

## Validação do método de deteção de eritropoietina recombinante humana em urina humana por focalização isoelétrica

Ana Sofia Rodrigues Tavares

Responsável da Triagem VIII – Deteção de EPO, Laboratório de Análises de Dopagem, Instituto Português do Desporto e Juventude. Sofia.Tavares@ipdj.pt  
Área Científica de Análises Clínicas e Saúde Pública, Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa, Instituto Politécnico de Lisboa.

**RESUMO:** A eritropoietina (EPO) é uma substância que estimula a produção de eritrócitos, aumentando a oxigenação muscular, sendo segregada de forma natural pelo organismo e excretada na urina em baixas concentrações. Devido às suas propriedades e características, a EPO foi rapidamente introduzida no mundo do desporto, como substância ilícita, proporcionando vantagens no rendimento desportivo. No início de 2000 foi desenvolvido um método de deteção direta de EPO Recombinante (rHuEPO) em urina humana por Lasne, baseado na focalização isoelétrica (IEF) em gel de poliacrilamida, seguido de duplo blote, tendo este sido publicado e validado. Em 2002, a Agência Mundial Antidopagem (AMA) implementou este mesmo método, sendo atualmente um dos métodos oficiais utilizado pelos laboratórios acreditados pela AMA. Desta forma, o ponto de partida para a realização deste trabalho consistiu na necessidade de implementar e validar o método de referência de IEF para a deteção de rHuEPO em urina humana. O trabalho foi realizado no Laboratório de Análises e Dopagem (LAD) do Instituto do Desporto de Portugal (IDP), atual Instituto Português do Desporto e Juventude (IPDJ). O principal objetivo deste trabalho consistiu no estudo/investigação de diferentes parâmetros de validação (especificidade/seletividade; capacidade de identificação; limite de deteção; exatidão e repetibilidade), de acordo com o protocolado no Procedimento Geral interno do Laboratório de Análises de Dopagem de Lisboa (LAD). O referido método de triagem e confirmação revelou possuir características de desempenho conformes com os requisitos aplicáveis, pelo que é considerado validado e apto.

*Palavras-chave: eritropoietina, focalização isoelétrica, duplo blote, deteção quimiluminescente, validação de métodos.*

## Validation of isoelectric focusing method for recombinant erythropoietin detection in human urine

**ABSTRACT:** Erythropoietin (EPO) is a substance that stimulates red blood cell production, increasing muscle oxygenation and is secreted naturally by the body and excreted in urine in low concentrations. Due to the special properties of EPO, this was quickly introduced into the world of sport and its illicit use provides advantages in sports performance. In early 2000, was developed a method for direct detection of erythropoietin (EPO) on recombinant human urine by Lasne, based on isoelectric focusing (IEF) in polyacrylamide gel, followed by double blotting, has been published and validated. In 2002, the World Anti-Doping Agency (WADA) has implemented this same method which is currently the only official method used by laboratories accredited by WADA. The starting point for this work was the need to implement and validate the reference method, for the detection of recombinant erythropoietin in human urine. The study was conducted at the Laboratory for Doping Analysis and (LAD) of the Sports Institute of Portugal (IDP), current IPDJ. The

objective of the work focused on validation studies/investigation of different validation parameters (specificity/selectivity; ability identification, detection limit, accuracy and repeatability), according the protocol Procedimento Geral Interno of the Antidoping Laboratory of Lisbon. This method of screening and confirmation has revealed performance characteristics in accordance with the applicable requirements for what is considered valid and fit.

*Keywords: erythropoietin, isoelectric focusing, double blot, chemiluminescent detection, method validation.*

## Introdução

A eritropoietina (EPO) é uma glicoproteína com um peso molecular de 30,4 kDa, 40% do qual é atribuído ao seu conteúdo em carboidratos<sup>1-2</sup>. A EPO regula a produção diária de  $2,5 \times 10^{11}$  glóbulos vermelhos necessária para manter a capacidade de transporte de oxigénio pelo sangue periférico sob condições fisiológicas<sup>1-2</sup>. Produzida no rim e libertada para a circulação, atinge a medula óssea na qual atua sobre recetores específicos, promovendo a proliferação e diferenciação dos progenitores eritróides<sup>1-2</sup>. Dadas as características da eritropoietina recombinante (rHuEPO), disponível como medicamento a partir de 1985, a EPO e os seus derivados foram rapidamente introduzidos no mundo desportivo como agente dopante. Esta substância é utilizada ilicitamente nos desportos aeróbicos, sobretudo em desportos de *endurance* com a finalidade de aumentar o aporte de oxigénio aos tecidos<sup>3-7</sup>. Em 1990, o Comité Olímpico Internacional (COI) proibiu oficialmente a utilização de EPO<sup>3,6,8-9</sup>. Durante muito tempo, a deteção laboratorial de rHuEPO em atletas, assim como as outras formas de eritropoietina sintética, era algo impossível de se realizar, devido ao facto desta substância ser estruturalmente complexa e de elevada massa molecular, estar presente em baixas concentrações nos fluidos biológicos e ser bastante semelhante à forma endógena<sup>3,5,7-10</sup>. No início de 2000 foi desenvolvido um método de deteção direta de rHuEPO em urina humana por Lasne, baseado na focalização isoeletrica (IEF) em gel de poliacrilamida, seguido de duplo blote, tendo sido publicado e validado<sup>3,7,11-12</sup>. O método de identificação das rHuEPO (i.e., epoínas) e análogos [e.g., darbepoína e *methoxypolyethylene glycol* – epoína beta (CERA)], atualmente aceite pela Agência Mundial de Antidopagem (AMA), baseia-se no método descrito por Lasne et al., tratando-se de um método direto e qualitativo<sup>11-13</sup>. O método para a deteção de EPO em urina, à data da realização deste trabalho (2010), encontra-se detalhadamente descrito no documento técnico TD2009EPO da AMA. No entanto, e apesar do referido documento técnico ter sido sujeito a reformulações em março de 2013 (TD2013EPO)<sup>14</sup> e setembro de 2014<sup>15</sup> (TD2014EPO), tal situação não implica qualquer alteração na aplicação da metodologia de validação de método<sup>10</sup>. A validação de um método consiste num conjunto de investigações empreendidas num laboratório de modo a, por um lado, “medir” a qualidade dos seus resultados, como

também apresentar evidências objetivas de que essa mesma qualidade está de acordo com o uso que vai ser dado aos seus resultados<sup>16</sup>.

