermente inferiore immediatamente dopo il trattamento ad alte dosi, ma a 2 settimane dal trattamento con alte dosi il 100% dei partecipanti in entrambi i gruppi trattati ha mostrato un risultato sospetto e il 75% anomalo. In conclusione, lo studio mostra che la somministrazione di rHuEPO determina un aumento dei valori di Hb-mass, [Hb], Hct, RBC e EV che può persistere fino a 3 settimane se sostenuto dalla somministrazione di microdosi di rHuEPO. L'ABP risulta in grado di identificare la maggior parte dei soggetti trattati con rHuEPO, e, in particolare, il parametro OFF-score ha una buona sensibilità nell'identificare l'abuso di rHuEPO anche in soggetti che fanno uso di microdosi a seguito di trattamento con alte dosi. **BASSO RISCHIO DI BIAS**

Variazioni fisiologiche

Un articolo del 2000 (**Schmidt 2000**) dimostra che una serie di variabili esogene ed endogene (esercizio fisico intenso, fluttuazioni nictemerali, posizione corporea) determinano significative variazioni dell'ematocrito (Hct) non legate all'uso di eritropoietina. Per dimostrare l'effetto di tali variabili sui valori di Hct sono state effettuate 5 osservazioni sperimentali. Nella prima osservazione, 8 soggetti sono stati suddivisi in due gruppi. Il primo gruppo, dopo un prelievo

al baseline, ha effettuato 1 ora di attività fisica intensa (una sessione di lavoro al 60% del carico massimo di lavoro) seguita da 23 ore di riposo mentre il secondo gruppo è stato utilizzato come gruppo di controllo (24 ore di osservazione). Ad entrambi i gruppi sono stati effettuati 8 prelievi ematici nell'arco delle 24 ore di studio. Nella seconda osservazione, 7 soggetti (5 maschi e 2 femmine) sono stati fatti stendere con il capo rivolto verso il basso su un piano inclinato di 7° per 20 minuti seguiti da 5 minuti in posizione seduta. Nella terza osservazione, 4 soggetti di sesso maschile hanno bevuto 1 litro di soluzione salina isotonica nell'arco di 15 minuti. La quarta osservazione ha incluso 10 soggetti di sesso maschile che hanno condotto un test da sforzo massimale su un cicloergometro (a partire da un carico di 100 W ed un incremento di 17 W/minuto), e sono stati effettuati 2 prelievi ematici al baseline, durante il test, e fino ad un'ora dopo il termine della prova. Per la terza osservazione sono stati considerati 4 ciclisti professionisti partecipanti ad una competizione di 10 giorni (1700 Km) cui è stato effettuato un prelievo ematico al giorno per tutta la durata dell'evento sportivo. I risultati relativi ai diversi disegni sperimentali hanno dimostrato che l'Hct non è un valore costante, ma può variare in entrambe le direzioni in funzione di diversi cambiamenti fisiologici. **ALTO RISCHIO DI BIAS**

Due studi longitudinali (**Morkeberg 2009 (A)**; **Morkeberg 2009 (B)**) hanno valutato la variazione dei parametri ematologici durante la stagione sportiva.

Il primo studio (**Morkeberg 2009 (A)**) analizza le possibili fluttuazioni dei parametri ematici in ciclisti elite in base alle competizioni effettuate nell'arco di 1 anno. Le analisi sono state effettuate su un totale di 374 campioni di sangue e 287 campioni di urine prelevati da 28 ciclisti elite, appartenenti alla team ciclistico danese, impegnati nella stagione agonistica 2007 (dal 12 dicembre 2006 al 30 novembre 2007). I campioni sono stati classificati come pre-competizione (prelevati 1-3 giorni prima di una gara), in-competizione (prelevati durante l'arco della gara), OOC (prelevati in atleti non impegnati in alcuna competizione al momento del prelievo). I risultati degli esami sono stati inseriti in un database in grado di calcolare automaticamente coefficiente di variazione di [Hb], OFF-model, OFF z-score. I valori di Hct, [Hb] e Ret% sono risultati vicini a una distribuzione normale, mentre i valori di Ret% hanno mostrato una distribuzione distorta con valori tra 0.2% a 2.0%. I valori di [Hb] in competizione sono risultati inferiori rispetto ai valori OOC e pre-competizione, mentre i valori di Ret% sono risultati maggiori OOC rispetto a pre- e in-competizione. I valori di OFF-score sono risultati maggiori pre-competizione rispetto ai valori OOC e in-competizione. I valori di Hct, [Hb] e Ret% hanno mostrato una variazione stagionale, correlata alla presenza di competizioni, con una diminuzione dei valori di Hct e [Hb] in presenza di gare e un aumento in periodi di non competizione. Esami effettuati su un sottogruppo di 7 atleti che avevano partecipato al Tour de France ha mostrato un calo significativo dell'11.5% dei valori di Hb (range 7.0% al 20.6%). In conclusione, lo studio mostra che, dal momento che i valori di Hct e [Hb] diminuiscono significativamente durante le stagioni competitive, tornando poi, nel periodo successivo, ai livelli di baseline, tutti i campioni prelevati per il monitoraggio ematologico antidoping dovrebbero essere correlati al periodo in cui sono stati prelevati (fuori competizione, prima della competizione o durante la competizione). **BASSO RISCHIO DI BIAS**

Il secondo studio (**Morkeberg 2009 (B)**) ha analizzato le variazioni dei valori di emoglobina e reticolociti e parametri derivati in una popolazione di 440 sciatrici e 634 sciatori nordici di fondo di livello mondiale. Dal 1997-1999 al 2001-2002 i valori medi di Hb hanno mostrato una riduzione di 0.9-15.3 g/dL negli sciatori e di 0.4-13.8 g/dL nelle sciatrici, con variazioni stagionali comprese tra 14.8 e 15.7 g/dL nei maschi e tra 13.4 e 14.2 g/dL nelle femmine. È stata osservata anche una riduzione significativa dei valori di [Hb] dal 2001-2002 al 2002-2003 di 0.5-14.8 g/dL nei maschi e di 0.4-13.4 g/dL nelle femmine, seguita da un incremento dei valori nelle stagioni successive. Dal 2001-2001 al 2002-2007 è stata osservata una riduzione significativa dei valori di Ret% in entrambi i sessi. La variazione inversa dei due parametri ha determinato un aumento significativo nei valori medi di OFF-score di 13.6 punti nei maschi e 12.9 punti nelle femmine dal 2002-2003 al 2006-2007. Inoltre i livelli di Hb sono risultati più elevati durante le stagioni dei Giochi Olimpici. In conclusione, lo studio osserva che l'intensificazione dei controlli ematologici antidoping sembra aver avuto un effetto, data la riduzione rispetto al 1999 dei valori di [Hb] osservati negli atleti, sebbene, però, i valori di [Hb] risultino comunque più alti dell'atteso e l'aumento degli score dell'OFF-model sembrano indicare un cambiamento nelle sostanze utilizzate e nelle modalità in cui vengono somministrate. **BASSO RISCHIO DI BIAS**

Due studi (**Schumacher 2010 (A)**; **Schumacher 2010 (B)**) hanno analizzato la variazione dei parametri ematologici durante l'esercizio al fine di migliorare l'interpretazione dei dati del Passaporto biologico.

Il primo studio (**Schumacher 2010 (A)**) valuta la variabilità intra- e inter-individuale del parametro Ret% in atleti allenati in sport di resistenza al fine di interpretare meglio i dati nel contesto dell'ABP. I dati sono stati raccolti in occasione di controlli di routine da 238 atleti caucasici (191 maschi e 47 femmine con un'età media di 23.2±6.1 anni), da cui sono stati ottenuti 793 campioni durante un periodo di 9 anni. Un secondo gruppo di 82 volontari caucasici sani sedentari (36 maschi e 46 femmine con un'età media di 24.2±2 anni) ha fornito un ulteriore set di campioni di controllo. Gli atleti hanno mostrato valori inferiori di Ret% durante la stagione competitiva (-0,1% p=0,048), mentre non sono state osservate variazioni significative nel gruppo di controllo. I soggetti di controllo hanno mostrato valori inferiori di Ret% rispetto agli atleti. È stato osservato un aumento significativo nei valori di Ret% a seguito di esercizio intensivo, con un aumento medio dello 0.05%. In conclusione, lo studio mostra che la popolazione degli atleti ha valori di Ret% con una

variabilità inter-individuale (0.0124) simile alla popolazione generale e una variabilità intra-individuale (0.0118) leggermente superiore, mostra un lieve aumento dei livelli di Ret% a seguito di esercizio e ha valori di Ret% inferiori durante i periodi di competizione. Tali variazioni dovrebbero essere considerate nella valutazione dei valori di Ret% all'interno dell'ABP. **BASSO RISCHIO DI BIAS**

Il secondo studio (**Schumacher 2010 (B)**) descrive la variabilità diurna di Hb e Ret% in atleti di sport di resistenza e non, tenendo in considerazione fattori come la temperatura ambientale, l'esercizio e l'assunzione di liquidi. Lo studio analizza campioni prelevati da 36 atleti caucasici di diverse discipline sportive e 7 controlli sedentari. In base alla propria disciplina, gli atleti sono stati suddivisi in "endurance" (END, 20 atleti principalmente ciclisti e triatleti) e "non endurance" (NON-END, 16 atleti principalmente di sport di squadra). Sono stati analizzati un totale di 500 campioni da 43 soggetti. L'ora del prelievo e il livello di attività fisica sono risultati avere un effetto significativo sui valori di Hb, mentre i valori di Ret% non sono risultati essere significativamente influenzati dalla maggior parte dei confondenti analizzati. L'esercizio fisico ha prodotto un aumento significativo nei valori di Hb, che sono rientrati nei range di normalità a partire da 1 ora dopo l'interruzione dell'attività fisica. Lo studio conclude, quindi, che Hb e Ret% mostrano una limitata variabilità diurna sia negli atleti che nei controlli sani, e che il confondente principale risulta essere l'esercizio fisico, che causa un aumento significativo dei valori di Hb. Pertanto, tali informazioni dovrebbero essere prese in considerazione nell'analizzare i risultati dell'ABP. **BASSO RISCHIO DI BIAS**

Uno studio del 2015 (**Baume 2015**) confronta i risultati delle analisi di alcuni parametri ematologici e steroidei dell'ABP effettuate durante (IC) e fuori le competizioni (OOC) in calciatori partecipanti alla FIFA World Cup. del 2014. Le analisi sono state effettuate su 776 campioni di urine, 769 campioni di sangue intero (EDTA) e 773 campioni di siero prelevati in fase OOC da 32 squadre, e 300 campioni di urine, 305 EDTA e 307 campioni di siero prelevati in fase IC nell'arco delle 64 partite. Dei 779 campioni di urine prelevati in fase OOC, 4 hanno mostrato tracce di clenbuterolo, 7 contenevano composti e metaboliti del tramadolo, 3 contenevano glucocorticoidi sopra la soglia stabilita dalla WADA, 1 campione è stato riportato per presenza di anfetamine (usate a scopo terapeutico) e 9 soggetti hanno riportato valori di T/E superiori a 4.0. Per gli atleti con almeno 3 test sono stati studiati i profili steroideo e ematologico tramite il modello ADAPTIVE dell'ABP. Non sono state osservate differenze significative tra i campioni prelevati in fase OOC e quelli prelevati in fase IC e non è stato osservato alcun effetto della competizione sui parametri ematologici. **BASSO RISCHIO DI BIAS**

Un articolo del 2014 (**Lobigs 2014**) si propone come obiettivo primario di rivalutare, con l'ausilio di un grande database che include valori di [Hb] da 2449 atleti nell'arco di 15 anni, le stime pubblicate di varianza intra-atleta relative all'[Hb] e, come obiettivo secondario, di quantificare la proporzione di varianza analitica sul valore originario di [Hb] per comprendere se sono necessari valori specifici di varianza relativi al sesso, analizzatore, sport e stagione. La media dei valori di [Hb] degli atleti di sesso maschile è risultata più elevata di quella delle atlete (152.8±8.1 vs. 136.6±6.8 g/L). Inoltre tali valori erano influenzati dal tipo di sport praticato. Approssimativamente, il 99% di tutte le osservazioni sia nei maschi che nelle femmine, sono risultate comprese all'interno degli intervalli di riferimento raccomandati dalla RCPA-QAP (Royal College of Pathologists of Australasia Haematology Quality Assurance Program: 130–180 g/L maschi, 115–165 g/L femmine). La distribuzione delle deviazioni standard intra-soggetto non ha mostrato differenze sostanziali tra gli sport presi in esame. Il passaporto biologico segue un approccio statistico di tipo Bayesiano, che identifica le deviazioni da intervalli individualizzati di riferimento per produrre prove basate sulla probabilità di anomalità dei valori ottenuti. La varianza intra-individuale non è risultata significativamente diversa tra sessi, ma è, invece, risultata dipendente dal tipo di sport praticato, con intervalli più ampi per gli sport di resistenza, di squadra e di abilità rispetto agli sport di potenza, ed ai valori ottenuti dagli atleti con disabilità ed ai non-atleti. La varianza intra-soggetto è risultata minore per le analisi ottenute con analizzatore Sysmex rispetto a quelle ottenute con i sistemi ADVIA e H3. Per quanto riguarda la stagione sportiva, è stata osservata una variabilità maggiore nei mesi caldi rispetto ai mesi freddi. Infine, la proporzione di varianza intra individuale riconducibile all'errore analitico è risultata stimata al 54%. **BASSO RISCHIO DI BIAS**

Le fluttuazioni del volume di plasma rappresentano la porzione più grande della variabilità biologica associata ai parametri ematologici volumetrici.

Un studio sul volume del plasma (**Watson 2014**) indaga l'effetto delle variazioni di osmolarità su Hb e Hct, misurate con metodologie manuali (cianometemoglobina, PCV) e con analizzatore automatico (AHA), sia aggiungendo salina a campioni raccolti a riposo, sia esaminando l'effetto dell'esercizio prolungato in un ambiente caldo. Nel primo studio i campioni sono stati prelevati da 8 volontari sani maschi, con un'età media di 27±4 anni, un'altezza media di 1.75±0.06 m e un peso medio di 73.9±5.4 kg. I risultati hanno mostrato una correlazione significativa tra le concentrazioni di Hb ottenute tramite le due diverse tecniche utilizzate. I valori di Hct sono risultati non essere influenzati dalla variazione di osmolarità quando analizzati con la tecnica AHA, mentre risultavano alterati con la tecnica PCV. Il secondo studio è stato effettuato su campioni prelevati da 8 volontari maschi fisicamente attivi, con un'età media di 26±4 anni, un'altezza media di 1.79±0.007 m e un peso medio di 76.3±10.2 kg, a baseline e dopo una sessione di esercizio in ambiente caldo

fino a esaurimento. I risultati hanno mostrato un aumento significativo delle concentrazioni di Hb durante l'esercizio, senza differenze significative tra i 2 metodi. L'esercizio ha prodotto una riduzione del volume ematico, con una differenza significativa nel grado di variazione del volume ematico tra i 2 metodi. In conclusione, lo studio mostra che la variazione di osmolarità ha un marcato effetto sui parametri misurati con PCV ma non con AHA. **ALTO RISCHIO DI BIAS**

Un altro lavoro del 2014 (**Voss 2014**) monitora le variazioni nel volume plasmatico e le concentrazioni ematiche di potenziali marcatori indiretti di uso di ESA. Lo studio analizza dati provenienti da 12 ciclisti amatori maschi sottoposti ad un test incrementale di pedalata, strutturato come simulazione di 6 giorni di gara. I prelievi sono stati eseguiti in conformità con le linee guida operative WADA dell'ABP. Tutte variabili sono risultate fortemente influenzate dall'esercizio, con una variabilità tra marcatori nella dimensione della variazione. Il volume plasmatico ha mostrato una leggera diminuzione nel periodo iniziale, con un successivo aumento durante i giorni di allenamento. Proteine totali, albumina e sTfR hanno mostrato una diminuzione costante. In conclusione, lo studio mostra un'influenza dell'esercizio fisico pensante su tutti i parametri ematici, che dovrebbe essere presa in considerazione nell'analizzare i dati dell'ABP.

ALTO RISCHIO DI BIAS

Un altro studio (**Lobigs 2017**) applica il nuovo marcatore PV al modulo ematologico dell'ABP ipotizzando che la rimozione della componente di varianza associata alle fluttuazioni del PV possa aumentare la sensibilità dell'ABP. Lo studio utilizza campioni prelevati da 33 atleti di endurance maschi di età compresa tra 25 e 53 anni monitorati periodicamente per 6 mesi, calcolando la frequenza di risultati atipici con e senza la correzione per PV. I risultati non hanno mostrato alcuna differenza di frequenza di valori di allerta falsi positivi tra analisi con e senza correzione per PV. I risultati raccolti immediatamente dopo l'esercizio fisico hanno mostrato una maggiore frequenza di valori anomali falsi positivi di Hb, significativamente ridotti dopo applicazione di correzione per PV. Un pattern simile è stato osservato per i valori di OFF-score. L'analisi della varianza dei dati di Hb ha mostrato che l'applicazione della correzione PV era in grado di rimuovere il 66% della variabilità intra-individuale, differenziando, quindi, tra le variazioni reali in HbM e quelle dovute a variazioni del PV. In conclusione, l'introduzione della correzione per PV potrebbe migliorare la capacità dell'ABP di identificare manipolazioni ematologiche migliorandone la sensibilità. **BASSO RISCHIO DI BIAS**

Potenziali limiti dovuti alle procedure preanalitiche

Due studi analizzano il potenziale impatto di tempo e temperatura di conservazione dei campioni sui risultati delle analisi del modulo ematologico dell'ABP.

Un primo studio prospettico (**Robinson 2011**) indaga l'effetto del tempo di conservazione sulle variabili comunemente misurate nel modulo ematologico del passaporto biologico dell'atleta e le possibili variazioni nelle misurazioni effettuate con lo stesso analizzatore e tra analisi effettuate con diversi analizzatori ematologici. Lo studio ha utilizzato 27 campioni EDTA prelevati da ciclisti maschi professionisti prima di una gara per analizzare la stabilità di Hgb, Ret% e OFF-score in 72 ore periodo di conservazione a 4°C, e altri 102 campioni ematici prelevati da ciclisti maschi per analizzare la stabilità intra e inter strumento dei parametri Hgb, Ret% e OFF-score. I campioni sono stati prelevati e analizzati secondo le linee guida operative WADA. Non è stato osservato un impatto significativo del tempo di conservazione su alcuna delle variabili in studio, che sono rimaste stabili per tutto il periodo di 72 ore dello studio. Non sono state osservate differenze in nessuna delle variabili misurate sullo stesso strumento (Sysmex XT-2000i), né su diversi strumenti dello stesso modello. In conclusione, lo studio mostra che i valori dei marcatori restano stabili per 72 ore in campioni prelevati e analizzati secondo le procedure WADA, dimostrando, quindi, che le procedure analitiche sono precise e accurate in quanto altamente standardizzate. **BASSO RISCHIO DI BIAS**

Il secondo articolo (**Ashenden 2013**) mira a caratterizzare la stabilità dei campioni di sangue intero e valutare l'impatto della durata dei tempi e delle temperature di conservazione sui parametri ematologici. I risultati dello studio hanno dimostrato che l'emoglobina contenuta nei campioni di sangue di 16 adulti volontari risultava stabile fino a 168 ore dopo il prelievo indipendentemente dalla temperatura di conservazione (4, 6 o 12°C). Le due variabili volume-dipendenti MCV (mean cell volume) ed ematocrito hanno mostrato un aumento graduale, dipendente sia dal tempo che dalla temperatura di conservazione dei campioni di sangue intero. In particolare, le variazioni dei valori di MCV sono risultate prevedibili sulla base di opportuni algoritmi. La percentuale dei reticolociti, infine, si è dimostrata stabile per 96 ore alle temperature più basse utilizzate nello studio (4, 6°C). Lo studio ha inoltre dimostrato che gli apparati di conservazione del sangue (NanoCool) erano in grado di mantenere le temperature desiderate per almeno 120 ore. La stabilità delle variabili ematiche utilizzate per le valutazioni antidoping è risultata quindi, ampiamente superiore al periodo massimo di ritardo consentito dalla WADA (36 ore) tra la raccolta e l'analisi dei campioni. **ALTO RISCHIO DI BIAS**

L'articolo di **Lippi del 2006** analizza la possibile variabilità introdotta dalla durata di mantenimento del laccio emostatico sui valori di Hb, Hct e conta dei reticolociti. Lo studio utilizza campioni prelevati da 27 ciclisti professionisti maschi. Sono stati prelevati due campioni ai fini dello studio, il primo immediatamente dopo posizionamento del laccio emostatico e il secondo come ultimo campione dopo il prelievo di altri 8 campioni di sangue intermedi finalizzati ad un ulteriore set

di analisi. Il tempo medio di permanenza del laccio emostatico è risultato di 2.30 ± 0.12 minuti. Sono state osservate differenze significative nei valori di Hb e Hct, ma non nei valori di Ret%, tra il primo e l'ultimo prelievo, con un aumento di +2.4% (da -0.5 a +5.4%) dei valori di Hb, di +1.4% per l'emoglobina (da -0.8 a +3.5%) e una diminuzione di -1.9% (da -17.7 a +13.9%) della conta dei reticolociti. Non è chiaro se tali variazioni siano dovute esclusivamente alla permanenza del laccio emostatico o possano essere influenzate anche dal numero di prelievi effettuati tra il primo e l'ultimo prelievo utilizzati ai fini del confronto. **ALTO RISCHIO DI BIAS**

Un articolo del 2010 (**Ahlgrim 2010**) valuta il possibile effetto della postura sui valori di Hb e Hct. Lo studio utilizza campioni prelevati secondo le procedure standard antidoping in un gruppo di 9 atleti professionisti di discipline di resistenza (ATH) (6 maschi e 3 femmine, età media 31 ± 8 anni, altezza media 177 ± 10 cm, peso medio 66 ± 10 kg) e in un gruppo di 9 controlli sani (6 maschi e 3 femmine, età media 32 ± 11 anni, altezza media 176 ± 10 cm, peso medio 73 ± 16 kg). I campioni ematici sono stati prelevati a 5, 10, 15, 20 e 30 minuti dal momento in cui i soggetti sono fatti sedere. Sono state osservate variazioni significative nei valori di Hb e Hct nei primi 10 minuti di mantenimento della posizione seduta, ma non sono stati osservati ulteriori variazioni tra i 10 e i 30 minuti. Le variazioni medie tra 0 e la media del periodo tra 10 e 30 minuti sono risultate di -2.4% (-0.35 g/dl) per Hb e -2.7% (-1.2%) per Hct. Le variabili gruppo e sesso non sono risultate avere un effetto significativo sulle variazioni dovute alla postura. In conclusione, lo studio mostra che Hb e Hct diminuiscono significativamente a seguito di variazione della postura, indipendentemente dal livello di allenamento e dal genere. Un periodo medio di 10 minuti di mantenimento della postura seduta è sufficiente a riequilibrare il volume vascolare e adattarlo alla nuova postura. **ALTO RISCHIO DI BIAS**

Lo studio di **Ashenden 2014** ha analizzato la stabilità dei campioni di sangue esposti a vibrazioni fisiche e fluttuazioni della pressione atmosferica durante il trasporto aereo. Le analisi sono state condotte su campioni prelevati da 21 volontari adulti sani. I campioni di sangue sottoposti a periodi di volo di 2, 10 e 28 ore sono stati confrontati con i campioni di controllo conservati in laboratorio a temperatura controllata tramite NanoCool o frigorifero. I valori di Hb non sono risultati modificati dal trasporto aereo, mentre i valori di MCV (mean cell volume) e Hct hanno mostrato un aumento significativo rispetto ai campioni conservati in laboratorio. Il trasporto aereo è risultato avere un effetto significativo anche sui valori di Ret%. Una successiva riproduzione in laboratorio delle condizioni di volo ha confermato la stabilità dei valori di Hb per 24 ore e l'aumento dei valori di MCV e Hct, mentre i valori di Ret% non hanno mostrato variazioni significative. Gli autori ammettono che un moderato grado di imprecisione analitica della conta dei reticolociti potrebbe aver causato alcuni risultati inconsistenti rispetto a tutte le fasi dello studio. **BASSO RISCHIO DI BIAS**

Uno studio del 2016 (**Robinson, 2016**) analizza i possibili effetti del trasporto su strada e del tempo dal prelievo (24, 36, 48 e 72 ore) sui valori di Hb, Ret% e OFF-score. Lo studio analizza anche alcune variabili di segnalazione (flags e scattergrams) determinate in automatico dagli analizzatori Sysmex XT-2000i per verificarne l'utilità nell'identificare un possibile processo di deterioramento del campione. Lo studio utilizza campioni raccolti da 22 volontari sani maschi di età compresa tra 23 e 31 anni. I campioni sono stati divisi in 2 gruppi, il primo conservato in frigoriferi standard e il secondo conservato in modo da simulare il trasporto (Nanocool). I risultati ottenuti confermano, in accordo con studi precedenti, che le variabili utilizzate nel modulo ematico del passaporto biologico dell'atleta non subiscono variazioni significative nell'intervallo di tempo considerato (72 ore) e non risentono degli effetti del trasporto. L'analisi delle informazioni riportate dagli strumenti Sysmex XT-2000i ha mostrato qualche segno di deterioramento, ma nessuno di rilevanza per le variabili utilizzate nell'ABP. In conclusione, lo studio mostra che il trasporto in condizioni controllate di refrigerazione non altera i parametri di Hb, Hct e OFF-score per 72 ore, e che, per quanto qualche campione possa subire un inizio di processo di deterioramento, tale processo non ha alcuna influenza sui parametri considerati, in quanto i processi sembrano essere soggettivi e principalmente a carico della popolazione dei globuli bianchi. **BASSO RISCHIO DI BIAS**

Confondenti e mascheranti

Uno studio del 2003 (**Parisotto 2003**) ha effettuato una survey di 1152 atleti elite internazionali con l'obiettivo di valutare la prevalenza di eventuali disturbi ematologici in tale popolazione e valutare l'impatto di tali disturbi sui valori di riferimento dei modelli utilizzati per l'identificazione di uso di rHbEPO. Lo studio ha incluso 739 atleti maschi e 413 atlete donne provenienti da 12 paesi, reclutati per stabilire i range di riferimento di popolazione dei parametri ematologici utilizzati a fini antidoping. Tra questi, un totale di 34 atleti (3 ginnastica, 1 atletica leggera, 14 sport da combattimento, 1 potenza, 2 potenza/resistenza, 12 sport di squadra, 1 sconosciuto) hanno riportato valori ematologici anomali. La variabilità del modello ON-he attribuibile a Hb è risultata simile tra maschi e femmine, sia che fossero atleti elite con o senza disturbi ematologici, sia che fossero soggetti trattati con rHuEPO durante un trial. La restante variabilità è

risultata attribuibile a EPO. La variabilità nello score ON-hes attribuibile a Hb è risultata simile a quella del modello ON-he e comparabile tra atleti elite sani, atleti elite con anomalie ematologiche e atleti amatoriali trattati con rHuEPO. L'influenza di Hb sui punteggi OFF-model è risultata notevolmente inferiore per i soggetti che avevano appena sospeso l'uso di rHuEPO. In conclusione, lo studio mostra che tali anomalie ematologiche tendono a ridurre, piuttosto che aumentare, i punteggi degli score utilizzati a fini antidoping, in quanto associati ad una diminuzione dell'Hb. **BASSO RISCHIO DI BIAS**

Un recente studio (**Alsaadi 2015**) analizza il possibile effetto del Ramadan sui parametri ematologici e steroidei dell'ABP. Nel corso dello studio sono stati arruolati 9 soggetti maschi che svolgevano regolare attività sportiva a cui sono stati effettuati prelievi durante la mattina e nel pomeriggio in due giorni delle due settimane che precedono l'inizio del Ramadan e in tre giorni del mese successivo. I risultati ottenuti dallo studio hanno mostrato una variazione significativa della concentrazione di emoglobina (-0.38 g/dL) nei prelievi mattutini e pomeridiani durante il Ramadan rispetto al periodo precedente. Le analisi condotte con il software dell'ABP della WADA, però, non hanno mostrato alcun valore anomalo. Lo stesso risultato è stato ottenuto per il parametro %Ret. Per quanto riguarda la variazione individuale del rapporto testosterone/epitestosterone (T/E) nell'urina dei soggetti analizzati, nessuno ha mostrato un valore superiore alla soglia WADA di 4 ed i risultati dell'analisi con il software ABP non hanno evidenziato alcuna variazione anomala. È stata osservata una tendenza significativa ($p=0.051$) alla variazione del peso specifico (SG) dell'urina nei campioni pomeridiani prelevati durante il Ramadan rispetto a quelli di riferimento pre-Ramadam. Tale tendenza potrebbe essere spiegata dalla disidratazione indotta dal digiuno, che produrrebbe una concentrazione delle urine. In conclusione, entrambi i moduli ematologico e steroideo dell'ABP non risultano essere influenzati dalle variazioni della dieta dovute dal periodo del Ramadan. **ALTO RISCHIO DI BIAS**

