

Analýza vzoriek v praxi

PharmDr. Daniel Pecher, PhD.

Seibersdorf Labor GmbH

Seibersdorf Laboratories



- Vysokokvalitná laboratórna analýza a meracia technika
- cca. 170 zamestnancov – 30 v Antidopingovom laboratóriu
- Campus Seibersdorf



Seibersdorf Laboratories



Vysokokvalitná laboratórna analýza a meracia technika



Kde je Seibersdorf?



WADA Akreditované Laboratórium

SEIBERSDORF
LABORATORIES



 **Bundesministerium**
Digitalisierung und
Wirtschaftsstandort



Die Nationale Akkreditierungsstelle / *The National Accreditation Body:*

AKKREDITIERUNG AUSTRIA

bestätigt die Akkreditierung der Rechtsperson / *confirms the accreditation of*

Seibersdorf Labor GmbH

A-2444 Seibersdorf

Identifikationsnummer / *ID-number:* **0312**
als / *as* **Prüflaboratorium / Testing Laboratory**
gemäß / *according to* **EN ISO/IEC 17025:2017**
Datum der Erstakkreditierung / *Initial date of accreditation:* **01.10.2009**

Standorte/Organisationseinheiten / *sites/units:*

Seibersdorf Labor GmbH - Chemische Analytik, A-2444 Seibersdorf
Seibersdorf Labor GmbH - Dopinganalytik, A-2444 Seibersdorf
Seibersdorf Labor GmbH - EMV, A-2444 Seibersdorf
Seibersdorf Labor GmbH - Ionisierende Strahlung und Strahlenschutz, A-2444 Seibersdorf
Seibersdorf Labor GmbH - Laser, LED & Lampen-Sicherheit, A-2444 Seibersdorf

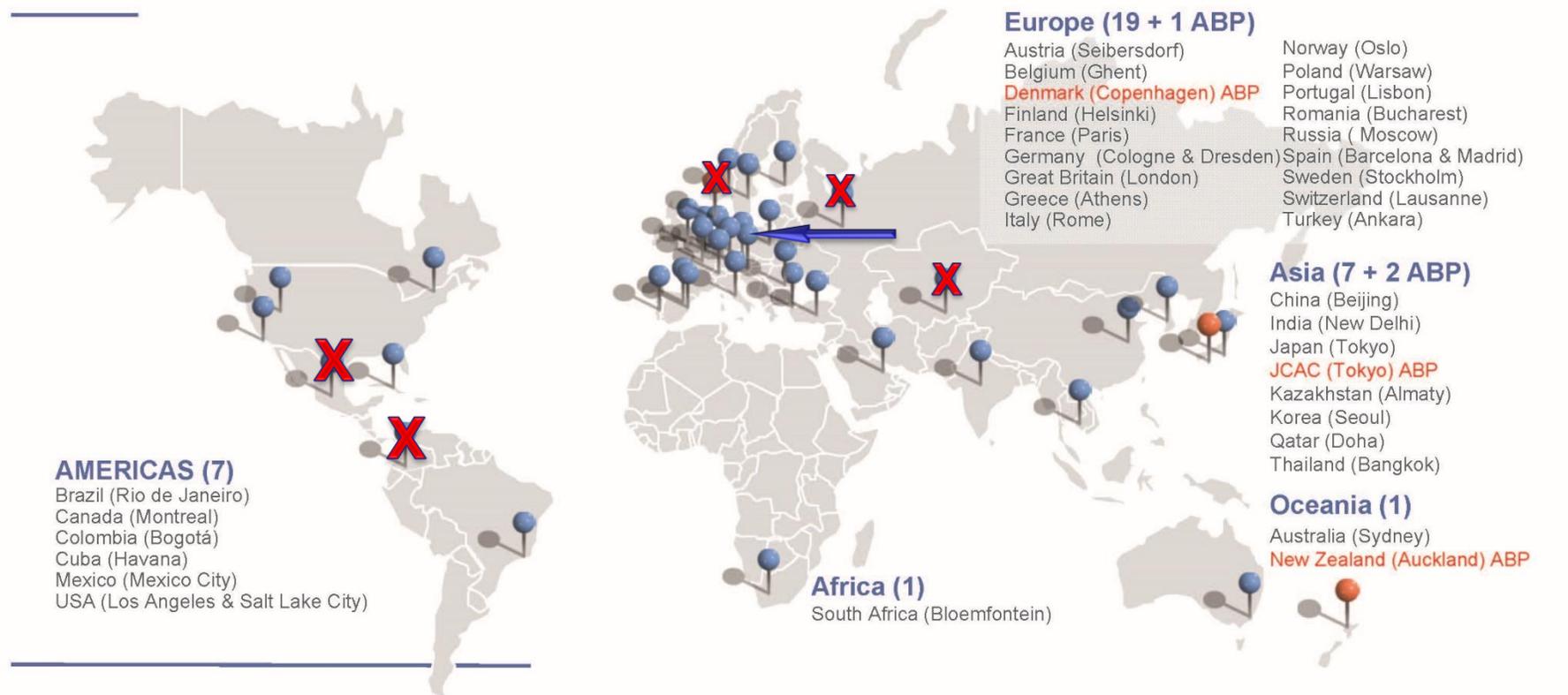
Informationen zum Akkreditierungsumfang und zu Akkreditierung Austria / *Information about the accreditation scope and Akkreditierung Austria* <http://www.bmdw.gv.at/akkreditierung>

Die Akkreditierung wurde mittels Bescheid erteilt und damit bestätigt, dass die Konformitätsbewertungsstelle die angeführten Anforderungen erfüllt. Diese Bestätigung darf nur unverändert weiterverbreitet werden. / *The accreditation was granted by a decree which confirms, that the Conformity Assessment Body fulfills the given requirements. This confirmation of accreditation may not be reproduced other than in full.*



Dipl.-Ing. Dr. Norman Brunner
Wien, am 15. April 2020

WADA Laboratóriá vo svete



Antidopingové Laboratórium



- **Špičková kvalita analýz**

- 20 rokov akreditácie
- Analýza vzoriek vysokého počtu NADO a medzinárodných federácií
- Stúpajúci počet vzoriek
- Nízky počet analýz B vzorky (2021: 4; 2022: 2)

- **Medzinárodné uznávaný výskum**

- Vývoj špičkových analytických metód
- Podpora pri tvorbe povinných medzinárodných štandardov