Assim, dada a natureza qualitativa do método em questão e a extensa validação científica a que o mesmo já foi submetido, em diferentes laboratórios e alvo de várias publicações, o principal objetivo deste trabalho consistiu no estudo/investigação de diferentes parâmetros de validação (especificidade/seletividade; capacidade de identificação; limite de deteção; exatidão e repetibilidade), de acordo com o protocolado no Procedimento Geral interno do Laboratório de Análises de Dopagem de Lisboa (LAD)<sup>17</sup>.

## Metodologia

### Desenho do estudo

Sendo este um método de referência qualitativo e não havendo, a esta data, um método que fosse comparável, o presente trabalho consiste no estudo e comparação dos resultados obtidos dentro de um conjunto representativo de amostras de urina de resultado conhecido.

### Amostras

Para o estudo dos parâmetros de validação especificidade/seletividade, capacidade de identificação e repetibilidade foram utilizadas amostras de urina obtidas a partir de colaboradores do LAD, sendo provenientes de indivíduos de ambos os géneros e com idades compreendidas entre os 25 e 40 anos. Todas as amostras foram divididas em duas alíquotas: a uma das alíquotas foi diretamente aplicado o procedimento de deteção de ruído e a outra alíquota foi previamente fortificada com um determinado volume de um dos três padrões de referência: *Biological Reference Preparation* (BRP); NESP e Mircera. Para o estudo do limite de deteção foram utilizados 3 padrões de referência (PR) – BRP, NESP e Mircera –, tendo sido efetuada a preparação de seis diluições para cada PR e utilizado o mesmo PR em duplicado para cada diluição efetuada. Para o estudo da repetibilidade dos PR – BRP, NESP, Mircera e NIBSC e BRP + NESP –, utilizou-se o mesmo padrão aplicado 5 vezes no mesmo gel. Para o estudo da exatidão utilizou-se uma amostra controlo verdadeira positiva, proveniente do ensaio interlaboratorial da AMA 2009 EQAS-3.

### Análise dos dados

A análise estatística dos resultados foi feita através do método com duas respostas (positivo/negativo). Neste estudo, a especificidade e a sensibilidade, bem como um conjunto de outros parâmetros indicadores da validade do método, foram estimados por aplicação de diferentes equações estatísticas.

### Material e reagentes

Os PR utilizados e os respetivos fornecedores foram: rHuEPO (BRP), da *European Pharmacopeia Commission* (mistura equimolar de epóietina  $\alpha$  e  $\beta$ ); darbepóietina  $\alpha$  (NESP), da *Amgen*; uHuEPO (*human urinary EPO*) do *National Institute for Biological Standards and Control* – NIBSC e Mircera (CERA – *Continuous Eritropoietin Receptor Activator*), da Roche. O cocktail inibidor de proteases (Complete) é da Roche (Portugal) e as unidades de filtração – *steriflip* (0,22  $\mu$ M), bem como as unidades de ultrafiltração *Amicon* 4 e 15 (ambas com um *cut-off* de 30.000 Da, em termos de peso molecular) e as membranas para *western blot*, *durapore* e *immobilon-P* – são da *Millipore*. O reagente *dithiothreitol* (DTT) é da *Sigma* e as tabletes de PBS da *Medicago*. Todos os tampões e soluções foram preparados com água destilada *MilliQ* (*Water Lab System*, *Millipore*). Para a preparação do gel de poliácridamida utilizaram-se os seguintes reagentes: *PlusOne ReadySol* IEF 40% T, 3% C, *PlusOne TEMED*, *PlusOne glycine*, *PlusOne ammonium-persulfate* (APS), fornecidos pela GE (VWR, Portugal) e, ainda, os anfólitos 2-6 pH da *Serva*. Os reagentes *Plus One Urea* e *Plus One Tris* e o ácido orto fosfórico 85% são da GE (VWR, Portugal). Foi utilizada uma combinação de anticorpos: o anticorpo monoclonal de rato (clone AE7A5; *R&D System*; *Labocontrol*, Portugal), anticorpo policlonal biotinilado [*ImmunoPure goat anti-mouse IgG (H+L)*]; *Pierce*; *Rockford*, IL], complexo de peroxidase – estreptavidina (*Biospa*; Milão, Itália) e substrato para potenciar a reação quimiluminescente (*West Pico*; *Pierce*; *Rockford*, IL), por forma a detetar as EPOs presentes nas membranas de *western blot*.

### Procedimento de validação

A validação do método foi feita de acordo com o procedimento geral PGER-LADB-019<sup>17</sup>, tendo sido aplicado o método então em vigor e descrito no documento técnico TD2009EPO<sup>10</sup>.

Contudo, o método foi sujeito a revalidação dos parâmetros: especificidade/selectividade e capacidade de identificação, devido à introdução de um passo de imunopurificação dos retentados urinários e após o procedimento de concentração das amostras para IEF, de acordo com o Documento Técnico da AMA, publicado a 1 de março de 2013 (TD2013EPO)<sup>14</sup>. Atualmente, os procedimentos para dete-

ção dos agentes estimulantes da eritropoiese (ESAs) estão abrangidos pelo documento técnico da AMA – TD2014EPO<sup>15</sup>, publicado em 1 de setembro de 2014, não tendo, entretanto, obrigado a qualquer passo de revalidação dos parâmetros já validados.