Uno studio del 2015 (**Bonne 2015**) ha valutato l'impatto dell'allenamento in alta quota sulla variabilità dei parametri ematologici e sull'applicazione del passaporto biologico. Le analisi sono state effettuate su campioni prelevati da 20 atleti allocati ad allenamento ad alta quota per 4 settimane (gruppo LHTH) o ad allenamento a livello del mare per 3 settimane (gruppo di controllo). I campioni di sangue sono stati prelevati in entrambi i gruppi a partire da 3 settimane prima del periodo di allenamento e fino a 4 settimane dopo la sua conclusione. I risultati delle analisi ematologiche sono inseriti nel modello statistico dell'ABP generando i valori soglia per [Hb], OFF-hr score, %ret e ABPS (abnormal blood profile score). I valori di ematocrito e Ret% hanno mostrato la maggiore variazione a seguito dell'allenamento a diverse quote, mostrando rispettivamente un aumento e una diminuzione significativi nel gruppo LHTH. Per quanto riguarda il passaporto biologico, in totale 5 campioni da 4 atleti hanno mostrato valori al di fuori della soglia di riferimento al 99%. In particolare l'OFF score ha mostrato un aumento di 17 ± 12 unità ($P<0,05$) nel gruppo LHTH durante l'allenamento e fino alla settimana successiva, generando valori anomali per il passaporto biologico in due atleti durante la prima settimana successiva al termine dell'allenamento. Uno dei due atleti ha riportato anche un valore anomalo di Ret% alla stessa data. Un terzo atleta ha riportato un risultato anomalo di OFF score a 4 settimane dal termine dell'allenamento. Infine, durante la seconda settimana del periodo post-allenamento un atleta ha riportato valori anomali per il parametro ABPS. Nessun atleta del gruppo di controllo ha riportato valori anomali durante tutta la durata dello studio. Gli autori concludono che l'allenamento ad alta quota, fino a 4 settimane dal suo termine, dovrebbe essere considerato un fattore di confondimento per l'interpretazione del passaporto biologico, sebbene non produca sempre valori anomali all'interno dell'ABP. **BASSO RISCHIO DI BIAS**

Uno studio del 2015 (**Schumacher del 2015**) analizza l'influenza dell'allenamento intenso e del passaggio da una bassa ad un'alta quota sul profilo ematologico endogeno integrato nel modello ADAPTIVE dell'ABP. Lo studio ha utilizzato i dati di 14 atleti nati a bassa altitudine (età media 24.6 ± 3.3 anni, altezza media 179 ± 4 cm, peso medio 69.7 ± 5.0 kg) e di 11 atleti cinesi maschi residenti ad alta quota (età media 25.5 ± 0.7 anni, altezza media 179 ± 4 cm, peso medio 70.1 ± 3.5 kg), tutti partecipanti alle 13 tappe del Tour di Qinghai Lake, a 2002 km di altitudine. I dati sono stati analizzati con il software dell'ABP per identificare eventuali anomalie. Un totale di 4 risultati da 3 campioni di 2 atleti nati a bassa altitudine hanno mostrato valori anomali alle soglie del 99% e 99.9% di specificità durante l'allenamento ad alta quota. Nel gruppo di atleti residenti ad alta quota, 3 risultati da 3 campioni di 3 diversi atleti hanno mostrato valori anomali alle soglie del 99% e 99.9% di specificità. La maggior parte degli atleti nati a bassa quota ha mostrato un aumento dei valori di Ret% a partire dal primo campione prelevato ad alta quota. Quasi tutti gli atleti hanno mostrato una diminuzione dei valori di Ret% nell'ultimo prelievo effettuato a fine gara, al ritorno a bassa quota. In conclusione, lo studio mostra che l'esposizione alle alte quote e l'allenamento intensivo non producono in modo sistematico risultati anomali rispetto ad i limiti di riferimento del passaporto biologico e che le anomalie rispetto ai parametri sono in linea con i cambiamenti fisiologici attesi. Per quanto, però, sia improbabile che tali variabili producano risultati di allerta falsi positivi, dovrebbero comunque essere presi in considerazione in presenza di eventuali allerte per discriminare tra possibile manipolazione ematologica e adattamento fisiologico. **BASSO RISCHIO DI BIAS**

Un recente studio (**Garvican–Lewis 2017**) valuta l'effetto della supplementazione di ferro per via endovenosa in concomitanza con un allenamento ad alta quota sui parametri del modulo ematologico dell'ABP. Lo studio ha utilizzato dati provenienti da un totale di 34 atleti di endurance (15 femmine, 19 maschi, di cui 20 corridori, 11 ciclisti e 3 triatleti), con un'età media di 28.9 ± 8.0 anni, un'altezza media di 174.6 ± 9.4 cm e un peso medio di 65.4 ± 9.3 kg, coinvolti in un allenamento di 3 settimane in condizioni simulate di altitudine (3000 m). Tutti gli atleti partecipanti sono stati assegnati a 3 gruppi di trattamento con supplementazione di ferro per via orale, per via endovenosa o con placebo a partire dalle 2 settimane precedenti e per tutta la durata dell'esposizione ad altitudine. Per ciascun atleta è stato calcolato il profilo individuale di Hb, Ret% e OFF-score tramite il software dell'ABP. Un totale di 11 atleti ha mostrato valori anomali a diversi tempi di allenamento e per diversi parametri. La percentuale di atleti che ha mostrato valori anomali all'ABP è risultata simile tra gruppi, ma il gruppo trattato con supplementazione per via endovenosa ha mostrato il maggior numero di valori individuali anomali. La frequenza di valori anomali individuali per Hb, OFF-score e Ret% è risultata simile ai due livelli di specificità di 99% e 99.9%. La maggior parte dei risultati anomali per Hb e OFF-score sono stati ottenuti durante esposizione ad altitudine, mentre la maggior parte delle segnalazioni per Ret% sono state ottenute al termine dell'esposizione ad alte quote. In conclusione, sebbene le anomalie osservate in risposta alla supplementazione con ferro e l'esposizione ad altitudine non siano sistematiche e non sembrano rappresentare una debolezza strutturale dell'ABP, tali variabili dovrebbero comunque essere prese in considerazione nella valutazione dei risultati dell'ABP. **BASSO RISCHIO DI BIAS**

Un recente studio (**Bejder 2016**) ha indagato l'effetto di una strategia di iperidratazione (Void-Drink-Wait) sui parametri ematologici dell'ABP, ipotizzando che l'assunzione di un bolo d'acqua (1000 mL) fosse in grado di espandere il volume plasmatico diminuendo, di conseguenza, la sensibilità dell'ABP nell'individuare il trattamento con EPO. Lo studio ha arruolato 20 sportivi amatoriali con un'età media di 25.7 ± 5.2 anni, un'altezza media di 180 ± 5 cm e un peso medio di 79.2 ± 6.5 kg. Tutti i soggetti arruolati sono stati trattati con 30 UI/kg BW di epoletina beta per via sottocutanea per un periodo di boosting (3 volte a settimana per 18 giorni) seguito da 10 giorni di washout. Ai giorni 28 e 31 i soggetti sono stati chiamati in laboratorio e, dopo somministrazione di una microdose di epoletina alfa (900 IU) sono stati divisi in 1 gruppo (G1) cui è stato somministrato un bolo d'acqua (1000 mL) e un secondo gruppo (G2) cui è stata somministrata una quantità normale di acqua (270 mL + 70 mL ogni 30 min). L'analisi dei dati è stata effettuata utilizzando il modello ADAPTIVE dell'ABP. I soggetti in G1 hanno mostrato valori inferiori di OFF-hr e [Hb] a 40, 60 e 80 minuti dall'ingestione di bolo acqua rispetto ai soggetti nel G2. La sensibilità di [Hb] e OFF-score complessivamente è risultata inferiore a 40, 60 e 80 minuti da trattamento con bolo d'acqua, mentre l'aggiunta del parametro ABPS ha aumentato significativamente la sensibilità a baseline e a 40 min dalla somministrazione di bolo d'acqua e a baseline, 20 e 60 minuti dopo normale idratazione. L'ABP ha, quindi, mostrato una sensibilità inferiore nei 40-80 minuti successivi a ingestione di bolo d'acqua, ma l'aggiunta del parametro ABPS ha limitato tale diminuzione di sensibilità. **BASSO RISCHIO DI BIAS**

Uno studio del 2012 (**Schumacher 2012**) indaga il possibile impatto del trasferimento degli atleti con voli a lungo raggio sui marcatori biologici utilizzati per la determinazione del passaporto biologico. Le analisi sono state condotte su campioni prelevati da 15 atleti di endurance (età media 28.1 ± 4.4 anni, altezza media 180.4 ± 6.4 cm, peso medio 72.4 ± 5.7 kg) e da 11 controlli non allenati (età media 25.2 ± 2.9 anni, altezza media 181.3 ± 8.0 cm, peso medio 74.0 ± 7.0 kg) prima, durante e dopo un viaggio di trasferta di 14 ore e 30 minuti. I campioni sono stati analizzati secondo le linee guida operative WADA. I risultati delle analisi hanno mostrato una diminuzione significativa dei livelli di Hb e Hct negli atleti immediatamente dopo il viaggio rispetto a prima della partenza. Lo stesso pattern è stato osservato 3 giorni dopo il viaggio. Una tendenza simile, ma non significativa, è stata osservata nel gruppo di controllo. Nessuno degli atleti ha mostrato aumenti significativi di Hb e Hct durante il periodo del viaggio, eccetto due soggetti che hanno mostrato valori maggiori la sera rispetto al mattino. Non sono state osservate differenze significative nei valori di Hb prelevata al mattino nei due gruppi. I valori di Ret% e degli indici di globuli rossi sono rimasti stabili, senza differenze significative tra gruppi. Non è stata osservata alcuna correlazione tra i marcatori ematici e gli indici di bilanciamento dei fluidi. In conclusione, i dati sembrano mostrare che l'esposizione a viaggi di lunga durata non influenza significativamente i parametri di Hb, Hct e Ret% al di là delle fisiologiche variazioni circadiane. **BASSO RISCHIO DI BIAS**

Uno studio del 2011 (**Schumacher 2011**) analizza il possibile impatto di disturbi gastroenterici acuti sui valori di Hb all'interno dell'ABP. Lo studio utilizza i dati di 5 atleti, 2 calciatori e 3 ciclisti con un'età media di 22.3 ± 3.4 anni, un peso medio di 76.3 ± 10.4 kg e un'altezza media di 182 ± 8.9 cm, affetti in passato ad un ambulatorio per sintomi gravi di gastroenterite caratterizzata da più di 3 episodi di vomito e diarrea nelle 12 ore precedenti alla visita. I dati sono stati analizzati utilizzando il software dell'ABP, tramite il quale sono stati costruiti i profili individuali di ciascun atleta. Nessuno degli atleti osservati ha riportato valori anomali durante l'episodio di gastroenterite, mentre 3 dei 5 atleti hanno riportato valori inferiori rispetto alla media dei dati precedenti. È stato, inoltre, osservato un marcato aumento del marcatore di infiammazione CRP e della frazione di granulociti e una diminuzione della frazione di linfociti in tutti gli atleti al momento dell'ammissione in ambulatorio. Nessuno degli atleti, nonostante la gravità dei sintomi e la perdita di

fluidi, ha mostrato una riduzione del volume plasmatico durante la malattia, mantenendo valori di Hct immutati. In conclusione, lo studio sembra dimostrare che episodi di gastroenterite anche in forma grave non sono in grado di modificare significativamente i parametri dell'ABP al punto di generare risultati anomali sospetti di manipolazione ematica. **ALTO RISCHIO DI BIAS**

Nuovi marcatori e/o matrici

Uno studio del 2012 (**Walpurgis del 2012**) analizza l'effetto della somministrazione di G-CSF a fini di doping o come agente mascherante sui parametri ematologici dell'ABP. Le analisi sono state effettuate su campioni prelevati da 20 donatori abituali di cellule staminali ematiche (14 maschi e 6 femmine di età compresa tra 21 e 57 anni) cui sono state somministrate iniezioni subcutanee di G-CSF. Sono stati prelevati un totale di 40 campioni di plasma prima e dopo la somministrazione ripetuta di G-CSF. In tutti i soggetti è stato osservato un aumento significativo dei globuli bianchi e dei livelli di Ret% circolanti dopo somministrazione di G-CSF. È stata inoltre osservata una diminuzione significativa dei livelli di globuli rossi, Hct e Hb a seguito del trattamento. In generale, l'effetto più importante osservato è risultato essere la massiccia diminuzione nel numero di leucociti circolanti. In conclusione, lo studio mostra che il G-CSF ha un effetto obliterante sul profilo ematologico, pertanto dovrebbe essere presa in considerazione l'ipotesi di effettuare analisi specifiche per questa sostanza nell'ambito delle valutazioni antidoping tramite ABP ed effettuare ulteriori studi sugli effetti biologici del G-CSF. **ALTO RISCHIO DI BIAS**

Due recenti studi (**Leuenberger nel 2016 A e B**) valutano la possibilità di utilizzare l'epcidina come marcatore di autotrasfusione.

Il primo studio (**Leuenberger 2016 A**) analizza i campioni prelevati da 15 volontari sani con un'età media di 25.5 ± 4.2 anni e un BMI medio di 23.9 ± 2.7 kg sottoposti un'iniziale infusione di salina, 14 giorni dopo a prelievo di una sacca di sangue conservata alternativamente in sacche contenenti DEHP e non contenenti DEHP, e successivamente ad autotrasfusione con la sacca donata. È stata osservata una diminuzione dei valori di Hb e OFF-score, ma non di Ret% e EPO, dopo infusione di salina. Dopo trasfusione di sangue tutte le variabili ematologiche hanno mostrato valori alterati a tempi diversi. È stato osservato un aumento significativo dei valori di epcidina 12 ore e fino a 1 giorno dopo trasfusione, con aumenti fino a 7 volte superiori a baseline. In conclusione, lo studio mostra che le variazioni nei parametri ematologici dopo autotrasfusione restano molto piccole nonostante le condizioni sperimentali, a differenza dei valori di epcidina che mostrano variazioni molto più marcate, suggerendo che l'inclusione di tale marcatore nelle strategie antidoping potrebbe essere utile per aumentarne la sensibilità. **ALTO RISCHIO DI BIAS**

Il secondo studio (**Leuenberger 2016 B**) analizza l'effetto della somministrazione di rhEPO sui livelli di epcidina e sui valori dei parametri ematologici dell'ABP. Lo studio utilizza i campioni prelevati da 6 volontari sani maschi con un'età media di 27.0 ± 4.1 anni e un BMI medio di 23.9 ± 2.66 kg trattati con una singola dose di rhEPO per via endovenosa somministrata i giorni 1, 3 e 5 dello studio. Le analisi hanno mostrato una correlazione positiva significativa tra livelli di epcidina e livelli di Hb, sideremia e ferritina e una correlazione negativa significativa tra livelli di ERFE e livelli di epcidina. La somministrazione di rhEPO ha prodotto una diminuzione dei livelli di ferritina al giorno 7 rispetto a baseline, mentre i livelli di epcidina hanno mostrato una maggiore riduzione a seguito della terza iniezione. A seguito della terza dose, è stato osservato anche un aumento dei livelli di Ret%. Il trattamento con rhEPO ha prodotto anche una diminuzione dei valori dell'OFF-score, principalmente dovuta alla variazione dei livelli di Ret%, mentre i livelli di Hb sono rimasti invariati. In conclusione, i dati mostrano che l'rhEPO modifica sensibilmente i livelli di epcidina, che può, quindi, essere utile come potenziale marcatore indiretto per l'identificazione di abuso di rhEPO. **ALTO RISCHIO DI BIAS**

Uno studio del 2013 (**Leuenberger 2013**) valuta il possibile utilizzo di miRNA circolanti come potenziali marcatori indiretti di autotrasfusione. Lo studio ha analizzato campioni prelevati da 10 volontari maschi sani con età media 25 ± 2 anni, peso medio 72 ± 6.2 kg e altezza media 179 ± 5 cm sottoposti a prelievo di sangue e reinfusione dello stesso 42 giorni dopo, e da 10 controlli sani maschi con età media 25 ± 2 anni, altezza media 180 ± 5 cm e peso medio 71.3 ± 6.6 kg. I risultati hanno mostrato un aumento dei miR-30b, miR-30c e miR-26b rispettivamente di 3.9, 4, e 3 volte. La trasfusione ha determinato anche un aumento dei livelli di Hct e Hb e un aumento significativo a lungo termine dei livelli di EPO fino a 10 giorni dopo la trasfusione. È stato osservato anche un aumento dei livelli di ferritina, mentre non sono state osservate differenze nei livelli di Ret%. In conclusione, i risultati hanno mostrato una variazione del pattern dei miRNA circolanti in risposta all'autotrasfusione, con una finestra di rilevanza fino a 3 giorni dopo l'infusione. Lo studio, inoltre, suggerisce che la combinazione delle variazioni a lungo termine dei livelli di EPO in reazione alla trasfusione con i marcatori miRNA potrebbe aumentare l'efficienza del modello nell'identificazione di autotrasfusioni. **BASSO RISCHIO DI BIAS**

Uno studio del 2013 (**Manokhina del 2013**) esamina la fattibilità di un metodo alternativo per identificare l'uso di trasfusione omologa tramite genotipizzazione ad alta risoluzione per identificare tracce del DNA del "donor" nel sangue

dei “doper”. Gli esami sono stati effettuati sui campioni di 39 volontari le cui aliquote di sangue donato sono state combinate subito dopo il prelievo. Non è stato effettuato un reale doping ematico, ma al momento di mescolare i campioni, i soggetti sono stati definiti come “doper” se avevano contribuito in modo predominante al campione, e “donor” se avevano contribuito in modo inferiore. Dalle aliquote di sangue combinate è stato analizzato il genotipo mediante PCR. I risultati hanno mostrato che il saggio è in grado di rilevare una seconda popolazione di cellule anche in caso di sangue impoverito del 99% di leucociti. In conclusione, lo studio mostra che un test basato sul DNA potrebbe essere un metodo rapido e relativamente economico per identificare l’uso di trasfusioni omologhe. **ALTO RISCHIO DI BIAS**

Due studi valutano la possibilità di utilizzare i metaboliti del DEHP analizzati in campioni di urine come possibili marcatori di autotrasfusione (Monfort 2010, Monfort 2012)

Il primo studio (**Monfort nel 2010**) confronta le concentrazioni urinarie di metaboliti del DEHP (MEHP, MEHHP, MEOHP) nella popolazione generale, in pazienti in rianimazione o sottoposti a trasfusione e in una popolazione di atleti. Le analisi sono state effettuate su campioni prelevati da 30 soggetti sani (50% maschi, età media 23.7±2.3 anni), 25 soggetti ricoverati sottoposti a trasfusioni per ragioni mediche (36% femmine 64% maschi, età media 57.4±18.1), 39 soggetti ricoverati non sottoposti a trasfusione ma esposti a strumenti medici in plastica (18.9% maschi 82.1% femmine, età media 32.4±8.5) e un gruppo di 127 atleti testati per analisi antidoping di routine. La concentrazione dei metaboliti del DEHP nei soggetti trasfusi è risultata significativamente maggiore rispetto ai non trasfusi, con una differenza significativa fino a 48 ore dopo la trasfusione. Nel gruppo degli atleti, le concentrazioni di metaboliti del DEHP sono risultate maggiori rispetto ai controlli i 4 campioni prelevati da 1 atleta di sport acquatici, 1 ciclista e 2 calciatori, con livelli simili a quelli riscontrati nei pazienti trasfusi. In conclusione, lo studio suggerisce una possibile utilità dei metaboliti del DEHP come marcatori di trasfusione negli atleti. **BASSO RISCHIO DI BIAS**

Il secondo studio (**Monfort 2012**) analizza la concentrazione di metaboliti del DEHP in campioni di urine prelevati da 10 soggetti moderatamente allenati (7 maschi 5 femmine, età media M 24.7±2.4, F 27.6±12.0 anni, peso medio M 77.4±19.7, F 68.5±6.6 kg, altezza media M 174.6±6.2, F 170.8±5.4 cm) sottoposti ad autotrasfusione 14 giorni dopo donazione e conservazione del sangue, e 13 soggetti moderatamente allenati (8 maschi e 5 femmine, età media M 24.8±3.2, F 25.0±1.9 anni; peso medio M 77.7±9.9, F 63.4±8.1 kg; altezza media M 179.5±6.9 e F 166.6±4.5 cm) sottoposti ad autotrasfusione 28 giorni dopo donazione e conservazione del sangue. I risultati hanno mostrato una alta concentrazione dei metaboliti in tutti i volontari il giorno della trasfusione, con una diminuzione delle concentrazioni durante il giorno successivo. In conclusione, lo studio conferma che la concentrazione dei metaboliti del DEHP nelle urine può essere utilizzata come marcatore per identificare la maggior parte delle trasfusioni e autotrasfusioni ematiche e suggerisce l’inclusione di tali marcatori nello screening antidoping. **BASSO RISCHIO DI BIAS**

Un recente RCT (**Wang 2017**) analizza la capacità di 45 marcatori trascrizionali precedentemente identificati di identificare la somministrazione di microdosi di rHuEPO e la possibile influenza sui geni considerati di confondenti quali esposizione a moderata altitudine e ad esercizio fisico strenuo. Lo studio ha analizzato dati provenienti dalle popolazioni incluse in 2 diversi studi, un primo trial sull’uso di microdosi (MDS) e un secondo trial sull’esposizione ad allenamento ad alta quota (ATS). Per analizzare la capacità dei marcatori in studio di individuare l’uso di microdosi di rHuEPO sono stati usati i campioni prelevati dai 14 atleti maschi di endurance (età media 29.9±4 anni, altezza media 178.8±4.5 cm) arruolati nello studio MDS e randomizzati a iniezioni sottocutanee di rHuEPO o placebo per 7 settimane. Per valutare l’effetto di esercizio e altitudine sulla performance dei marcatori in studio sono stati invece utilizzati i dati dei 21 atleti elite di endurance arruolati nello studio ATS e allocati ad allenamento in alta quota (n=12) o allenamento standard a bassa quota (n=9). L’analisi quantitativa dei trascritti di 45 geni ha mostrato una differente espressione di 9 geni sia durante che dopo l’esposizione alle microdosi. Applicando il modello ADAPTIVE sono stati osservati due geni con la più alta sensibilità (≥93%) e specificità (≥93%), *BCL2L1* e *CSDA*. *BCL2L1* è risultato differenzialmente espresso sia durante che dopo la somministrazione di microdosi, mentre *CSDA* è risultato down-regolato solo dopo somministrazione di microdosi. Entrambi i geni hanno mostrato tali differenze fino a tre settimane dopo la somministrazione rHuEPO. In conclusione, i dati sembrano mostrare che l’aggiunta di biomarcatori trascrizionali all’ABP è in grado di prolungare la finestra di rilevanza e migliorare la sensibilità e specificità dell’ABP nel rilevamento del doping ematologico. **BASSO RISCHIO DI BIAS**

In un recente studio (**Cox 2017**) viene proposto l’utilizzo dei DBS per rilevare le trasfusioni autologhe. A tal proposito, gli autori propongono di utilizzare dei nuovi marcatori: due specifiche proteine di membrana, la CD71 e la Band3 estratte a partire dai DBS (in qualità di matrice biologica), per misurare rispettivamente il numero di reticolociti immaturi (IRC) e di eritrociti (RBC). In particolare, gli autori si soffermano sull’utilità di utilizzare gli IRC per determinare le trasfusioni autologhe: essi infatti, pur rappresentando il 3-14% dei reticolociti circolanti nel torrente ematico, sembrano migliorare la sensibilità dell’ABP nel rilevare le trasfusioni autologhe rispetto alla %RET (percentuale di reticolociti). La proteina CD71 viene espressa solamente negli IRC, mentre la Band3 solo nei reticolociti maturi e negli eritrociti: la loro

quantificazione fornisce una buona correlazione con il numero di IRC e RBC circolanti. In particolare, in questo lavoro viene misurato il rapporto CD71/Band3 (ovvero il rapporto IRC/RBC). Vengono arruolati 12 maschi e 14 femmine (individui attivi ed in buona salute, di età compresa tra i 18 ed i 40 anni): all'inizio dello studio, a tutti i soggetti viene effettuato il prelievo di una unità di sangue (circa 475 ml). Dopo 21 giorni, al gruppo di volontari, suddiviso in due sottogruppi, viene rinfuso il loro sangue (15 soggetti, solo eritrociti) o una soluzione salina (11 soggetti). I DBS vengono prelevati 3 volte nell'arco delle 3-4 settimane che precedono il prelievo di sangue (BL1, BL2, BL3), subito prima del prelievo (Pre-Out) e subito dopo (Post-out), subito prima la trasfusione, tutti i giorni per una settimana dopo la trasfusione e quindi nei giorni 13, 20, 27 e 34. Cinque soggetti del gruppo dei trasfusi è stato escluso dalla successiva analisi poiché anemici (3 donne) o non rispondenti (un maschio ed una femmina la cui Hb non è aumentata di almeno il 2% dopo la trasfusione). Nel gruppo di controllo sono state escluse 2 femmine poiché anemiche. Sulla base dei criteri sperimentalmente definiti (ovvero valori dei parametri selezionati \geq 80% di quelli registrati al baseline), il rapporto CD71/Band3 è in grado di identificare 7 soggetti trasfusi su 10, mentre RET% ne identifica solo 3. L'OFF-score settato ad un valore soglia con il 99% di specificità riesce a rilevare 1 solo soggetto trasfuso. Gli autori sottolineano che quando si vanno ad interpretare i risultati, occorre tenere conto della [Hb], poiché una condizione di anemia può alterarne l'interpretazione. **ALTO RISCHIO DI BIAS**

Sintesi delle evidenze

Ad oggi tre sono gli studi sulle stime di prevalenza dei profili ematologici anomali. Il primo risale al 2003 ed è stato effettuato su atleti professionisti di sci di fondo che hanno partecipato al Campionato mondiale di Sci del 2001. I risultati degli atleti analizzati hanno mostrato che i programmi antidoping utilizzati al 2003 non erano efficaci né per rilevare pratiche ematologiche dopanti né tantomeno come deterrente (Stray-Gundersen 2003). Il secondo lavoro del 2011, invece, analizza 2737 atleti professionisti stimando una prevalenza del doping di tipo ematologico del 14% e che oscillavano dall'1% al 48% per sotto-popolazioni di campioni (Sottas 2011). L'ultimo lavoro valuta l'applicazione del Passaporto biologico per il doping negli anni 2008, 2009 e 2010 trovando un aumento del rilevamento del doping rispetto al 2007 (Zorzoli 2012).

Utilità dei parametri inclusi nel modulo ematologico

Diversi autori hanno valutato la capacità di alcuni parametri ematologici inclusi in diversi modelli statistici di identificare gli atleti che hanno fatto uso di eritropoietina. Nel 2001 viene descritto che l'uso di r-HuEpo determina delle risposte ematologiche riproducibili e che i marcatori analizzati (ematocrito, ematocrito reticolocitario, percentuale di macrociti, eritropoietina sierica e recettore solubile della transferrina) sono presenti per alcune settimane dopo l'uso di eritropoietina ricombinante (Parisotto 2001). Nel 2016 viene effettuato uno studio sull'uso della % di reticolociti tra i parametri ematologici confermando che la sua introduzione migliora la sensibilità dell'ABP (Bejder 2016).

Alcuni lavori hanno messo in evidenza alcune criticità legate ai parametri ematologici inclusi nell'ABP. Nel 2011 un articolo descrive la difficoltà del software del passaporto biologico limitato ai parametri del modulo ematico di identificare l'uso di microdosi di rhEPO alle concentrazioni e nei tempi utilizzati nello studio. (Ashenden 2011). Inoltre il successo nell'individuare i soggetti dopati utilizzando il metodo di screening ematico dipendeva in modo stringente dal regime di iniezioni di rhEPO (frequenze diverse, ma in quantità sufficienti a migliorare le prestazioni) seguito dai soggetti arruolati nello studio (Bornø 2010). Nel 2017 è stato pubblicato un lavoro che mette in evidenza come l'OFF-score sia particolarmente sensibile nel corso delle settimane successive la somministrazione di un dosaggio elevato di rHuEPO, anche in un gruppo di soggetti che stava ancora ricevendo microdosi di rHuEPO (Clark 2017).

Variazioni fisiologiche

Un articolo del 2000 (Schmidt 2000) dimostra che una serie di variabili esogene ed endogene (esercizio fisico intenso, fluttuazioni nictemerali, posizione corporea) determinano variazioni significative dell'ematocrito (Hct) non legate all'uso di eritropoietina. Inoltre, due studi longitudinali del 2009 (Morkeberg 2009 (A); Morkeberg 2009 (B)) hanno valutato la variazione dei parametri ematologici durante la stagione sportiva mettendo in rilievo la necessità di correlare i risultati dei parametri ematologici con il periodo in cui sono avvenuti i campionamenti (fuori competizione, prima della competizione o durante la competizione). La variazione dei parametri ematologici durante l'esercizio fisico è stata valutata anche da due studi del 2010 su (Schumacher 2010 (A); Schumacher 2010 (B)) atleti sottoposti ad allenamento intensivo per verificare la loro variabilità intra- e inter-individuale nella percentuale di reticolociti (Ret%). Durante la stagione competitiva, Ret% diminuisce leggermente, mentre dopo esercizio intensivo a breve termine Ret% aumenta in maniera consistente. Inoltre l'esercizio fisico ha un impatto sull'aumento dell'emoglobina che però scompare due ore. È importante quindi rispettare delle tempistiche per riequilibrare i volumi vascolari.

Anche Baume e colleghi (2015) si sono occupati di studiare alcuni parametri ematici durante e fuori le competizioni su 32 squadre partecipanti al campionato mondiale FIFA del 2014. In questo caso le curve della distribuzione cumulativa

di frequenza delle concentrazioni di emoglobina e della percentuale di reticolociti non mostravano alcuna differenza nei campioni prelevati prima e durante l'evento sportivo.

Un articolo del 2014 (Lobigs 2014) si propone di rivalutare, con l'ausilio di un grande database che include valori di [Hb] da 2449 atleti nell'arco di 15 anni, le stime pubblicate di varianza intra-atleta relative all'[Hb]. I risultati mostrano che la varianza intra-soggetto non differiva significativamente tra i sessi, ma risultava dipendente dal tipo di sport praticato, con intervalli più ampi per gli sport di resistenza, di squadra e di abilità rispetto agli sport di potenza.

Le fluttuazioni del volume di plasma rappresentano la porzione più grande della variabilità biologica associata ai parametri ematologici volumetrici. Tre studi (Voss 2014, Watson 2014, Lobigs 2017) si sono occupati di questo argomento e mostrano che si può utilizzare un modello multi-parametrico usando marcatori chimici comuni per correggere le variazioni di VP. Inoltre mostrano che l'esercizio produce un aumento dell'osmolarità nel plasma. Il metodo automatico per analizzare i parametri ematologici prevede una manipolazione del campione che altera l'osmolarità del campione. Quindi, interventi che alterano l'osmolarità plasmatica producono una discrepanza nei livelli di Hct misurati usando l'analizzatore automatico.