- **Edukačné aktivity a osveta**

Každoročný medzinárodný antidopingový workshop

– účasť predstaviteľov WADA

2022: NADOs: 71 %

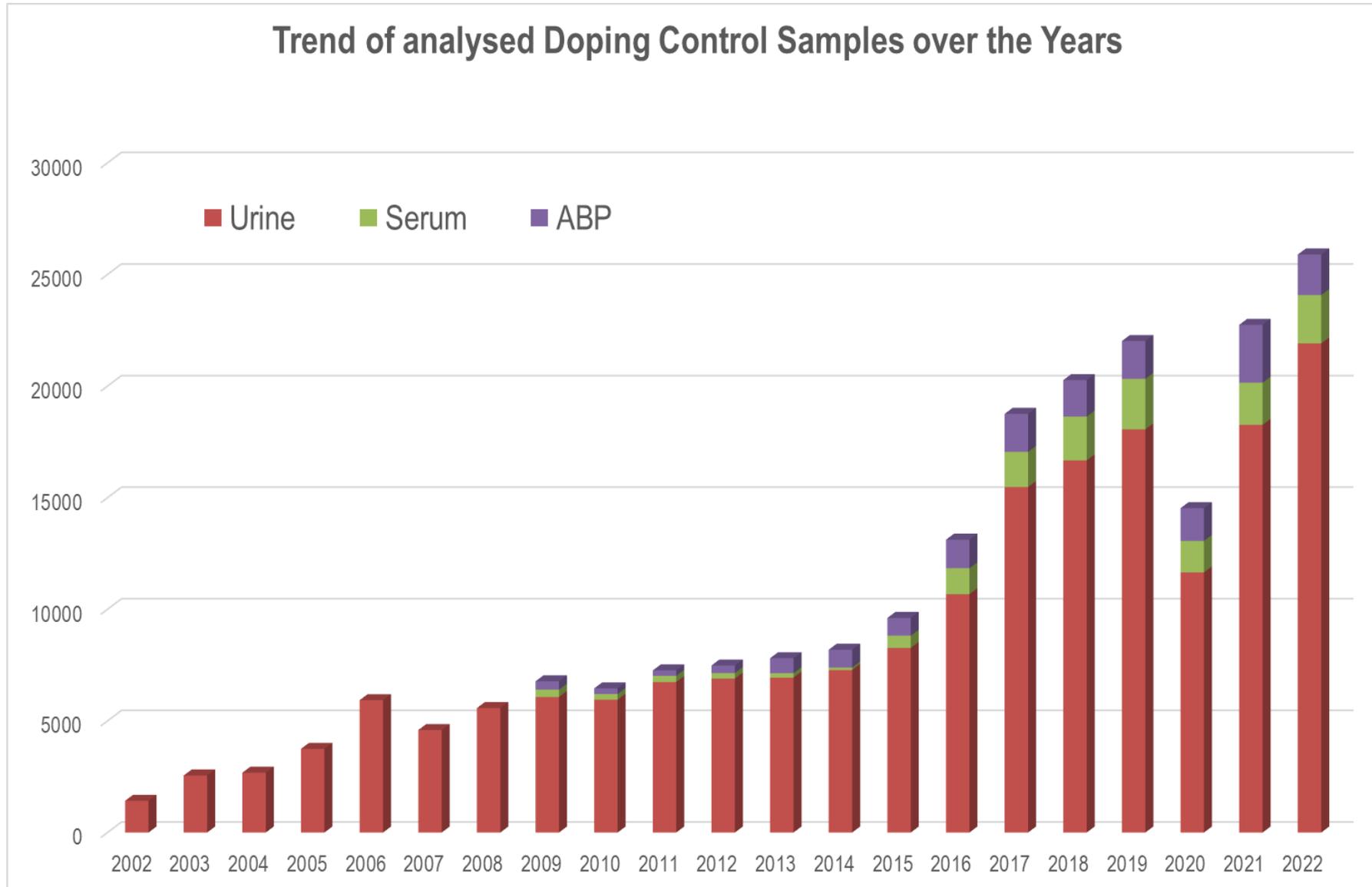
SEIBERSDORF
LABORATORIES



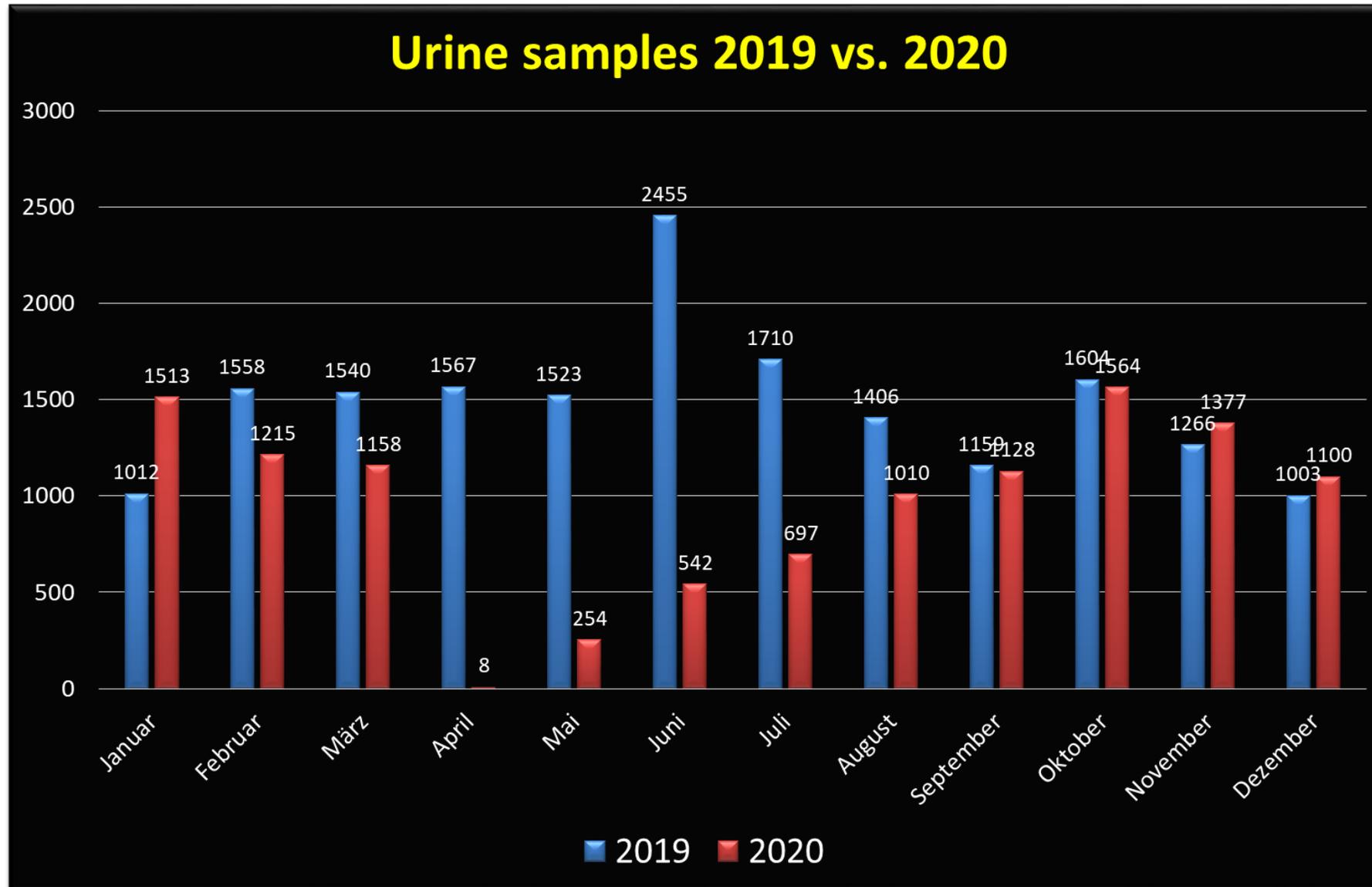
- + Armenia
- + Malta
- + Cyprus
- + Chinada
- + Uzbekistan
- + ...