### Preparação da amostra

Devido ao facto de a excreção urinária de eritropoietina ser muito baixa (aproximadamente 1 UI/L), é necessário proceder à concentração da proteína presente na amostra de forma a alcançar a sensibilidade que o método requer, ou seja, aproximadamente cerca de 100 UI/L no retentado<sup>3,8,18</sup>. Mediante sucessivas centrifugações e ultrafiltrações, faz-se a concentração da urina, cujo objetivo é eliminar as proteínas de pequeno tamanho presentes no filtrado. Utilizando filtros com tamanho de poro 30.000 Da., a EPO e as moléculas grandes são retidas e recuperadas num passo posterior. Este supõe uma primeira separação das proteínas, em função do seu tamanho, e também um aumento da quantidade relativa de proteína presente na amostra. Este processo permite alcançar um fator de concentração entre 700-1000<sup>2-3,8</sup>.

No processo de concentração da amostra controla-se o pH e adiciona-se um cocktail de inibidores de atividade proteolítica – Solução Complete, por forma a evitar a ação das proteases<sup>2-3,8</sup>.

### Focalização Isoelétrica (IEF) dos retentados urinários

A IEF é efetuada num intervalo de pH compatível com os pontos isoelétricos (pI) quer da eritropoietina endógena, quer dos seus análogos recombinantes (num pH com o intervalo 2 a 6). O gradiente de pH é construído através da utilização de anfólitos e a IEF é efetuada sob condições de desnaturação<sup>3,8</sup>.

### Western blot

O *western blot* é efetuado após a IEF, com o objetivo de detetar as isoformas da EPO. É efetuada uma primeira transferência em meio básico (tampão 25 mM Tris, 192 mM glicina), em que as isoformas passam do gel para uma membrana de PVDF, por transferência semi-seca. Após um passo de redução (5 mM DTT em PBS a 37° C), a membrana é bloqueada em solução de leite não gordo a 5% e posteriormente incubada numa solução 1% de leite sem gordura, com o anticorpo primário (clone AE7A5). Por forma a eliminar ligações inespecíficas do segundo anticorpo, é efetuada uma segunda transferência (duplo blote) em meio ácido (solução ácido acético 0,7%), cujo objetivo é transferir apenas o anticorpo primário que se ligou às isoformas da EPO para uma segunda membrana de PVDF – em que as proteínas interferentes ficam retidas na primeira membrana<sup>19</sup>. A membrana é bloqueada em solução de leite não gordo a 5%, incubada com o segundo anticorpo (anticorpo policlonal biotinilado) e, após um passo de lavagem, incubada com a solução de estreptavidina peroxidase (HRP).

\* Não serão apresentados os resultados referentes ao estudo de revalidação, uma vez que seguiram o mesmo protocolo<sup>17</sup> utilizado na validação do método em questão.

### Deteção quimiluminescente

A deteção por quimiluminescência baseia-se na deteção dos antígenos imobilizados e conjugados com *Horseradish Peroxidase* (HRP) que, por sua vez, estão ligados a anticorpos. A HRP, juntamente com um catalisador de reação (estreptavidina), favorece a oxidação do substrato (*Super Signal West Pico*), que gera luz quimiluminescente ao ser oxidado<sup>8</sup>. A luz é então detetada por uma câmara CCD (LAS 4000 da FUGI), a qual captura uma imagem digital do *western blot*. A imagem é analisada por densitometria, a qual avalia a quantidade de proteína colorida e quantifica os resultados em termos de intensidade ótica.

### Análise de imagem

A análise do perfil das bandas é feito através de um programa de análise de imagem – *Gel Analysis System for Erythropoietin* (GASepo), concebido especificamente para este fim<sup>20-22</sup>. Para esse efeito, o sistema de deteção (câmara CCD LAS-4000) é a interface com o *software* que transforma a banda em picos, cuja área é proporcional à intensidade da banda correspondente. As imagens obtidas após a revelação quimiluminescente são analisadas para quantificar a abundância de cada banda.

### Avaliação e interpretação dos resultados

Os resultados do procedimento de triagem/confirmação têm de cumprir com qualidade os critérios de aceitação e de identificação descritos no documento técnico da AMA TD2009EPO, versão 2.0 de 21 de setembro de 2009, documento em vigor, à data da realização deste estudo<sup>10</sup>.

### Resultados e Discussão

#### Seletividade/especificidade

No estudo da seletividade/especificidade pretendeu-se medir a eficácia do método em discriminar um analito específico numa mistura complexa, sem interferências significativas de outros componentes da mistura e de outros interferentes. Os resultados obtidos para esta experiência estão compilados nas Tabelas 1A e 1B.

**Tabela 1A:** Resultados e tratamento dos resultados da especificidade e seletividade

| Código - AU                     | Resultado | Observações              |
|---------------------------------|-----------|--------------------------|
| AU - SOF                        | Negativo  | Nada a observar          |
| AU - CLA                        | Negativo  | Nada a observar          |
| AU - AND                        | Negativo  | Nada a observar          |
| AU - ANA                        | Negativo  | Nada a observar          |
| AU - MAR                        | Negativo  | Arrastamento das bandas* |
| AU - LIL                        | Negativo  | Arrastamento das bandas* |
| AU - SAD                        | Negativo  | Nada a observar          |
| AU - MJ                         | Negativo  | Nada a observar          |
| AU - PAT                        | Negativo  | Nada a observar          |
| AU - SAR                        | Negativo  | Nada a observar          |
| PERCENTAGEM DE FALSOS POSITIVOS |           | 0%                       |

\* Característica intrínseca de cada amostra, sem significado analítico.