Potenziati limiti dovuti alle procedure preanalitiche

Due studi analizzano il potenziale impatto di tempo e temperatura di conservazione dei campioni sui risultati delle analisi del modulo ematologico dell'ABP. Il primo (Robinson 2011) è stato effettuato su un gruppo di ciclisti prima e dopo la competizione. I risultati ottenuti hanno dimostrato che l'intervallo di tempi di conservazione utilizzato (24, 48 e 72 ore di conservazione, alla temperatura di 4°C) non influenzava in modo significativo nessuna delle variabili ematiche considerate (Hb, %RET e OFFscore). Il secondo (Ashenden 2013), effettuato su volontari, valuta due variabili volume-dipendenti: MCV (mean cell volume) e l'ematocrito. I risultati hanno mostrato che gli apparati di conservazione del sangue (NanoCool) utilizzati erano in grado di mantenere le temperature desiderate per almeno 120 ore e che quindi la stabilità delle variabili ematiche utilizzate per le valutazioni antidoping è ampiamente superiore al periodo massimo di ritardo consentito dalla WADA (36 ore) tra la raccolta e l'analisi dei campioni.

Un altro articolo (Lippi 2006), invece, analizza l'influenza dei tempi del prelievo sui livelli di emoglobina, ematocrito e conta dei reticolociti su campioni di ciclisti professionisti. Gli autori descrivono che se trascorre troppo tempo nell'effettuare il prelievo cambiano i valori di emoglobina, e di ematocrito (diventano più alti), mentre non cambiano i valori di conta dei reticolociti. Ahlgrim e colleghi (2010), invece, valutano l'effetto della postura prima del prelievo ematico sulle variazioni della concentrazione di emoglobina [Hb] e di ematocrito i quali mostravano cambiamenti significativi durante i primi 10 minuti di mantenimento della posizione seduta dei soggetti. Successivamente nessun altro cambiamento era riscontrabile. Lo stato di allenamento ed il genere non avevano effetti statisticamente rilevanti sui parametri analizzati.

Due articoli valutano la stabilità dei campioni di sangue durante il trasporto. Il primo studio (Ashenden 2014) analizza i campioni esposti a vibrazioni fisiche e fluttuazioni della pressione atmosferica durante il trasporto aereo. I risultati ottenuti hanno dimostrato che i valori di concentrazione di emoglobina non erano modificati dal trasporto aereo, mentre, i valori di MCV (mean cell volume), ematocrito e % di reticolociti mostravano consistenti aumenti rispetto alle condizioni di conservazione in laboratorio. L'altro studio (Robinson, 2016) effettuato sugli effetti del trasporto su strada mostra che le variabili utilizzate nel modulo ematico dell'ABP non subiscono variazioni significative nell'intervallo di tempo considerato e sono indipendenti dagli effetti del trasporto dei campioni

Raccomandazioni

Utilità dei test

(Bejder 2016)

L'inclusione dell'ABPS tra i parametri analizzati nel modulo ematologico dell'ABP è in grado di limitare la riduzione di sensibilità dell'ABP nell'identificare l'uso di rhEPO a scopo di doping dovuta a iperidratazione tramite ingestione di bolo d'acqua.

(Bejder 2015)

Evidenze preliminari suggeriscono che l'aggiunta della percentuale di reticolociti (ret%) alle analisi dei valori di Hb e OFF-hr aumenta la sensibilità, con una specificità fissata al 99%, dell'ABP nell'identificare l'uso di alte dosi di rhEPO a breve termine e di basse dosi di rhEPO a lungo termine.

(Ashenden 2011, Clark 2017)

Evidenze preliminari suggeriscono che l'ABP ha una minore sensibilità nell'identificare l'uso di microdosi di rhEPO sia somministrate da sole che come mantenimento a seguito di somministrazione di alte dosi di rhEPO.

(Bornø 2010)

Evidenze preliminari suggeriscono che l'ABP ha una ridotta sensibilità nell'identificare l'uso di rhEPO quando assunto in dosaggi sufficienti a migliorare le prestazioni, ma con minore frequenza.

Procedure preanalitiche

Conservazione dei campioni

(Robinson 2011, Ashenden 2013)

La conservazione dei campioni a temperature tra 4° e 12° non influenza significativamente i parametri del modulo ematologico dell'ABP per periodi anche superiori a 36 ore.

Postura

(Ahlgrim 2010)

L'atleta chiamato al controllo antidoping dovrebbe essere mantenuto a riposo, in posizione seduta, per almeno 10 minuti prima di effettuare il prelievo di sangue, per evitare potenziali alterazioni dei valori di emoglobina e ematocrito.

Confondenti/Mascheranti

Gastroenterite

(Schumacher 2011)

Evidenze preliminari suggeriscono che i parametri ematologici dell'ABP non subiscono alterazioni significative a seguito di episodi di gastroenterite acuta.

Alta quota

(Bonne 2015, Schumacher)

Periodi di allenamento ad alta quota possono produrre alterazioni significative di parametri quali OFF-score, emoglobina, % ret, ABPS, inclusi nel modulo ematologico dell'ABP.

Raccomandazioni di ricerca

Nuovi marcatori e/o matrici

Epcidina

(Leuenberger 2016)

L'epcidina sembra essere utile come marcatore per l'identificazione di soggetti sottoposti ad autotrasfusione o che hanno fatto uso di agenti stimolanti l'eritropoiesi (ESA), ma sono necessari ulteriori studi per verificarne l'accuratezza ed efficienza.

MiRNA

(Leuenberger 2013)

Evidenze preliminari sembrano sostenere uso di specifici MiRNA a supporto di altri marcatori per l'identificazione di trasfusioni autologhe, ma sono necessari ulteriori studi per determinare se e quali MiRNA sono in grado di aumentare l'accuratezza e l'efficienza dei sistemi di rilevamento delle autotrasfusioni.

Metaboliti del DEHP nelle urine

(Monfort 2010, Monfort 2012, Leuenberger 2016)

I metaboliti del DHEP escreti nelle urine sembrano essere utili ed efficienti nell'identificare soggetti sottoposti sia a trasfusione eterologa che autologa, indipendentemente dal tipo di sacca utilizzata per la procedura (DHEP o DHEP-free).

Bibliografia

Ahlgrim C, Pottgiesser T, Robinson N, Sottas PE, Ruecker G, Schumacher YO. Are 10 min of seating enough to guarantee stable haemoglobin and haematocrit readings for the athlete's biological passport? *Int J Lab Hematol.* 2010 Oct;32(5):506-11.

Alsaadi K, Voss SC, Kraiem S, Alwahaibi A, Alyazedi S, Dbes N, Goebel R, Mohamed-Ali V, Alsowaidi S, Seyam AM, Bashraheel AS, Alsayrafi M, Georgakopoulos C. The effect of fasting during Ramadan on parameters of the haematological and steroidal modules of the athletes biological passport – a pilot study. *Drug Testing and Analysis.* 2015;7(11-12):1017-1024.

Anielski P, Simmchen J, Wassill L, Ganghofner D, Thieme D. Epidemiological investigation of the UGT2B17 polymorphism in doping control urine samples and its correlation to T/E ratios. *Drug Test Anal.* 2011 Oct;3(10):645-51.

Ashenden M, Gough CE, Garnham A, Gore CJ, Sharpe K. Current markers of the Athlete Blood Passport do not flag microdose EPO doping. *Eur J Appl Physiol* 2011;(111):2307–2314.

Ashenden M, Clarke A, Sharpe K, d'Onofrio G, Plowman J, Gore CJ. Stability of athlete passport parameters during extended storage. *Int J Lab Hematol.* 2013 Apr;35(2):183-92.

Ashenden M, Sharpe K, Plowman J, Allbon G, Lobigs L, Baron A, Gore CJ. Stability of athlete blood passport parameters during air freight. *Int J Lab Hematol.* 2014 Oct;36(5):505-13.

Baume N, Jan N, Emery C, Mandanis B, Schweizer C, Giraud S, Leuenberger N, Marclay F, Nicoli R, Perrenoud L, Robinson N, Dvorak J, Saugy M. Antidoping programme and biological monitoring before and during the 2014 FIFA World Cup Brazil. *Br J Sports Med.* 2015 May;49(9):614-22.

Bejder J, Hoffmann MF, Ashenden M, Nordsborg NB, Karstoft K, Mørkeberg J. Acute hyperhydration reduces athlete biological passport OFF-hr score. *Scand J Med Sci Sports.* 2016 Mar;26(3):338-47.

Bejder J, Aachmann-Andersen NJ, Bonne TC, Olsen NV, Nordsborg NB. Detection of erythropoietin misuse by the Athlete Biological Passport combined with reticulocyte percentage. *Drug Test Anal.* 2016 Oct;8(10):1049-1055. doi: 10.1002/dta.1932. Epub 2015 Dec 21.

Bonne TC, Lundby C, Lundby AK, Sander M, Bejder J, Nordsborg NB. Altitude training causes haematological fluctuations with relevance for the Athlete Biological Passport. *Drug Test Anal.* 2015 Aug;7(8):655-62

Bornø A, Aachmann-Andersen NJ, Munch-Andersen T, Hulston CJ, Lundby C. Screening for recombinant human erythropoietin using [Hb], reticulocytes, the OFF(hr score), OFF(z score) and Hb(z score): status of the Blood Passport. *Eur J Appl Physiol* 2010;109(3):537-43.

Clark B, Woolford SM, Eastwood A, Sharpe K, Barnes PG, Gore CJ. Temporal changes in physiology and haematology in response to high- and micro-doses of recombinant human erythropoietin. *Drug Test Anal.* 2017 Oct;9(10):1561-1571. doi: 10.1002/dta.2176. Epub 2017 Apr 11.

Cox HD, Miller GD, Lai A, Cushman D, Eichner D. Detection of autologous blood transfusions using a novel dried blood spot method. *Drug Test Anal.* 2017. doi: 10.1002/dta.2323.

Durussel J, Haile DW, Mooses K, Daskalaki E, Beattie W, Mooses M, Mekonen W, Ongaro N, Anjila E, Patel RK, Padmanabhan N, McBride MW, McClure JD, Pitsiladis YP. Blood transcriptional signature of recombinant human erythropoietin administration and implications for antidoping strategies. *Physiol Genomics.* 2016 Mar;48(3):202-9.

Garvican-Lewis LA, Vuong VL, Govus AD, Schumacher YO, Hughes D, Lovell G, Eichner D, Gore CJ. Influence of combined iron supplementation and simulated hypoxia on the haematological module of the athlete biological passport. *Drug Test Anal.* 2017 Sep 19.

Gore CJ, Parisotto R, Ashenden MJ, Stray-Gundersen J, Sharpe K, Hopkins W, Emslie KR, Howe C, Trout GJ, Kazlauskas R, Hahn AG. Second-generation blood tests to detect erythropoietin abuse by athletes. *Haematologica.* 2003 Mar;88(3):333-44.

- Leuenberger N, Barras L, Nicoli R, Robinson N, Baume N, Lion N, Barelli S, Tissot JD, Saugy M. Heparin as a new biomarker for detecting autologous blood transfusion. *Am J Hematol*. 2016 (A) May; 91(5):467-72
- Leuenberger N, Bulla E, Salamin O, Nicoli R, Robinson N, Baume N, Saugy M. Heparin as a potential biomarker for blood doping. *Drug Test Anal*. 2016 (B)
- Leuenberger N, Schumacher YO, Pradervand S, Sander T, Saugy M, Pottgiesser T. Circulating microRNAs as biomarkers for detection of autologous blood transfusion. *PLoS One*. 2013 Jun 20;8(6):e66309.
- Leuenberger N, Barras L, Nicoli R, Robinson N, Baume N, Lion N, Barelli S, Tissot JD, Saugy M. Urinary di-(2-ethylhexyl) phthalate metabolites for detecting transfusion of autologous blood stored in plasticizer-free bags. *Transfusion*. 2016 Mar;56(3):571-8.
- Lippi G, Salvagno GL, Solero GP, Guidi GC. The influence of the tourniquet time on hematological testing for antidoping purposes. *International journal of sports medicine*. 2006 May;27(5):359-62.
- Lobigs LM, Knight EJ, Schumacher YO, Gore CJ. Within-subject haemoglobin variation in elite athletes: a longitudinal investigation of 13,887 haemoglobin concentration readings. *Drug Test Anal*. 2014;8(2):228-34.
- Lobigs LM, Sottas PE, Bourdon PC, Nikolovski Z, El-Gingo M, Varamenti E, Peeling P, Dawson B, Schumacher YO. A step towards removing plasma volume variance from the Athlete's Biological Passport: The use of biomarkers to describe vascular volumes from a simple blood test. *Drug Test Anal*. 2017 May 26. doi: 10.1002/dta.2219
- Malcovati L, Pascutto C, Cazzola M. Hematologic passport for athletes competing in endurance sports: a feasibility study. *Haematologica*. 2003 May;88(5):570-81.
- Manokhina Irina & James L Rupert A DNA-based method for detecting homologous blood doping. *Anal Bioanal Chem*. 2013;405:9693–9701
- Monfort N, Ventura R, Latorre A, Belalcázar V, López M, Segura J. Urinary di-(2-ethylhexyl)phthalate metabolites in athletes as screening measure for illicit blood doping: a comparison study with patients receiving blood transfusion. *Transfusion*. 2010 Jan;50(1):145-9
- Monfort N, Ventura R, Platen P, Hinrichs T, Brixius K, Schänzer W, Thevis M, Geyer H, Segura J. Plasticizers excreted in urine: indication of autologous blood transfusion in sports. *Transfusion*. 2012 Mar;52(3):647-57.
- Morkeberg JS, Belhage B, Damsgaard R. Changes in blood values in elite cyclist. *Int J Sports Med*. 2009 Feb;30(2):130-8. **(A)**
- Morkeberg J, Saltin B, Belhage B, Damsgaard R. Blood profiles in elite cross-country skiers: a 6-year follow-up. *Scand J Med Sci Sports*. 2009 Apr;19(2):198-205. **(B)**
- Morkeberg J, Sharpe K, Karstoft K, Ashenden MJ. Detection on microdoses of rhEPO with the MAIIA test. *Scand J Med Sci Sports*. 2014;24(4):634-41.
- Parisotto R, Wu M, Ashenden MJ, Emslie KR, Gore CJ, Howe C, Kazlauskas R, Sharpe K, Trout GJ, Xie M. Detection of recombinant human erythropoietin abuse in athletes utilizing markers of altered erythropoiesis. *Haematologica*. 2001 Feb;86(2):128-37.
- Parisotto R, Ashenden MJ, Gore CJ, Sharpe K, Hopkins W, Hahn AG. The effect of common hematologic abnormalities on the ability of blood models to detect erythropoietin abuse by athletes. *Haematologica*. 2003 Aug;88.
- Robinson N, Sottas PE, Pottgiesser T, Schumacher YO, Saugy M. Stability and robustness of blood variables in an antidoping context. *Int J Lab Hematol*. 2011 Apr;33(2):146-53.
- Robinson N, Giraud S, Schumacher YO, Saugy M. Influence of transport and time on blood variables commonly measured for the athlete biological passport. *Drug Test Anal*. 2016 Feb;8(2):199-207.

- Sharpe K, Ashenden MJ, Schumacher YO. A third generation approach to detect erythropoietin abuse in athletes. *Haematologica*. 2006 Mar;91(3):356-63.
- Schmidt W, Biermann B, Winchenbach P, Lison S, Böning D. How valid is the determination of hematocrit values to detect blood manipulations? *Int J Sports Med*. 2000 Feb;21(2):133-8.
- Schumacher YO, Sahm D, Baumstark MW, Pottgiesser T. Reticulocytes in athletes: Longitudinal aspects and the influence of long- and short-term exercise. *Drug Test Anal*. 2010 Oct;2(10):469-74. **(A)**
- Schumacher YO, Wenning M, Robinson N, Sottas PE, Ruecker G, Pottgiesser T. Diurnal and exercise-related variability of haemoglobin and reticulocytes in athletes. *Int J Sports Med*. 2010 Apr;31(4):225-30. **(B)**
- Schumacher YO, Pottgiesser T. The impact of acute gastroenteritis on haematological markers used for the athletes biological passport - report of 5 cases. *Int J Sports Med*. 2011 Feb;32(2):147-50.
- Schumacher YO, Klodt F, Nonis D, Pottgiesser T, Alsayrafi M, Bourdon PC, Voss SC. The impact of long-haul air travel on variables of the athlete's biological passport. *Int J Lab Hematol*. 2012 Dec;34(6):641-7.
- Schumacher YO, Garvican LA, Christian R, Lobigs LM, Qi J, Fan R, He Y, Wang H, Gore CJ, Ma F. "High altitude, prolonged exercise, and the athlete biological passport". 2015 *Drug Test Anal*. 7(1):48-55.
- Stray-Gundersen J, Videman T, Penttilä I, Lereim I. Abnormal hematologic profiles in elite cross-country skiers: blood doping or? *Clin J Sport Med*. 2003 May;13(3):132-7.
- Sottas PE, Robinson N, Fischetto G, Dollé G, Alonso JM, Saugy M. Prevalence of blood doping in samples collected from elite track and field athletes. *Clin Chem*. 2011 May;57(5):762-9. doi: 10.1373/clinchem.2010.156067. Epub 2011 Mar 22.
- Voss SC, Alsayrafi M, Bourdon PC, Klodt F, Nonis D, Hopkins WG, Schumacher YO. Variability of serum markers of erythropoiesis during 6 days of racing in highly trained cyclists. *Int J Sports Med*. 2014 Feb;35(2):89-94.
- Zorzoli M, Rossi F. Case studies on ESA-doping as revealed by the Biological Passport. *Drug Test Anal*. 2012 Nov;4(11):854-8.
- Walpurgis K, Slijepcevic M, Wenzel F, Thomas A, Geyer H, Franz S, Schänzer W, Thevis M. Influence of repeated subcutaneous G-CSF injections on selected blood parameters relevant for monitoring programmes in sports drug testing. *Drug Test Anal*. 2012 Oct;4(10):798-802.
- Wang G, Durussel J, Shurlock J, Moores M, Fuku N, Bruinvels G, Pedlar C, Burden R, Murray A, Yee B, Keenan A, McClure JD, Sottas PE, Pitsiladis YP. Validation of whole-blood transcriptome signature during microdose recombinant human erythropoietin (rHuEpo) administration. *BMC Genomics*. 2017 Nov 14;18(Suppl 8):817.
- Watson P, Maughan RJ. Artifacts in plasma volume changes due to hematology analyzer-derived hematocrit. *Med Sci Sports Exerc*. 2014 Jan;46(1):52-9.

Quesito 3

Modulo steroideo

3a. I parametri inclusi nel modulo steroideo delle LG operative della WADA sono sufficienti e adeguati per stabilire il profilo steroideo, con finalità antidoping, degli atleti?

3b. Il metodo di analisi del modulo steroideo è più utile (in termini di efficacia, sensibilità, specificità) dei metodi diretti come metodo di contrasto del doping?

Studi reperiti tramite strategia di ricerca	511
Studi selezionati e letti in full text	28
Studi inclusi	*

Background

La lista delle sostanze e metodi proibiti per doping della WADA prevede il divieto di utilizzo, in e fuori gara, degli agenti anabolizzanti. Gli agenti anabolizzanti includono essenzialmente gli steroidi anabolizzanti androgeni (AAS) (sebbene vengano classificati come agenti anabolizzanti anche altri principi attivi come ad esempio i modulatori selettivi dei recettori degli androgeni) ed esplicano i loro effetti preminentemente mediante un'azione proteico-sintetica a livello della muscolatura scheletrica (aumentano la forza e la massa muscolare, l'aggressività, la resistenza agli allenamenti e il recupero dopo carichi di lavoro intensi) (**Ferrara 2004**).

Gli AAS possono essere naturalmente prodotti dall'organismo (es. testosterone) oppure possono essere il prodotto di una sintesi chimica (es. metandienone). Il testosterone è il più importante composto endogeno per attività anabolica ed androgenica: viene secreto, nel maschio, essenzialmente dalle cellule di Leydig del testicolo, mentre nelle donne dal surrene, dall'ovaio (corpo luteo) e dal tessuto adiposo. Naturalmente, essendo il testosterone il principale ormone responsabile della virilizzazione nel maschio e del mantenimento dei caratteri sessuali secondari, sussistono notevoli differenze nelle concentrazioni plasmatiche dello stesso negli uomini rispetto alle donne: nei primi, infatti, i livelli plasmatici di testosterone si aggirano attorno agli 0,6 mg/dl mentre nelle donne sono venti volte più bassi (0,03 mg/dl) (**Ferrara 2004**). Nel processo di sintesi endogena di testosterone viene prodotto anche il suo isomero: l'epitestosterone, che, a differenza del testosterone, non sembra possedere effetti fisiologici anabolici o androgenici. Il rapporto tra testosterone ed epitestosterone (T/E) in un uomo si aggira intorno a 1:1.

La somministrazione di testosterone per via esogena, trova indicazione terapeutica in patologie quali l'ipogonadismo maschile, l'ipostaturismo secondario (non causato dall'insufficienza ipofisaria) o l'anemia refrattaria: in quest'ultimo caso si sfrutta terapeuticamente l'azione stimolante degli androgeni sull'eritropoiesi.

A partire dal testosterone naturale, sono stati immessi sul mercato numerosi steroidi anabolizzanti di sintesi (es. stanozololo, il clostebol o il danazol) che si differenziano dall'ormone naturale per una maggiore attività anabolica rispetto a quella androgenica.

L'uso degli AAS a fini di doping è diffuso soprattutto nella pratica dei cosiddetti "sport di forza" (atletica pesante, pesistica, culturismo) in ragione di un aumento della potenza muscolare derivante dal loro utilizzo. Tale effetto si realizza per l'incremento della massa muscolare mediato dall'aumento della sintesi proteica (effetto anabolico) e della ritenzione idrica. I possibili effetti dannosi degli steroidi anabolizzanti coinvolgono il fegato, l'apparato endocrino/riproduttivo, la cute, l'apparato cardiovascolare ed il Sistema Nervoso Centrale. Le reazioni avverse sono solitamente legate ad una tossicità cronica (atrofia testicolare nel maschio, mascolinizzazione della donna, epatite acuta) ma annoverano anche alterazioni psichiche, caratterizzate da aumento di aggressività, da psicosi o da abuso compensatorio di psicostimolanti. Alla sospensione dell'uso di AAS si può realizzare una sindrome depressiva da farmacodipendenza (**Parssinen 2002**). Alcuni effetti sono reversibili se chi abusa di tali sostanze smette di prenderle, mentre altri sono permanenti.

L'assunzione a scopo di doping degli AAS può prevedere dosaggi da 10 a 100 volte superiori rispetto ai dosaggi terapeutici ed avviene seguendo uno schema "a cicli" della durata di 6-12 settimane, con dosaggi crescenti per la prima metà del ciclo che poi tendono a diminuire gradualmente nella seconda metà del ciclo fino a tornare a zero.

Le indagini analitiche tradizionalmente utilizzate per rilevare un utilizzo illecito di AAS si basano su metodiche separative quali la GC o LC/MS. Con tali indagini si mira a rilevare nella matrice biologica (solitamente le urine) la sostanza vietata o i suoi metaboliti. Sfortunatamente, molti AAS utilizzati per doping sono anche sostanze naturalmente presenti nell'organismo umano (es. testosterone): così, se le tecniche analitiche quali la GC/MS sono estremamente efficaci nel rilevare sostanze esogene (es. narcotici o stimolanti), esse presentano indubbe difficoltà quando devono discriminare tra una sostanza endogena naturalmente prodotta dall'organismo e la stessa sostanza artificialmente introdotta

dall'esterno. Il doping con AAS, tuttavia, induce alterazioni di alcuni parametri biochimici (indicatori specifici) che perdurano temporaneamente anche dopo aver interrotto il consumo della sostanza: in pratica, l'uso illecito di agenti anabolizzanti può essere accertato retroattivamente mediante la ricerca mirata delle variazioni dei marcatori d'uso (es. assetto steroideo urinario). In buona sostanza, determinando e quantificando alcuni composti urinari glucuro-coniugati e liberi legati essenzialmente al testosterone ed al suo metabolismo, è possibile stabilire un "profilo steroideo" normale o atipico. Tuttavia, a causa di un'ampia variabilità interindividuale nelle concentrazioni assolute degli steroidi endogeni, è stato dimostrato che i valori di riferimento basati sulla popolazione non sono sempre abbastanza sensibili da rivelare il potenziale abuso di AAS a livello individuale. Seguendo tale principio, è stata quindi sviluppata l'idea che il contrasto all'uso illecito di AAS può essere posto in essere utilizzando un approccio longitudinale alla lotta al doping: ovvero, con la raccolta sistematica di una serie di risultati analitici personali per ciascun atleta sottoposto a controllo antidoping, è possibile generare un "profilo" individuale che non dipende più da range di popolazione, ma da intervalli di riferimento individuali.

Il modulo steroideo del Passaporto Biologico dell'Atleta, introdotto a gennaio 2014, mira ad identificare gli steroidi anabolizzanti androgeni di natura endogena (EAAS) quando somministrati a livello esogeno ed altri agenti anabolizzanti, come i modulatori del recettore androgeno selettivo (SARMS). Il modulo steroideo considera un gruppo di biomarcatori di doping steroideo misurato in un campione di urina dell'atleta (dal Sito Wada <https://www.wada-ama.org/en/questions-answers/athlete-biological-passport>).

Analisi delle evidenze

Utilità dei parametri inclusi nel modulo steroideo

Un recente studio (**Mullen 2017**) ha valutato la capacità di ABP, IRMS e altri possibili marcatori ematologici di individuare una singola dose di testosterone (T) gel. Le analisi sono state effettuate su campioni di urine e sangue prelevati da 8 volontari sani maschi di età compresa tra 39 e 46 anni. I risultati di tre campioni di urine prelevati nei tre giorni precedenti alla somministrazione di T e un campione di sangue prelevato prima della somministrazione di T sono stati utilizzati come valori di baseline. I campioni successivi di urine sono stati raccolti 12, 24, 36 e 48 ore dopo somministrazione di T e i campioni ematici 24 e 48 ore dopo somministrazione di T. Dal DNA estratto dai campioni ematici è stato determinato il genotipo UGT2B17. I risultati hanno mostrato un aumento significativo dei livelli di T e 5 α Adiolo 12 e 24 ore dopo somministrazione di T e una variazione significativa dei rapporti T/E, 5 α Adiolo/5 β Adiolo, A/Etio, A/T e 5 α Adiolo/E. Solo 1 soggetto ha mostrato valori di T/E >4, ovvero superiori al cut-off di positività di popolazione, mentre tutti i soggetti hanno mostrato un profilo ABP anomalo. I rapporti più sensibili sono risultati essere 5 α Adiolo/E, T/E e 5 α Adiolo/5 β Adiolo. Dei 5 soggetti analizzati con IRMS, solo 2 sono risultati positivi sulla base del set di criteri proposti dalla WADA, sebbene tutti mostrassero risultati inconclusivi, ovvero positivi ad almeno un criterio. Il DHT si è dimostrato marcatore ematico migliore nell'identificare la somministrazione di T, mentre LH, FSH, 17-OHP and RBC non hanno mostrato alcuna variazione a seguito di somministrazione di T. In conclusione, l'ABP si è dimostrato in grado di identificare la somministrazione di una singola dose di T gel in tutti i partecipanti, in presenza di 3 valori di baseline, mentre l'analisi IRMS ha mostrato un 40% di positivi. **ALTO RISCHIO DI BIAS**

Un recente studio (**Miller 2016**) valuta la finestra di rilevazione, sulla base dei cut-off di popolazione WADA (T/E >4, A/T <20, T >200ng/mL, A or Etio >10,000ng/mL, 5 α Adiol/5 β Adiol, 5 α Adiol >250ng/mL and 5 α Adiol/E >10) e del passaporto biologico WADA; di dosi standard di T somministrate in una formulazione intranasale (Natesto), e l'effetto che tale modalità di somministrazione ha sul profilo individuale del modulo steroideo dell'ABP. La formulazione intranasale di T è stata somministrata a 5 soggetti sani maschi, fisicamente attivi, ma non partecipanti a competizioni sportive, né membri di organizzazioni sportive professionali o parte di un pool per l'effettuazione di test da parte federazioni internazionali o organizzazioni antidoping. I primi 3 campioni di urine sono stati prelevati nelle 2 settimane precedenti alla somministrazione di T, per costruire i valori di baseline per l'ABP. I campioni successivi sono stati prelevati 24 e 48 ore dopo ogni somministrazione. Per ogni campione sono stati analizzati i rapporti T/E, A/T, A/Etio, 5 α Adiol/5 β Adiol e 5 α Adiol/E. Nessun campione baseline è risultato anomalo. Un totale di 20 campioni sono stati raccolti tra 0 e 24 ore dopo la somministrazione di T, e 5 campioni sono stati prelevati tra 24 e 48 ore dopo somministrazione di T. Il 70% dei campioni raccolti tra 0 e 24 ore dopo T hanno riportato valori di T/E >4. Di questi, non più del 25% è risultato alterato rispetto ad altri criteri di positività. Nessun campione prelevato tra le 24 e le 48 ore successive a somministrazione di T è risultato positivo ad alcun criterio. Applicando il profilo steroideo dell'ABP, con una specificità del 99% fissata a priori, invece, l'85% dei campioni prelevati a 24 ore dalla somministrazione di T e il 40% di quelli prelevati a 48 ore dalla somministrazione di T ha riportato un profilo alterato. L'ABP ha quindi mostrato una maggiore sensibilità nell'identificare alterazioni del profilo steroideo rispetto al confronto con cut-off di popolazione. **BASSO RISCHIO DI BIAS**

Variazioni fisiologiche

Uno studio pilota (**Mullen 2016**) ha analizzato il profilo steroideo urinario durante l'intero ciclo mestruale, inclusi i glucuronidi e coniugati dello zolfo e ha monitorato il profilo steroideo dell'ABP prima e dopo la somministrazione di anticoncezionali di emergenza (EC). Sono state arruolate 6 volontarie sane, di età compresa tra 29 e 49 anni, con ciclo mestruale regolare, non sottoposte ad alcuna terapia ormonale per almeno 6 mesi. I risultati delle analisi hanno mostrato un aumento significativo delle concentrazioni di epitestosterone durante il ciclo mestruale, con un aumento significativamente maggiore nel giorno 14 e 21 rispetto al giorno 0, mentre non sono state osservate variazioni significative nelle concentrazioni di testosterone, androsterone, etiocolanone, 5 β -diolo e 5 α -diolo tra le diverse fasi del ciclo mestruale. Il rapporto T/E è risultato significativamente inferiore nei giorni 14 e 21 rispetto al giorno 0. Sono state osservate variazioni significative anche nei valori di 5 α -diolo durante il ciclo mestruale, con i valori più bassi registrati il giorno 14. È stata osservata una diminuzione significativa dei valori di epitestosterone, androsterone, etiocolanone e 5 β -diolo 24 ore dopo la somministrazione di EC. I valori sono rientrati nei range di normalità 48 ore dopo la somministrazione di EC. Non sono state osservate variazioni significative nei rapporti T/E, T/A, A/Etio, 5 α -diolo/5 β -diolo e 5 α -diolo/E. Nessun rapporto ha generato valori atipici all'analisi con l'ABP, eccetto un valore anomalo del rapporto T/E 12 ore dopo assunzione di EC in una donna con un profilo atipicamente basso di T/E in tutti i campioni osservati. In conclusione, lo studio mostra che i marcatori del profilo steroideo variano significativamente durante il ciclo mestruale e la somministrazione di EC può modificare le concentrazioni urinarie di epitestosterone, etiocolanone e 5 β -diolo e quindi risultare in valori anomali dell'ABP, soprattutto in donne con polimorfismi dell'UGT2B17. **ALTO RISCHIO DI BIAS**

Iperandrogenismo

Uno studio del 2014 (**Bermon 2014**) ha misurato i livelli di ormoni androgeni e la frequenza di iperandrogenismo in una popolazione di atlete di alto livello, partecipanti al 2011 IAAF World Championships in Daegu (Sud Corea). Lo studio ha arruolato 849 atlete provenienti da 163 paesi, cui è stato somministrato un questionario ed è stato prelevato un singolo campione di sangue. Dal campione iniziale, 10 atlete sono state poi escluse perché positive al test per uso di ormoni androgeni o steroidei o perché avevano ricevuto una diagnosi di disturbo dello sviluppo sessuale 46XY. Un totale di 717 atlete (85.5%) hanno riportato di non fare uso di contraccettivi orali (CO) e di queste 168 (23.5%) sono risultate avere amenorrea o oligomenorrea, in 3 casi dovuta a gravidanza. Le atlete con oligomenorrea e amenorrea sono risultate avere concentrazioni inferiori di T, DHEAS e A4, ma maggiori di SHBG. La fase mestruale non è risultata avere alcun effetto né sulle concentrazioni di LH e FSH né sul FT. Le atlete che non facevano uso di CO hanno mostrato valori significativamente maggiori di DHEAS, A4, FT, LH e FSH e valori significativamente minori di SHBG rispetto alle atlete che ne facevano uso. Il gruppo etnico di appartenenza non è risultato avere alcuna influenza sui livelli di ormoni androgeni. In conclusione, lo studio mostra che i parametri osservati nel campione di atlete risultano simili a quelli osservati in una popolazione di giovani donne sane. I dati sembrano confermare che l'orario di prelievo influenza, anche se debolmente, i livelli di T, FT, e A4, che l'età dell'atleta è correlata inversamente ai livelli A4 e DHEAS, e che oligomenorrea, amenorrea e uso di CO determinano una diminuzione dei livelli di ormoni androgeni. I dati dimostrano anche che l'iperandrogenismo risulta essere molto più frequente nella popolazione di atlete rispetto alla popolazione generale e questo potrebbe implicare che un disturbo dello sviluppo sessuale può determinare un vantaggio in ambito sportivo.