2022: Vzorky od 113 rôznych organizácií

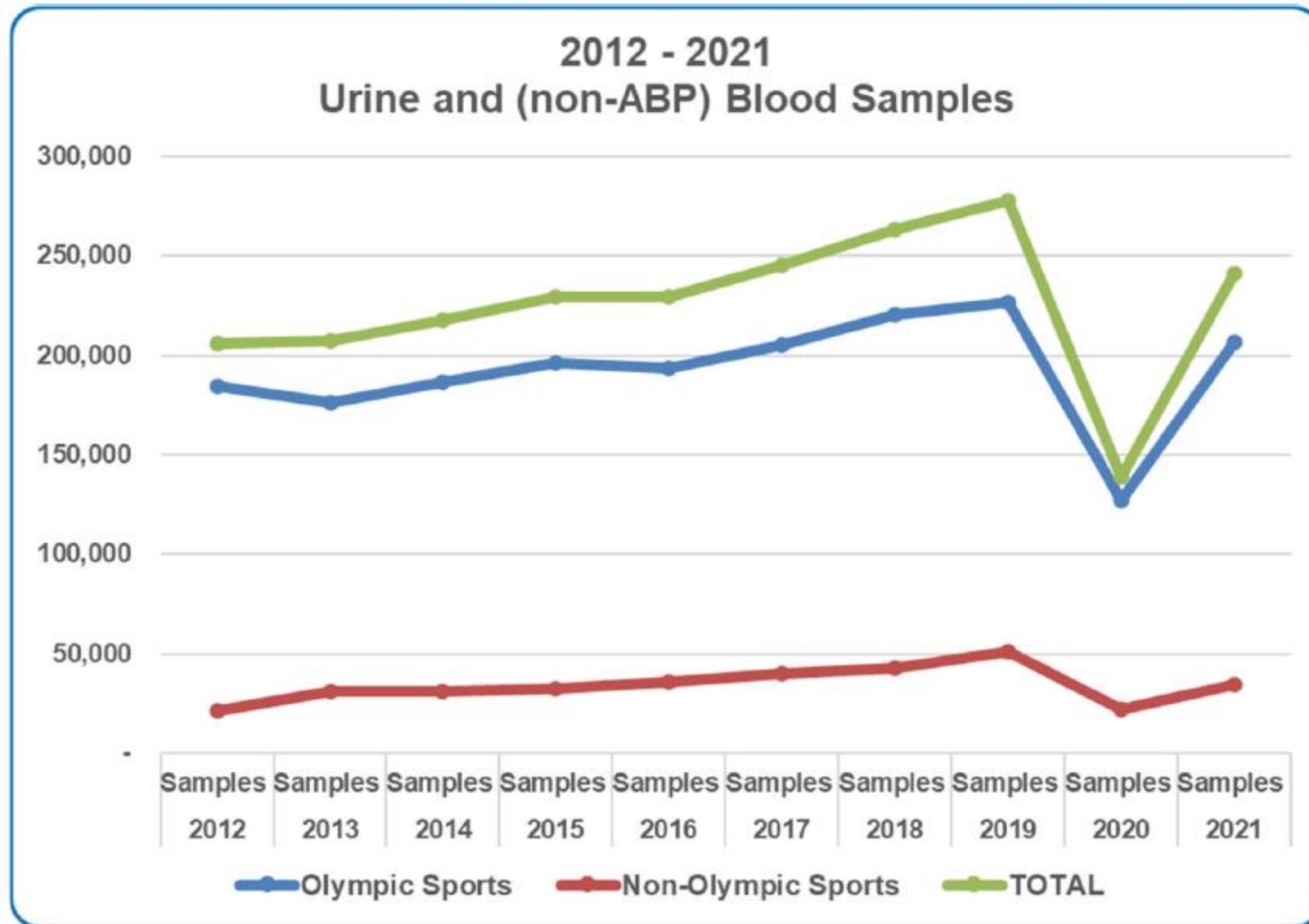
Počet vzoriek v rokoch 2002 – 2022



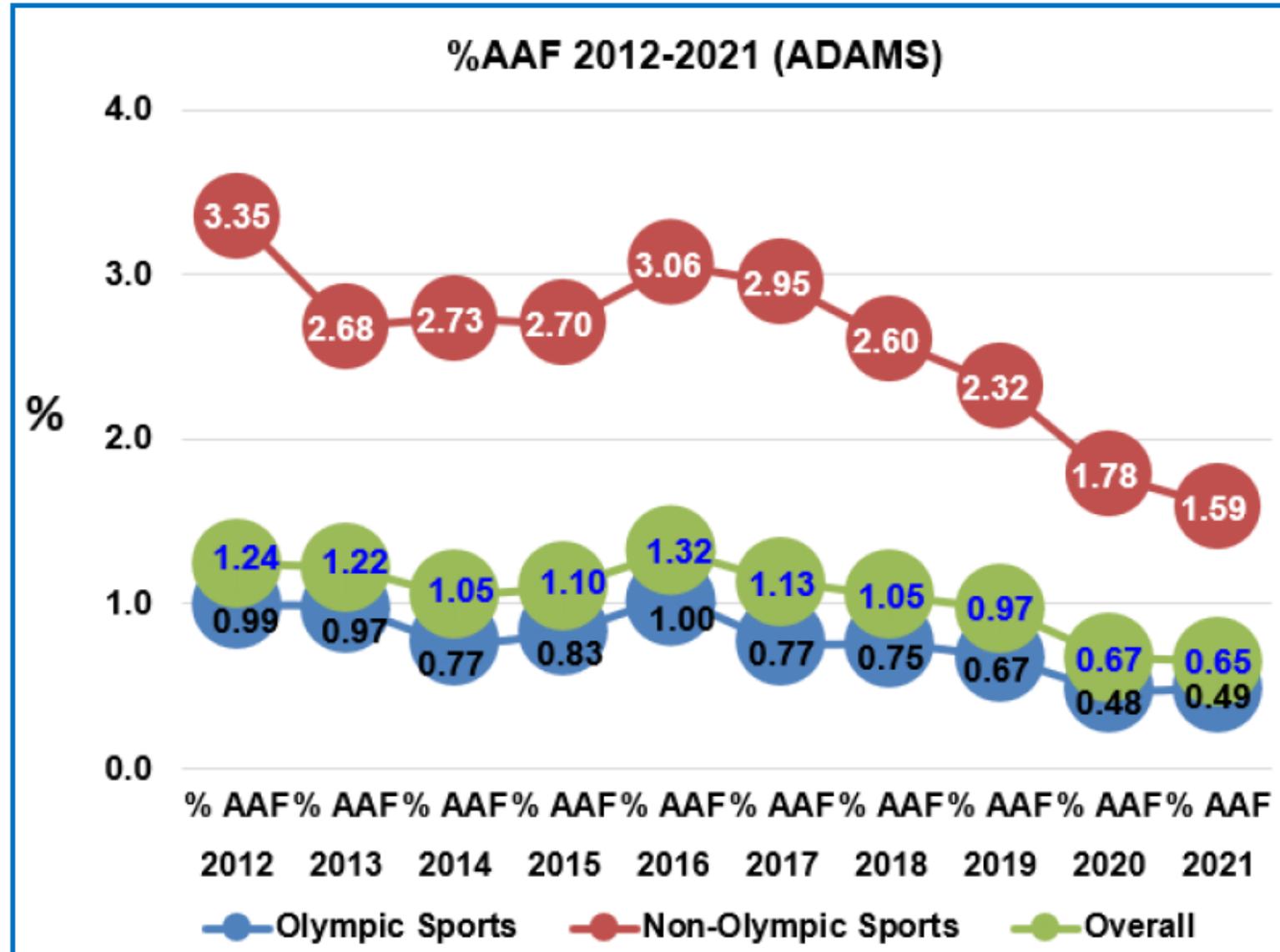
Počet vzoriek – 2019 vs. 2020



Štatistiky WADA – počet vzoriek



Štatistiky WADA, %AAFs



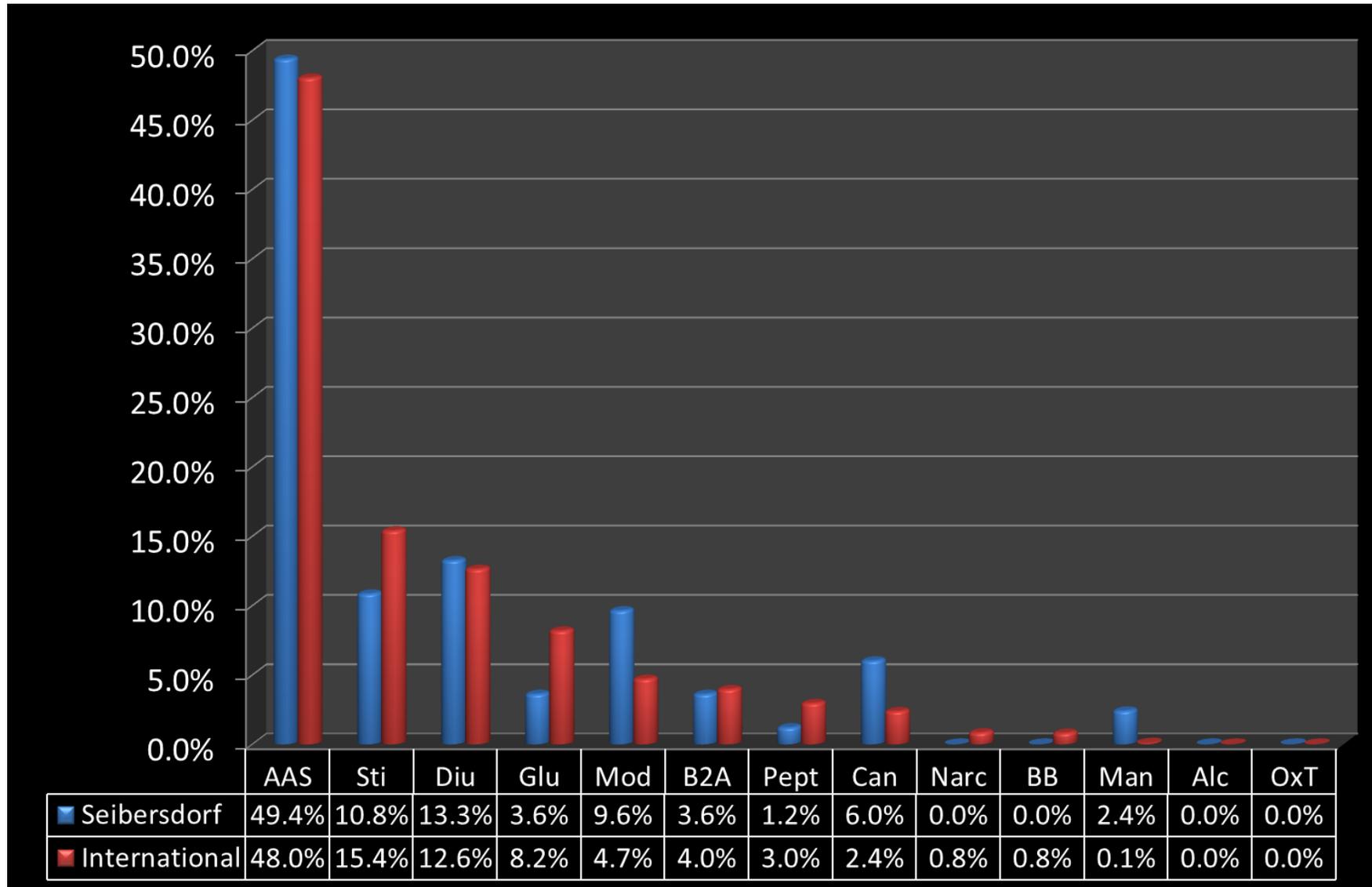
Štatistiky WADA 2021

Table 1: Summary - Samples Analyzed per Laboratory (as reported in ADAMS)

Laboratory	Urine			Blood ¹			DBS			Total % AAF	ABP Samples ²	Total Samples
	Samples	ATF	AAF	Samples	ATF	AAF	Samples	ATF	AAF			
Ankara, Turkey	2094	3	11	169	2	2	-	-	-	0.52%	242	2,505
Bangkok, Thailand ³	25	-	1	-	-	-	-	-	-	4.00%	-	25
Barcelona, Spain	7433	8	65	528	-	-	-	-	-	0.72%	1013	8,974
Beijing, China	14920	7	50	1861	-	2	782	-	-	0.27%	1535	19,098
Bloemfontein, South Africa	2864	19	50	95	-	-	-	-	-	1.65%	80	3,039
Bucharest, Romania	2502	5	35	645	-	-	-	-	-	1.06%	151	3,298
Cologne, Germany	24480	14	131	3285	1	2	20	-	-	0.41%	4995	32,780
Doha, Qatar	5983	3	58	425	-	1	-	-	-	0.89%	235	6,643
Dresden, Germany	16235	15	85	1197	-	-	-	-	-	0.46%	1075	18,507
Ghent, Belgium	16494	7	140	992	-	1	-	-	-	0.72%	2121	19,607
Havana, Cuba	4069	20	23	34	-	-	-	-	-	0.56%	24	4,127
Helsinki, Finland	2088	2	5	189	-	2	-	-	-	0.27%	347	2,624
Lausanne, Switzerland	9038	8	50	732	-	3	-	-	-	0.42%	2840	12,610
London, UK	6959	1	15	683	-	-	-	-	-	0.19%	466	8,108
Los Angeles, USA ³	3877	3	57	3	-	-	-	-	-	1.47%	-	3,880
Madrid, Spain	4730	6	30	396	-	-	-	-	-	0.48%	1115	6,241
Montreal, Canada	9537	64	64	759	-	-	-	-	-	0.59%	585	10,881
Oslo, Norway	3152	-	36	261	-	1	97	-	2	0.87%	951	4,461
Paris, France	11916	19	103	785	1	1	-	-	-	0.73%	1483	14,184
Rio de Janeiro, Brazil	4415	9	50	390	-	3	-	-	-	1.06%	177	4,982
Rome, Italy	7849	6	63	986	-	4	-	-	-	0.70%	783	9,618
Seibersdorf, Austria	17982	11	121	1914	1	1	-	-	-	0.54%	2569	22,465
Seoul, Korea	3184	2	28	515	-	-	-	-	-	0.72%	165	3,864
Stockholm, Sweden	5682	2	42	279	-	-	-	-	-	0.57%	1351	7,312
Sydney, Australia	4781	6	31	444	-	-	-	-	-	0.53%	607	5,832
Tokyo, Japan	13482	13	31	1599	-	3	69*	-	-	0.21%	1305	16,455
Salt Lake City, USA	8602	17	85	1392	5	2	-	-	-	0.71%	2253	12,247
Warsaw, Poland	4749	24	70	782	8	-	-	-	-	1.09%	905	6,436
Totals	219,122	294	1,530	21,340	18	28	968	0	2		29,373	270,803