**Tabela 1B:** Resultados e tratamento dos resultados da especificidade e seletividade

| Código - AU                     | Resultado                 | Observações         |
|---------------------------------|---------------------------|---------------------|
| AU - SOF                        | Positivo                  | Nada a observar     |
| AU - CLA                        | Positivo                  | Nada a observar     |
| AU - AND                        | Positivo                  | Nada a observar     |
| AU - ANA                        | Perfil não consistente ** | Evidência Adicional |
| AU - MAR                        | Positivo                  | Nada a observar     |
| AU - LIL                        | Positivo                  | Nada a observar     |
| AU - SAD                        | Positivo                  | Nada a observar     |
| AU - MJ                         | Positivo                  | Nada a observar     |
| AU - PAT                        | Positivo                  | Nada a observar     |
| AU - SAR                        | Positivo                  | Nada a observar     |
| PERCENTAGEM DE FALSOS NEGATIVOS |                           | 0%                  |

\*\* Perfil não consistente com o típico perfil endógeno, sendo necessário efetuar SDS. Dado este facto, esta amostra não foi contabilizada para o cálculo da percentagem de falsos negativos.

**Capacidade de identificação**

Verificou-se que cada uma das quatro amostras de urina fortificadas com um dos PR em estudo, quando analisadas, cumpriam os critérios descritos na respetiva secção do TD2009EPO, verificando-se apenas exceção para uma das amostras fortificadas com Mircera.

**Limite de deteção (LD)**

Através da análise do gel onde foi efetuado o estudo do LD para o BRP, NESP e Mircera, verificou-se que o LD, quer para o BRP quer para o NESP, corresponde ao valor de 0,0144 ng e para o Mircera corresponde ao valor 0,0311 ng, uma vez que se verificou que os critérios de identificação expressos nas respetivas secções do TD2009EPO só são cumpridos até estes valores.

**Exatidão**

Verificou-se que os perfis IEF da amostra e dos PR preencheram os critérios de aceitação e de identificação, de acordo com a secção 3.2.1 do TD2009EPO, concluindo-se que o método é capaz de detetar um verdadeiro positivo.

**Repetibilidade intra-gel: padrões de referência (PR)**

Verificou-se que os PR em estudo (cf. Figuras 1-5), quando repetidos cinco vezes no mesmo gel, apresentavam perfil idêntico nas cinco repetições e todos cumpriam os critérios descritos na respetiva secção do TD2009EPO; para o NIBSC verificou-se que nenhum dos critérios era cumprido.

**Repetibilidade intra-gel: amostras**

Verificou-se que cada uma das oito amostras de urina fortificadas com um dos PR em estudo, quando repetidas duas vezes no mesmo gel (cf. Figura 6), apresentavam um perfil idêntico, bem como quando comparadas inter-gel e todas elas cumpriam os critérios descritos nas respetivas secções do TD2009EPO. Contudo, verificou-se uma exceção em duas amostras fortificadas com CERA, que apresentaram um perfil não consistente.

Figura 1 – Tratamento dos resultados correspondentes à Repetibilidade do BRP

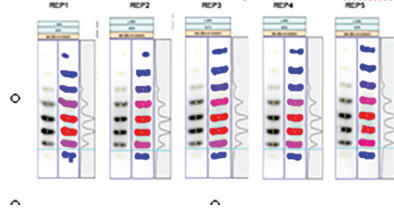


Figura 2 – Tratamento dos resultados correspondentes à Repetibilidade do NESP

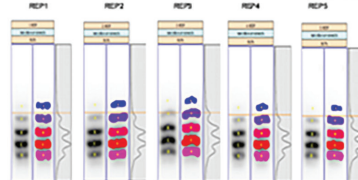


Figura 3 – Tratamento dos resultados correspondentes à Repetibilidade do BRP + NESP

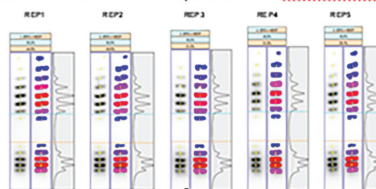


Figura 4 – Tratamento dos resultados correspondentes à Repetibilidade do Mircera

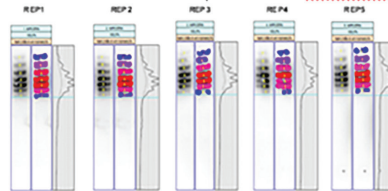
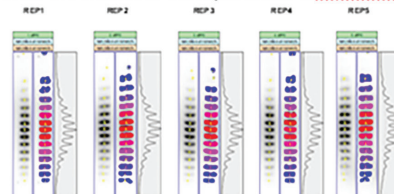
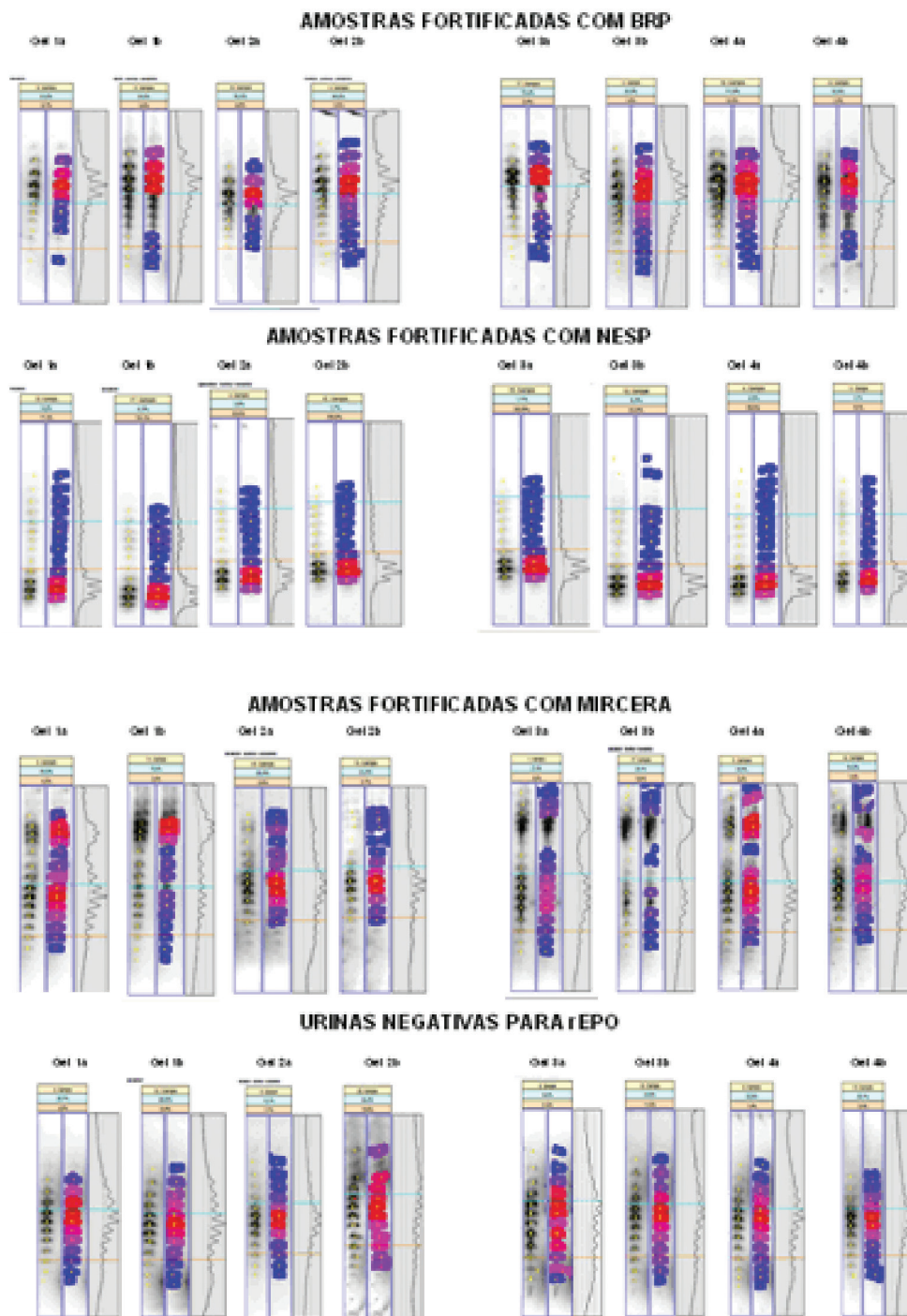