BASSO RISCHIO DI BIAS

Un recente studio (**Eklund 2017**) esamina il profilo ematico di ormoni androgeni, inclusi precursori e metaboliti, in relazione alla composizione corporea e alla performance fisica di atlete olimpioniche di diverse discipline sportive (potenza, tecniche, resistenza), a confronto con una popolazione di controllo. Le analisi sono state effettuate su campioni forniti da 106 atlete olimpioniche svedesi e 117 controlli appaiati per sesso, età e BMI che praticavano attività sportiva per un massimo di 2 ore di allenamento di resistenza e/o forza e non avevano mai partecipato a competizioni a livello elite. Sono state raccolte informazioni su stato di salute e dati ginecologici, quali uso di contraccettivi orali (CO), presenza di disfunzioni mestruali (DM) (oligomenorrea o amenorrea) nelle non utilizzatrici di CO. I risultati hanno mostrato una maggiore frequenza di DM nelle atlete rispetto ai controlli, mentre non sono state osservate differenze nella frequenza di uso di CO. Le atlete sono risultate avere livelli significativamente inferiori di estrone (E1) e livelli significativamente maggiori di DHEA, 5-DIOL e Etio-G rispetto ai controlli. Il sottogruppo di atlete con DM ha inoltre mostrato livelli maggiori di Etio-G rispetto alle altre atlete e livelli maggiori sia di E1 che di Etio-G rispetto ai controlli. Come atteso, tutte le atlete hanno mostrato una densità minerale ossea (BMD) e una massa magra significativamente maggiore e una percentuale di grasso corporeo significativamente minore rispetto ai controlli. Per quanto riguarda le differenze tra tipi di discipline sportive, tutti i valori relativi alle variabili endocrine e ai metaboliti degli ormoni androgeni sono risultate comparabili tra gruppi. Le atlete di discipline di potenza sono risultate avere la BMD maggiore rispetto

alle altre categorie. È stata, inoltre, osservata una correlazione significativa tra i livelli di ormoni androgeni e la BMD in tutto il gruppo di atlete. Le atlete di discipline di resistenza sono risultate avere i valori maggiori di massa magra e la minore percentuale di grasso corporeo, mentre le atlete di sport tecnici sono risultate avere la maggiore percentuale di grasso corporeo. In tutto il gruppo di atlete i livelli di DHEA e Etio-G sono risultati correlati positivamente alla percentuale di massa magra totale e delle gambe e il 5-DIOL alla massa magra delle gambe. In conclusione, lo studio dimostra una presenza di livelli più alti di precursori e metaboliti degli ormoni androgeni e di una correlazione significativa tra ormoni androgeni, massa magra e performance fisica nelle atlete olimpiche. I risultati supportano un ruolo significativo degli ormoni androgeni nella performance atletica delle donne, come suggerito dal dibattito sulla prevalenza di androgenismo in questa popolazione. **BASSO RISCHIO DI BIAS**

Confondenti e mascheranti

Uno studio del 2002 (**Kicman 2002**) analizza il possibile impatto della contaminazione da *Candida albicans* sul profilo steroideo urinario. Le analisi sono state effettuate su campioni forniti da 134 volontarie sane di età compresa tra 18 e 40 anni. A seguito di inoculazione dei campioni con *C. albicans*, è stata osservata una differenza significativa tra i campioni non trattati e i campioni trattati con 10K e 100K nelle concentrazioni di testosterone e nel rapporto T/E, ma non nei livelli di epitestosterone. Sono state osservate variazioni significative rispetto ai campioni non trattati in 92 dei campioni trattati con 10K e 99 dei campioni trattati con 100K. I dati dimostrano che la presenza di *C. albicans* può produrre quantità piccole ma significative di testosterone. Lo studio, quindi, supporta l'ipotesi che i livelli di testosterone possono aumentare in presenza di contaminazione microbica, sebbene l'aumento sia piccolo e di conseguenza l'impatto sul rapporto T/E sia basso. **BASSO RISCHIO DI BIAS**

Uno studio del 2009 (**Grosse 2009**) analizza il possibile utilizzo dell'etilglucuronide (EtG) come possibile marcatore di variazioni indotte dall'uso di alcol nel profilo steroideo monitorato durante le analisi anti doping. Lo studio ha utilizzato un totale di 50 campioni di urine prelevati da 4 volontari sani di età compresa tra 32 e 50 anni e BMI compreso tra 22.2 e 27.1, prima e fino a 32 ore dopo l'assunzione di etanolo. In tutti i soggetti è stato osservato un aumento del rapporto T/E dopo assunzione di etanolo significativamente correlato con l'eliminazione di EtG, mentre è stata osservata una correlazione inversa con il rapporto And/T. È stato osservato un aumento superiore al 30% del rapporto T/E a partire da 1 ora e 40 minuti fino a 24 ore dopo l'assunzione di etanolo. In conclusione, lo studio evidenzia che il consumo eccessivo di alcool può alterare sensibilmente il profilo steroideo. Dovrebbe quindi essere presa in considerazione la possibilità di che eventuali alterazioni osservate in un profilo steroideo possano essere dovute al consumo di alcool, soprattutto in test effettuati al di fuori delle competizioni, per quanto, sebbene la probabilità di incorrere in simili risultati durante le competizioni sia estremamente bassa, l'evenienza non dovrebbe essere comunque esclusa dal momento che gli effetti dell'alcol sul profilo steroideo possono durare anche molto a lungo dopo l'assunzione. **ALTO RISCHIO DI BIAS**

Un recente studio (**Albeiroti 2017**) esamina l'influenza della somministrazione di basse dosi di etanolo (0.2g/kg e 0.4g/kg) sui valori di T/E e la possibile correlazione tra le concentrazioni urinarie di EtG (etilglucuronide) e EtS (etilsolfato) e l'effetto dell'etanolo sul rapporto T/E. Le analisi sono state effettuate su campioni prelevati da 20 volontari sani di età compresa tra 21 e 34 anni e da 20 volontarie sane di età compresa tra 21 e 35 anni. I partecipanti sono stati classificati in base al livello di T/E a baseline. Hanno partecipato allo studio 10 uomini e 10 donne con alti livelli di T/E a baseline (<0.25) e 10 uomini e 10 donne con bassi livelli di T/E a baseline (≤ 0.25). I campioni di urine sono stati raccolti prima e durante le 6, 12 e 18 ore successive alla somministrazione di 0.2 g/kg o 0.4 g/kg di etanolo. Il 58% dei partecipanti (n=23) ha mostrato un picco nei livelli urinari di EtG e EtS a 6 ore dalla somministrazione di etanolo, il 37% (n=15) ha mostrato un picco di EtG e EtS a 18 ore, mentre solo il 5% (n=2) ha mostrato un picco di EtG e EtS a 24 ore. L'etanolo è risultato impossibile da rilevare nel 60% dei partecipanti che avevano ricevuto una dose di 0.2 g/kg a 6 ore dalla somministrazione e in tutti i partecipanti a 18 ore dalla somministrazione. In media, il picco nei valori di EtG e EtS è risultato maggiore dopo somministrazione di 0.4 g/kg rispetto alla dose di 0.2 g/kg. A seguito di somministrazione di etanolo 9 dei 10 uomini trattati con 0.2 g/kg di etanolo e 9 dei 10 uomini trattati con 0.4 g/kg di etanolo non hanno riportato variazioni significative nel rapporto T/E (aumento >30% da baseline), e 4 delle 5 donne trattate con 0.2 g/kg e 5 delle 8 donne trattate con 0.4 g/kg non hanno riportato valori significativamente anomali di T (aumento >60% da baseline) (7 donne sono state escluse dalle analisi). Nessuno dei profili steroidei urinari è risultato anomalo applicando i cutoff di positività della WADA (T/E \leq 4.0, androsterone/t>20, 5 α Adiolo/5 β Adiolo \leq 2.4). In conclusione lo studio riporta che anche a basse dosi l'etanolo può variare il profilo steroideo urinario, in proporzione maggiore nelle donne rispetto agli uomini, e EtG e EtS possono essere utili per identificare il consumo di alcol. **ALTO RISCHIO DI BIAS**

Uno studio preliminare (**Palermo 2016**) testa gli effetti della somministrazione per via orale di miconazolo sui marcatori urinari del profilo steroideo. Lo studio ha arruolato 2 volontari sani, di 24 e 45 anni, con BMI normale, non sottoposti ad

alcuna altra terapia farmacologica, con un consumo nullo o moderato di alcol, un profilo steroideo fisiologicamente alto e un'alta concentrazione dei principali steroidi target. I campioni di urine sono stati prelevati a partire da una settimana prima della somministrazione e durante il trattamento con miconazolo. Nel soggetto 1 la somministrazione di miconazolo ha prodotto una variazione significativa delle concentrazioni di Andro e Etio e dei loro rapporti, una diminuzione della concentrazione di 16 α -OH-Etio e 16 α -OH-Andro del 42 e 48% rispettivamente e una riduzione di 7 β -OH-DHEA e 6 β -OH-Etio del 74 e 60% rispettivamente. I valori di 7 α -OH-DHEA e 6 β -OH-DHEA sono risultati inferiori alla LOQ e in alcuni casi non rilevabili dopo 1 settimana di trattamento. È stata osservata una diminuzione dei valori di 11 β -OH-Andro e 11 β -OH-Etio dell'89 e 76% rispettivamente. I risultati per il soggetto 2 hanno confermato le osservazioni. In conclusione lo studio suggerisce che la somministrazione di miconazolo può influenzare significativamente la strategia analitica attualmente in uso per l'identificazione di abuso di steroidi pseudo-endogeni. **ALTO RISCHIO DI BIAS**

Un recente studio (**Lehtihet 2017**) valuta la possibile influenza dell'uso a breve termine di codeina sulla secrezione urinaria dei metaboliti androgeni inclusi nel modulo steroideo dell'ABP prima e in concomitanza di somministrazione di testosterone (T). Le analisi sono state effettuate su campioni prelevati da 15 volontari sani maschi di età compresa tra 18 e 45 anni non facenti parte di alcuna organizzazione appartenente alla Swedish Sports Confederation. I campioni di baseline sono stati prelevati nei 3 giorni precedenti alla somministrazione di codeina. I partecipanti sono stati trattati con 50mg di codeina per via intramuscolare 3 volte al giorno per 6 giorni e dopo 3 giorni di trattamento con codeina hanno ricevuto una dose di T per via intramuscolare. Il profilo ABP è stato valutato in 8 soggetti trattati con 500mg di T e in 2 soggetti trattati con 125mg di T. A seguito di somministrazione di T, è stato osservato un aumento dei livelli di T e una diminuzione dei livelli di LH e FSH. La somministrazione di un dosaggio più alto di T ha determinato un aumento dei livelli di T sopra la soglia consentita in tutti i soggetti. Non è stata osservata alcuna influenza della codeina sui tassi di secrezione dei metaboliti esaminati durante cosomministrazione di codeina e T. Come atteso, la somministrazione di 500mg di T ha determinato un aumento di tutti i metaboliti eccetto i livelli di Epi-testosterone che sono risultati diminuiti. Non sono state osservate differenze significative tra la AUC del rapporto T/E durante cosomministrazione di T e codeina rispetto alla AUC del rapporto T/E durante somministrazione di T in monoterapia, nemmeno in soggetti con mutazione dell'UGT2B17. Tutti i soggetti sono risultati avere un profilo ABP anomalo dopo somministrazione di T, indipendentemente dal dosaggio, pertanto, la somministrazione di T non è risultata mascherata dalla terapia con codeina. **ALTO RISCHIO DI BIAS**

Uno studio del 2011 (**Mazzarino 2011**) ha come obiettivo verificare se la somministrazione orali di dosi multiple di SERM (modulatori selettivi del recettore degli estrogeni) (tamoxifene, toremifene o clomifene) determina variazioni significative nelle concentrazioni urinarie di T (testosterone), E (epitestosterone), 4-androstenedione, androsterone, etiocolanone, 5 α -androstano-3 α , 17 β -diolo, 5 β -androstano-3 α , 17 β -diolo, LH (ormone luteinizzante) e FSH (ormone follicolo stimolante). Lo studio ha confrontato campioni di urine prelevati da 4 volontari e 4 volontarie di età compresa tra 25 e 43 anni e peso compreso tra 50 e 85 anni, prelevati prima e dopo somministrazione di tamoxifene, toremifene o clomifene. I dati sono stati analizzati sia tramite confronto diretto delle concentrazioni urinarie dei metaboliti prima e dopo somministrazione di SERM sia tenendo in considerazione i cutoff adottati dalla WADA per la definizione di un risultato atipico o positivo (CV% \geq 30 per i maschi e CV% \geq 60 per le femmine). La variabilità individuale degli steroidi androgeni endogeni a baseline è stata valutata tramite raccolta di campioni per 3 giorni consecutivi prima del trattamento. I risultati hanno mostrato una variazione circadiana nella secrezione di T in entrambi i sessi, con un picco massimo al mattino e minimo la sera, lo stesso trend è stato osservato per 4-androstenedione, 5 α -androstano-3 α , 17 β -diolo, 5 β -androstano-3 α , 17 β -diolo, androsterone e etiocolanone, mentre la variazione diurna del rapporto T/E è risultata inferiore al 20% in entrambi i sessi. Sono state osservate inoltre marcate differenze inter-individuali nei valori baseline di tutti gli steroidi endogeni considerati. Dopo somministrazione di dosi multiple di SERM sono state osservate variazioni significative, generalmente dopo il secondo giorno di trattamento, dei valori individuali baseline di 4-androstenedione, T e E solo in soggetti maschi. Non sono state osservate variazioni significative da baseline nei valori di LH, FSH, 5 α -androstano-3 α , 17 β -diolo, 5 β -androstano-3 α , 17 β -diolo, androsterone e etiocolanone. In conclusione, lo studio mostra che in soggetti maschi la somministrazione di SERM determina un'aumento significativo della concentrazione di 4-AD, T e E solo in soggetti maschi, non causando alcuna variazione nelle concentrazioni di androsterone, etiocolanone, 5 α -androstano-3 α , 17 β -diolo, 5 β -androstano-3 α , 17 β -diolo, e nei rapporti A/E e 5 α -diolo/5 β -diolo in entrambi i sessi, né alcuna variazione nei valori urinari di T/E. Il trattamento con SERM, quindi, può provocare un'alterazione significativa del profilo urinario steroideo endogeno in soggetti di sesso maschile. **ALTO RISCHIO DI BIAS**

UGT2B17

Uno studio del 2009 (**Schulze 2009**) ha indagato il potenziale effetto confondente del polimorfismo UGT2B17 sull'identificazione del testosterone nelle urine. Il polimorfismo nel gene codificato come UGT2B17, infatti, è fortemente

associato ad una riduzione nella secrezione di testosterone nelle urine ed ha una diversa distribuzione in popolazioni di differenti etnie. Lo studio ha analizzato campioni prelevati da 55 volontari sani maschi di età compresa tra 18 e 50 anni, sia portatori che non portatori della mutazione del gene UGT2B17, cui ha somministrato una dose singola di testosterone, per via intramuscolare, per valutare l'impatto della presenza del polimorfismo sui valori di T/E urinari analizzati con il modello ADAPTIVE. I risultati dello studio hanno dimostrato che inserire l'informazione sul polimorfismo del gene UGT2B17 nel modello ADAPTIVE ne aumenta significativamente la sensibilità. **BASSO RISCHIO DI BIAS**

Uno studio del 2011 (**Anielski 2011**) ha effettuato un'analisi epidemiologica del polimorfismo UGT2B17 per valutarne l'affidabilità e utilità all'interno dei sistemi di monitoraggio anti-doping, ad esempio nel fornire informazioni aggiuntive nell'interpretazione del profilo steroideo. Le analisi sono state condotte su un set di campioni di atleti inviati per procedura standard al laboratorio di controllo anti-doping. È stato possibile analizzare tutti i campioni dal momento che gli atleti hanno acconsentito all'uso del materiale biologico a fini di ricerca. Sono stati selezionati un totale di 674 campioni (421 maschi, 253 femmine). Solo il 2.7% (n=18) dei campioni analizzati ha prodotto un risultato non valido al test del genotipo. In un totale di 502 campioni (74.5%) è stato identificato un fenotipo positivo all'UGT2B17, mentre la delezione del gene è stata identificata in 154 campioni (22.8%). Coerentemente con i dati di letteratura, sono risultate differenze significative nella valutazione dei rapporti T/E tra i campioni di urine dei soggetti con fenotipo positivo all'UGT2B17 e soggetti con delezione, mentre i valori di E non sono risultati influenzati dal polimorfismo. In conclusione, la procedura per l'identificazione del fenotipo UGT2B17 è sensibile e riproducibile e, data la sua semplicità di gestione, il metodo è adatto per essere inserito nel processo analitico di un laboratorio anti doping. Dal momento che il polimorfismo dell'enzima UGT2B17 ha un'influenza diretta sui risultati dei test anti doping, la conoscenza del fenotipo UGT2B17 di un atleta completerebbe l'approccio individuale e i dati registrati nel passaporto biologico. **BASSO RISCHIO DI BIAS**

Uno studio del 2012 (**Ekstrom 2012**) valuta l'impatto dei polimorfismi UGT2B17 e UGT2B15 sul rapporto T/E in atleti e atlete elite. Lo studio utilizza 93 campioni di sangue intero e urine prelevati a fini di controllo antidoping da atleti e atlete di discipline di endurance. Tra le atlete, il 33.3% è risultato omozigote wildtype (ins/ins), il 55.6% eterozigote per UGT2B17 (ins/del), l'11.1% omozigote UGT2B17 (del/del). Tra gli atleti, il 36.8% è risultato omozigote wildtype (ins/ins), il 50.9% eterozigote per UGT2B17 (ins/del), il 12.3% omozigote UGT2B17 (del/del). In totale, il 35.5% degli atleti è risultato omozigote wildtype (ins/ins), il 52.7% eterozigote per UGT2B17 (ins/del), l'11.8% omozigote UGT2B17 (del/del). Il rapporto T/E negli atleti maschi è risultato più fortemente dipendente dal genotipo UGT2B17 rispetto alle atlete donne. I rapporti T/E sono risultati significativamente più bassi negli atleti, sia maschi che femmine, con delezione del gene sia in omozigosi che in eterozigosi. **BASSO RISCHIO DI BIAS**

Uno studio del 2013 (**Okano 2013**) analizza la distribuzione del genotipo UGT2B17 e il suo potenziale effetto sul profilo steroideo urinario di atleti giapponesi. L'analisi del genotipo UGT2B17 è stata condotta su un totale di 511 atleti universitari, di cui 255 maschi e 256 femmine, con un'età media di 20.3 anni e BMI medio di 23.3, attivi in diverse categorie sportive (es. atletica, football, basket, baseball, pallavolo, e danza). Un'ulteriore gruppo di 10 volontarie sane non atlete è stato arruolato per valutare l'accuratezza del profilo steroideo e dell'analisi GC-C-IRMS nell'identificare la somministrazione di testosterone enantato. Il 74.5% degli atleti e il 60.2% delle atlete hanno riportato una delezione in omozigosi (del/del) del gene UGT2B17 e il 24.3% degli atleti e il 37.1% delle atlete ha riportato una delezione in eterozigosi (del/ins), mentre solo l'1.2% degli atleti e il 2.7% degli atleti non ha riportato alcuna mutazione (ins/ins) del gene UGT2B17. La prevalenza del genotipo del/del è risultata significativamente maggiore negli atleti rispetto alle atlete. Le concentrazioni di T in entrambi i gruppi di atleti del/ins e ins/ins e atlete del/ins e ins/ins sono risultate significativamente maggiori rispetto agli atleti e alle atlete del/del, mentre non sono state osservate differenze significative tra gruppi nei livelli di epitestosterone. Il rapporto T/E nei gruppi del/del, di conseguenza, è risultato significativamente minore rispetto ai gruppi del/ins e ins/ins. Non sono state osservate differenze significative tra genotipi nei livelli di 5 α -diolo, mentre le concentrazioni di 5 β -diolo sono risultate significativamente maggiori nei gruppi del/ins e ins/ins rispetto ai gruppi del/del, con un rapporto 5 α -/5 β -diolo significativamente maggiore nei gruppi del/del rispetto ai gruppi del/ins e ins/ins. Non sono state osservate differenze significative tra gruppi nei livelli di DHEA. Il gruppo di volontarie sane su cui è stata testata l'analisi GC-C-IRMS era composto da 6 soggetti del/del, 3 del/ins e 1 ins/ins. Dopo somministrazione di T per via intramuscolare tutti i soggetti hanno mostrato concentrazioni di T significativamente superiori rispetto a baseline. Nessun soggetto del/del ha raggiunto il cut-off di positività WADA (T>4). In conclusione, la prevalenza di mutazioni nel gene UGT2B17 è estremamente alta nella popolazione giapponese, e i risultati dimostrano i limiti dell'uso di un cut-off di popolazione per l'analisi di T/E a fini antidoping. Introdurre cut-off specifici per genotipo per il T/E aumenterebbe la sensibilità dei test, così come è necessario introdurre il genotipo UGT2B17 all'interno del profilo steroideo dell'ABP. **BASSO RISCHIO DI BIAS**

Uno studio del 2014 (**Schultze 2014**) analizza l'effetto di 3 polimorfismi genetici e dell'uso di contraccettivi orali (CO) sul profilo steroideo di 57 atlete olimpiche e 22 atlete elite. Un totale di 25 atlete (39%) faceva uso di CO. Di queste, 2 utilizzavano contraccettivi a base di solo progesterone, mentre 23 utilizzavano contraccettivi combinati. I campioni di sangue e urine prelevati dalle 79 atlete sono stati utilizzati per analizzare i livelli di testosterone, epitestosterone, androsterone (A), etiolanone (Etio), 5 α -androstano-3 α , 17 β -diolo (5 α -diolo) e 5 β -androstano- α ,17 β diolo (5 β -diolo), e il genotipo UGT2B17, UGT2B7 e CYP17A1. I livelli di secrezione di T delle atlete che facevano uso di CO sono risultati significativamente inferiori rispetto alle atlete che non ne facevano uso. Rimuovendo i soggetti con mutazione del gene UGT2B17 in omozigosi (del/del) il rapporto T/E nelle atlete utilizzatrici di CO è risultato significativamente maggiore rispetto alle non utilizzatrici. Non sono state osservate differenze né nei livelli di T né nei rapporti A/Etio e 5 α -diolo/5 β diolo tra le utilizzatrici di CO e le non utilizzatrici. Le utilizzatrici di CO hanno riportato livelli inferiori di epitestosterone, e di conseguenza un rapporto A/E è significativamente maggiore rispetto alle non utilizzatrici. Per quanto riguarda il gene UGT2B17, l'8.3% delle atlete ha riportato una mutazione in omozigosi (del/del), il 58.3% in eterozigosi (ins/del) e il 33.3% non ha riportato mutazioni del gene (ins/ins), per quanto riguarda il gene UGT2B7, il 20.5% delle atlete ha riportato una mutazione in omozigosi (HH), il 56.4% in eterozigosi (HY) e il 23.1% non ha riportato mutazioni del gene (YY), mentre per quanto riguarda il gene CYP17A1 il 44.9% delle atlete ha riportato una mutazione in omozigosi (TT), il 39.7% in eterozigosi (CT) e il 15.4% non ha riportato mutazioni del gene (CC). Non sono state osservate differenze significative nei livelli di T tra i gruppi ins/del e ins/ins, mentre il gruppo del/del ha mostrato un rapporto 5 α -diolo/5 β diolo significativamente maggiore rispetto al gruppo ins/del e ins/ins. Il gruppo YY ha mostrato una tendenza a livelli maggiori di epitestosterone indipendentemente dall'uso di CO. Il genotipo TT è risultato significativamente associato a livelli inferiori di epitestosterone. In conclusione, lo studio mostra che l'uso di CO e i polimorfismi UGT2B17 e CYP17 influenzano il profilo steroideo delle atlete, pertanto tali informazioni dovrebbero essere incluse nel questionario standard per il controllo del doping. **ALTO RISCHIO DI BIAS**

Uno studio del 2015 (**Strahm 2015**) indaga e confronta la sensibilità dell'ABP e del GC-C-IRMS nell'identificare soggetti che hanno ricevuto 3 diverse dosi di T enantato (125 mg, 200mg e 500mg). Lo studio ha analizzato i campioni di sangue e urine prelevati da 25 volontari sani maschi, di età compresa tra 27 e 43 anni, di cui 8 soggetti con mutazione UGT2B17 in omozigosi (del/del) e 17 con mutazione UGT2B17 in eterozigosi (ins/del) o senza mutazione (ins/ins). Nessuno dei soggetti arruolati è risultato positivo ai test antidoping effettuati a baseline e né allo screening per specifiche malattie infettive quali HIV e epatite B o C. I campioni ematici sono stati prelevati prima e a 4 e 14 giorni dalla somministrazione di T. È stato osservato un aumento dose dipendente di T e dei suoi metaboliti Etio, A, 5 α Adiol, 5 β Adiol, tutti inclusi nell'ABP. I livelli urinari di E sono diminuiti, in modo non dose dipendente, a seguito di somministrazione di T. È stata osservata una correlazione significativa tra i livelli urinari di E e i livelli ematici di T a quattro giorni dalla prima dose, mentre non è stata osservata alcuna correlazione tra i livelli di LH e di E. L'ampia variabilità inter-individuale osservata è principalmente dovuta al polimorfismo UGT2B17. Il rapporto T/E è risultato aumentato nei soggetti non mutati o eterozigoti. Nessuno dei soggetti del/del ha mai raggiunto le soglie di positività di popolazione (T>4). È stato osservato un aumento dei rapporti T/E, 5 α Adiol/E e A/E indipendentemente dal polimorfismo UGT2B17. Tutti i soggetti ins/ins e ins/del hanno riportato un profilo anomalo all'analisi con ADAPTIVE. Tutti i soggetti del/del hanno mostrato un profilo anomalo alle dosi più alte, mentre tutti tranne uno alla dose minore. In conclusione, laddove utilizzando i cut-off di popolazione nessun soggetto del/del risultava positivo a doping, l'uso del modulo steroideo ABP con almeno 2 valori di baseline ha permesso di identificare tutti i soggetti come positivi. **BASSO RISCHIO DI BIAS**