Adverse Analytical Findings



Príjem vzoriek

Zapečatené vzorky sú dodané do laboratória - kontrola



Registrácia vzoriek



Otvorenie vzorky



SEIBERSDORF
LABORATORIES

OBRAZAC ZA DOPING KONTROLU
DOPING CONTROL FORM

1. OBAVIŠTENIE ŠPORTISTE • ATHLETE NOTIFICATION

1. INFORMÁCIE ZA ANALÝZU • INFORMATION FOR ANALYSIS

ŠPORTOVCI	ŠPORTOVÁ DISCIPLÍNA	ŠPORTOVÁ KATEGÓRIA	ŠPORTOVÝ KÓD						
WHATEPOLO	WHATEPOLO								

ŠPORTOVCI	ŠPORTOVÁ DISCIPLÍNA	ŠPORTOVÁ KATEGÓRIA	ŠPORTOVÝ KÓD						
4	4	4	4	4	4	4	4	4	4

Fluid Motion, Mg

4. POTVRDA PROCEDURE TESTIRANIA URINA I/ILI KRVI • CONFIRMATION OF PROCEDURE FOR URINE AND/OR BLOOD TESTING

DU-2474(2020)-A (UR) 4455133

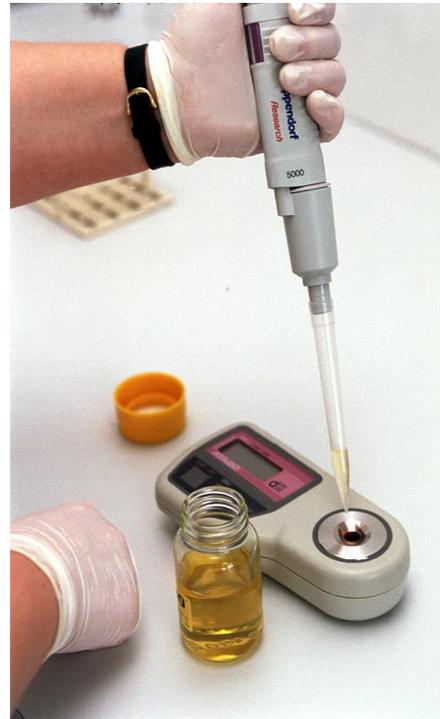
DU-2474(2020)-B (UR) 4455133

REPORT DOPING IN SPORT: www.wada-ama.org/reportdoping

Predpríprava vzoriek



Stanovenie objemu



Meranie pH a špecifickej hmotnosti



Odber alikvót pre
skriningové
metódy

Príprava vzoriek pre analýzu



Prídavok reagensí
Extrakcia



Transfer vzorky (fázy)
Derivatizácia

Automatizácia ⇒



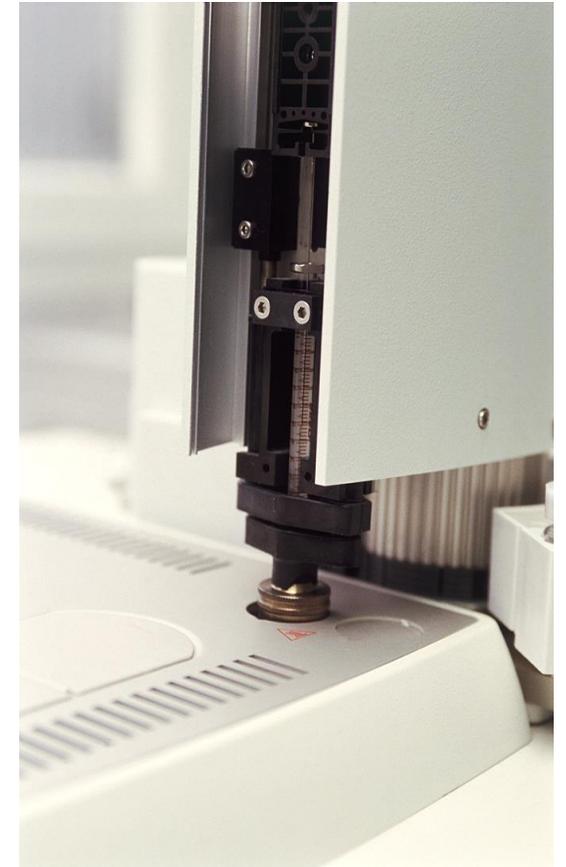
Analýza vzoriek



Vzorky pripravené na analýzu



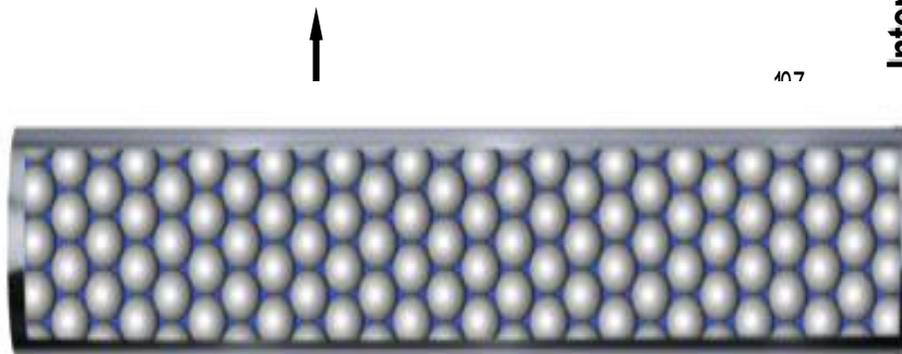
Chromatografia -
Hmotnostná spektrometria



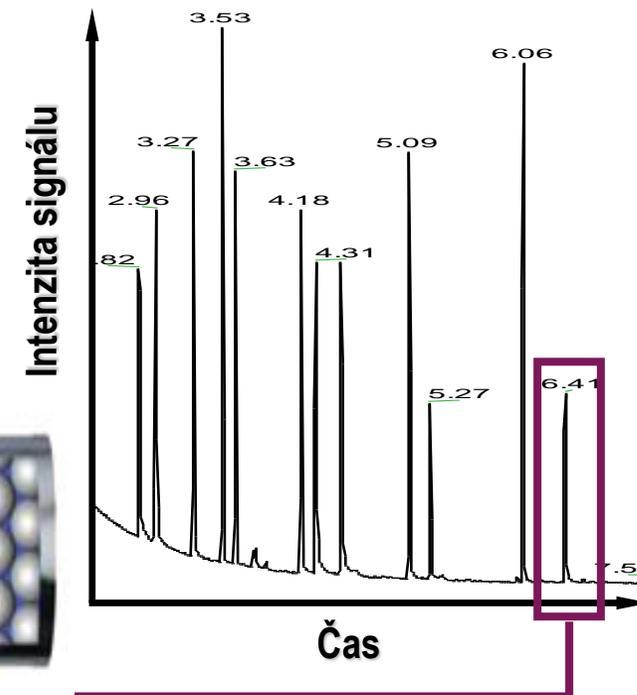
Chromatografia – Hmotnostná spektrometria



Chromatografia:
Separácia zmesi látok na jednotlivé
komponenty



Sample Introduction:
A small volume of sample is injected
and carried onto the column by the
mobile phase



Hmotnostná spektrometria:
"otlačok prsta" molekuly
forme jej fragmentov

Osobitosti dopingovej analýzy

- **Definovaná štandardami WADA**
 - WADA – Code
 - Medzinárodný štandard pre laboratória (ISL)
 - Technické dokumenty (TD), ...
- **Rigorózna kontrola kvality**
 - 15 zaslepených vzoriek ročne,
 - 5 dvojito zaslepených vzoriek, etc.
- **System A a B vzorky**
 - Opakovateľnosť analytického výsledku
 - Pod dohľadom externých odborníkov
- **Kompletná dokumentácia analýzy**



Osobitosti dopingovej analýzy

- **Skríningová (ITP) a Potvrdzovacia procedúra (CP)**
Dvojitá analýza pozitívnych vzoriek (AAF)
- **Látky s/bez limitu**
Treshold vs. Non-treshold vs. MRL
- **Minimálne kritériá na preukázanie dopingu**
Medzinárodná porovnateľnosť výsledkov
- **Endogénna vs. exogénna látka**