Figura 5 – Tratamento dos resultados correspondentes à Repetibilidade do NESP





**Figura 6:** Tratamento dos resultados correspondentes às amostras utilizadas nos géis 1, 2, 3 e 4.

**Repetibilidade inter-gel: padrões de referência (PR)**  
Verificou-se que os PR, quando comparados entre os dife-

rentes géis efetuados (cf. Figura 7), apresentavam perfil idêntico e todos cumpriam os critérios descritos no TD2009EPO.

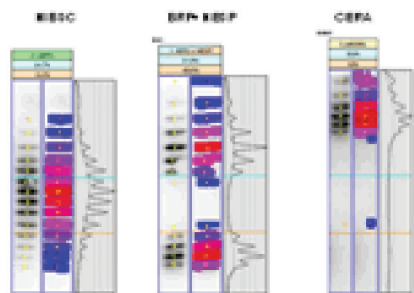


Figura 7: Tratamento dos resultados correspondentes aos padrões de referência utilizados no gel.

**Repetibilidade inter-gel: amostras**

Cada uma das duas amostras de urina fortificadas com um dos respetivos PR, quando repetidas duas vezes no mesmo gel (cf. Figura 8) apresentavam um perfil idêntico, bem como quando comparadas inter-gel e todas cumpriam os critérios descritos na respetiva secção do TD2009EPO. Das duas amostras fortificadas com Mircera, apenas uma delas apresentava um perfil idêntico quando comparada inter-gel e cumpria o critério descrito na secção 3.2.4. As urinas negativas para rHuEPO, quando repetidas duas vezes no mesmo gel, apresentavam perfil idêntico, bem como quando comparadas inter-gel e nenhuma delas cumpria os critérios descritos no TD2009EPO.

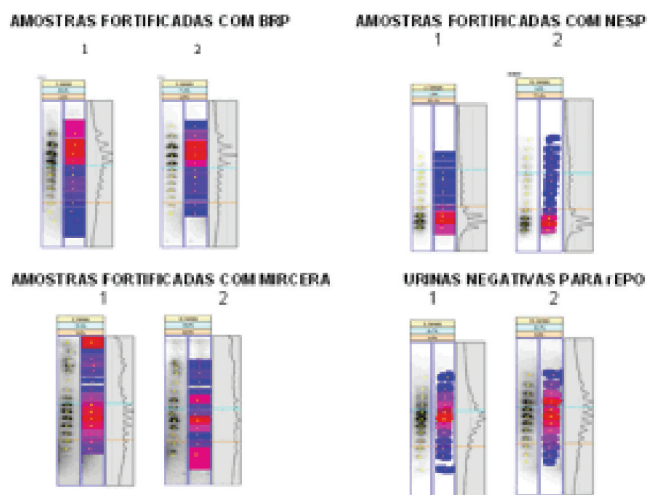


Figura 8: Tratamento dos resultados correspondentes às amostras utilizadas no gel.

**Análise dos resultados**

Apresentam-se seguidamente os resultados e respetivo tratamento dos dados obtidos para as amostras sujeitas ao método IEF (cf. Tabelas 2A e 2B).