Uno studio del 2015 (**Martin-Escudero 2015**) ha determinato la distribuzione delle diverse forme di espressione del gene UGT2B17 negli atleti e come questo fattore influenza il rapporto T/E. Lo studio ha prelevato 1410 campioni di urine da un totale di 140 atleti di entrambi i sessi, di età compresa tra 16 e 55 anni, appartenenti a diverse discipline sportive (46.1% miste, 20.6% anaerobiche). A seguito della caratterizzazione genetica, il 48.2% è risultato omozigote wildtype (wt), il 12.1% omozigote mutato e il 39.7% eterozigote. La frequenza della mutazione in omozigosi è risultata del 6.9% negli atleti caucasici e dell'80% negli atleti asiatici, mentre la frequenza della mutazione in eterozigosi è risultata dello 0% negli atleti asiatici e del 52.3% negli atleti caucasici. Gli atleti omozigoti sono risultati essere complessivamente più anziani, principalmente asiatici e più frequentemente impegnati in discipline anaerobiche. Il valore del rapporto T/E negli atleti maschi è risultato maggiore rispetto al T/E nelle atlete donne. Sono state osservate differenze significative nei rapporti T/E tra l'attività sportiva aerobica, anaerobica e mista. I soggetti con mutazione in omozigosi hanno riportato valori di T/E significativamente minori rispetto ai soggetti eterozigoti o omozigoti wt. Il genotipo è l'unica variabile indipendente che è risultata associata al T/E. Gli atleti con mutazione omozigote hanno mostrato valori di T/E minori dell'83% rispetto agli eterozigoti, mentre gli atleti omozigoti wt hanno mostrato valori di T/E maggiori del 53% rispetto ai soggetti eterozigoti. In conclusione, lo studio conferma che l'uso del rapporto T/E come marcatore della somministrazione di T deve essere accompagnato da informazioni sulla mutazione del gene UGT2B17 per poter avere una prospettiva più accurata delle variazioni longitudinali del profilo steroideo. **BASSO RISCHIO DI BIAS**

Un recente studio (**Choong 2016**) indaga i possibili fattori che possono influenzare l'accuratezza delle procedure di estrazione di DNA dalle urine, la concordanza tra genotipi derivati da urine e sangue e l'associazione tra variazioni genetiche e profilo steroideo in atleti elite. La concordanza tra genotipo eseguito su campioni di sangue e su campioni di urine è stata valutata utilizzando campioni prelevati da 21 volontari sani arruolati in un precedente studio, ed è risultata del 92% per UGT2B7, dell'83% per 2B15 e del 92% per CYP17A1. Un totale di 713 campioni inviati al laboratorio antidoping di Stoccolma nel 2014, prelevati da 596 atleti di diverse discipline sportive (100 in sport di endurance come nuoto, triathlon e ciclismo; 315 in sport da combattimento e di squadra; 151 in altri tipi di sport) sono stati invece utilizzati per valutare l'associazione tra polimorfismi genetici e profilo steroideo. Nell'84% degli atleti testati è stato possibile eseguire il genotipo. Il 12.5% degli atleti testati è risultato UGT2B17 del/del. È stata osservata una maggiore concentrazione di testosterone e T/E nei portatori del soggetto con inserzione del UGT2B17 rispetto ai soggetti con delezione. L'associazione tra genotipo UGT2B17 e rapporto T/E è stata osservata in entrambi i sessi, ma è stata osservato un rapporto T/E più alto negli uomini con UGT2B17 ins rispetto alle donne con UGT2B17 ins. In conclusione, le urine non sembrano essere una fonte attendibile di DNA per la rilevazione del genotipo e non forniscono risultati sui genotipi soddisfacenti ai fini anti doping. Per minimizzare l'influenza delle variazioni genetiche nei test antidoping si suggerisce di raccogliere i campioni anche in periodi di scarso allenamento, quando il rischio di doping è più basso, per aumentare la probabilità di raccogliere campioni realmente di baseline e non alterati da uso di sostanze dopanti. **BASSO RISCHIO DI BIAS**

Nuovi marcatori

Uno studio del 2010 (**Enea 2010**) analizza gli effetti di fattori che possono potenzialmente interferire con la secrezione di metaboliti del nandrolone (19-NA e 19-NE) in giovani donne, incluso il ciclo mestruale, l'uso di contraccettivi orali (CO), l'allenamento fisico e l'esercizio fisico fino a esaurimento. L'obiettivo secondario dello studio era di esaminare se il cut-off di concentrazione massima di 19-NA stabilito per il controllo del doping fosse appropriato per la popolazione femminile di atlete. Lo studio ha utilizzato campioni prelevati da 32 giovani donne con un'età media di 22.8 anni (range 18-30), altezza media compresa tra 1.63 e 1.66, peso medio compreso tra 55.2 e 61.3 e BMI medio compreso tra 20.0 e 23.7, di cui 22 utilizzavano CO (10 donne che praticavano sport a livello ricreativo e 12 atlete elite, 6 judoka e 6 triatlete/cicliste) e 10 non facevano uso di CO (nessuna praticava alcun tipo di attività sportiva). Tutti i soggetti arruolati hanno partecipato a 2 sessioni di esercizi e controllo ad intervalli da almeno una settimana. Nessuno dei gruppi ha mostrato un aumento dei livelli di 19-NA e 19-NE a seguito delle sessioni di esercizio. I livelli di entrambi i metaboliti non sono risultati influenzati né dallo stato ormonale né dalla quantità di attività fisica praticata. In conclusione, lo studio mostra che la secrezione del nandrolone nelle donne non sembra essere influenzata dall'attività fisica intensiva o a esaurimento, dall'uso di CO, dalla fase mestruale nelle donne con ciclo regolare, né dal livello di allenamento fisico. Inoltre, i livelli massimi osservati di 19-NA (1.14ng/mL) mostrano che il limite di 2ng/mL stabilito come cut-off di positività al doping sembra essere adeguato anche per la popolazione di atlete. **BASSO RISCHIO DI BIAS**

Un recente studio (**Fabregat 2016**) ha indagato il potenziale effetto di fattori relativi alla conservazione del campione, fattori endogeni e fattori esogeni noti per la loro influenza sul profilo steroideo sui livelli dei metaboliti di T coniugati con la cisteina. Nello specifico, sono stati indagati i marcatori Δ^1 -AED, Δ^6 -AED, Δ^6 -T and Δ^{15} -AD. Questi composti cisteinici si sono dimostrati relativamente stabili rispetto ai fattori relativi alla conservazione del campione (es. degradazione microbica, cicli di congelamento/scongelo). Sono state osservate variazioni moderate, inferiori al 30%, in relazione ai cicli circadiani. Sono state osservate anche variazioni in relazione al genere. In particolare, i livelli di Δ^6 -AED and Δ^6 -T sono risultati più alti nei campioni di urine provenienti da partecipanti di sesso femminile. Sono state osservate variazioni nella secrezione dei composti cisteinici nelle donne durante le prime fasi di gravidanza. Le variazioni nella secrezione di T osservate nella popolazione asiatica a causa del polimorfismo UGT2B17 non sono risultate avere alcun effetto sulla secrezione dei composti cisteinici. Pertanto, le variazioni etniche, che costituiscono il maggiore ostacolo all'uso di un cut-off comune di T/E, potrebbero essere superati utilizzando i composti cisteinici. In conclusione, lo studio mostra che l'inclusione dei composti cisteinici nel profilo steroideo potrebbe contribuire a superare alcune dei suoi attuali limiti. **ALTO RISCHIO DI BIAS**

Uno studio del 2009 (**Handelsman 2009**) ha valutato l'effetto della somministrazione di rhLH e rhCG sulla concentrazione in sangue e urine di LH e ormoni androgeni allo scopo di individuare possibili approcci utili per identificare l'uso delle due gonadotropine a scopo di doping. Un gruppo di volontari sani di età compresa tra 18 e 45 anni è stato randomizzato in due gruppi cui la produzione endogena di LH e testosterone (T) è stata lasciata integra oppure soppressa tramite somministrazione di nandrolone decanoato (ND). Due sottogruppi di 23 e 24 partecipanti sono stati ulteriormente randomizzati in 4 gruppi di trattamento per partecipare rispettivamente allo studio sul rhLH e allo studio sul rhCG. Nello studio sul rhLH i partecipanti che avevano ricevuto ND pretrattamento hanno mostrato livelli

inferiori di T e LH post trattamento, ma la dose di LH non è risultata correlata con il livello ematico di T. La dose di LH non è risultata correlata con la concentrazione ematica di T né nel gruppo che aveva ricevuto ND pretrattamento, né nel gruppo che non lo aveva ricevuto, ma in questi ultimi è stata osservata un'interazione significativa tra la dose di LH e il tempo. Non sono state osservate differenze significative tra gruppi nelle concentrazioni di T, E, androsterone (A), eticolanone (Et), rapporto T/E, e rapporto A/Et. La somministrazione di ND pretrattamento, ma non la dose di LH, è risultata correlata alla concentrazione di LH e ha determinato una riduzione dei livelli urinari di T, senza però modificare il rapporto T/E. Nello studio sul rhCG, invece, i livelli di hCG sono risultati dose-dipendenti. I livelli ematici di LH sono risultati significativamente soppressi a seguito di somministrazione di hCG, indipendentemente dalla dose e dalla somministrazione di ND pretrattamento. I livelli ematici di T sono risultati soppressi nel gruppo che aveva ricevuto ND pretrattamento, mentre sono risultati stimolati al di sopra dei livelli fisiologici nel gruppo che non aveva ricevuto ND pretrattamento. Il trattamento con ND ha determinato una riduzione del Cmax nel sangue, ma non nelle urine. È stato osservato un forte aumento progressivo del rapporto T/E fino a 8 giorni dopo la somministrazione di hCG, indipendente da dose e da somministrazione di ND pretrattamento. Le analisi di hCG, LH e T nelle urine hanno prodotto risultati simili alle analisi ematiche. Il test per la valutazione del rapporto T/E nelle urine ha mostrato una buona accuratezza. In conclusione, lo studio dimostra che una dose singola di rhLH non modifica sensibilmente i valori ematici e urinari di LH e T, mentre il rhCG ha un effetto significativo, dose-dipendente e prolungato sui valori ematici e urinari di hCG, LH e T. Il rapporto T/LH potrebbe essere un test sensibile per individuare l'assunzione di hCG fino ad 1 settimana dopo la somministrazione, indipendentemente dall'uso concomitante di ormoni androgeni. **ALTO RISCHIO DI BIAS**

Uno studio pilota (**Strahm 2011**) valuta l'effetto di 3 iniezioni intramuscolo di rhCG sui livelli ematici e urinari di LH, hCG e androgeni al fine di identificare ulteriori marcatori per l'identificazione di hCG e il rapporto T/LH per l'identificazione di abuso di gonadotropine. Lo studio ha analizzato i livelli di testosterone, LH e hCG in campioni di sangue e urine prelevati da 10 volontari sani, di età compresa tra 21 e 29 anni (media 24 ± 2 DS) e BMI compreso tra 18.8 e 26.2 (media 22.6 ± 2.3 DS), prima e dopo la somministrazione di hCG. In tutti i soggetti è stato osservato un aumento dei livelli ematici e urinari di hCG, con i valori massimi raggiunti da 9 soggetti 12 ore dopo la prima iniezione. È stata osservata una maggiore variabilità inter-individuale nei campioni di urine rispetto ai campioni di sangue. Le concentrazioni osservate nei campioni di urine sono risultate comparabili ai livelli ematici per 8 soggetti, mentre 2 presentavano livelli urinari inferiori. A 12 giorni dall'ultima iniezione, il livello medio di T è risultato significativamente inferiore rispetto a prima del trattamento. È stata osservata una diminuzione dei livelli di LH durante tutto lo studio. A 12 giorni dall'ultima iniezione i livelli di LH non sono risultati significativamente diversi rispetto a prima del trattamento. È stato osservato un aumento del rapporto T/LH a seguito di somministrazione di hCG, con un'ampia variabilità inter-individuale. I livelli urinari di T hanno mostrato un pattern simile ai campioni ematici, ma con una maggiore variabilità inter-individuale. Nei soggetti con mutazione del gene UGT2B17 l'aumento di T è risultato significativamente ritardato rispetto ai risultati ematici a 24 ore dalla prima iniezione, alla seconda iniezione e 24 ore dopo la seconda iniezione. Il profilo steroideo urinario di tutti i soggetti è risultato anomalo. È stato osservato un aumento del rapporto A/Etio a 12 e 24 ore dalla prima iniezione, a 12 e 24 ore dalla seconda iniezione e a 12 ore dall'ultima iniezione. Le variazioni osservate nei livelli di epitestosterone sono risultate simili a quelle del testosterone, mentre i livelli dei restanti marcatori sono risultati simili ai valori pretrattamento. I marcatori che hanno riportato valori migliori di sensibilità e specificità e i valori più alti di AUC sono risultati essere i livelli ematici assoluti (sens. 57.5, spec. 97.5, PPV 97.9, NPV 53.4, ROC area 77.5) e relativi (sens. 63.7, spec. 97.5, PPV 98.1, NPV 57.4, ROC area 80.6) di T/LH, seguiti dai livelli relativi, ematici (sens. 56.3, spec. 100, PPV 100, NPV 53.3, ROC area 78.1) e urinari (sens. 51.2, spec. 97.5, PPV 97.6, NPV 50.0, ROC area 74.4), di T. In conclusione, l'uso di entrambe le matrici per l'analisi dei livelli di T e T/LH si è dimostrato in grado di aumentare la sensibilità dei test nell'identificare i soggetti trattati con hCG. Inoltre, il modello ADAPTIVE dovrebbe tenere conto sia delle variazioni intra-individuali naturali sia di altri fattori, come la genetica, che impattano sul metabolismo di T. **ALTO RISCHIO DI BIAS**

Uno studio del 2017 (**Kotronoulas 2017**) ha valutato l'utilità di due glucuronidi (6OGH-Andros3G e 6OH-Egtio3G) resistenti all'idrolisi enzimatica come marcatori dell'assunzione di T. Lo studio ha analizzato campioni di urine prelevati da 5 volontari prima e dopo la somministrazione per via orale di T undecanoato, su cui ha calcolato i rapporti tra i metaboliti 6OGH-Andros3G e 6OH-Egtio3G e EG e TG per confrontarli con il rapporto TG/EG. Le finestre di rilevamento (DW) di ciascun partecipante sono state utilizzate come riferimento per la valutazione dei nuovi marcatori. La media delle concentrazioni basali di 6OGH-Andros3G e 6OH-Egtio3G è risultata rientrare nei range attesi. Dopo somministrazione di T, è stato osservato un aumento nei valori di TG/EG, e i valori sono rientrati nei range di normalità dopo 12-48 ore. I valori di 6OH-Andros3G/EG e 6OH-Egtio3G/EG hanno raggiunto i valori massimi 4 ore dopo somministrazione di T, per poi iniziare a rientrare nei valori di normalità. Le DW ottenuti dal marcatore 6OH-Andros3G/EG sono risultate avere un range da 24 a 72 ore per tutti i volontari, mostrando un aumento del tempo di identificazione della somministrazione di T fino a 60 ore. In conclusione, i risultati mostrano che i marcatori 6OGH-Andros3G/EG, 6OH-Egtio3G/EG, 6OGH-Andros3G/TG e 6OH-Egtio3G/TG hanno DW molto più ampie rispetto al T/E,

estendendo quindi la capacità di identificare la somministrazione di T fino a 84 ore in più rispetto ai marcatori classici.

ALTO RISCHIO DI BIAS

Uno studio pilota (**van Renterghem 2010**) su campioni prelevati da 6 volontari sani indaga nuovi potenziali marcatori di DHT e DHEA e confronta la loro accuratezza sia utilizzando il confronto con cut-off di popolazione, sia utilizzando il modello ADAPTIVE. Un totale di 396 campioni di urine sono stati prelevati da 6 volontari sani, con un'età media di 24.7 anni (DS 1.0) e un peso medio di 79.7 kg (DS 9.5), prima e dopo somministrazione di DHT per via transdermica e successivamente di DHEA per via orale. A partire dai risultati dei 24 marcatori analizzati sono stati generati 552 rapporti. Per calcolare i cut-off di popolazione di riferimento sono stati utilizzati 2014 campioni di atleti maschi con risultati negativi ai test. La sensibilità dei marcatori analizzati è stata calcolata utilizzando l'analisi ROC fissando un valore di specificità al 99%, sia per le soglie di popolazione che per le soglie intra-individuali. L'approccio di popolazione ha prodotto valori di sensibilità compresi tra il 10% e il 16% per l'identificazione l'abuso di DHT e tra il 7.5% e il 29.5% nell'identificare l'abuso di DHEA. L'applicazione del modello ADAPTIVE ha aumentato la sensibilità di tutti i marcatori a valori compresi tra il 42.1% e il 46.8% per l'identificazione di abuso di DHT e tra il 23.0% e il 43.2% per l'individuazione di abuso di DHEA. In conclusione, l'applicazione di nuovi marcatori adatti all'elaborazione di profili longitudinali e la loro combinazione (per il DHT: $5\alpha\beta$ -Adiol/ $5\beta\alpha\beta$ -Adiol, DHT/E, DHT/ $5\beta\alpha\beta$ -Adiol; per il DHEA: 16α -OH-DHEA/E, 7β -OH-DHEA/E, DHEA/E, $5\beta\alpha\beta$ -Adiol/ $5\alpha\beta$ -Adiol) può migliorare la sensibilità dell'ABP, che sembra essere un approccio particolarmente adatto all'identificazione di singole dosi di DHT e DHEA. **BASSO RISCHIO DI BIAS**

Uno studio del 2011 (**Schonfelder 2011**) valuta la possibilità di utilizzare profili di espressione genica per determinare l'uso di sostanze anaboliche. Un totale di 19 volontari maschi sono stati suddivisi in 2 sottogruppi. Il primo gruppo, composto da 11 soggetti con un'età media 38.6 ± 12.4 anni e un peso medio di 82.8 ± 13.8 kg, è stato utilizzato come gruppo di controllo per dimostrare gli effetti dell'esercizio sull'espressione genica tramite test incrementale massimale al cicloergometro. Il secondo gruppo, composto da 8 soggetti con un'età media di 38.1 ± 9.4 anni e un peso medio di 85.4 ± 5.9 kg, è stato sottoposto ad esercizio fisico con aggiunta di somministrazione transdermica di 1.5mg di T gel per kg di peso corporeo. L'analisi quantitativa su 14 geni candidati ha mostrato una variazione significativa dell'espressione genica in quasi tutti i geni target, ma l'unico a mostrarsi esclusivamente dipendente dalla somministrazione di T è risultato essere l'interleuchina 6 che ha mostrato un'alterazione dei suoi trascritti soltanto dopo la terza somministrazione di T, durante la valutazione degli effetti a lungo termine. La maggior parte dei geni analizzati, infatti, è risultata modulata dall'esercizio. In conclusione, lo studio dei profili di espressione genica per rilevare l'uso di sostanze anaboliche potrebbe essere una buona alternativa ai metodi classici, sebbene sia importante tenere in considerazione l'influenza dell'esercizio sulla modulazione dell'espressione genica. **ALTO RISCHIO DI BIAS**

Un recente studio (**Salamin 2016**) ha valutato la possibile utilità dei miRNA circolanti come biomarcatori per identificare la somministrazione di testosterone esogeno. Lo studio ha incluso campioni provenienti da 19 volontari maschi sani, derivati da un precedente studio, con un'età compresa tra 19 e 28 anni (media 24.3 ± 2.7), un BMI compreso tra 18.3 e 27.2 kg/m^2 (media 23.1 ± 2.4) e differenti genotipi UGT2B17 (ins/ins, ins/del, del/del). Lo studio è durato 5 settimane e ha incluso 4 fasi principali, una prima fase di raccolta dei campioni di controlli, una seconda settimana in cui ai partecipanti sono stati somministrati 2.4 mg/24 ore di T per via transdermica, un periodo successivo di 2 settimane di washout e un'ultima fase in cui ai partecipanti sono state somministrate 2 dosi di 40 mg di T per via orale. L'analisi nel plasma ha identificato tre miRNA alterati dopo entrambe le somministrazioni. I livelli dei miRNA identificati sono stati quindi sottoposti a monitoraggio longitudinale. I livelli di miR-122 sono risultati essere gli unici a rimanere elevati durante tutto il giorno a supporto di un cambiamento testosterone-dipendente piuttosto che associato al ritmo circadiano. Questo risultato fornisce nuove basi per approfondire un nuovo approccio complementare ai metodi basati sull'urina nel rilevamento del testosterone e altri steroidi. **ALTO RISCHIO DI BIAS**

Uno studio del 2014 (**Boccard 2014**) ha effettuato un profiling steroidomico per monitorare i metaboliti steroidei allo scopo di identificare l'abuso di AAS (anabolic androgen steroids). I dati sono stati raccolti da campioni di urine prelevati da 19 volontari di età compresa tra 19 e 28 anni arruolati in un precedente studio di eliminazione di T dopo somministrazione controllata di TU (testosterone undecanoato). I dati sono stati trattati tramite consensus OPLS-DA (orthogonal partial least squares discriminant analysis) e sono stati costruiti dei modelli statistici multiblocco. I modelli OPLS-DA sono stati calcolati per distinguere i campioni di controllo (CO), raccolti nella settimana precedente alla somministrazione di TU, da quelli di trattamento (TESTO). Sono stati calcolati due modelli, il primo targeted (12 steroidi quantificati e il rapporto T/E, modello targeted, 13 variabili) e il secondo untargeted (436 potenziali metaboliti steroidei, modello untargeted). In entrambi i casi è stato ottenuto un modello con 2 variabili latenti (una componente predittiva e una ortogonale) con accuratezza dell'81.3% per il modello targeted (specificità 85.7%, sensibilità 77.8%) e dell'87.5% per il modello untargeted (specificità 85.7%, sensibilità 89.9%). Il profiling metabolomico untargeted si è dimostrato un approccio efficiente per l'identificazione di nuovi biomarcatori per migliorare i sistemi antidoping. I risultati hanno

confermato l'impatto del polimorfismo UGT2B17 sul metabolismo degli AAS. È stato inoltre identificato un subset di 24 biomarcatori con un'alta capacità predittiva, che è stato ulteriormente analizzato utilizzando un approccio coclustering, e 10 dei 24 marcatori analizzati sono stati identificati come metaboliti steroidei. **ALTO RISCHIO DI BIAS**

Nuove matrici

Uno studio del 2016 (**Ponzetto 2016**) analizza 532 campioni di sangue e urine provenienti da 19 volontari sani di età compresa tra 19 e 28 anni (media 24.3 ± 2.7) e BMI compreso tra 18.3 e 27.2 kg/m² (media 23.1 ± 2.4), per quantificare 14 ormoni steroidei, inclusi progestogeni, androgeni, corticoidi e estrogeni. I campioni sono stati acquisiti da un precedente trial clinico in 4 fasi. Durante la prima fase sono stati raccolti campioni di controllo, durante la seconda fase ai 19 volontari sono state somministrate 2 dosi di T per via transdermica, la terza fase è stata costituita da 2 settimane di washout, mentre durante l'ultima fase sono state somministrate ai partecipanti 2 dosi di testosterone undecanoato (TU) per via orale. Su tutti i campioni ematici dei partecipanti è stata anche eseguita l'analisi per il geni codificanti l'UGT2B17. I risultati hanno mostrato una drastica influenza dei ritmi circadiani sugli ormoni analizzati. Otto degli ormoni considerati (androstenedione, progesterone, 17 α -idrossiprogesterone, DHEA, corticosterone, deossicorticosterone, cortisolo e 11-deossicortisolo) hanno mostrato alte concentrazioni ematiche al mattino, che decrescevano durante il giorno, mentre i restanti ormoni (testosterone, epitestosterone, DHT, LH, estrogeni e SHBG) hanno mostrato fluttuazioni meno pronunciate. A seguito delle prime osservazioni è stato deciso di effettuare l'analisi longitudinale solo dei profili di T, DHT e androstenedione. È stato osservato un aumento significativo dei valori di T e DHT, ma nessuna variazione evidente dei valori di androstenedione dopo somministrazione di T transdermico. Sia T che DHT hanno mostrato una buona capacità di identificare T sulla base delle soglie individuali. L'analisi di T ha portato a rilevare valori superiori alle soglie nel 60.2% dei campioni, con una finestra di rilevazione tra 2 e 96 ore. L'analisi di DHT ha riportato una percentuale di campioni positivi del 71.3% con la stessa finestra di rilevazione. Non è stata osservata nessuna differenza nella risposta di T e DHT tra i diversi genotipi UGT. La capacità di T e DHT di identificare i soggetti trattati con UT per via orale è risultata meno pronunciata. L'analisi di DHT ha mostrato aumenti nei valori di 16 dei 19 partecipanti e valori superiori alle soglie nel 42.1% dei campioni, con una finestra di rilevazione tra 2 e 12 ore. L'analisi di T non ha mostrato le stesse capacità di rilevazione, con 6 volontari con valori superiori alle soglie e una percentuale di campioni positivi del 17.5%. In conclusione, lo studio mostra che l'analisi longitudinale del profilo steroideo effettuata su campioni ematici può costituire un valido complemento all'analisi delle urine, soprattutto per casi che presentano polimorfismi dell'UGT o un caso di utilizzo di T per via transdermica. **BASSO RISCHIO DI BIAS**

Sintesi delle evidenze

Il modulo steroideo del passaporto biologico valuta attualmente le alterazioni individuali in una sequenza longitudinale dei seguenti analiti: testosterone (T), epitestosterone (E), androsterone (A) etiocolanolone (Etio) 5 α -androstano-3 α ,17 β -diolo (5 α Adiolo) 5 β -androstano-3 α ,17 β -diolo (5 β Adiolo) e dei loro rapporti (T/E, A/T, A/Etio, 5 α Adiol/5 β Adiol e 5 α Adiol/E). In un lavoro (**Miller 2016**) volto a valutare la capacità dell'ABP di identificare l'assunzione di testosterone a dosaggio standard per via intranasale, è stato osservato che nessun campione raccolto oltre le 24 ore successive la somministrazione di T mostrava un rapporto T/E alterato, mentre il 40% dei campioni cui è stato applicato il modulo steroideo dell'ABP ha riportato un profilo alterato. Per quanto riguarda gli altri parametri inclusi nel modulo steroideo dell'ABP, un recente studio (**Mullen 2017**) ha dimostrato che quelli maggiormente in grado di rilevare l'assunzione di basse dosi di testosterone (gel) sono il 5 α Adiolo/E, il T/E ed il 5 α Adiolo/5 β Adiolo. Alcune condizioni fisiche (come il ciclo mestruale nelle donne e l'uso di contraccettivi d'emergenza) sono in grado di alterare alcuni parametri del profilo steroideo dell'ABP (**Mullen 2016**). Più in generale, le atlete sembrano essere affette da iperandrogenismo più frequentemente delle donne provenienti da una popolazione generale, ed in particolare, sembrerebbe che nelle atlete sia presente un livello più elevato di precursori e metaboliti degli ormoni androgeni (**Eklund 2017**). Anche alcuni fattori esogeni possono influenzare i parametri inseriti nel modulo steroideo dell'ABP. Un abuso episodico di alcol etilico, ad esempio, determina un incremento del rapporto T/E ed una correlazione inversa con il rapporto A/T (**Grosse 2009**). Inoltre, soprattutto nelle donne, anche quantitativi di alcol più modesti possono determinare un incremento del rapporto T/E (**Albeiroti 2017**). Uno studio (**Mazzarino 2011**) ha osservato che la somministrazione orale di dosi multiple di SERM (modulatori selettivi del recettore per gli estrogeni) determina, nei maschi, un aumento significativo delle concentrazioni urinarie di T ed E, provocando una significativa alterazione del profilo steroideo. Una contaminazione urinaria da parte di *C.albicans* può artificialmente alterare il rapporto T/E, in quanto causa un aumento (di lieve entità) dei livelli di T (**Kicman 2002**).

Il rapporto T/E è fortemente associato ad un polimorfismo dell'enzima UDP-glucuronosiltransferasi (UGT2B17), il quale presenta una variante (*del/del*) inattiva che influenza fortemente l'escrezione urinaria del testosterone. Gli individui portatori della variante *del/del*, hanno infatti livelli di testosterone urinario insolitamente bassi, sicché in questi individui

anche l'assunzione esogena di T non determina il superamento del valore soglia del rapporto T/E ($T/E > 4$). Diversi studi (Elstrom 2012, Okano 2013, Martin–Escudero 2015, Choong 2016) dimostrano che la presenza della variante *del/del* determina una significativa diminuzione del T urinario, tanto che alcuni autori (Schulze 2009, Anielski 2011) si spingono a formulare la conclusione che inserire la determinazione del fenotipo UGT2B17 nei parametri del modulo steroideo dell'ABP, ne aumenterebbe significativamente la sensibilità. Un lavoro (Strahm 2015) ha dimostrato che, a seguito della somministrazione di T, laddove utilizzando cut-off di popolazione nessun individuo *del/del* risultava positivo, l'uso del modulo steroideo dell'ABP con almeno 2 valori di baseline è stato in grado di identificare tutti i soggetti *del/del* che avevano assunto T. Nelle donne (Shultze 2014), la presenza del polimorfismo *del/del* determina, nel caso di utilizzo di contraccettivi orali, un rapporto 5 α Adiolo/5 β Adiolo significativamente più elevato rispetto a coloro che non presentano tale variante.

Raccomandazioni

Utilità dei test

(Miller 2016)

Il profilo steroideo dell'ABP sembra essere in grado di indentificare gli atleti che hanno fatto uso di T per via intranasale (Natesto) con una sensibilità significativamente superiore rispetto all'uso di cut-off di popolazione.