Analýza – Skrining / Potvrdenie

Skriningová procedúra (ITP)



Potvrdzovacia procedúra (CP)

Potenciálne pozitívne vzorky

- Univerzálna
- Rýchla
- Citlivá
- Lacná

Jedinečná identifikácia

- Optimalizovaná pre 1 látku
- Špecifická
- Citlivá
- Nespochybniteľná

Skríningové metódy pre vzorky moču

Názov	Analyty	Príprava vzorky	Analýza
Screening III	Steroidy, Diuretiká, Stimulanty,...	Hydrolyza, Extrakcia (pH 7)	LC-MS/MS
Screening IV	Anabolické steroidy	Hydrolyza, Extrakcia, Derivatizácia	GC-MSMS
Screening XV	Stimulanty	Riedenie	LC-MS/MS
Screening VI	Peptidové hormóny (HCG)	-	Immunoassay
Screening XI	Erythropoietin	SAR-Page; D-Blot	Chemilumin.
Screening XIV	Peptidové látky	SPE	LC-MS/MS

Skríningové metódy pre vzorky krvi

Názov	Analyty	Príprava vzorky	Analýza
Screening XI	rEPO	SAR-Page; D-Blot	Chemilumin.
Screening E1	Krvné parametre	-	Sysmex
Screening E3	HGH	Extrakcia protilátok	Elisa

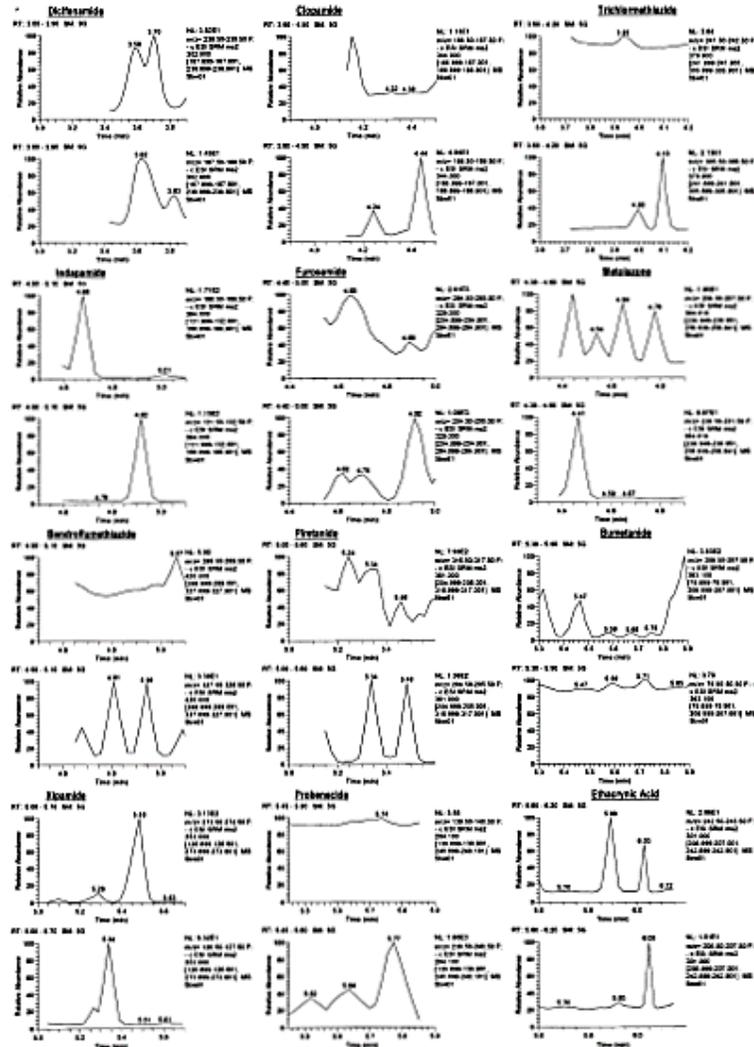
Skríningové metódy pre vzorky séra

Názov	Analyty	Príprava vzorky	Analýza
Screening XI	rEPO	SAR-Page; D-Blot	Chemilumin.
Screening E3	HGH	Extrakcia protilátok	Elisa
Screening E4	HGH biomarkery	-	Radioimmunoassay

Skríningové metódy

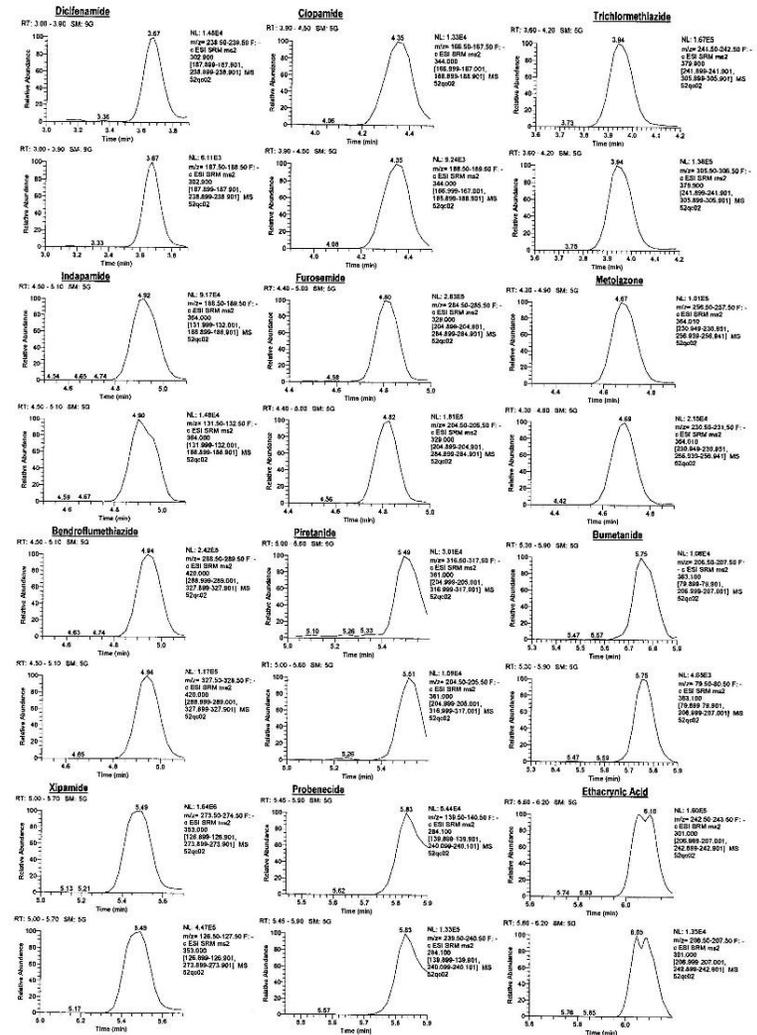
Negatívna kontrola – čistý moč

Sample Preparation: Screening 3 - Various doping substances in urine using LC-MS/MS (AA DCL/S03), Page 2 Seibersdorf Laboratories
Data Path: D:\Daten\110728SU Data File: 519u01



Pozitívna kontrola – spikovaný moč

Sample Preparation: Screening 3 - Various doping substances in urine using LC-MS/MS (AA DCL/S03), Page 2 Seibersdorf Laboratories
Data Path: D:\Daten\110429SU Data File: 529u02



Reálna vzorka – ľahká atletika

SEIBERSDORF
LABORATORIES



Reálna vzorka

Sample Preparation: Screening 3 - Anabolics in Urine using LC-MS: Page 1

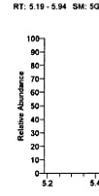
Seibersdorf Laboratories

Data File: 3du3639
Sample Name: Sample
Calibration File: N/A
Instr. Method: D:\Methoden\Screening\303

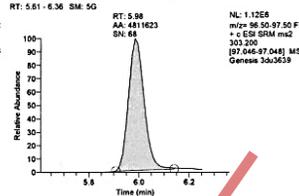
Data Path: D:\DATEN\120620VA
Acquisition Date: 06/21/12 07:00:12 PM
Dilution Factor: 1.00
Proces. Method: N/A

Inj. Vol. (µl): 10.00
Sample Type: Unknown
Vial: CSK1-06.77

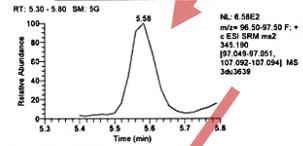
d5-3OH Stanozolol (IS)



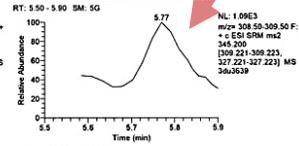
Methyltestosterone (IS)



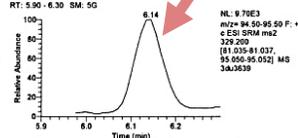
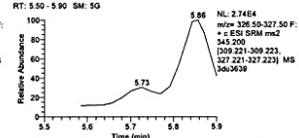
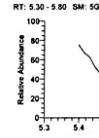
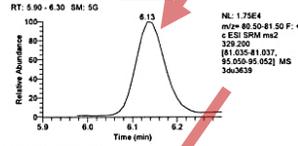
StanozololM1 (3'OH Stanozolol)



