



Presentazione
ELISA TDM

Informazioni generali

- Il prodotto TDM-ELISA consiste in un test immunoenzimatico competitivo colorimetrico impiegato per la determinazione della concentrazione plasmatica degli inibitori della proteasi di HIV
- Le concentrazioni plasmatiche dei PI sono correlate alla risposta terapeutica e a fenomeni di tossicità
Il loro monitoraggio aggiunge un'importante informazione nella gestione di pazienti HIV-positivi

Applicazioni

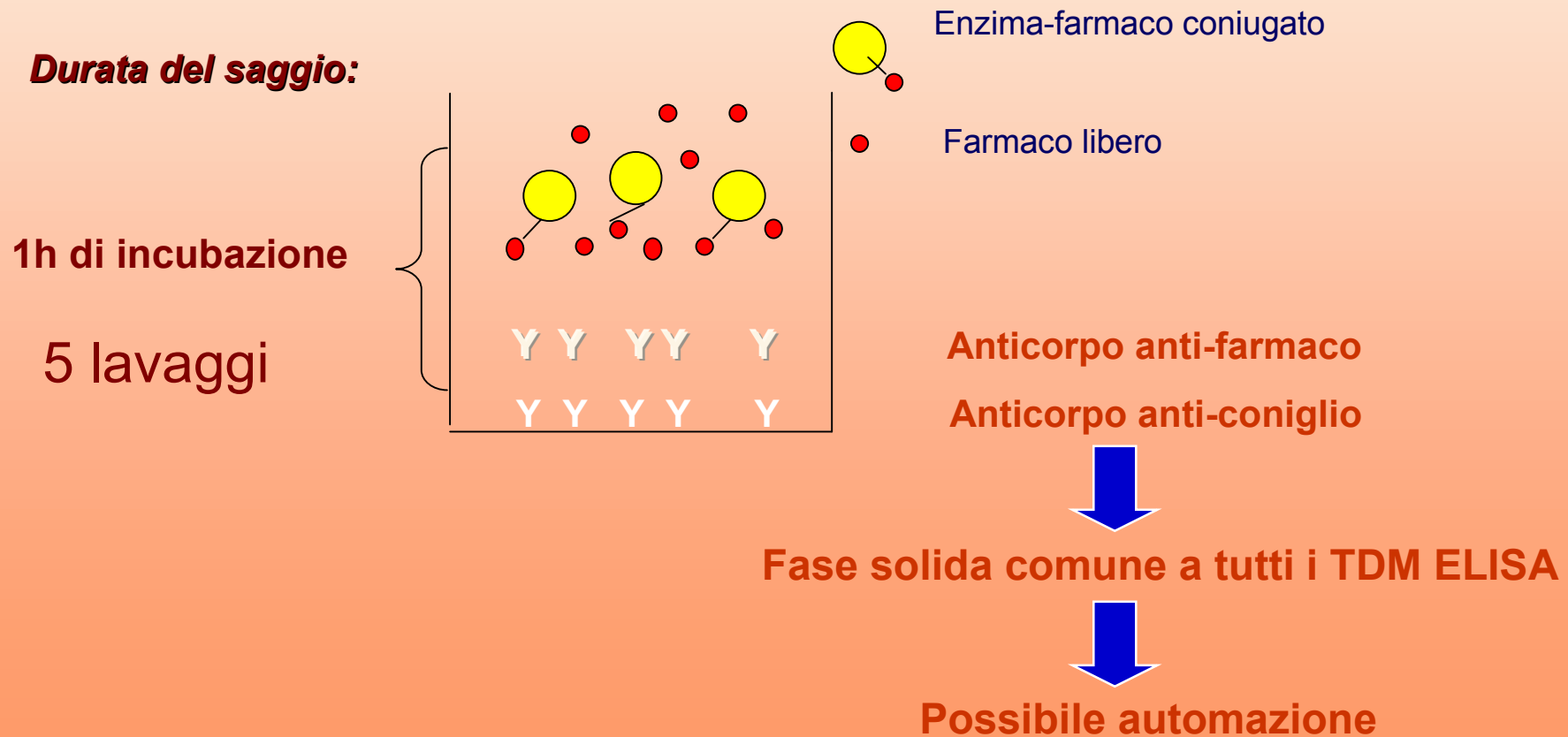
- ✓ **Il metodo permette la determinazione della concentrazione degli IP nel plasma di pazienti in terapia HAART**
- ✓ **L'uso del TDM appare particolarmente utile nelle seguenti situazioni:**
 - ✓ **donne gravide e bambini**
 - ✓ **pazienti nei quali siano sospettate interazioni farmacologiche significative che possano indurre effetti avversi dose-correlati o causare una riduzione dell'efficacia della terapia**
 - ✓ **condizioni fisiopatologiche che modifichino in modo significativo la funzionalità epatica o renale e che inducano una alterazione nell'assorbimento, distribuzione, metabolismo o eliminazione del farmaco**
 - ✓ **pazienti pluri-trattati che presentino ceppi virali resistenti alla terapia**
 - ✓ **pazienti nei quali vengano utilizzati schemi di dosaggio alternativi la cui efficacia non è stata ancora provata in trial clinici**
 - ✓ **presenza di tossicità dose-correlata**
 - ✓ **mancanza di risposta virologica in paziente "naive"**