Tabela 2A: Tratamento dos dados (IEF)

| Amostra    | Fortificada | Resultados Obtidos | Resultados Conhecidos | Result.  |
|------------|-------------|--------------------|-----------------------|----------|
| Amostra 1  | BRP         | Positivo           | Positivo              | PP       |
| Amostra 2  | BRP         | Positivo           | Positivo              | PP       |
| Amostra 3  | BRP         | Positivo           | Positivo              | PP       |
| Amostra 4  | BRP         | Positivo           | Positivo              | PP       |
| Amostra 5  | BRP         | Positivo           | Positivo              | PP       |
| Amostra 6  | BRP         | Positivo           | Positivo              | PP       |
| Amostra 7  | BRP         | Positivo           | Positivo              | PP       |
| Amostra 8  | BRP         | Positivo           | Positivo              | PP       |
| Amostra 9  | BRP         | Positivo           | Positivo              | PP       |
| Amostra 10 | BRP         | Positivo           | Positivo              | PP       |
| Amostra 11 | NESP        | Positivo           | Positivo              | PP       |
| Amostra 12 | NESP        | Positivo           | Positivo              | PP       |
| Amostra 13 | NESP        | Positivo           | Positivo              | PP       |
| Amostra 14 | NESP        | Positivo           | Positivo              | PP       |
| Amostra 15 | NESP        | Positivo           | Positivo              | PP       |
| Amostra 16 | NESP        | Positivo           | Positivo              | PP       |
| Amostra 17 | NESP        | Positivo           | Positivo              | PP       |
| Amostra 18 | NESP        | Positivo           | Positivo              | PP       |
| Amostra 19 | NESP        | Positivo           | Positivo              | PP       |
| Amostra 20 | NESP        | Positivo           | Positivo              | PP       |
| Amostra 21 | MIRCERA     | Positivo           | Positivo              | PP       |
| Amostra 22 | MIRCERA     | Positivo           | Positivo              | PP       |
| Amostra 23 | MIRCERA     | Duvidoso           | Positivo              | Duvidoso |
| Amostra 24 | MIRCERA     | Duvidoso           | Positivo              | Duvidoso |
| Amostra 25 | MIRCERA     | Positivo           | Positivo              | PP       |
| Amostra 26 | MIRCERA     | Positivo           | Positivo              | PP       |
| Amostra 27 | MIRCERA     | Positivo           | Positivo              | PP       |
| Amostra 28 | MIRCERA     | Positivo           | Positivo              | PP       |
| Amostra 29 | MIRCERA     | Positivo           | Positivo              | PP       |
| Amostra 30 | MIRCERA     | Duvidoso           | Positivo              | Duvidoso |
| Amostra 31 | -           | Negativo           | Negativo              | NN       |
| Amostra 32 | -           | Negativo           | Negativo              | NN       |
| Amostra 33 | -           | Negativo           | Negativo              | NN       |
| Amostra 34 | -           | Negativo           | Negativo              | NN       |
| Amostra 35 | -           | Negativo           | Negativo              | NN       |
| Amostra 36 | -           | Negativo           | Negativo              | NN       |
| Amostra 37 | -           | Negativo           | Negativo              | NN       |
| Amostra 38 | -           | Negativo           | Negativo              | NN       |
| Amostra 39 | -           | Negativo           | Negativo              | NN       |
| Amostra 40 | -           | Negativo           | Negativo              | NN       |
| Positivos  |             | 27                 | 30                    |          |
| Negativos  |             | 10                 | 10                    |          |
| FN         |             |                    | 0                     |          |
| FP         |             |                    | 0                     |          |
| PP         |             |                    | 27                    |          |
| NN         |             |                    | 10                    |          |

**Tabela 2B:** Tratamento dos dados (IEF)

| Resultados Obtidos | Resultados Conhecidos |                     |                     |
|--------------------|-----------------------|---------------------|---------------------|
|                    | Positivos             | Negativos           | Total               |
| Positivos          | 27 <sup>(A)</sup>     | 0 <sup>(B)</sup>    | 27 <sup>(A+B)</sup> |
| Negativos          | 0 <sup>(C)</sup>      | 10 <sup>(D)</sup>   | 10 <sup>(C+D)</sup> |
| Total              | 27 <sup>(A+C)</sup>   | 10 <sup>(B+D)</sup> | 37 <sup>(N)</sup>   |

A – Nº de amostras identificadas como positivas nos Resultados Obtidos/Resultados Conhecidos.

B – Nº de amostras identificadas como positivas pelos “Resultados Obtidos” e negativas pelos “Resultados Conhecidos”.

C – Nº de amostras identificadas como negativas pelos “Resultados Obtidos” e positivas pelos “Resultados Conhecidos”.

D – Nº de amostras identificadas como negativas por ambos os Resultados.

N – Nº de amostras analisadas.

As “amostras duvidosas” para Mircera pelo método IEF foram submetidas ao método de confirmação SDS-PAGE, tendo sido obtidos os resultados apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3:** Tratamento dos dados (SDS-PAGE)

| Amostra    | Fortificada | Resultados Obtidos | Resultados Conhecidos | Result.  |
|------------|-------------|--------------------|-----------------------|----------|
| Amostra 23 | MIRCERA     | Positivo           | Positivo              | Positivo |
| Amostra 24 | MIRCERA     | Positivo           | Positivo              | Positivo |
| Amostra 30 | MIRCERA     | Positivo           | Positivo              | Positivo |
| Positivos  |             | 3                  | 3                     |          |
| Negativos  |             | 0                  | 0                     |          |
| FN         |             |                    | 0                     |          |
| FP         |             |                    | 0                     |          |
| PP         |             |                    | 0                     |          |
| NN         |             |                    | 0                     |          |

Após se ter verificado que as amostras duvidosas para Mircera, em IEF eram positivas em SDS-PAGE, construiu-se uma nova tabela de dados onde se fez a análise final dos resultados obtidos (*cf.* Tabelas 4A e 4B).