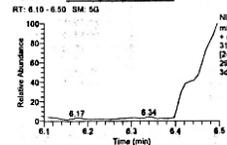
StanozololM2 (4b-OH Stanozolol)



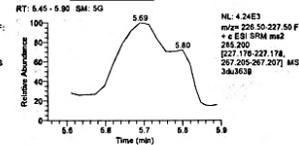
Stanozolol



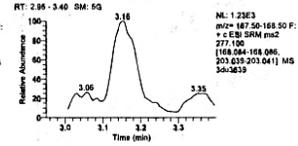
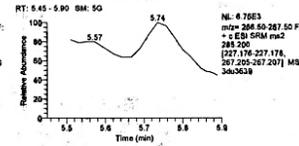
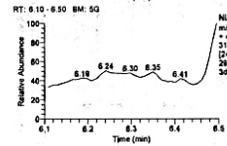
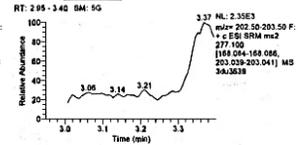
Tetrahydrocortisonone



Methyltrienolone



Clenbuterol



Negatívna kontrola

Sample Preparation: Screening 3 - Anabolics in Urine using LC-MS: Page 1

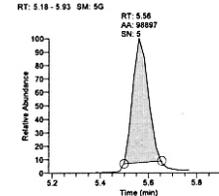
Seibersdorf Laboratories

Data File: 3bu01
Sample Name: BW
Calibration File: N/A
Instr. Method: D:\Methoden\Screening\303

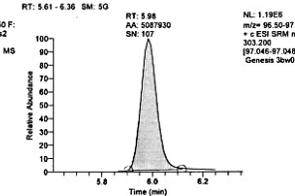
Data Path: D:\DATEN\120620VA
Acquisition Date: 06/20/12 11:00:13 PM
Dilution Factor: 1.00
Proces. Method: N/A

Inj. Vol. (µl): 10.00
Sample Type: Unknown
Vial: CSK1-06.2

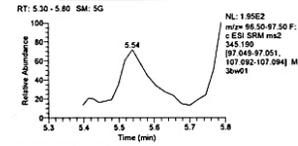
d5-3OH Stanozolol (IS)



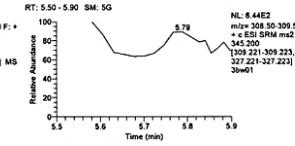
Methyltestosterone (IS)



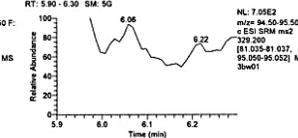
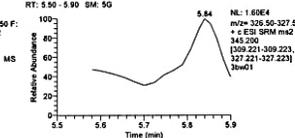
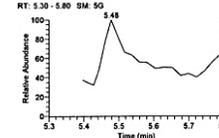
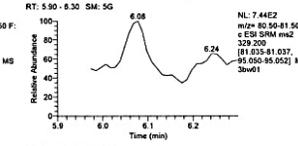
StanozololM1 (3'OH Stanozolol)



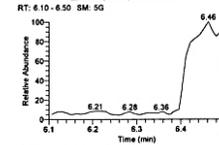
StanozololM2 (4b-OH Stanozolol)



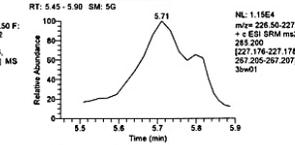
Stanozolol



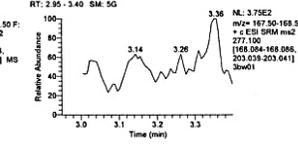
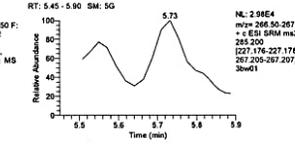
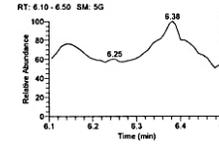
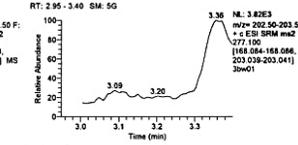
Tetrahydrocortisonone



Methyltrienolone



Clenbuterol



Ca. 1 ng/ml PC, ca. 0,05 ng/ml Mx

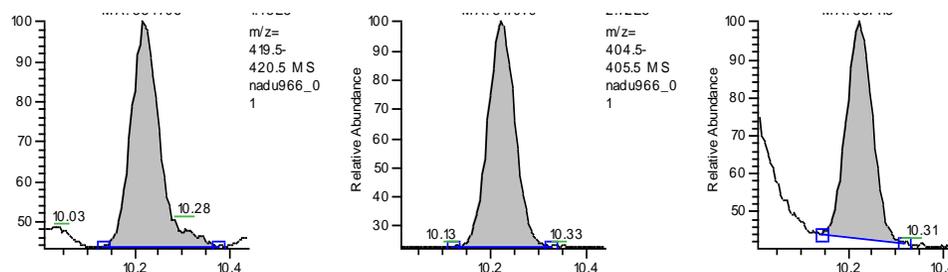
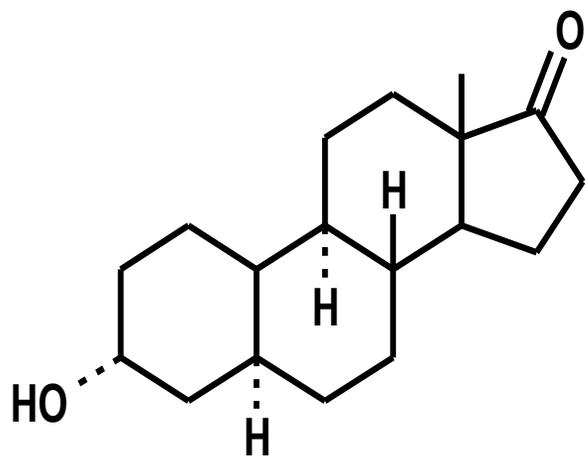
Potvrdzovacia procedúra (CP)

- **Potenciálne pozitívne vzorky identifikované ITP**
- **Nové alikvóty vzoriek – príprava 2 roztokov vzorky**
- **Poradie analýzy**
 - Čisté rozpúšťadlo
 - Čistý moč
 - Vzorka
 - Vzorka
 - Čisté rozpúšťadlo
 - Čistý moč
 - Pozitívna kontrola (čistý moč s prídavkom štandardu potvrdzovanej látky)

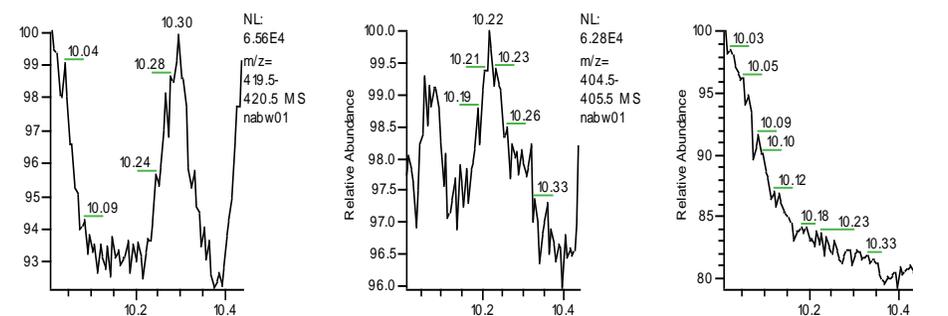
Potvrzovacia procedúra (CP)

Porovnanie vzorky moču športovca s čistým močom a močom s prídavkom štandardu potvrdzovanej látky