IMPORTANZA TDM - ELISA

Un risultato TDM nella norma è un dato assai importante per il clinico perché permette di escludere livelli alterati di farmaco come causa di possibili tossicità o inefficacia terapeutica

Schema ELISA

I. COMPETIZIONE

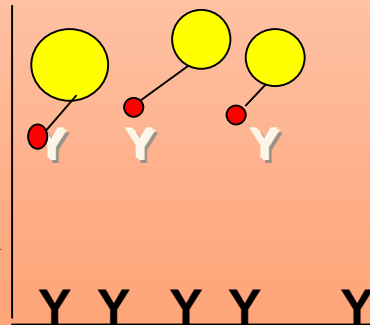


II. Reazione di rilevazione

Aggiunta del **Substrato cromogeno**



30 min di
incubazione



Anticorpo anti-farmaco

Aggiunta della soluzione di
arresto e lettura a 450nm

Anticorpo anti-coniglio

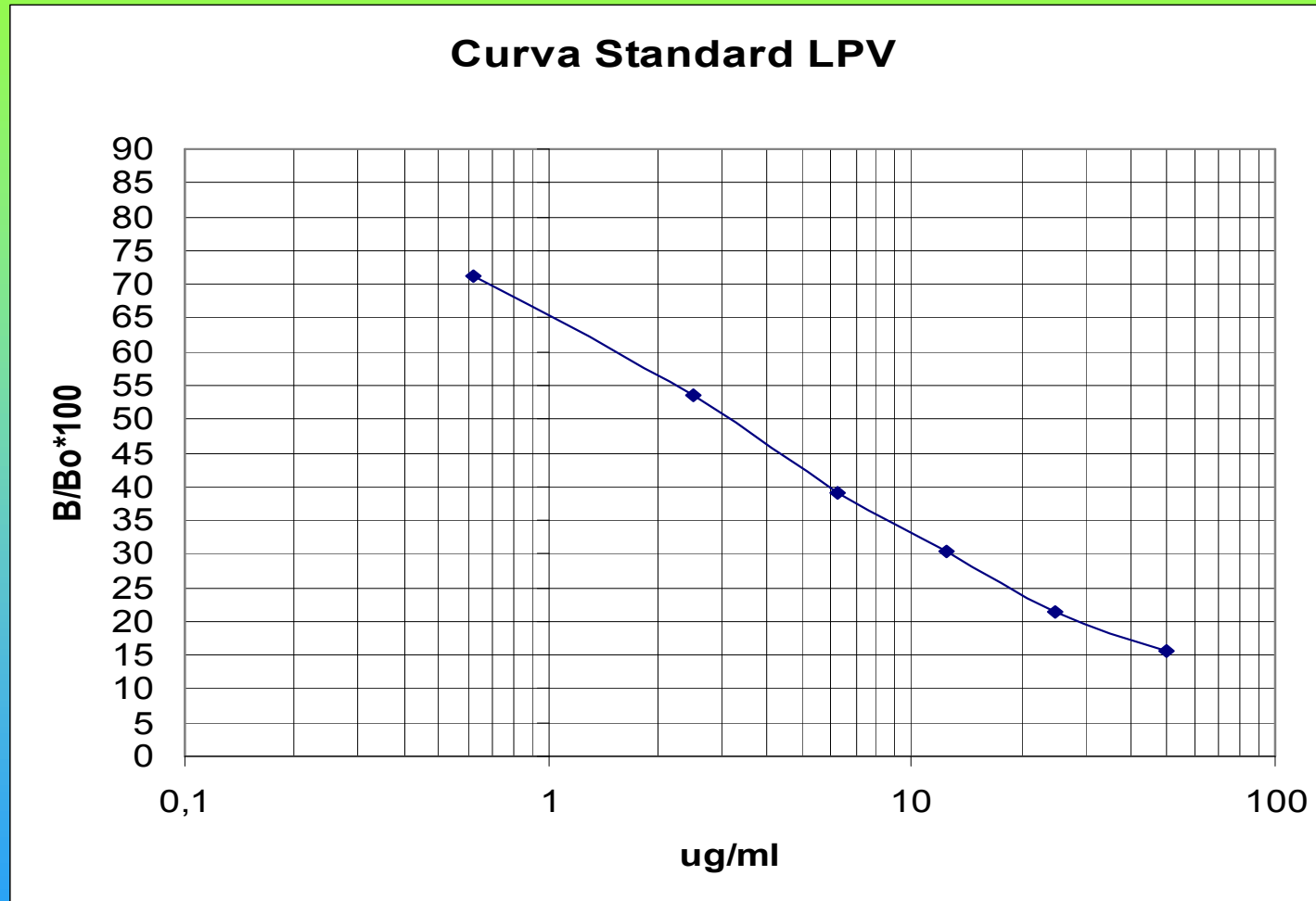
Tabella riassuntiva

Descrizione e codice	Preparazione del campione	Procedimento ELISA
TDM-ELISA LPV Cod. 2678	100µl di plasma + 300µl di MetOH – Vortex per 10-15sec Centrifugazione a 10min 10000 rpm in microcentrifuga Prelevare 100µl di surnatante limpido e diluirlo con 150µl di acqua. Vortex Prelevare 100µl della precedente diluizione e aggiungere 150µl di MetOH 30% Vortex Usare 20 µl per i test	20µl campione precedentemente preparato + 80µl Enzima specifico + 100 µl Antisiero specifico <u>Incubare 1h a RT</u>
TDM-ELISA RTV booster Cod. 7678	10µl di + 990 µl di MetOH 30% Vortex Usare 20 µl per i test	Lavare i pozzetti 5 volte con il Tampone di Lavaggio Aggiungere 200µl della soluzione cromogena (TMB) opportunamente diluita nella soluzione di sviluppo
TDM-ELISA APV / Fos APV Cod. 1678	10µl di plasma + 990 µl di diluente del campione fornito Vortex Usare 20 µl per i test	<u>Incubare 30min (al buio)</u> Aggiungere 50µl della soluzione di arresto