Variazioni fisiologiche

(Mullen 2016)

Nel prelevare i campioni di urine nelle atlete è necessario considerare la fase del ciclo mestruale in quanto sembra influire sui parametri del profilo steroideo dell'ABP.

Confondenti e mascheranti

UGT2B17

L'uso della valutazione longitudinale dei parametri steroidei dell'ABP permette di identificare gli atleti portatori del polimorfismo UGT2B17 in omozigosi (*del/del*) che hanno fatto uso di T con una sensibilità significativamente superiore rispetto all'uso di cut-off di popolazione.

(Grosse 2009, Palermo 2016)

L'abuso episodico di alcol (es. binge drinking) e sembra essere in grado di produrre alterazioni nei parametri analizzati dal profilo steroideo dell'ABP.

GPP Le possibili alterazioni dei parametri inclusi nel profilo steroideo dell'ABP dovute all'abuso episodico di alcol, essendo collegate alla produzione di enzimi coinvolti nel metabolismo dell'alcol, sembrano essere più pronunciate negli atleti più giovani e nella popolazione femminile.

(Palermo 2016)

L'uso di antimicotici (miconazolo) sembra essere in grado di produrre alterazioni del profilo steroideo dell'ABP.

Raccomandazioni di ricerca

Nuovi marcatori

(Handelsmann 2009, Strahm 2011)

L'aggiunta del rapporto T/LH al profilo steroideo dell'ABP sembra essere in grado di aumentare la sensibilità del modulo steroideo nell'identificare gli atleti che hanno fatto uso di rhCG.

(Fabregat 2016)

Recenti evidenze sembrano supportare l'uso di composti cisteinici (metaboliti di T coniugati con la cisteina) a complemento dei parametri attualmente inclusi nel profilo steroideo dell'ABP.

(Kotronoulas 2017)

Evidenze preliminari suggeriscono che l'uso dei due glucuronidi 6OGH-Andros3G e 6OH-Egtio3G è in grado di estendere la finestra di rilevabilità degli atleti che hanno fatto uso di T fino a 84 ore in più rispetto ai marcatori classici.

(van Renterghem 2010)

L'aggiunta di nuovi marcatori di DHT e DHEA (per il DHT: 5 α β -Adiol/5 β α β -Adiol, DHT/E, DHT/5 β α β -Adiol; per il DHEA: 16 α -OH-DHEA/E, 7 β -OH-DHEA/E, DHEA/E, 5 β α β -Adiol/5 α β -Adiol) al profilo steroideo dell'ABP sembra aumentare la sensibilità del modulo steroideo dell'ABP nell'identificazione di abuso di DHT e DHEA.

Nuove matrici

(Ponzetto 2016)

L'analisi longitudinale del profilo steroideo su campioni ematici può rappresentare un buon complemento all'analisi delle urine, soprattutto nel caso di atleti portatori del polimorfismo UGT2B17 (*del/del*) in omozigosi.

Bibliografia

Albeiroti S, Ahrens BD, Sobolevskii T, Butch AW. The influence of small doses of ethanol on the urinary testosterone to epitestosterone ratio in men and women. *Drug Test Anal.* 2017 Jul 3. doi: 10.1002/dta.2241. [Epub ahead of print]

Anielski P, Simmchen J, Wassill L, Ganghofner D, Thieme D. Epidemiological investigation of the UGT2B17 polymorphism in doping control urine samples and its correlation to T/E ratios. *Drug Test Anal.* 2011 Oct;3(10):645-51.

Bermon S, Garnier PY, Hirschberg AL, Robinson N, Giraud S, Nicoli R, Baume N, Saugy M, Fénichel P, Bruce SJ, Henry H, Dollé G, Ritzen M. Serum androgen levels in elite female athletes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(11):4328-35.

Boccard J, Badoud F, Jan N, Nicoli R, Schweizer C, Pralong F, Veuthey JL, Baume N, Rudaz S, Saugy M. Untargeted profiling of urinary steroid metabolites after testosterone ingestion: opening new perspectives for antidoping testing. *Bioanalysis.* 2014;6(19):2523-36. doi: 10.4155/bio.14.200.

Choong E, Schulze JJ, Ericsson M, Rane A; Ekstroem L. Discordant genotyping results using DNA isolated from anti-doping control urine samples. *Drug Testing and Analysis* (2016)

Eklund E, Berglund B, Labrie F, Carlström K, Ekström L, Hirschberg AL. Serum androgen profile and physical performance in women Olympic athletes. *Br J Sports Med.* 2017 Sep;51(17):1301-1308.

Ekstrom L, Gok E, Johansson M, Garle M, Rane A, Schulze JJ. Doping and genetic testing: sex difference in UGT2B15 expression, testosterone glucuronidation activity and urinary testosterone/epitestosterone glucuronide ratio. *Current Pharmacogenomics and Personalized Medicine.* 2012;10(2):125-131.

Enea C, Boisseau N, Bayle ML, Flament MM, Grenier-Loustalot MF, Denjean A, Diaz V, Dugué B. Nandrolone excretion in sedentary vs physically trained young women. *Scand J Med Sci Sports.* 2010 Feb;20(1):90-9.

Fabregat A, Marcos J, Segura J, Ventura R, Pozo OJ. Factors affecting urinary excretion of testosterone metabolites conjugated with cysteine. *Drug testing and analysis.* 2016;8(1):110-9.

Ferrara SD. Xenobiotici, sostanze e pratiche dopanti. parte ii: agenti anabolizzanti e antiestrogenici. in: *Doping Antidoping.* ed. Piccin, 2004; pag.236.

Grosse J, Anielski P, Sachs H, Thieme D. Ethylglucuronide as a potential marker for alcohol-induced elevation of urinary testosterone/epitestosterone ratios. *Drug testing and analysis.* 2009;1(11-12):526-30.

Handelsman DJ, Goebel C, Idan A, Jimenez M, Trout G, Kazlauskas R. Effects of recombinant human LH and hCG on serum and urine LH and androgens in men. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2009 Sep;71(3):417-28. PMID: 19170708

- Kicman AT, Fallon JK, Cowan DA, Walker C, Easmon S, Mackintosh D. *Candida albicans* in urine can produce testosterone: impact on the testosterone/epitestosterone sports drug test. *Clin Chem*. 2002 Oct;48(10):1799-801.
- Kotronoulas A, Gomez-Gomez A, Segura J, Ventura R, Joglar J, Pozo OJ. Evaluation of two glucuronides resistant to enzymatic hydrolysis as markers of testosterone oral administration. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2017;165(Part_B):212-218.
- Lehtihet M, Andersson A, Börjesson A, Schulze J, Rane A, Ericsson M, Ekström L. Codeine influences the serum and urinary profile of endogenous androgens but does not interact with the excretion rate of administered testosterone. *Drug Test Anal*. 2017 Sep 13. doi: 10.1002/dta.2301. [Epub ahead of print]
- Martin-Escudero P, Munoz-Guerra J, Del Prado N, Galindo Canales M, Fuentes Ferrer M, Vargas S, Soldevilla AB, Serrano-Garde E, Miguel-Tobal F, Maestro de las Casas M, Fernandez-Perez C. Impact of UGT2B17 gene deletion on the steroid profile of an athlete. *Physiological Reports*. 2015;3(12):e12645.
- Mazzarino M, Braganò MC, de la Torre X, Molaioni F, Botrè F. Relevance of the selective oestrogen receptor modulators tamoxifen, toremifene and clomiphene in doping field: endogenous steroids urinary profile after multiple oral doses. *Steroids*. 2011 Nov;76(12):1400-6.
- Miller GD, Nair V, Morrison MS, Summers M, Willick SE, Eichner D. Intranasal delivery of Natesto testosterone gel and its effects on doping markers. *Drug Testing and Analysis*. 2016;8(11-12):1197-1203.
- Mullen JE, Thoerngren J-O, Schulze JJ, Ericsson M, Garevik N, Lehtihet M, Ekstroem L. Urinary steroid profile in females - the impact of menstrual cycle and emergency contraceptives. *Drug Testing and Analysis*. 2016 Ahead of Print.
- Mullen J, Börjesson A, Hopcraft O, Schulze JJ, Ericsson M, Rane A, Lehtihet M, Ekström L. Sensitivity of doping biomarkers after administration of a single dose testosterone gel. *Drug Test Anal*. 2017 Nov 18. doi: 10.1002/dta.2341. [Epub ahead of print]
- Okano M, Ueda T, Nishitani Y, Kano H, Ikekita A, Kageyama S. UDP-glucuronosyltransferase 2B17 genotyping in Japanese athletes and evaluation of the current sports drug testing for detecting testosterone misuse. *Drug Test Anal*. 2013 Mar;5(3):166-81
- Palermo A, Botrè F, de la Torre X, Fiacco I, Iannone M, Mazzarino M. Drug-drug interactions and masking effects in sport doping: influence of miconazole administration on the urinary concentrations of endogenous anabolic steroids. *Forensic Toxicology*. 2016;34(2):386-397.
- Parssinen M., Seppala T., Steroid use and long-term health risks in former athletes. *Sports Med.*, 32: 83-94, 2002.
- Ponzetto F, Mehl F, Boccard J, Baume N, Rudaz S, Saugy M, Nicoli R. Longitudinal monitoring of endogenous steroids in human serum by UHPLC-MS/MS as a tool to detect testosterone abuse in sports. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2016;408(3):705-19.
- Salamin O, Jaggi L, Baume N, Robinson N, Saugy M, Leuenberger N. Circulating microRNA-122 as Potential Biomarker for Detection of Testosterone Abuse. *PLoS One*. 2016 May 12;11(5):e0155248.
- Schönfelder M, Hofmann H, Anielski P, Thieme D, Oberhoffer R, Michna H. Gene expression profiling in human whole blood samples after controlled testosterone application and exercise. *Drug Test Anal*. 2011 Oct;3(10):652-60. doi: 10.1002/dta.360.
- Schulze JJ, Lundmark J, Garle M, Ekström L, Sottas PE, Rane A. Substantial advantage of a combined Bayesian and genotyping approach in testosterone doping tests. *Steroids*. 2009 Mar;74(3):365-8.
- Schulze JJ, Mullen JE, Lindgren EB, Ericsson M, Ekstrom L, Hirschberg AL. The impact of genetics and hormonal contraceptives on the steroid profile in female athletes. *Frontiers in Endocrinology*. 2014;5:Article No.: 50.

Strahm E, Marques-Vidal P, Pralong F, Dvorak J, Saugy M, Baume N. Influence of multiple injections of human chorionic gonadotropin (hCG) on urine and serum endogenous steroids concentrations. *Forensic Sci Int.* 2011;10;213(1-3):62-72. doi: 10.1016/j.forsciint.2011.07.002. Epub 2011 Jul 27.

Strahm E, Mullen JE, Garevik N, Ericsson M, Schulze JJ, Rane A, Ekstroem L. Dose-dependent testosterone sensitivity of the steroidal passport and GC-C-IRMS analysis in relation to the UGT2B17 deletion polymorphism. *Drug Testing and Analysis.* 2015;7(11-12):1063-1070.

Van Renterghem P, Van Eenoo P, Sottas P-E, Saugy M, Delbeke F. Subject-based steroid profiling and the determination of novel biomarkers for DHT and DHEA misuse in sports. *Drug Testing and Analysis.* 2010;2(11-12):582-588.

Quesito 4

Qual è l'utilità (in termini di efficacia, sensibilità, specificità) del passaporto biologico come metodo di contrasto del doping?

Studi reperiti tramite strategia di ricerca	70
Studi selezionati e letti in full text	22
Studi inclusi	*

Background

I due moduli del passaporto biologico dell'atleta attualmente implementati dalla WADA sono basati sul monitoraggio individuale e longitudinale di marcatori ematici o urinari che appartengono ad una cascata biologica influenzata dalla somministrazione di agenti stimolanti l'eritropoiesi (ESA), steroidi anabolizzanti o più in generale da alcune manipolazioni biologiche che possono migliorare le prestazioni sportive. Il monitoraggio individuale e longitudinale si dimostra particolarmente interessante soprattutto quando la variabilità intra-individuale di un marcatore risulta minore della corrispondente variabilità inter-individuale (Saugy M, 2014). Quando il passaporto biologico elabora con il modello statistico ADAPTIVE i risultati analitici degli atleti inseriti in ADAMS, restituisce un segnale di "allerta" nel momento in cui i risultati attesi e calcolati per ciascun atleta sottoposto a monitoraggio, non sono compresi in un intervallo di normalità stimato dal modello statistico stesso.

A tutela degli atleti sottoposti a controllo antidoping, il passaporto biologico deve essere implementato nel modo più trasparente possibile ed assicurare la necessaria indipendenza tra pianificazione, interpretazione e gestione dei risultati analitici. Come già menzionato, l'unità di gestione del passaporto dell'atleta (Athlete Passport Management Unit, APMU) ha il compito di garantire la corretta implementazione dei due moduli che attualmente compongono il passaporto biologico, assicurando al contempo il superamento di tutte le possibili criticità di natura scientifica o legale. L'APMU gestisce tempestivamente i passaporti degli atleti in ADAMS, sottoponendo i profili "sospetti" generati dal modello ADAPTIVE ad un panel di esperti. Al segnale di "allerta" del passaporto, quindi, segue sempre una accurata indagine di natura più strettamente forense. Solo quando l'atleta ha avuto la possibilità di giustificare l'anomalia di un dato o di una sequenza di dati analitici del passaporto biologico, e gli esperti non ritengono valida tale giustificazione, questi viene accusato di violazione del regolamento antidoping (ADRV). Un risultato atipico del passaporto biologico confermato dal panel di esperti, pertanto, può comportare che un atleta possa essere accusato di una violazione della normativa antidoping senza che per esso sia un risultato positivo da parte di test diretto (risultato analitico avverso) (Dvorak, 2014).

Una valutazione congiunta dei due moduli del passaporto biologico, relativamente alla loro capacità di produrre un segnale di allerta per dei risultati (o delle sequenze) atipici su un medesimo campione di atleti, appare complesso, anche e soprattutto a causa dei diversi costrutti teorici e delle differenze procedurali cui vanno incontro i due moduli. Ciò nonostante, la stessa WADA ha recentemente prodotto un documento nel quale riporta quante ADRV (per violazione dell'articolo 2.2 del Codice) derivano direttamente dall'ABP nel suo complesso (WADA, 2017).

Pertanto, sulla scia del documento della WADA, si ritiene interessante andare a valutare il passaporto biologico (o meglio il modello statistico ADAPTIVE) nel suo insieme, ovvero nei termini di quali e quante anomalie riesce ad intercettare, indipendentemente dal fatto che poi vengano confermate in una effettiva ADRV. Questo dato, infatti, potrebbe dare una indicazione sulla potenza del modello statistico ovvero sulla sua abilità di individuare un utilizzo di sostanze proibite anche se concesse per una esenzione a fini terapeutici (TUE), oppure una effettiva condizione medica patologica o infine un vero e proprio uso fraudolento di sostanze vietate per doping.

Analisi delle evidenze

Un articolo del 2012 (Robinson 2012) descrive la definizione e implementazione di un programma antidoping su larga scala durante i Mondiali IAAF (International Association of Athletics Federations) 2011 a Daegu, in Corea del Sud, incluse le problematiche di tipo logistico legate ad un evento che ha visto la partecipazione di atleti provenienti da 200 paesi. Obiettivo del programma era di testare tutti gli atleti partecipanti al mondiale IAAF 2011 e nel contempo raccogliere dati utili per i nuovi moduli endocrinologico e steroideo dell'ABP. Allo scopo, è stato costruito un laboratorio mobile accreditato WADA all'interno dell'area predisposta per lo IAAF 2011, per consentire di eseguire le analisi senza alcuna interruzione della catena di custodia. La partecipazione degli atleti è risultata molto alta, consentendo di ottenere 5503 campioni da 1833 atleti (99.7% degli atleti partecipanti allo IAAF 2011), di cui 855 atlete. In totale, sono stati raccolti 1856 campioni (865 atlete, 986 atleti) per l'analisi EDTA (Acido etilendiamminotetraacetico), di cui 1831 sono stati analizzati in sede, a Daegu. I dati ottenuti sono stati categorizzati per orario di prelievo (mattino, pomeriggio, sera) e caratteristiche demografiche dell'atleta (es. data di nascita, genere). Sono state osservate differenze evidenti nella

variabili inserite nell'ABP (es. HGB, OFF-score e %RET), la cui origine non è, però, stata indagata, così come la possibile influenza di altri fattori eterogenei (es. etnia, tipo di sport, altitudine ecc.). In conclusione, l'esperienza è risultata apprezzata da tutti i partecipanti allo IAAF 2011 e i dati raccolti sono stati messi a disposizione sia per un successivo calcolo della prevalenza di doping nello IAAF 2011, sia per il perfezionamento dell'ABP. **BASSO RISCHIO DI BIAS**

Uno studio del 2012 (**Zorzoli 2012**) riporta l'esperienza dell'Unione Internazionale Ciclisti (UCI: Union Cycliste Internationale) nell'applicazione dell'ABP per l'individuazione di agenti stimolanti dell'eritropoiesi (ESA). Il progetto di implementazione dell'ABP, lanciato dall'UCI nel 2008, ha arruolato più di 800 ciclisti l'anno dal 2008 al 2010, per un totale di più di 100 profili. Durante i primi 3 anni del progetto UCI ABP, 26 atleti sono risultati positivi a presenza di ESA (10 nel 2008, 8 nel 2009 e 8 nel 2010), con un aumento notevole rispetto al 2007, anno precedente all'introduzione dell'ABP, in cui 3 atleti sono stati accusati di doping ematologico (1 per ESA e 2 per trasfusioni di sangue autologo (HBT home blood transfusion). Lo studio riporta dettagli su 4 casi specifici, come esempio di applicazione della procedura dell'ABP. Nel primo caso l'atleta ha mostrato un aumento di quasi il 100% della %RET in meno di 7 giorni, a seguito di analisi di urine per EPO (erythropoietin) e CERA (Continuous erythropoietin receptor activator) l'atleta è risultato positivo a CERA. Il caso dimostra che la %RET è un marcatore sensibile a questo genere di doping e sottolinea l'importanza di valutare i campioni in concomitanza con i periodi di competizione. Nel secondo caso un atleta ha mostrato un aumento della %RET per cui l'uso di ESA sembrava essere la causa più probabile. Per confermare l'ipotesi sono stati condotti test per EPO e CERA che hanno portato a confermare la presenza di rhEPO. Anche nel terzo caso un aumento della %RET e un profilo globale consistente con la somministrazione di ESA ha portato ad eseguire esami di conferma che hanno identificato la presenza di rhEPO. L'ultimo caso è riportato per sottolineare che per quanto si possano nutrire sospetti sui risultati delle analisi di uno specifico atleta, può trascorrere molto tempo prima che sia possibile formulare una condanna per doping. In questo caso, nonostante il profilo dell'atleta, con variazioni per vari mesi della %RET e dell'OFF-HR, sono stati necessari diversi tentativi prima di ottenere un esame di conferma positivo a rhEPO (recombinant human erythropoietin). In conclusione, l'uso dell'ABP può, in alcuni casi, avere una maggiore sensibilità rispetto ai metodi diretti nell'individuare soggetti che hanno fatto uso di doping. **BASSO RISCHIO DI BIAS**

Un recente studio (**Aguilar 2017**) utilizza i dati dei report pubblicati dalla WADA a partire dal 2003 come base per un'analisi dell'evoluzione del doping e delle misure anti doping nel periodo 2003-2017. È stato osservato un aumento annuale del numero di controlli antidoping, con una leggera riduzione del numero di campioni analizzati. Il numero di campioni analizzati è aumentato del 101% dal 2003 al 2015, in concomitanza con il miglioramento delle metodologie e del numero di sostanze/metodi inclusi nella lista delle sostanze proibite nello sport. Nello stesso arco di tempo, invece, il numero di esiti analitici avversi e atipici è rimasto stabile, a rappresentare una stabilità nella capacità di identificare il doping, ma anche un aumento significativo del numero assoluto di campioni catalogati come doping (da 2247 campioni avversi/atipici nel 2003 a 5912 campioni nel 2015). Non sono state osservate variazioni significative nelle percentuali di rilevazioni avverse e atipiche tra il 2008 e il 2015. È stato osservato un aumento della proporzione di rilevamenti relativi ad agenti anabolizzanti dal 2003 al 2009, dovuta principalmente alla riduzione del cut-off di positività del rapporto T/E (Testosterone/Epitestosterone) da 6/1 a 4/1, e poi una stabilizzazione del dato fino al 2015, dove si è osservata una riduzione notevole al 34.5% probabilmente dovuta all'implementazione del modulo steroideo dell'ABP. Il secondo gruppo di sostanze osservate nei rilevamenti avversi sono le sostanze stimolanti, la cui importanza in queste analisi potrebbe essere sottostimata in quanto proibiti solamente durante le competizioni e non nei periodi tra di esse. Altri gruppi di sostanze rappresentano proporzioni inferiori al 10% dei rilevamenti avversi. In conclusione, si osserva che la proporzione di rilevazioni avverse dei diversi gruppi di sostanze proibite è rimasto relativamente stabile negli ultimi anni. Per quanto i risultati del passaporto non siano riportati nei dati dei report utilizzati per questo studio, l'ABP risulta essere un elemento chiave per eseguire test mirati, sebbene si debba aspettare ancora qualche anno per aver più dati per valutarne l'efficienza. **BASSO RISCHIO DI BIAS**

Uno studio del 2017 (**Pereira 2017**) riporta l'esperienza di costruzione e gestione di un nuovo laboratorio nel campus dell'Università Federale di Rio de Janeiro in occasione Giochi della XXXI Olimpiade e dei XV Giochi paralimpici estivi (Rio 2016). Durante il periodo di Rio 2016 sono stati effettuati controlli per tutte le classi di sostanze proibite, ad eccezione del doping genetico, incluse le analisi per l'ABP. Durante le Olimpiadi, il laboratorio brasiliano per il controllo del doping (LBCE: Laboratorio Brasileiro de Controle de Dopagem) ha ricevuto 4913 campioni, di cui 4071 campioni di urine e 842 campioni di sangue. In totale, 2911 campioni erano prelevati in competizione (IC: in competition) e 2002 fuori da competizione (OOC: out of competition). Dei campioni di urine, 905 sono stati sottoposti ad analisi per gli agenti stimolanti l'eritropoiesi (ESA) e 302 ad analisi per l'insulina e per gli analoghi del fattore di crescita insulino-simile (IGF-I: insulin-like growth factor 1). Dei campioni di sangue, 444 sono stati analizzati per l'ABP, 289 sono stati sottoposti ad analisi per isoforme e biomarcatori dell'ormone della crescita (hGH: human growth hormone), 154 sono stati analizzati per gli agenti stimolanti l'eritropoiesi (ESA), 69 per le trasfusioni di sangue autologo (HBT) e 805 per i trasportatori di ossigeno a base emoglobinica (HBOCs: Hemoglobin-based oxygen carriers). Durante le Paralimpiadi, il LBCE ha ricevuto

un totale di 1987 campioni, di cui 1396 campioni di urine e 291 di sangue. In totale, 878 campioni erano IC e 809 OOC. Di questi, 964 provenivano da atleti maschi e 723 da atlete femmine. Dei campioni di urine, 205 sono stati sottoposti ad analisi per ESA e nessun campione è stato sottoposto ad analisi per insulina o analoghi dell'GF-I. Dei campioni di sangue, 2 sono stati analizzati per ESA, 40 per HBT, 46 per l'ABP, 291 per HBOCs e 244 per hGH, incluse isoforme e biomarcatori. Un totale di 33 campioni sono stati segnalati come esiti avversi (AAF: Adverse Analytical Finding) durante le Olimpiadi, di cui 18 sono stati considerati come "veri AAF". Tra i campioni che hanno fatto registrare un esito avverso, 7, provenienti da 3 atleti, sono risultati positivi al CERA (Attivatore Continuo del Recettore dell'Eritropoietina): di fatto, su tre atleti risultati positivi, 1 è stato rilevato grazie alla segnalazione di una anomalia del passaporto ematologico. Per quanto riguarda il modulo steroideo, su 177 campioni mandati in conferma con la GC-C-IRMS (Gas chromatography combustion isotope ratio mass spectrometry) su segnalazione dell'ABP, 2 sono stati confermati come veri positivi. In conclusione, l'introduzione di misure indirette come l'ABP (modulo ematologico e steroideo) ha permesso di monitorare durante lo svolgimento delle Olimpiadi l'uso illecito da parte degli atleti del crescente numero di sostanze proibite per doping della WADA. **BASSO RISCHIO DI BIAS**

Sintesi delle evidenze

La letteratura suggerisce una complementarità e in alcuni casi anche una maggiore sensibilità, del modello ABP rispetto ai metodi diretti e ai metodi indiretti basati su cut-off di popolazione, soprattutto in caso di utilizzo di sistemi di doping di più difficile rilevazione, come ad esempio l'autotrasfusione.

Dalle pubblicazioni scientifiche e dai report tecnici si rileva una difficoltà a valutare complessivamente, in modo quantitativo, la performance dell'ABP. Il costruito teorico e l'applicazione pratica del passaporto biologico, infatti, rendono oggettivamente difficoltoso valutare la sensibilità e specificità di questo strumento nel suo insieme. Sono disponibili, comunque, diversi studi in letteratura che riportano i valori di sensibilità e specificità dei singoli moduli, ematologico e steroideo, che compongono il passaporto biologico.

In alcuni report scientifici è stata eseguita una valutazione complessiva delle strategie antidoping utilizzate. I risultati sono di difficile interpretazione in quanto, ad esempio, non è sempre chiara la distinzione tra il dato relativo al campione e quello relativo al singolo atleta e, non è sempre chiara la segnalazione relativa a ciascuno strumento antidoping (Pereira 2017, Aguillar 2017, WADA report).

Raccomandazioni

Il modello dell'ABP sembra essere un valido complemento, e in alcuni casi avere una maggiore sensibilità, rispetto ai metodi diretti e ai metodi indiretti basati su cut-off di popolazione.

Data la difficoltà di produrre studi mirati a valutare i parametri di accuratezza dell'ABP, non sono disponibili evidenze sulla sensibilità e specificità dell'ABP nel suo insieme, ma sono disponibili evidenze sulla validità del modello statistico su cui l'ABP si basa e sui singoli moduli che lo compongono.

Raccomandazione di ricerca

Data la difficoltà di interpretazione dei dati prodotti da report e pubblicazioni relative alla valutazione della performance delle strategie antidoping correntemente utilizzate, sarebbe necessario produrre studi e/o report che riportino in modo più chiaro i dati relativi alle analisi antidoping effettuate con il modello ABP, ponendo una particolare attenzione a distinguere i dati relativi ai campioni da quelli relativi ai singoli atleti e specificando separatamente i dati relativi a ciascuno strumento di monitoraggio antidoping utilizzato, così da permettere una valutazione oggettiva di ciascuno strumento separatamente.

Bibliografia

Aguilar M, Muñoz-Guerra J, Plata MDM, Del Coso J. Thirteen years of the fight against doping in figures. Drug Test Anal. 2017 ;9(6):866-869.

Oliveira CD, Bairros AV, Yonamine M. Blood doping: risks to athletes' health and strategies for detection. *Subst Use Misuse*. 2014;49(9):1168-81.

Pereira HMG, Sardela VF, Padilha MC et al. Doping control analysis at the Rio 2016 Olympic and Paralympic Games. *Drug Test Anal*. 2017;9(11-12):1658-1672.

Robinson N, Dollé G, Garnier PY, Saugy M. 2011 IAAF World Championships in Daegu: blood tests for all athletes in the framework of the Athlete Biological Passport. *Bioanalysis*. 2012 Jul;4(13):1633-43.

Saugy M, Lundby C, Robinson N. Monitoring of biological markers indicative of doping: the athlete biological passport. *Br J Sports Med*. 2014;48(10):827-32.

Schumacher YO, d'Onofrio G. Scientific expertise and the Athlete Biological Passport: 3 years of experience. *Clin Chem*. 2012;58(6):979-85.

Sottas PE, Robinson N, Saugy M. The athlete's biological passport and indirect markers of blood doping. *Handbook of experimental pharmacology* 2010; 195: 305-26.

World anti-doping agency. website: <https://www.wada-ama.org/en/questions-answers/athlete-biological-passport> (consultato il: 13/12/2017)

WADA. Athlete Biological Passport. Operating Guidelines. Version 6.0. January 2017. (Disponibile online all'indirizzo: https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/guidelines_abp_v6_2017_jan_en_final.pdf)

Zorzoli Mario; Rossi Francesca. Case studies on ESA-doping as revealed by the Biological Passport. *Drug testing and analysis*. 2012;4(11):854-8.

Quesito 5

Esistono evidenze a supporto dell'introduzione nel passaporto biologico di ulteriori esami/moduli attualmente non inclusi nel documento della WADA (es. ormoni peptidici, fattori di crescita, ecc.)?

Studi reperiti tramite strategia di ricerca	1314
Studi selezionati e letti in full text	52
Studi inclusi	*

Background

Con l'introduzione da parte della WADA del Passaporto Biologico dell'Atleta, ovvero con l'applicazione nelle strategie di lotta al doping dei moduli che attualmente lo vanno a costituire (modulo ematologico e modulo steroideo), il contrasto all'uso di sostanze vietate si è evoluto passando da un concetto strettamente "analitico" della positività ad una sostanza e da un limite di normalità di marcatori d'uso basati su range di popolazione, all'applicazione di limiti di normalità individuali, ovvero costruiti su range che tengono conto della variabilità intra-individuale di ciascun atleta.