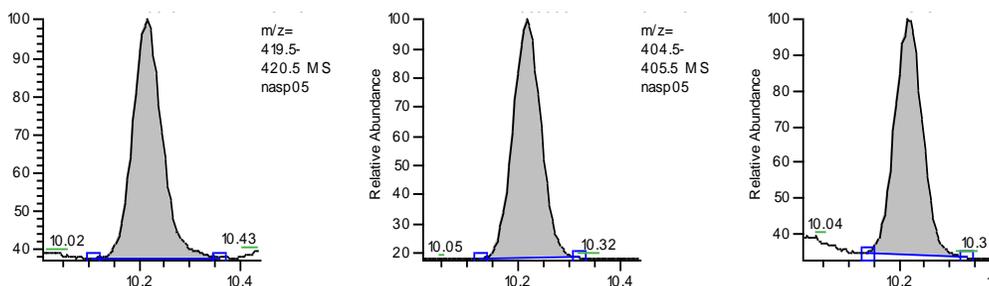
Príklad:
Nandrolon - Metabolit



Moč športovca

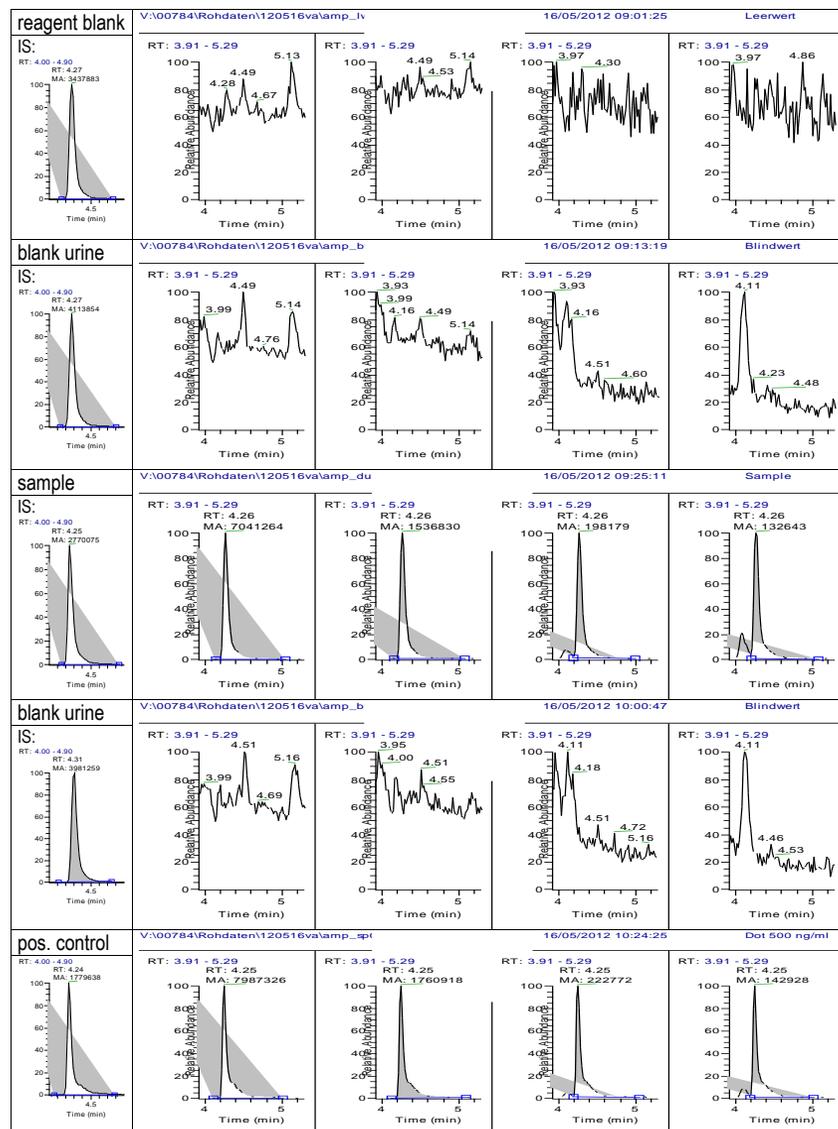


Čistý moč



Moč s prídavkom štandardu potvrdzovanej látky

Potvrzovacia procedúra (CP)



Criteria for Identification

According to WADA Technical Document - TD2010IDCR

Version: 12.9.2010

Ersteller: Günter Gmeiner

Chromatographic Separation

Mass Spectrometric Detection

Method: LC

Method: ESI

Mode: SRM

Maximum Tolerance Windows

Maximum Tolerance Windows

Parameter	<	2%	relative
Ret. Time	<	0,1	absolute
Rel. Ret. Time	<	2%	relative
RRT SILIS	<	0,1%	relative

Relative abundance	Tolerance
> 50%	10% absolute
> 25%	20% relative
> 5%	5% absolute
< 5%	50% relative

Evaluation of current analyte

Standard

Sample

Filename: amp_sp02

Filename: amp_du2661

Chromatographic Separation

Ret. Time 4,250

Ret. Time 4,260

Applicable Difference: relative (%) 0,24 Evaluation: acceptable

Mass Spectrometric Detection

Mass/Trans.	Area	Rel. Abund.	Range Limits		Area	Rel. Abund.	Difference	Evaluation
			Lower	Upper				
136>91	7987326	100,0%	90,0%	110,0%	7041264	100,0%	0,0%	acceptable
136>65	1760918	22,0%	17,0%	27,0%	1536830	21,8%	0,2%	acceptable
136>39	222772	2,8%	1,4%	4,2%	198179	2,8%	0,0%	acceptable
136>63	142928	1,8%	0,9%	2,7%	132643	1,9%	0,1%	acceptable
		0,0%	0,0%	0,0%		0,0%	0,0%	

Area Ratio Sample/Standard (m/z = 136>91): 0,88

Skladovanie vzoriek

- Bežné vzorky - 3 mesiace
- Možnosť dlhodobého skladovania až na 10 rokov
 - Požiadavka klienta
 - Pozitívne vzorky
 - Podozrivé vzorky

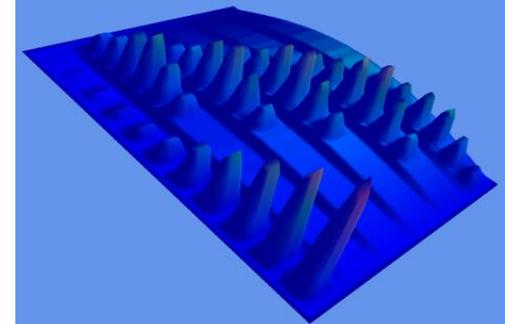
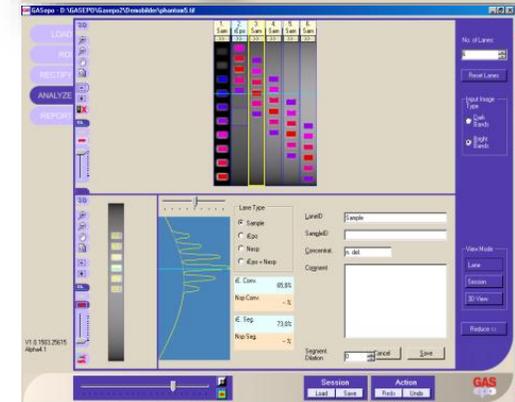
Medzinárodne uznávaný výskum

- **Progres v hmotnostnej spektrometrii**
 - Vývoj sensitívnych detekčných techník
 - Dlhodobé metabolity anabolických steroidov
- **Vývoj nových metód**
 - Detekcia rec. Erythropoietinu
 - Detekcia esterov Testosterónu
- **Definovanie medzinárodných štandardov**
 - Vývoj softwaru
 - Referenčné metódy
 - WADA Expert Groups

Finančná podpora WADA, PCC a Rakúskeho ministerstva školstva

SEIBERSDORF
LABORATORIES

GAS
epo



WADA EPO Detection Standard

- WADA Reference Method for the Detection of rEPO:

WADA Technical Document - TD2014EPO

Document Number:	TD2014EPO	Version Number:	1.0
Written by:	WADA EPO Working Group	Approved by:	WADA Executive Committee
Date:	17 May 2014	Effective Date:	1 September 2014

HARMONIZATION OF ANALYSIS AND REPORTING OF ERYTHROPOIESIS STIMULATING AGENTS (ESAs) BY ELECTROPHORETIC TECHNIQUES.

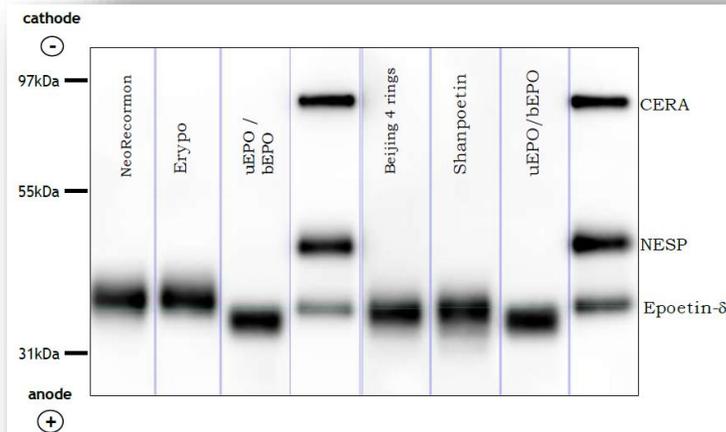


Figure 2. SDS-PAGE image showing the broad band characteristic of some commercially available Epoetin- α and - β preparations (NeoRecormon[®], Erypo[®], Beijing 4 rings, Shanpoetin[™]). The relative positions of endogenous urinary/blood EPO, Epoetin- δ , NESP and CERA are also shown.

Research Article

Drug Testing
and Analysis

Received: 12 August 2009

Revised: 10 November 2009

Accepted: 10 November 2009

Published online in Wiley InterScience: 16 December 2009

(www.drugtestinganalysis.com) DOI 10.1002/dta.97

SARCOSYL-PAGE: a new method for the detection of MIRCERA- and EPO-doping in blood

Christian Reichel,* Friedrich Abzieher and Thomas Geisendorfer

Transfer of Knowledge



- **Od roku 2012:**

- 38 Peer Reviewed publikácií

- 40+ aktívnych účastí na medzinárodných konferenciách

- 17 zamestnancov ostatných WADA laboratórií, ktorí absolvovali tréningovú stáž v Seibersdorfe

- **Medzinárodná reputácia:**

- Referenčné WADA laboratórium pre detekciu rEPO

- Pozývanie odborníkov z laboratória na takmer všetky Olympijské hry od roku 2004