**Tabela 4A:** Tratamento dos dados (IEF/SDS-PAGE)

| Amostra    | Fortificada | Resultados Obtidos | Resultados Conhecidos | Result. |
|------------|-------------|--------------------|-----------------------|---------|
| Amostra 1  | BRP         | Positivo           | Positivo              | PP      |
| Amostra 2  | BRP         | Positivo           | Positivo              | PP      |
| Amostra 3  | BRP         | Positivo           | Positivo              | PP      |
| Amostra 4  | BRP         | Positivo           | Positivo              | PP      |
| Amostra 5  | BRP         | Positivo           | Positivo              | PP      |
| Amostra 6  | BRP         | Positivo           | Positivo              | PP      |
| Amostra 7  | BRP         | Positivo           | Positivo              | PP      |
| Amostra 8  | BRP         | Positivo           | Positivo              | PP      |
| Amostra 9  | BRP         | Positivo           | Positivo              | PP      |
| Amostra 10 | BRP         | Positivo           | Positivo              | PP      |
| Amostra 11 | NESP        | Positivo           | Positivo              | PP      |
| Amostra 12 | NESP        | Positivo           | Positivo              | PP      |
| Amostra 13 | NESP        | Positivo           | Positivo              | PP      |
| Amostra 14 | NESP        | Positivo           | Positivo              | PP      |
| Amostra 15 | NESP        | Positivo           | Positivo              | PP      |
| Amostra 16 | NESP        | Positivo           | Positivo              | PP      |
| Amostra 17 | NESP        | Positivo           | Positivo              | PP      |
| Amostra 18 | NESP        | Positivo           | Positivo              | PP      |
| Amostra 19 | NESP        | Positivo           | Positivo              | PP      |
| Amostra 20 | NESP        | Positivo           | Positivo              | PP      |
| Amostra 21 | MIRCERA     | Positivo           | Positivo              | PP      |
| Amostra 22 | MIRCERA     | Positivo           | Positivo              | PP      |
| Amostra 23 | MIRCERA     | Positivo           | Positivo              | PP      |
| Amostra 24 | MIRCERA     | Positivo           | Positivo              | PP      |
| Amostra 25 | MIRCERA     | Positivo           | Positivo              | PP      |
| Amostra 26 | MIRCERA     | Positivo           | Positivo              | PP      |
| Amostra 27 | MIRCERA     | Positivo           | Positivo              | PP      |
| Amostra 28 | MIRCERA     | Positivo           | Positivo              | PP      |
| Amostra 29 | MIRCERA     | Positivo           | Positivo              | PP      |
| Amostra 30 | MIRCERA     | Positivo           | Positivo              | PP      |
| Amostra 31 | -           | Negativo           | Negativo              | NN      |
| Amostra 32 | -           | Negativo           | Negativo              | NN      |
| Amostra 33 | -           | Negativo           | Negativo              | NN      |
| Amostra 34 | -           | Negativo           | Negativo              | NN      |
| Amostra 35 | -           | Negativo           | Negativo              | NN      |
| Amostra 36 | -           | Negativo           | Negativo              | NN      |
| Amostra 37 | -           | Negativo           | Negativo              | NN      |
| Amostra 38 | -           | Negativo           | Negativo              | NN      |
| Amostra 39 | -           | Negativo           | Negativo              | NN      |
| Amostra 40 | -           | Negativo           | Negativo              | NN      |
| Positivos  |             | 30                 | 30                    |         |
| Negativos  |             | 0                  | 10                    |         |
| FN         |             |                    | 0                     |         |
| FP         |             |                    | 0                     |         |
| PP         |             |                    | 30                    |         |
| NN         |             |                    | 10                    |         |



**Tabela 4B:** Tratamento dos dados (IEF/SDS-PAGE)

| Resultados Obtidos | Resultados Conhecidos |           |       |
|--------------------|-----------------------|-----------|-------|
|                    | Positivos             | Negativos | Total |
| Positivos          | 30                    | 0         | 30    |
| Negativos          | 0                     | 10        | 10    |
| Total              | 30                    | 10        | 40    |

A – Nº de amostras identificadas como positivas nos Resultados Obtidos/Resultados Conhecidos.

B – Nº de amostras identificadas como positivas pelos “Resultados Obtidos” e negativas pelos “Resultados Conhecidos”.

C – Nº de amostras identificadas como negativas pelos “Resultados Obtidos” e positivas pelos “Resultados Conhecidos”.

D – Nº de amostras identificadas como negativas por ambos os Resultados.

N – Nº de amostras analisadas.

Para tratamento estatístico dos resultados obtidos foram aplicadas as seguintes equações:

$$\text{Sensibilidade} = \frac{A}{(A + C)} \times 100\% \quad \text{Equação 1}$$

Por aplicação da Equação 1, o valor obtido para o parâmetro sensibilidade foi de 100%.

$$\text{Especificidade} = \frac{D}{(B + D)} \times 100\% \quad \text{Equação 2}$$

Por aplicação da Equação 2, o valor obtido para o parâmetro especificidade foi de 100%.

$$\text{Eficiência} = \frac{(A + D)}{N} \times 100\% \quad \text{Equação 3}$$

Por aplicação da Equação 3, o valor obtido para o parâmetro eficiência foi de 100%.

$$\text{Índice de Youden} = (\text{Sensibilidade} + \text{Especificidade} - 1) \times 100\% \quad \text{Equação 4}$$

Por aplicação da Equação 4, a percentagem de Índice Youden é de 100%.

$$\% \text{ Negativos Verdadeiros}(TN) = \frac{D}{(C + D)} \times 100\% \quad \text{Equação 5}$$

Por aplicação da Equação 5, a percentagem de negativos verdadeiros é de 100%.

$$\% \text{ Positivos Verdadeiros}(TP) = \frac{A}{(A + B)} \times 100\% \quad \text{Equação 6}$$

Por aplicação da Equação 6, a percentagem de positivos verdadeiros é de 100%.