Un problema sempre attuale che ci si trova a dover affrontare nel contrasto all'uso di sostanze doping è quello legato alla matrice biologica che si intende utilizzare: sangue intero/plasma o siero, infatti, richiedono un tipo di prelievo invasivo, mentre l'urina è più facilmente collezionabile, sebbene sia anche più facilmente adulterabile. Queste matrici, inoltre, richiedono particolari attenzioni durante il trasporto e nella loro conservazione, al fine di evitare la degradazione/alterazione dei parametri di interesse o la contaminazione microbica (con l'attivazione di enzimi proteolitici) che possono portare ad una misinterpretazione del risultato analitico (**de la Torre et al. 2001**). Così, nel tempo, è stato studiato il potenziale utilizzo di matrici alternative, quali la matrice cheratinica (capelli) (**Rivier 2000**), la saliva (**Thieme 2012**) o i dried blood spot (DBS). Il campionamento mediante DBS consiste nel prelevare una goccia di sangue intero che, assorbita su una particolare carta da filtro, deve essere opportunamente essiccata prima di poter essere inviata piuttosto agevolmente al laboratorio che effettuerà le analisi di rito. Inizialmente ideata per l'indagine diagnostica di alcune malattie metaboliche sui neonati, nel tempo ha visto una sua applicazione nello sviluppo preclinico di nuovi principi attivi, negli studi tossicologici e di monitoraggio terapeutico dei farmaci. A causa della velocità di raccolta del campione, della sua semplicità e minima invasività, il DBS si propone come matrice alternativa nei test antidoping (**Tretzel 2015**).

Sia il modulo ematologico che quello steroideo inoltre, devono tenere conto di variabili che possono inficiarne la validità: per quanto riguarda il modulo steroideo, ad esempio, è noto come particolari varianti geniche possono influenzare alcuni marcatori inseriti nel pattern del modulo stesso. O, ancora, la sensibilità del passaporto biologico dell'atleta è limitata se l'effetto del doping a basse dosi genera variazioni che rimangono all'interno dell'intervallo di riferimento intra-individuale (**Delanghe et al. 2014**).

Così, l'obiettivo a lungo termine dell'ABP deve essere lo sviluppo di un ampio gruppo di biomarcatori di doping che possano tenere conto dei continui progressi della chimica analitica e di una migliore comprensione della biologia dei sistemi, anche utilizzando la nuova frontiera della scienza cosiddetta "omica". La ricerca nel campo della "-OMICA" (genomica, trascrittomica, proteomica, metabolomica) ha portato a una maggiore comprensione delle malattie a livello molecolare e ha stimolato lo studio di nuovi e più specifici biomarcatori per la diagnosi precoce delle malattie, la loro progressione e prognosi. Poiché si ipotizza che l'utilizzo di sostanze vietate per doping possano portare ad alterazioni a livello molecolare che possono essere misurabili e quantificabili, la ricerca d'avanguardia contro l'utilizzo di sostanze proibite sta cercando di applicare le strategie "-omiche" alla lotta contro il doping. L'idea alla base di questo tipo di ricerca è quella di individuare geni candidati o profili di espressione da utilizzare come marcatori molecolari di assunzione di sostanze dopanti (**Reichel 2011**), sui quali si possa anche prevedere di costruire un "profilo d'espressione" individuale.

D'altro canto, la WADA è impegnata su diversi fronti con esperti e soggetti interessati, con l'obiettivo di sviluppare e ulteriormente migliorare l'ABP. Essa sta altresì lavorando su un modulo endocrino che miri a rilevare l'abuso di fattori di crescita come l'ormone della crescita (GH). Il GH è un ormone naturalmente prodotto dall'organismo. E' sintetizzato e secreto dalle cellule della parte anteriore della ghiandola pituitaria, localizzata alla base del cranio. La sua secrezione nel circolo sanguigno avviene in maniera pulsatile, determinando ampie fluttuazioni dei livelli ematici che sono anche influenzati da fattori quali l'età, il genere, l'attività fisica, la dieta, lo stress, la febbre, gli steroidi e le condizioni ambientali. Nel siero umano, il GH è presente come una complessa combinazione di differenti isoforme, incluse

l'isoforma maggiore di 22-kDa e isoforme minori tra cui quella di 20 kDa. Inoltre, il GH si trova naturalmente sottoforma di aggregati di queste isoforme (dimeri e oligomeri che danno luogo a omo- ed eterodimeri). A seguito della secrezione nel torrente ematico, l'emivita dell'isoforma di 22 kDa è pari a 10-20 minuti (**WADA 2018**).

L'ormone della crescita viene indebitamente utilizzato da atleti professionisti e non, a causa delle sue proprietà anaboliche e lipolitiche che lo rendono una sostanza ergogenica ed in grado di migliorare le prestazioni sportive. Esso è attualmente inserito nella lista delle sostanze vietate per doping redatta dalla WADA.

Attualmente esistono due diversi approcci metodologici per rilevare un utilizzo illecito di rhGH nello sport: a) un approccio "diretto", che coinvolge metodi basati sulla relazione tra diverse varianti (isoforme) di hGH e b) un approccio indiretto, basato sulle variazioni di parametri indiretti che si modificano in relazione ad una assunzione di rhGH (metodo dei biomarcatori) (**Ferro et al. 2016**). La metodologia diretta si basa sui rapporti tra varie isoforme (o varianti) di GH, che rimangono piuttosto costanti in condizioni fisiologiche, ma sono alterati dopo la somministrazione esogena di rhGH. Le alterazioni tra i rapporti delle varie isoforme del GH possono essere rilevate mediante immunodosaggi specifici, ma solo per un breve periodo di tempo dall'assunzione del GH. La metodologia indiretta aumenta la finestra di rilevabilità della sostanza utilizzando due marcatori, l'IGF-1 ed il PIIINP, selezionati tra diversi marcatori presi in esame (**Ferro et al. 2016**). I gruppi di ricerca dei progetti GH-2000 e GH-2004 hanno sviluppato un metodo di rilevazione del GH utilizzando l'IGF-1 ed il PIIINP come marcatori indiretti di uso. In estrema sintesi, le concentrazioni analitiche dei marcatori rilevate analiticamente sono combinate in funzioni discriminanti aggiustate per sesso ed età che consentono il calcolo di uno score sulla base del quale è determinata la conformità (o meno) del risultato analitico (**Holt et al. 2015**). Il limite decisionale proposto per rilevare un abuso di GH in una popolazione di atleti professionisti è stato fissato tenendo conto di una specificità pari al 99,99%. In tale contesto, si potrà ottenere un falso positivo ogni 10.000 test effettuati.

Anche il metodo indiretto, tuttavia, non è esente da limitazioni: è influenzato ad esempio dal sesso e dall'età degli atleti. L'IGF-1, inoltre, ha una velocità di eliminazione maggiore rispetto al PIIINP, il che riduce la potenza retrospettiva dell'algoritmo unificato per entrambi i marcatori (**Ferro et al. 2016**). Pertanto, si rende necessario ricercare nuovi biomarcatori o sviluppare nuove tecniche affidabili, robuste e sensibili e che consentano di allargare la finestra di rilevabilità del GH.

Analisi delle evidenze

IGF1, PIIINP

Alcuni lavori hanno valutato la variabilità inter-individuale ed intra-individuale dell'IGF-1 e del PIIINP con l'obiettivo di valutare un possibile utilizzo degli stessi in qualità di biomarcatori d'uso di rhGH.

Uno studio del 2008 (**Nguyen 2008**) valuta la variabilità inter-individuale e intra-individuale (espressa come SD) a breve termine dei marcatori IGF-1, IGFBP-III, ALS, PINP, ITCP e PIIINP in una coorte di 1103 atleti professionisti di 10 diverse discipline sportive non meglio specificate ed età uguale o superiore a 14 anni (699 maschi e 404 femmine, età media 22.2 ± 5.2), che nei 12 mesi antecedenti il reclutamento avevano partecipato a competizioni regionali, nazionali o internazionali. La variabilità intra-individuale è stata valutata in termini di varianza totale, varianza analitica e varianza biologica. La coorte era costituita prevalentemente da individui maschi (63%) caucasici (54%) e a seguire da asiatici (32%), africani (10%) e polinesiani/australiani e altri (4,5%). Ai soggetti arruolati sono stati prelevati campioni di sangue in maniera casuale per quanto riguarda l'ora del prelievo, l'assunzione di cibo, l'attività fisica, l'essere o meno in competizione. Lo studio ha previsto la raccolta in media di 3 campioni venosi per soggetto in un periodo di tempo variabile tra le 2 e le 3 settimane. Il risultato delle indagini ha mostrato come la varianza inter-individuale rende conto della maggior parte della variabilità osservata nei marcatori in esame. In particolare, la variabilità inter-individuale rappresenta dal 64 al 68% della variabilità totale dei marcatori dell'asse IGF, e dall'87 al 96% della variabilità totale dei marcatori del collagene. La variabilità intra-individuale, invece, rappresenta dal 4 al 36% della variabilità totale, ed in particolare oscilla tra il 32 ed il 36% per i marcatori dell'asse IGF, mentre varia dal 4 al 13% per i marcatori del collagene (PINP, ITCP, PIIINP). La variabilità intra-individuale è dovuta soprattutto alla variabilità biologica (80-95% della variabilità intra-individuale). Quando espressa come CV, la variabilità intra-individuale per IGF-1, IGFBP-III, ALS è risultata compresa tra l'11 ed il 21% (più alta nell'IGF-1). Quella relativa a PINP, ITCP e PIIINP è risultata compresa tra il 13 ed il 15% (14,3 nel PIIINP). Gli autori concludono che qualora sia disponibile un solo valore analitico relativo a tutti i marcatori studiati, un approccio statistico di tipo bayesiano può stimare il valore probabile che si misurerà in una successiva valutazione a lungo termine. **BASSO RISCHIO DI BIAS**

Uno studio trasversale (**Guha 2010**) valuta la possibilità di validare l'IGF-I ed il PIIINP come biomarcatori d'uso di GH in un campione di 157 atleti caucasici adolescenti di elite (85 maschi, 72 femmine) appartenenti a 16 diverse discipline sportive (inclusi sport di resistenza, di potenza, atletica, nuoto ginnastica etc.) con un'età compresa tra i 12 e i 20 anni. I risultati ottenuti per il biomarcatore IGF-1 hanno dimostrato che tutte le osservazioni ottenute sono risultate inferiori al limite di predizione superiore del 99% estrapolato dallo studio GH-2000 per gli atleti adulti, mentre circa il 14% è

risultato minore del limite inferiore. Rispetto al biomarcatore PIIINP le concentrazioni rilevate sono state più elevate del limite superiore nell'11,8% degli atleti maschi e nel 4,2% delle femmine. Inoltre, approssimativamente il 12% delle osservazioni sono risultate al di sotto del limite inferiore. Applicando il punteggio soglia di 3.7, individuato nello studio GH-2000, alla popolazione esaminata in questo studio, nessun atleta adolescente avrebbe superato tale limite indicando, quindi, che nessuno sarebbe stato accusato di doping. Tuttavia, un numero significativo di atleti adolescenti ha ottenuto punteggi superiori a 3.0 e, poiché, entrambi i marcatori in età leggermente differenti per i maschi e per le femmine raggiungono i loro picchi di espressione nell'intervallo di età considerato nello studio, i valori ottenuti dagli esami debbono essere sempre interpretati con cautela per evitare falsi positivi. **BASSO RISCHIO DI BIAS**

Uno studio del 2013 (**Kniess 2013**) valuta la variabilità intra-individuale dell'IGF-1 e del PIIINP come marcatori dell'rhGH in atleti che effettuavano almeno sei sessioni di allenamento intensivo a settimana prendendo in considerazione le variazioni dovute ai diversi carichi di lavoro. Tutti gli atleti reclutati nello studio gareggiavano a livello regionale, nazionale ed internazionale. Sono stati valutati 50 atleti (31 femmine di cui 26 pallavoliste e 5 canoiste, età media $19,8 \pm 3,7$ e 19 maschi di cui 12 calciatori e 7 canoisti, età media $19,1 \pm 2,1$), i quali sono stati sottoposti a 8 prelievi di sangue in un arco di tempo variabile tra i 10 ed i 18 mesi (media: 13,5 mesi) e con un intervallo di tempo fra un prelievo e l'altro di almeno 4 settimane. I prelievi sono stati effettuati sempre alla stessa ora e prima dell'allenamento sportivo. I risultati ottenuti per quanto riguarda le concentrazioni ematiche di IGF-1 mostrano che non ci sono differenze significative tra maschi e femmine. È stato rilevato un ampio range di valori dell'IGF-1 tra gli atleti, e ciò riflette l'elevata variabilità interindividuale del biomarcatore. La variabilità intra-individuale invece, misurata come coefficiente di variazione (CV), è risultata essere compresa tra il 6 ed il 26%. In particolare, tale variabilità è risultata più elevata nelle atlete rispetto agli atleti ($14,6 \pm 5,4\%$ nelle femmine, $10,4 \pm 3\%$ nei maschi). Non è stata trovata nessuna differenza significativa tra atleti con più o meno di 18 anni. Non è stato possibile valutare l'influenza del tipo di sport praticato sulla concentrazione dell'IGF-1 a causa dell'esiguo numero di campioni. Per quanto riguarda il PIIINP, invece, la variabilità intra-individuale è risultata compresa tra il 6 ed il 33%. Anche per questo marcatore, la variabilità intra-individuale nelle atlete è risultata significativamente più elevata ($17,1 \pm 5,4\%$) di quella rilevata tra gli atleti ($11,3 \pm 3,8\%$). Anche in questo caso non è stata rilevata nessuna differenza significativa tra gli atleti con più o meno di 18 anni per entrambi i sessi. Negli atleti maschi i livelli ematici di PIIINP sono in media significativamente più elevati che nelle atlete. Infine, è stata osservata una variazione dal 4 al 36% delle differenze intra-individuali negli score del test GH-2000, espresse come CV, marcatamente inferiori nella maggior parte dei soggetti rispetto alla variazione interindividuale. Nella maggior parte dei casi, i cut-off individuali secondo gli score di GH-2000, sembrerebbero risultare inferiori a quelli basati sui valori di popolazione. **BASSO RISCHIO DI BIAS**

Alcuni lavori hanno valutato sia la variabilità inter- ed intra-individuale dell'IGF-1 e del P-IIINP che la loro variazione a seguito della somministrazione di rhGH, sia quando esaminati singolarmente che quando studiati in combinazione con altri marcatori dell'asse IGF o con altri marcatori del collagene.

Uno studio cross sectional del 2002 (**Di Luigi & Guidetti 2002**) valuta il possibile effetto della somministrazione di GH ricombinante (0.09 IU/kg/die) a due diversi dosaggi (6 giorni a settimana o 3 giorni a settimana per 3 settimane) sui valori ematici di GH, IGF-1, IGFBP2, IGFBP3 e sui loro rapporti (IGF-1/IGFBP-2, and IGFBP-3/IGFBP-2). Le analisi sono state effettuate sui dati provenienti da 7 soggetti di sesso maschile, normalmente impegnati in attività sportive non professionistiche della durata di circa 12-15 ore alla settimana. Ai volontari è stato somministrato GH ricombinante 6 giorni a settimana per 3 settimane (trial A), facendo seguire un wash-out di due mesi prima dell'inizio del secondo trattamento (GH ricombinante 3 volte a settimana per 3 settimane, trial B). I prelievi ematici per il trial A sono stati effettuati prima del trattamento (baseline), durante il trattamento (nei giorni +2, +3, +4, +8, +15), alla fine del trattamento e durante il follow-up (nei giorni +3, +6, +9, +12, +15); quelli relativi al trial B sono stati effettuati prima (baseline), durante (nei giorni +8, +15) e alla fine del trattamento e durante il follow-up (nei giorni +3, +6, +9, +12, +15). I risultati più significativi riguardano l'aumento di IGF-1 e IGFBP-3 ad entrambe le modalità di somministrazione; tuttavia, tali valori raramente eccedono i valori di riferimento. L'utilizzo di tali parametri indiretti per la valutazione dell'assunzione di rhGH esogeno a fini di doping diviene complicato. Lo studio sottolinea la difficoltà di utilizzare parametri indiretti per valutare l'assunzione di rhGH esogeno a fini di doping. In conclusione, lo studio evidenzia il fatto che i parametri valutati, sebbene siano risultati poco sensibili in termini assoluti, possono avere una qualche utilità se considerati nell'ambito di una valutazione intra-individuale longitudinale. **ALTO RISCHIO DI BIAS**

Uno studio successivo (**Sartorio 2004**) riporta i risultati di un trial in cui sono stati valutati sia i livelli basali di IGF-1, PIIINP, ICTP, e la loro variazione a seguito della somministrazione di rhGH. Lo studio ha arruolato un gruppo di controllo composto da 66 atleti (definiti come soggetti sottoposti a regolare allenamento 2-3 h/die per 4-5 gg/settimana negli ultimi 3 anni) caucasici maschi (età media 25 ± 5 anni) e un gruppo in trattamento con rGH costituito da 6 atleti di sesso maschile non coinvolti in competizioni sportive ufficiali (età media 24 ± 2 anni). Le analisi dei marcatori in esame sono state condotte prima e dopo la sessione di allenamento

nel gruppo di controllo e prima e al termine di ciascuna delle 3 settimane di trattamento con rGH (0.09IU/Kg per 6 giorni alla settimana per 3 settimane) nel gruppo trattato (in totale 18 campioni). È stato osservato un aumento significativo e progressivo dei livelli di IGF-1, PIIINP e ICTP rispetto al baseline, osservabile fino alla fine della terza settimana di trattamento. Non sono state osservate variazioni significative nei livelli di GH. In conclusione, lo studio mostra che l'assegnazione di un punteggio ad ogni marcatore investigato è risultato in 1 solo allerta falso positivo su 66 atleti arruolati in assenza di trattamento con GH, mentre sono stati riscontrati 12/18 valori anomali nei soggetti trattati con rGH (66.7%), con 6/6 score positivi alla terza settimana di trattamento e 3/6 alla prima e seconda settimana. La strategia proposta dallo studio, quindi, riporta una sensibilità del 50% alla prima e seconda settimana di trattamento con rGH e del 100% alla fine della terza settimana di trattamento, con una specificità del 98.5%. **ALTO RISCHIO DI BIAS**

In un RCT relativamente più recente (**Powrie 2007**) gli autori hanno studiato la variazione dell'IGF-1 e del PIIINP in una popolazione di volontari sani (53 maschi e 49 femmine, età 18-35 anni) che pur non prendendo parte a competizioni sportive, risultavano tuttavia ben allenati. La popolazione è stata suddivisa in tre bracci: i primi due hanno ricevuto tutti i giorni per 28 giorni rhGH a basso (15 maschi e 15 femmine, 0.1 IU/kg/day) o elevato dosaggio (22 maschi e 19 femmine, 0.2 IU/Kg/die), mentre il terzo braccio ha ricevuto un placebo (16 maschi e 15 femmine). I volontari hanno effettuato prelievi nei giorni 21 e 28 (in trattamento) e durante il periodo di wash out (prelievi nei giorni 30, 33, 42 e 84). Inoltre, lo studio ha incluso una popolazione di 813 atleti professionisti (effettuando un prelievo di sangue entro le due ore successive il termine di una competizione sportiva di livello nazionale o internazionale), con l'obiettivo di creare un range di riferimento per la popolazione di atleti, per i parametri oggetto di analisi. I risultati ottenuti mostrano che, per quanto riguarda l'IGF-1, i maschi trattati con rhGH hanno una variazione più marcata rispetto alle femmine. Le donne trattate con GH a dosaggio elevato mostrano un incremento significativamente più marcato nei giorni 21 e 28. Questi livelli si mantengono elevati anche il 30° giorno, ma non al giorno 33. La somministrazione di GH a basso dosaggio, invece, determina un incremento statisticamente non significativo. Gli uomini invece, mostrano un incremento significativo nei giorni 21 e 28 ad entrambi i dosaggi di GH (basso e elevato). I livelli iniziano a decrescere con la fine del trattamento, ma rimangono significativamente elevati nei giorni 30 e 33. Per quanto riguarda il PIIINP, nelle donne si rilevano valori significativamente più elevati in entrambi i gruppi trattati con rhGH rispetto al placebo dal giorno 21 al giorno 42. Negli uomini si osservano le stesse variazioni osservate nelle donne, ma, nel gruppo trattato con rhGH ad elevato dosaggio, i valori di PIIINP rimangono significativamente più elevati rispetto al placebo fino al giorno 84. Per quanto riguarda i valori di IGF-1 e PIIINP misurati negli atleti professionisti, lo studio rileva che essi mostrano una diminuzione significativa con l'aumentare dell'età. Sono inoltre significativamente più elevati quando misurati in atleti al termine di una competizione rispetto alla popolazione generale o ad atleti fuori competizione. Non sono state rilevate differenze legate alla tipologia di sport praticato. Utilizzando l'analisi discriminante ed effettuando una correzione per l'età, gli autori propongono di utilizzare una formula matematica in grado di discriminare gli utilizzatori di GH in funzione dei marcatori studiati (IGF-1 e PIIINP). Sulla base dei risultati derivanti dall'applicazione della formula matematica sviluppata, gli autori propongono un cut-off pari a 3.7. Tale cut-off è in grado di discriminare gli atleti che hanno assunto GH con una possibilità di errore di 1:10.000. **BASSO RISCHIO DI BIAS**

Uno studio del 2008 (**Nelson 2008**) analizza la farmacodinamica dei marcatori sierici sia dell'asse IGF (IGF-1, IGFBP-3, ALS) che dei marcatori del collagene (PINP, ICTP, PIIINP), in risposta alla somministrazione di GH in atleti non professionisti sottoposti ad almeno 2 sessioni di allenamento /settimana nell'ultimo anno. Inoltre stabilire lo studio aveva come obiettivo secondario quello di valutare se esiste una differenza di genere nella risposta al GH e se questa è influenzata dalla contemporanea assunzione di testosterone (T). Sono stati arruolati 96 atleti non professionisti (63 maschi, 33 femmine, età 18-40 anni) che praticavano sport di resistenza (n=22), di potenza (n=10), o un allenamento di tipo misto (n=64). I volontari arruolati sono stati suddivisi per genere e randomizzati in 2 bracci (le femmine) o tre (i maschi). In particolare, 17 atlete hanno ricevuto rhGH (2 mg/die) e 16 un placebo per otto settimane seguito da 6 settimane di washout, mentre 15 atleti hanno ricevuto rhGH (2 mg/die) per otto settimane seguito da 6 settimane di wash-out, 16 solo testosterone (250 mg/settimana), 16 sia rhGH che testosterone e 16 un doppio placebo. I campioni biologici (sangue e urine) sono stati raccolti due settimane prima dell'inizio del trattamento (wk-2), alla baseline (wk 0), durante il trattamento (wk 2, 4, 6, 8) e durante il periodo di wash-out (giorno 1, 2, 4 e 7; poi 2, 4, 6 settimane dopo la fine del trattamento). I risultati del lavoro mostrano che per quanto riguarda i marcatori dell'asse IGF, alla baseline, non emerge nessuna differenza nei diversi gruppi in trattamento (sia uomini che donne). Nel confronto di genere, alla baseline, solo ALS è più elevato nelle femmine rispetto ai maschi. Al termine del trattamento (8ª settimana), il GH ha modificato significativamente le concentrazioni sieriche di tutti i marcatori dell'asse IGF rispetto al placebo (per l'IGF-1, l'incremento osservato è maggiore rispetto a quella degli altri marcatori: circa tre volte superiore rispetto agli altri). L'incremento delle concentrazioni di IGF-1, IGFBP-3 e ALS è maggiore negli uomini rispetto alle donne (circa 1.6 volte maggiore negli uomini per IGF-1 e ALS). L'aggiunta di T non influenza significativamente nei maschi l'aumento di IGF-1, IGFBP-3 e ALS indotto dal GH. Per quanto riguarda i marcatori del collagene, alla baseline, non emerge nessuna differenza nei diversi gruppi in trattamento (sia uomini che donne). Il PIIINP nelle femmine, alla baseline, è leggermente

(ma significativamente) più elevato nel braccio del placebo rispetto a quello del trattamento. PINP alla baseline è più elevato nei maschi rispetto alle femmine. Al termine del trattamento (8^a settimana), il GH ha modificato significativamente le concentrazioni sieriche di tutti i marcatori del collagene rispetto al placebo. La variazione più marcata è stata quella del PIIINP (1.7 volte maggiore rispetto al PINP, ICTP e IGF-1). Le concentrazioni sieriche dei marcatori del collagene aumentano e diminuiscono più lentamente rispetto ai marcatori dell'asse IGF, rimanendo elevati anche dopo le 6 settimane di wash out (a differenza dei marcatori dell'IGF che si normalizzano entro 1 settimana). L'incremento delle concentrazioni di PINP, ICTP e IGF-1 è maggiore di circa due volte nei maschi rispetto alle femmine. Nei maschi, l'aggiunta di T alla somministrazione di GH non influenza significativamente l'aumento di PINP e ICTP indotto dal GH. Tuttavia, nel caso del PIIINP, l'aggiunta di testosterone alla somministrazione di GH ne aumenta le concentrazioni di 1.65 volte rispetto al solo trattamento con il GH. Il trattamento con il solo T negli uomini, determina un incremento di PINP, ICTP o PIIINP sierico, pari rispettivamente a circa il 20, 10 e 30% rispetto all'incremento determinato dall'assunzione di GH. **BASSO RISCHIO DI BIAS**

Uno studio del 2009 (**Abellan 2009**) confronta la variabilità inter-laboratorio di 4 marcatori dell'rhGH (IGF-II, IGFBP-2, IGFB-3, ICTP) nonché la ripetibilità analitica e l'accuratezza intra-laboratorio. Le analisi sono state effettuate sui dati provenienti da 221 soggetti (134 maschi e 87 femmine) suddivisi in tre gruppi (sedentari n=64, atleti dilettanti n=80, atleti professionisti di diverse discipline, n=77). In particolare, è stata valutata 1) la variabilità intra-individuale di IGF-II, IGFBP-2, IGFB-3, ICTP in atleti professionisti nel corso della stagione di allenamento (all'inizio della stagione di allenamento, quando il carico di lavoro è minimo, nel mezzo della stagione, quando il carico di lavoro è medio ed alla fine della prima gara effettuata, quando il carico di lavoro è massimo); 2) la variabilità interindividuale negli atleti professionisti rispetto agli atleti amatoriali e nei soggetti sedentari. I risultati dello studio hanno mostrato un effetto significativo del genere sui livelli ematici di IGF-II e IGFBP-2, con valori significativamente meno elevati negli uomini, e un effetto dell'età sui valori di IGF-II, IGFBP-2 e ICTP, con valori più elevati nei soggetti più giovani. Inoltre, per quanto riguarda gli atleti professionisti, i valori basali dell'IGFBP-2 e dell'IGFBP-3 sono significativamente più elevati rispetto agli atleti amatoriali e ai sedentari. Inoltre, il tipo di sport praticato influenza sia l'IGFBP3 che l'ICTP. È stato osservato un aumento dei valori della variabilità intra-individuale aumenta per l'IGFBP2 durante la stagione di allenamento in alcuni sport quali il sollevamento pesi e taekwondo. Prendendo in considerazione tutti gli atleti professionisti durante la stagione sportiva, il coefficiente di variazione intra-individuale è risultato inferiore per l'IGF-II (9,3%) e l'IGFBP-3 (9,8%), e maggiore per l'IGFBP-2 (24,7%) e l'ICTP (28,6%). In conclusione, lo studio suggerisce che sebbene i marcatori analizzati abbiamo mostrato una performance accettabile ai fini antidoping, sembra essere necessaria una ulteriore armonizzazione di alcuni parametri analitici per migliorare la riproducibilità e comparabilità dei risultati. Lo studio sottolinea inoltre che la variabilità dei valori ematici dei parametri considerati tra le popolazioni in studio dovrebbe essere presa in considerazione nella costruzione dei valori di riferimento per il monitoraggio antidoping. **BASSO RISCHIO DI BIAS**

IGF1 ed IGFBP-3 utilizzati a scopo di doping

Poiché l'IGF-1 ricombinante (rhIGF-1) può essere utilizzato a fini di doping da solo o in associazione all'rhGH, alcuni autori (**Guha 2013**) hanno studiato le variazioni delle concentrazioni sieriche dell' IGF-II, IGFBP-2, IGFBP-3 e ALS e di alcuni marcatori del collagene e del turnover osseo (osteocalcina, ICTP e PICP) in risposta alla somministrazione combinata di rhIGF-1 e rhIGFBP-3. Lo studio ha arruolato 56 atleti amatoriali in buona salute (30 uomini e 26 donne, età 18-30 anni) praticanti attività fisica in modo regolare (almeno 2 sessioni di allenamento/settimana). I soggetti arruolati sono stati randomizzati in tre bracci in un trial in doppio cieco: rhIGF-I/ rhIGFBP-3 a basso dosaggio (30 mg / die, 9 donne e 10 uomini), rhIGF-I/ rhIGFBP-3 ad elevato dosaggio (60 mg/die, 9 donne e 10 uomini) più un braccio di controllo (placebo, 8 donne e 10 uomini), per una durata del trattamento pari a 28 giorni. I risultati dello studio hanno evidenziato che nelle donne del gruppo trattato con alte dosi di rhIGF-I/ rhIGFBP-3, le concentrazioni sieriche medie di IGF-II e ALS sono diminuite rispettivamente del 53% e del 40% al 21° giorno di trattamento, mentre l'IGFBP-2 è aumentato del 119%. Non sono stati osservati cambiamenti significativi nell'IGFBP-3, nell'osteocalcina, nell'ICTP o PICP. Negli uomini del braccio in trattamento con rhIGF-I/rhIGFBP-3 ad elevato dosaggio, le concentrazioni sieriche medie di IGF-II sono diminuite del 51% al 21° giorno di trattamento, mentre, nello stesso periodo di trattamento, l' IGFBP-2 è aumentato del 125%. Non sono stati osservati cambiamenti significativi nelle concentrazioni sieriche diIGFBP-3, ALS, osteocalcina, ICTP o PICP. Gli autori pertanto concludono lo studio proponendo l' IGFBP-2 e l'IGF-II come marcatori per rilevare l'abuso di rhIGF-I /rhIGFBP-3 in individui di entrambi i sessi. **ALTO RISCHIO DI BIAS**

Successivamente i medesimi autori (**Guha 2014**) hanno valutato in uno studio controllato randomizzato in doppio cieco, la risposta di IGF-I, P-III-NP e GH-2000- score alla somministrazione di rhIGF-I/rhIGFBP-3 per un periodo di 28 giorni. I partecipanti erano 56 atleti amatoriali (26 donne e 30 uomini, età media 18-30 anni) praticanti attività fisica in modo regolare (almeno 2 sessioni di allenamento/settimana) divisi in tre bracci in funzione del trattamento ricevuto: rhIGF-

I/rhIGFBP a basse (30 mg/die) o alte dosi (60 mg/die) -3 o con placebo. I risultati dello studio hanno mostrato che tutti e tre i marcatori oggetto di indagine (IGF-I, P-III-NP e il GH-2000-score) aumentavano sia nei soggetti trattati con rhIGFI / rhIGFBP-3 ad elevato dosaggio che nei soggetti trattati con rhIGFI/rhIGFBP-3 a basso dosaggio. In particolare l'IGF-I arrivava ad aumentare fino a 4 volte, mentre il PIIIINP aumentava del 40-50%. La sensibilità più elevata (94%) si aveva utilizzando soltanto le concentrazioni di IGF-I rispetto all'uso combinato di IGF-1 e PIIIINP della formula di GH-2000.