- Pravidelná účasť zástupcov WADA na Workshope organizovanom laboratóriom

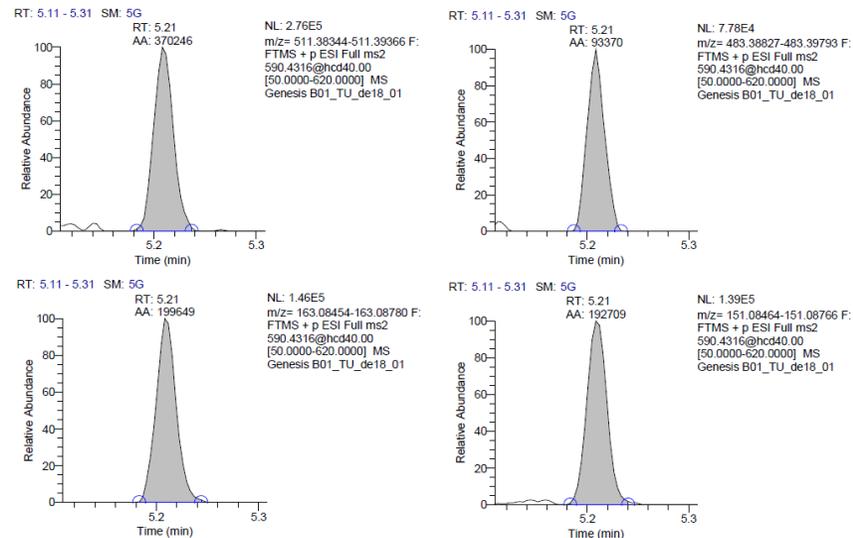
Nové trendy v antidopingovej analýze

- Analýza Esterov Testosterónu
- Dried Blood Spots (DBS) – suchá kvapka krvi

Analýza esterov testosterónu

- Krátky polčas, obmedzená stabilita vo vzorke
- Analýza vzoriek séra alebo plnej krvi (tiež DBS)
- Fluoridové skúmavky obzvlášť v prípade plnej krvi - stabilita
- Príprava vzorky – precipitácia proteínov, extrakcia, derivatizácia – LC/MS analýza
- Prvý prípad v cyklistike reporotovaný v júni 2021 laboratóriom v Seibersdorfe

Testosterone Undecanoate GP



Analýza esterov testosterónu



Research article

Drug Testing
and Analysis

Received: 31 May 2013

Revised: 4 September 2013

Accepted: 4 September 2013

Published online in Wiley Online Library

(www.drugtestinganalysis.com) DOI 10.1002/dta.1560

Screening of testosterone esters in human plasma

G. Forsdahl,^{a,b*} H.K. Vatne,^b T. Geisendorfer^a and G. Gmeiner^a

Research article

Drug Testing
and Analysis

Received: 28 June 2015

Revised: 5 October 2015

Accepted: 6 October 2015

Published online in Wiley Online Library

(www.drugtestinganalysis.com) DOI 10.1002/dta.1914

Detection of testosterone esters in blood

Guro Forsdahl,^{a,b*} Damir Erceg,^{c,d} Thomas Geisendorfer,^a Mirjana Turkalj,^{c,d}
Davor Plavec,^{c,d} Mario Thevis,^e Laura Tretzel^e and Günter Gmeiner^a

Suchá kvapka krvi - DBS

- Nový trend v boji proti dopingu
- TD2021DBS
- Výhody:
 - Jednoduchý odber vzorky
 - Preferované športovcami
 - Nízky objem odobranej krvi
 - Jednoduchší transport vzoriek
 - Nižšie nároky na skladovanie
 - Stabilita vzorky
- Avšak:
 - **Nenahrádza žiadne z ostatných testov / matric**
 - Doplnujúci test

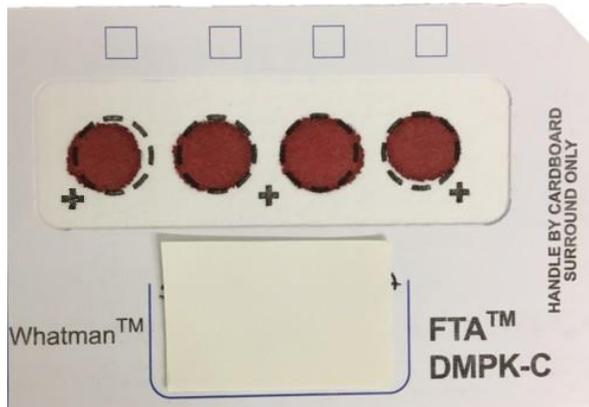
WADA Technical Document – TD2021DBS

Document Number:	TD2021DBS	Version Number:	1.0
Written by:	Collaborative DBS Working Groups, WADA	Approved by:	WADA Executive Committee
Reviewed by:	WADA Laboratory Expert Group		
Date:	20 May 2021	Effective Date:	1 September 2021

DRIED BLOOD SPOTS (DBS) FOR *DOPING CONTROL* **Requirements and Procedures for Collection, Transport, Analytical Testing and Storage**

- Nevýhody:
 - Nízky objem vzorky – citlivosť metód
 - Zabezpečenie proti manipulácii – A + B
 - Kvantitatívna analýza?
 - Menej skúseností s danou matricou

Suchá kvapka krvi - DBS



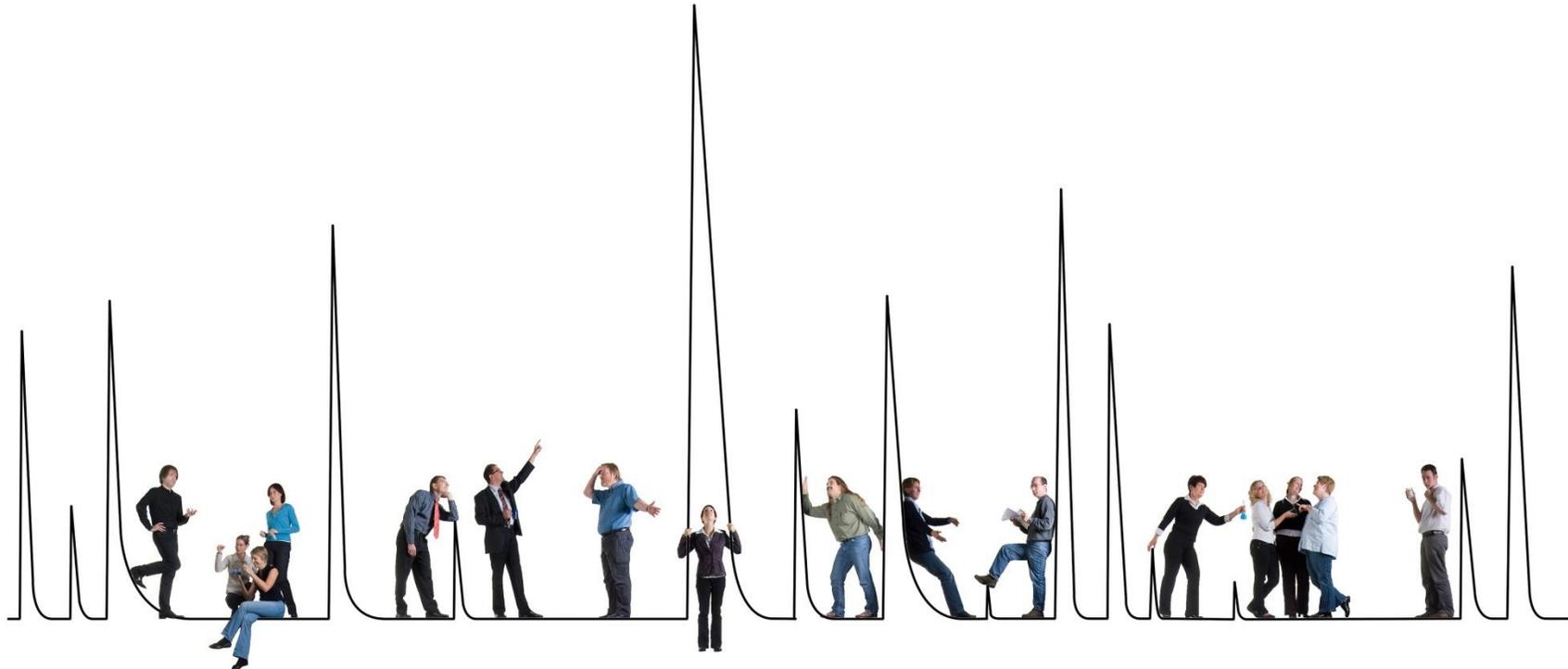
- **Celulózové karty**
 - odber z prsta (bolestivé?)
 - lacné
 - nie príliš vhodné na kvantitatívnu analýzu
 - ochrana pred manipuláciou so vzorkou?

- **VAMS**
 - odber z prsta (bolestivé?)
 - drahšie
 - vhodné aj na kvantitatívnu analýzu
 - ochrana pred manipuláciou so vzorkou?

- **TASSO**
 - (jednoduchý) odber z ramena
 - najdrahšie
 - vhodné aj na kvantitatívnu analýzu
 - ochrana pred manipuláciou so vzorkou!

Suchá kvapka krvi - DBS

- Akreditovaná metóda v laboratóriu od 1. štvrt'roku 2022
- Vyše 200 analytov
- Celulóзовé karty + TASSO
- Analytické Menu: na základe odporúčaní WADA
 - 1) Non-threshold látky bez MRL
 - 2) Estery steroidov
- Analýza DBS je vhodnou alternatívou pre testovanie športovcov mimo rámec bežného testovania na znížený počet analytov (prednostne OOC?)
- Nenahrádza ostatné testovanie



Seibersdorf Labor GmbH, 2444 Seibersdorf, Austria

T +43 (0) 50 550-2500, F +43 (0) 50 550-2502

office@seibersdorf-laboratories.at

www.seibersdorf-laboratories.at