## Conclusões

Os laboratórios de análises de dopagem que se encontram acreditados pela AMA, para realizar este tipo de método, devem seguir rigorosamente todas as indicações descritas no documento técnico em vigor. Sendo um método de ensaio totalmente estandardizado e sujeito a extensa validação científica, o objetivo da implementação e validação do método no LAD de Lisboa foi demonstrar o rendimento do procedimento e não avaliar se o método era ou não adequado para o uso a que se destina. Verificou-se, de acordo com os resultados obtidos na validação do método, bem como através dos testes estatísticos efetuados, que o método de referência para a pesquisa de EPO em urina por IEF apresenta um bom desempenho para método de triagem/confirmação, uma vez que possui características de desempenho conformes com os requisitos aplicáveis, pelo que é considerado validado e apto. De acordo com o TD2009EPO, os “resultados duvidosos” obtidos para as amostras fortificadas com MIRCERA foram confirmados por procedimento eletroforético de SDS-PAGE que foi utilizado em complementaridade ao método IEF. Tais resultados duvidosos deveram-se, provavelmente, a um volume de fortificação do Branco de Urina com o PR Mircera ligeiramente inferior ao ideal para a deteção de Mircera através do método IEF, bem como um provável efeito matriz, cujas características endógenas podem ter atuado como interferentes no método IEF. Contudo, as evidências adicionais obtidas no SDS-PAGE pelas amostras em questão (“resultado duvidoso”) confirmaram um resultado positivo para o MIRCERA, o que suporta o referido no documento técnico então em vigor (TD2009EPO) no que toca à necessidade de realizar testes de evidência adicional sempre que estamos perante uma amostra cujo perfil não seja o típico perfil endógeno.

Atualmente, o método de IEF é considerado, para a maioria dos ESAs, método de triagem e não de confirmação, existindo para tal testes de maior sensibilidade, como o SAR-PAGE e o SDS-PAGE.

## Agradecimentos

Este trabalho só foi possível com a ajuda de alguns colaboradores do LAD, nomeadamente, o Dr. Michael Sekera, a Dra. Maria João Moniz e a Eng. Sandra Ramos. A todos eles, o meu muito Obrigada!

**Referências bibliográficas**

1. Moreira L. Eritropoietina: produção renal, anemia e cancro. Porto: Faculdade de Medicina da Universidade do Porto; 2011 [cited 2011 Sep 2]. Available from: <http://repositorio-aberto.up.pt/handle/10216/21977>
2. Reichel C, Gmeiner G. Erythropoietin and analogs. In Thieme D, Hemmersbach P, editors. Doping in sports: biochemical principles, effects and analysis. Springer; 2010. p. 251-94. ISBN 9783540790884
3. Lasne F, Martin L, Crepin N, de Ceaurriz J. Detection of isoelectric profiles of erythropoietin in urine: differentiation of natural and administered recombinant hormones. *Anal Biochem.* 2002;311(2):119-26.
4. Delanghe JR, Bollen M, Beullens M. Testing for recombinant erythropoietin. *Am J Hematol.* 2008;83(3):237-41.
5. Breidbach A, Catlin DH, Green GA, Tregub I, Truong H, Gorzek J. Detection of recombinant human erythropoietin in urine by isoelectric focusing. *Clin Chem.* 2003;49(6 Pt 1):901-7.
6. Khan A, Grinyer J, Truong ST, Breen EJ, Packer NH. New urinary EPO drug testing method using two-dimensional gel electrophoresis. *Clin Chim Acta.* 2005;358(1-2):119-30.
7. Lasne F, de Ceaurriz J. Recombinant erythropoietin in urine. *Nature.* 2000;405(6787):635.
8. García-Vaquero Soriano MP. Análisis de rhEPO en orina: metodología aplicada en el Laboratorio de Control de Dopaje del CSD. *Col ICD: invest cienc deporte.* 2005;(43):219.
9. Lasne F, Thioulouse J, Martin L, de Ceaurriz J. Detection of recombinant human erythropoietin in urine for doping analysis: interpretation of isoelectric profiles by discriminant analysis. *Electrophoresis.* 2007 ;28(12):1875-81.
10. Ayotte C, Pascual JA, Gmeiner G, Reichel C, Lasne F, Saugy M. Harmonization of the method for the identification of recombinant erythropoietins and analogues. WADA Executive Committee; 2009.
11. Lamon S, Robinson N, Sottas PE, Henry H, Kamber M, Mangin P, et al. Possible origins of undetectable EPO in urine samples. *Clin Chim Acta.* 2007;385(1-2):61-6.
12. Segura J, Pascual JA, Gutiérrez-Gallego R. Procedures for monitoring recombinant erythropoietin and analogues in doping control. *Anal Bioanal Chem.* 2007;388(7):1521-9.
13. Lundby C, Achman-Andersen NJ, Thomsen JJ, Norgaard AM, Robach P. Testing for recombinant erythropoietin in urine: problems associated with current anti-doping testing. *J Appl Physiol.* 2008;105(2):417-9.
14. World Anti-Doping Agency. Harmonization of the method for the identification of recombinant erythropoietins and analogues. WADA; 2013.
15. WADA EPO Working Group. TD2014EPO: harmonization of analysis and reporting of erythropoiesis stimulating agents (ESAs) by electrophoretic techniques. WADA; 2014.
16. Lopes H. Seleção e validação de métodos de ensaio. Lisboa: LAD, Instituto do Desporto de Portugal; 2005.
17. Ramos S. Validação de métodos qualitativos – EPO. Lisboa: LAD, Instituto do Desporto de Portugal; 2010.
18. Tavares S. Procedimento de deteção de eritropoietina recombinante humana na urina por focalização isoelectrica. Lisboa: LAD, Instituto do Desporto de Portugal; 2010.
19. Lasne F. Double-blotting: a solution to the problem of nonspecific binding of secondary antibodies in immunoblotting procedures. *J Immunol Methods.* 2003;276(1-2):223-6.
20. Seibersdorf Labor GmbH. GASepo software package for quantification of recombinant erythropoietin in urine probes. Seibersdorf Labor GmbH; 2005.
21. Seibersdorf Labor GmbH. GASepo software package for quantification of recombinant erythropoietin in urine probes (supplement v2.0). Seibersdorf Labor GmbH; 2010.
22. Stolc S, Bajla I. Improved accuracy of band detection in GASepo system for quantitative analysis of images in EPO doping control. *Meas Sci Rev.* 2007;7(2):14-8.

Artigo recebido em 18.06.2013 e aprovado em 27.02.2015