BASSO RISCHIO DI BIAS

FATTORI CONFONDENTI

Tre studi hanno valutato l'effetto di sessioni di attività fisica intensa sui parametri indiretti utilizzati per la determinazione di abuso di GH a fini di doping.

Il primo studio (**De Palo 2005**) analizza l'effetto dell'esercizio fisico strenuo per periodi prolungati sui livelli plasmatici e urinari di IGF-I. Lo studio ha utilizzato campioni prelevati da 20 ciclisti professionisti maschi di età compresa tra 17 e 18 anni, peso compreso tra 56 e 77 kg (media 65.3 kg) e altezza compresa tra 158 e 189 cm (media 168.2) prelevati 10-20 minuti prima e subito dopo una gara in montagna di circa 102 km. Al termine della gara è stato osservato un aumento significativo dei livelli urinari di IGF-I, proteine e creatinina rispetto a prima della gara. Non sono state osservate differenze significative tra i livelli di pIGF prima e dopo la gara. Non è stata osservata alcuna correlazione significativa tra pIGF e uIGF, mentre è stato osservato un aumento significativo del rapporto pIGF/uIGF al termine della competizione rispetto a baseline. In conclusione, lo studio suggerisce che la misurazione dell'IGF-I può rappresentare un'utile aggiunta alle analisi antidoping non solo per l'identificazione di abuso di IGF-I, ma anche di altre sostanze correlate al sistema GH/IGF. **BASSO RISCHIO DI BIAS**

Il secondo studio (**Pichini 2010**) confronta i livelli dei biomarcatori per GH (GH, IGF-1, IGF-2, IGFBP-2, insulina, peptide C, beta2-microglobulina e proteinuria totale) in atleti professionisti (affiliati a federazioni sportive o appartenenti a squadre sportive nazionali o internazionali), atleti dilettanti (attività sportiva a bassa intensità e non appartenenti ad alcuna organizzazione sportiva) e soggetti sedentari (individui non praticanti attività sportiva). Lo studio ha utilizzato i dati provenienti da un totale di 61 individui (28 maschi e 33 femmine), di cui 26 atleti (17 maschi e 9 femmine, età media 21±3 anni), 18 atleti dilettanti (9 maschi e 9 femmine, età media 23±5 anni) e 7 volontari sani (2 maschi e 5 femmine, età media 28±9 anni). Gli atleti professionisti sono risultati avere livelli di peptide C maggiori rispetto agli altri due gruppi, mentre non sono state osservate differenze significative tra gruppi nei livelli degli altri parametri considerati. Tra gli atleti professionisti, i soggetti che praticavano taekwondo hanno mostrato livelli maggiori di IGF-2, mentre gli atleti che praticavano sollevamento pesi hanno mostrato livelli inferiori di IGF-1 e IGFBP-3. In conclusione, lo studio sottolinea che le variazioni osservate nei livelli urinari di peptide C negli atleti professionisti rispetto agli altri 2 gruppi e le fluttuazioni nei marcatori osservate tra gli stessi atleti professionisti dovrebbero essere prese in considerazione nella ricerca di possibili sistemi di identificazione di abuso di GH a fini di doping. **ALTO RISCHIO DI BIAS**

Il terzo studio (**Voss 2013**) analizza il possibile effetto di diversi giorni di allenamento intensivo sui suoi rapporti tra isoforme di GH utilizzati per le analisi antidoping. Lo studio ha utilizzato campioni prelevati da 15 ciclisti amatoriali e triatleti maschi (età media 28,3 ± 4.5 anni; VO₂max 63,5 ± 5.8 ml kg⁻¹ min⁻¹) sottoposti ad una simulazione di regime di competizione, con 3 giorni di riposo, seguiti da 9 giorni di gara, seguiti infine da 3 giorni di recupero. La gara a tappe simulata è stata progettata in modo tale da essere il più simile possibile ad una gara vera e propria. Lo studio conclude che il rapporto tra isoforme di hGH mostra una notevole variabilità individuale e pertanto risulta difficile la sua applicazione come marcatore all'interno dell'ABP. Sottolinea, inoltre, che, sebbene l'effetto dell'esercizio fisico strenuo, a lungo termine, sui rapporti tra isoforme di GH non sia ancora chiarito, non sembra comunque interferire in modo significativo con i range di riferimento per la definizione di valori anomali. **BASSO RISCHIO DI BIAS**

Altri due studi invece hanno valutato l'influenza di specifici fattori demografici sui parametri utilizzati per la rilevazione di abuso di GH a fini di doping.

Uno studio del 2009 (**Nelson 2009**) utilizza i dati di un ampio studio cross-sectional per analizzare l'influenza dei fattori demografici sui marcatori responsivi al GH. I dati dello studio osservazionale si riferiscono ad un campione di 1103 atleti professionisti (699 atleti e 404 atlete) provenienti da 12 nazioni differenti, in rappresentanza dei 4 principali gruppi etnici (caucasici, asiatici, africani e australiani) e da 10 diverse discipline sportive. I risultati hanno mostrato una correlazione negativa significativa tra età e tutti i marcatori dell'asse IGF e del collagene. I marcatori ematici di IGF sono risultati tutti più alti nelle donne, mentre i marcatori del collagene sono risultati maggiori nei maschi. Per i marcatori dell'asse IGF, le differenze sono risultate maggiori per ALS rispetto a IGFBP-3 e IGF-I. Per i marcatori del collagene le differenze sono risultate considerevoli per PINP e ICTP, mentre il PIIIINP è risultato solo moderatamente maggiore. Le differenze tra genere sono rimaste significative anche dopo correzione per età. Non sono state osservate correlazioni significative tra i marcatori in studio e BMI e etnia degli atleti. I marcatori dell'IGF sono risultati inferiori negli sport da combattimento e maggiori negli sport di potenza e resistenza, mentre i marcatori del collagene sono risultati maggiori negli sport da combattimento. L'IGF-I è risultato significativamente inferiore negli sport da combattimento e in quelli

di squadra rispetto agli sport di potenza e resistenza, mentre IGF-1 e ALS sono risultati significativamente inferiori negli sport di combattimento rispetto a quelli di resistenza e potenza. In conclusione, lo studio mostra che età e genere risultano essere i maggiori determinanti di variabilità dei marcatori di IGF-1 e collagene, mentre etnia e tipo di sport hanno una minore influenza. **BASSO RISCHIO DI BIAS**

Un secondo studio (**Sgrò 2016**) valuta l'effetto di dosi superiori a quelle fisiologiche di rhGH sull'asse HPT e il possibile ruolo del genere sullo status dell'asse HPT durante e dopo somministrazione di rhGH. Lo studio utilizza dati di 9 volontarie (età media 24.2 ± 3.5 anni) e 13 volontari (età media 23.3 ± 2.3 anni) caucasici che praticavano un allenamento regolare di circa 12 ore a settimana in diversi sport di squadra, ma non erano coinvolti in competizioni ufficiali. Tutti i partecipanti sono stati trattati con rhGH somministrato per via sottocutanea 6 giorni a settimana per 3 settimane. Nelle donne, la somministrazione di rhGH ha prodotto un aumento significativo dei livelli di IGF-1, che sono tornati rapidamente ai valori di baseline subito dopo sospensione del trattamento. Negli uomini i livelli di IGF-1 sono aumentati durante tutto il trattamento, per poi diminuire lentamente dopo la sospensione del farmaco, ma senza tornare ai livelli di baseline. I livelli di IGF-1 sono risultati significativamente maggiori negli uomini rispetto alle donne. Nelle donne, il trattamento ha prodotto una diminuzione transitoria dei livelli di TSH e FT4, mentre nei maschi ha prodotto una diminuzione stabile dei livelli di TSH e FT4. Durante il trattamento sono stati osservati livelli significativamente inferiori di TSH e FT4 negli uomini rispetto alle donne. In conclusione, lo studio mostra che la somministrazione di rhGH induce risposte diverse per genere nell'asse HPT, con un'inibizione precoce del TSH in entrambi i sessi. **BASSO RISCHIO DI BIAS**

FN1

Due studi recenti hanno valutato la possibilità di utilizzare la fibronectina 1 (FN1) come possibile marcatore complementare o alternativo all'IGF-1 ed il PIIINP attualmente riconosciuti dalla WADA per rilevare un abuso di GH.

Il primo studio (**Ferro 2016**) descrive un nuovo approccio genetico e proteomico su soggetti sani provenienti da due trial clinici. Il primo trial, controllato e randomizzato, ha utilizzato dati provenienti da 10 volontari trattati con rhGH e 4 volontari sani, non trattati, come gruppo di controllo. Il secondo trial ha utilizzato dati provenienti da 3 volontari trattati con GHRP-2 e 2 soggetti non trattati. Lo studio ha analizzato i geni FN1 e RAB31 e le relative proteine prima e dopo i trattamenti considerati. Nel primo studio, i valori dei geni hanno mostrato un aumento, sia a livello di mRNA che di proteina, a seguito di trattamento con rhGH, mentre il FN1 ha mantenuto livelli maggiori per un periodo più prolungato (fino a 216 ore dopo il trattamento), risultando, quindi, un marcatore genetico più interessante. Nel secondo studio, invece, non sono state osservate differenze tra significative tra gruppi nei marcatori in studio. **ALTO RISCHIO DI BIAS**

Il secondo studio (**Ferro 2017**), valuta la possibile utilità della fibronectina 1 (FN1) come biomarcatore di abuso di rhGH utilizzando come matrice biologica il *dried blood spot* (DBS). Lo studio ha utilizzato campioni prelevati da un totale di 14 volontari sani di età compresa tra 20 e 30 anni, peso medio di 72.9 ± 8.7 kg e BMI medio di 22.5 ± 3.5 , di cui 10 trattati con rhGH e 4 controlli. Per valutare il potenziale effetto di sesso ed età, lo studio ha considerato anche i dati provenienti da campioni di urine prelevati da 13 donne sedentarie e 14 uomini sedentari di età compresa tra 21 e 30 anni. Un'ulteriore set di analisi sono state condotte sui dati provenienti da un campione di atleti composto da 21 ciclisti, 8 calciatori, 14 nuotatori e 11 triatleti. A seguito di somministrazione di rhGH, è stato osservato un aumento dei livelli di FN1 sia nei campioni DBS che nei campioni urinari nei soggetti trattati rispetto ai non trattati. I soggetti trattati con dosi maggiori di rhGH hanno mostrato livelli maggiori di FN1 rispetto ai soggetti trattati con dosi inferiori. Non sono state osservate differenze significative nei livelli di FN1 tra donne e uomini. In un'analisi secondaria, non è stata osservata alcuna variazione di FN1 in funzione dell'età. Sono state, inoltre, osservate differenze significative tra i diversi sport considerati rispetto ai soggetti sedentari. In conclusione, dato il profilo logistico vantaggioso dei DBS, se ne suggerisce uno studio più approfondito come interessanti alternative per la misurazione di FN-1 nell'ambito delle analisi antidoping. **BASSO RISCHIO DI BIAS**

Altri parametri

Uno studio del 2009 (**Mitchell 2009**) valuta il profilo di espressione genica nei leucociti ricavati da sangue periferico nell'identificare soggetti che hanno fatto uso di GH a fini di doping. Lo studio, condotto in doppio cieco, è stato condotto su 7 atleti non professionisti maschi (età media $24,3 \pm 2,4$ anni) e 13 atlete non professioniste femmine (età media $31,7 \pm 1,6$ anni) a cui è somministrato GH (2 mg/giorno) per 8 settimane. I campioni di sangue sono stati raccolti a baseline e dopo 8 settimane di trattamento. L'assunzione di GH ha prodotto un consistente aumento dei livelli ematici di IGF-1 circolante, che sono risultati elevati a 4 settimane e fino a 8 settimane di trattamento, per poi tornare ai livelli di baseline a 14 settimane di studio. Le variazioni indotte dal GH nell'espressione genica sono risultate piccole e nell'ordine delle variazioni intraindividuali. Per tale motivo, lo studio conclude che l'analisi dell'espressione genica dei leucociti da sangue periferico non sembra essere un approccio utile per l'identificazione di abuso di GH a fini di doping. **BASSO RISCHIO DI BIAS**

Uno studio del 2011 (**Ding 2011**) utilizza un approccio proteomico su campioni ematici per identificare e quantificare nuovi biomarcatori per l'identificazione di esposizione ad alte dosi di GH. Lo studio utilizza i dati di 8 volontari sani maschi (età media 23.2±0.6 anni) sottoposti a trattamento con rhGH o placebo secondo un disegno cross-over. A ciascun soggetto arruolato sono stati effettuati prelievi di sangue nei giorni 0 (baseline), 3 e 8 di trattamento. Sui tutti i campioni sono state valutate 94 proteine separate mediante 2DE/MS. I due gruppi hanno mostrato valori significativamente diversi nella concentrazione totale di proteine a seguito di trattamento con GH o placebo. La differenza nelle concentrazioni è risultata minima a baseline e a 3 giorni di trattamento, mentre è risultata significativamente inferiore a 8 giorni. Delle 94 proteine analizzate, 5 (alfa-1 antitripsina, transtiretina, catena pesante H4 dell'inibitore dell'inter-alfa-tripsina, apolipoproteina A-1 e catena beta dell'emoglobina) hanno mostrato variazioni significative in funzione del tempo. AAT, TTR e ITIH4 sono state confermate tramite Western blot utilizzando campioni prelevati al giorno 0 e 8 di trattamento. In conclusione, lo studio mostra che alte dosi di rhGH producono una riduzione significativa della concentrazione di proteine totali nel sangue e di isoforme specifiche up- o down-regolate di 5 proteine. Sebbene siano necessari ulteriori studi per validarle, tali isoforme sembrano essere utili come potenziali marcatori di uso di rhGH. **ALTO RISCHIO DI BIAS**

Un ulteriore lavoro del 2011 (**Such-Sanmartin 2011**) analizza la potenziale utilità della lectina legata al mannano (MBL) come potenziale marcatore di abuso di rGH. Lo studio utilizza i dati di 12 sportivi amatoriali maschi (età media 24.2±2.2, peso medio 76.1±6.1) coinvolti in 2 diversi studi. Nel primo studio 3 soggetti sono stati trattati con una dose giornaliera di 6IU di rGH per 3 giorni, mentre nel secondo studio 7 soggetti sono stati trattati con rGH per 7 giorni. In tutti i partecipanti trattati è stato osservato un aumento dei livelli di MBL. Tale aumento è risultato significativo a 72, 168 e 192 ore di trattamento. Durante il washout, i valori di MBL sono rimasti aumentati per un periodo maggiore nei soggetti che presentavano un aumento maggiore delle concentrazioni, con valori maggiori rispetto a baseline fino a 48 ore dopo l'ultima dose. In conclusione, lo studio sottolinea la potenziale utilità dell'MBL come marcatore complementare per l'identificazione di abuso di rGH. **ALTO RISCHIO DI BIAS**

Un recente lavoro (**Tan 2017**) propone un approccio di screening proteomico al fine di identificare nuovi potenziali marcatori proteici dell'abuso di GH. Le analisi sono state effettuate su campioni di plasma prelevati da 16 atleti non professionisti randomizzati a trattamento con rhGH o placebo per 8 settimane. I campioni sono stati analizzati tramite tecnica 2-D DIGE a seguito di immunodeplezione delle 7 proteine più abbondanti. Sono state identificate 8 proteine candidate GH-dipendenti, nello specifico, apolipoproteina L1, alfa HS glicoproteina, proteina D-binding, afamina, proteina-3 IGF-binding, proteina ALS IGF-binding, lumican e proteine di matrice extracellulare 1. Di queste, l'apolipoproteina L1 e la glicoproteina alfa-HS sono state validate tramite Western blot per conferma di identità e pattern di espressione sia nei soggetti trattati con rGH che nei soggetti trattati con placebo. In conclusione, lo studio osserva una sovraespressione dei marcatori candidati (eccetto il VBDP) a seguito di somministrazione di GH, con un ritorno dei livelli a concentrazioni simili a quelle rilevate nei soggetti randomizzati a placebo dopo un giorno di washout. La brevità della finestra di rilevazione rende tali marcatori poco utili ai fini delle analisi antidoping. **BASSO RISCHIO DI BIAS**

Sintesi delle evidenze

Poiché il GH somministrato per via esogena ha un'emivita molto breve, risente della variabile età e, quando naturalmente prodotto dall'organismo, viene immesso nel torrente ematico in modo pulsatile, un suo abuso a scopo di doping risulta di difficile identificazione con un metodo analitico diretto. Una sua identificazione pertanto è legata all'utilizzo di marcatori indiretti che abbiano maggiore stabilità e maggiore emivita del GH e la cui variazione possa esserne indice d'uso. A tal proposito, marcatori promettenti sono l'IGF-1 ed il PIIINP, per i quali è stata dimostrata una variabilità intraindividuale più bassa rispetto alla variabilità interindividuale in diversi contesti ambientali o fisiologici (atleti sottoposti a diversi carichi di lavoro, atleti impegnati in competizioni sportive, adolescenti praticanti attività agonistica professionale) (**Nguyen 2008, Guha 2010, Kneiss 2013**). Alcuni fattori, quali l'attività fisica (**De Paolo 2005**) e il tipo di sport praticato (**Pichini 2010**) possono influenzare le concentrazioni plasmatiche e/o urinarie dell'IGF-1, mentre differenze di genere sono state osservate nei valori dell'IGF (più elevato nelle donne) e nei marcatori del collagene (più elevati nei maschi) (**Nelson 2009**).

Nell'utilizzo dei marcatori indiretti IGF-1 e P-IIINP per la determinazione di un uso illecito di ormone della crescita (GH), un controllo di tipo longitudinale sembra avere una migliore capacità di individuare gli atleti che hanno fatto uso di GH rispetto ai controlli analitici basati su cut-off di popolazione (**Di Luigi & Guidetti 2002**). Questi marcatori aumentano in modo progressivo e significativo in funzione della tipologia di trattamento ricevuto (dosaggio e durata del trattamento con GH) (**Sartorio 2004, Powrie 2007, Mitchell 2009**) soprattutto nei maschi che mostrano maggiori incrementi nelle concentrazioni di questi marcatori rispetto alle femmine (**Powrie 2007, Nelson 2008**). Più in generale, Nelson (**Nelson**

2008) ha osservato che le concentrazioni sieriche dei marcatori del collagene quali il P-III-NP aumentano e diminuiscono più lentamente rispetto ai marcatori dell'asse IGF (es. IGF-1).

Quando l'IGF-1 viene utilizzato con finalità di doping in combinazione con l'IGFBP-3 (rhIGF-1/rhIGFBP-3), si rileva un aumento nelle concentrazioni sieriche fino a 4 volte dell'IGF-1 e fino al 50% del PIIIINP (**Guha2014**). Similmente, anche altri marcatori dell'asse IGF e del collagene subiscono importanti cambiamenti nelle loro concentrazioni sieriche. In particolare, **Guha 2013** ha osservato una diminuzione dell'IGF-II ed un aumento dell'IGFBP-2, proponendo quindi questi analiti quali marcatori d'uso combinato di IGF-1 e IGFBP-3.

La ricerca di marcatori indiretti capaci di rilevare una somministrazione di rhGH, ha portato alcuni autori (**Ferro 2016 e Ferro 2017**) a proporre la fibronectina 1 (FN1) quale biomarcatore d'uso di rhGH. In particolare, è stata studiata la variazione nei livelli ematici di mRNA del gene che codifica per l'FN1 e la relativa proteina, con il risultato che questi marcatori mantengono concentrazioni significativamente più elevate rispetto ai valori basali fino a 9 giorni dopo il trattamento con rhGH. Anche l'utilizzo di una matrice quale il DBS (dried blood spot) permette di rilevare l'innalzamento delle concentrazioni ematiche di FN1, che raggiungono il loro massimo livello sette giorni dopo l'inizio del trattamento con rhGH. Altri lavori (**Ding 2011**) propongono l'uso di nuovi marcatori d'esposizione a breve termine all'rhGH (l'alfa-1 antitripsina, la transtiretina, la catena pesante H4 dell'inibitore dell'inter-alfa-tripsina, l'apolipoproteina A-1 e la catena beta dell'emoglobina) selezionati attraverso un approccio di tipo proteomico, ma il numero esiguo di soggetti reclutati nello studio rendono i risultati molto preliminari. E ancora, due proteine plasmatiche (APOL1 e AHSB) selezionate dagli autori (**Tan 2017**) in uno studio che ha valutato un approccio di tipo proteomico per la determinazione dell'rhGH si sono dimostrate promettenti marcatori d'uso di rhGH, sebbene anche i risultati di questo studio risentano del numero esiguo di soggetti reclutati. Alcuni autori (**Mitchell 2009**) che hanno valutato l'utilità di utilizzare il profilo di espressione genica per identificare un uso di rhGH utilizzando il DNA leucocitario estratto da sangue periferico, hanno concluso che questo tipo di indagine, utilizzando tale matrice, è improbabile che si riveli un valido approccio per la ricerca d'uso di rhGH.

Raccomandazioni

IGF-1, P-III-NP

La valutazione longitudinale dei parametri IGF-1 e P-III-NP sembra avere una buona accuratezza nell'individuare soggetti che hanno fatto uso di GH, ma sono necessari ulteriori studi per confermarne l'utilità. (Powrie 2007 e Nelson 2008)

FN1

L'analisi FN1 da *dried blood spot* sembra essere un valido complemento all'analisi di IGF-1 e P-III-NP per rilevare l'abuso di GH. (Ferro 2017)

I livelli di mRNA e proteici di FN1 sembrano essere marcatori promettenti nel rilevare l'abuso di GH. Ferro 2016)

Bibliografia

Abellan R, Ventura R, Palmi I, di Carlo S, di Giovannandrea R, Bellver M, Olive R, Pascual JA, Pacifici R, Segura J, Zuccaro P, Pichini S. Evaluation of immunoassays for the measurement of insulin and C-peptide as indirect biomarkers of insulin misuse in sport: values in selected population of athletes. *J Pharm Biomed Anal.* 2009;49(3):793-9.

Delanghe J R; Maenhout T M; Speeckaert M M; De Buyzere M L. Detecting doping use: more than an analytical problem. *Acta clinica Belgica* 2014; 69(1):25-29.

de la Torre R, de la Torre X, Alía C, Segura J, Baró T, Torres-Rodríguez JM. Changes in androgenic steroid profile due to urine contamination by microorganisms: A prospective study in the context of doping control. *Anal Biochem.* 2001;289(2):116-23.

Di Luigi L, Guidetti L. IGF-I, IGFBP-2, and -3: do they have a role in detecting rhGH abuse in trained men? *Med Sci Sports Exerc.* 2002;34(8):1270-8.

De Palo EF, Gatti R, Lancerin F, Cappellin E, De Palo CB, Spinella P. Urinary insulin-like growth factor-I measurement in an actual sport competition, an additional approach in laboratory antidoping tests. *Clin Chim Acta.* 2005;351(1-2):73-8.

- Ding J, Okada S, Jørgensen JO, Kopchick JJ. Novel serum protein biomarkers indicative of growth hormone doping in healthy human subjects. *Proteomics*. 2011; 11(17):3565-71.
- Ferro P, Ventura R, Pérez-Mañá C, Farré M, Segura J. Genetic and protein biomarkers in blood for the improved detection of GH abuse. *J Pharm Biomed Anal*. 2016;128:111-8.
- Ferro P, Ventura R, Pérez-Mañá C, Farré M, Segura J. Evaluation of fibronectin 1 in one dried blood spot and in urine after rhGH treatment. *Drug Test Anal*. 2017;9(7):1011-1016.
- Guha N, Erotokritou-Mulligan I, Burford C, Strobridge G, Brigg J, Drake T, Bassett EE, Cowan D, Bartlett C, Sönksen PH, Holt RI. Serum insulin-like growth factor-I and pro-collagen type III N-terminal peptide in adolescent elite athletes: implications for the detection of growth hormone abuse in sport. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(6):2969-76
- Guha N, Erotokritou-Mulligan I, Bartlett C, Nevitt SP, Francis M, Bassett EE, Cowan DA, Sönksen PH, Holt RI. Biochemical Markers of Insulin-Like Growth Factor-I Misuse in Athletes: The Response of Serum IGF-I, Procollagen Type III Amino-Terminal Propeptide, and the GH-2000 Score to the Administration of rhIGF-I/ rhIGF Binding Protein-3 Complex; *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(6):2259-68.
- Holt RI, Böhning W, Guha N, Bartlett C, Cowan DA, Giraud S, Bassett EE, Sönksen PH, Böhning D. The development of decision limits for the GH-2000 detection methodology using additional insulin-like growth factor-I and amino-terminal pro-peptide of type III collagen assays. *Drug Test Anal*. 2015;7(9):745-55.
- Kniess A, Ziegler E, Thieme D, Müller RK. Intra-individual variation of GH-dependent markers in athletes: comparison of population based and individual thresholds for detection of GH abuse in sports. *J Pharm Biomed Anal*. 2013;84:201-8.
- Mitchell CJ, Nelson AE, Cowley MJ, Kaplan W, Stone G, Sutton SK, Lau A, Lee CM, Ho KK. Detection of growth hormone doping by gene expression profiling of peripheral blood. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94(12):4703-9.
- Nelson AE, Meinhardt U, Hansen JL, Walker IH, Stone G, Howe CJ, Leung KC, Seibel MJ, Baxter RC, Handelsman DJ, Kazlauskas R, Ho KK. Pharmacodynamics of growth hormone abuse biomarkers and the influence of gender and testosterone: a randomized double-blind placebo-controlled study in young recreational athletes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(6):2213-22.
- Nelson AE, Ho KK. Demographic factors influencing the GH system: Implications for the detection of GH doping in sport. *Growth Horm IGF Res*. 2009;19(4):327-32.
- Nguyen TV, Nelson AE, Howe CJ, Seibel MJ, Baxter RC, Handelsman DJ, Kazlauskas R, Ho KK. Within-subject variability and analytic imprecision of insulinlike growth factor axis and collagen markers: implications for clinical diagnosis and doping tests. *Clin Chem*. 2008;54(8):1268-76.
- Pichini S, Ventura R, Palmi I, di Carlo S, Bacosi A, Langohr K, Abellan R, Pascual JA, Pacifici R, Segura J, Zuccaro P. Effect of physical fitness and endurance exercise on indirect biomarkers of growth hormone and insulin misuse: Immunoassay-based measurement in urine samples. *J Pharm Biomed Anal*. 2010;53(4):1003-10.
- Powrie JK, Bassett EE, Rosen T, Jørgensen JO, Napoli R, Sacca L, Christiansen JS, Bengtsson BA, Sönksen PH, GH-2000 Project Study Group. Detection of growth hormone abuse in sport. *Growth Horm IGF Res*. 2007;17(3):220-6.
- Reichel C. OMICS-strategies and methods in the fight against doping. *Forensic Sci Int*. 2011;213(1-3):20-34.
- Rivier L. Is there a place for hair analysis in doping controls? *Forensic Sci Int*. 2000;107(1-3):309-23.
- Sartorio A, Agosti F, Marazzi N, Maffiuletti NA, Cella SG, Rigamonti AE, Guidetti L, Di Luigi L, Muller EE. Combined evaluation of resting IGF-I, N-terminal propeptide of type III procollagen (PIIINP) and C-terminal cross-linked telopeptide of type I collagen (ICTP) levels might be useful for detecting inappropriate GH administration in athletes: a preliminary report. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2004;61(4):487-93.

Sgrò P, Sansone-M, Parisi A, Sartorio A, Sansone A, Romanelli F, Lenzi A, Di Luigi L. Supra-physiological rhGH administration induces gender-related differences in the hypothalamus–pituitary–thyroid (HPT) axis in healthy individuals. *J Endocrinol Invest.* 2016;39(12):1383-1390.

Such-Sanmartín G, Bosch J, Segura J, Gutiérrez-Gallego R. Growth hormone abuse and biological passport: is mannan-binding lectin a complementary candidate? *Clin J Sport Med.* 2011;21(5):441-3.

Tan SH, Lee A, Pascovici D, Care N, Birzniece V, Ho K, Molloy MP, Khan A. Plasma biomarker proteins for detection of human growth hormone administration in athletes. *Sci Rep.* 2017;7(1):10039.

Thieme D. Potential and limitations of alternative specimens in doping control. *Bioanalysis.* 2012;4(13):1613-22.

Tretzel L, Thomas A, Geyer H, Delahaut P, Schänzer W, Thevis M. *Anal Bioanal Chem.* 2015;407(16):4709-20.

Voss SC, Giraud S, Alsayrafi M, Bourdon PC, Schumacher YO, Saugy M, Robinson N. The effect of a period of intensive exercise on the isoform test to detect growth hormone doping in sports. *Growth Horm IGF Res.* 2013;23(4):105-8.

WADA. Human growth hormone (hGH) Testing. WADA, 2018. Disponibile all'indirizzo: <https://www.wada-ama.org/en/questions-answers/human-growth-hormone-hgh-testing>. (visitato il 25/01/2018)