TDM-ELISA NFV Cod. 3678	100µl di plasma + 300µl di MetOH – Vortex per 10-15sec Centrifugazione a 10min 10000 rpm in microcentrifuga Prelevare 100 µl di surnatante limpido e diluirlo con 150 µl di acqua distillata. Vortex Prelevare 10 µl della precedente diluizione + 990µl di Metanolo al 30%. Vortex Usare 20 µl per i test	Lettura a 450nm su lettore da micropiastra

Di seguito vengono schematizzate le fasi delle varie preparazioni per l'analisi dei diversi farmaci a partire da un plasma limpido fresco. Il plasma da processare va analizzato subito dopo il prelievo oppure può essere aliquotato e conservato a -20°C e analizzato in un secondo momento. Vanno evitate fasi di congelamento e scongelamento del campione che possono alterarne l'integrità

	LPV	APV	NFV	RTV booster
Diluizione in metanolo assoluto	✓	✓	✓	
Centrifugazione	✓		✓	
Diluizione in acqua	✓		✓	
Diluizione in metanolo 30%	✓		✓	✓

TDM-Elisa LPV (Lopinavir)



Range di quantificazione del kit (entro il quale si ha una accuratezza del $\pm 20\%$) va da 1 a 8 $\mu\text{g/ml}$

Dati interni di precisione inter-saggio calcolata su n.5 campioni negativi addizionati di Lopinavir (Spike) ripetuti in n.5 sedute successive

Spike	ELISA 1	ELISA 2	ELISA 3	ELISA 4	ELISA 5	Media	DEV ST	CV
10	10	9,837	9,5	10,47	7,4	9,44	1,19	12,64
5	3,87	4,65	4	4,52	5	4,41	0,47	10,63
2,5	2,53	2,69	2,2	2,27	2,3	2,40	0,2	8,5
1,25	1,38	1,2	1	1,128	1,1	1,16	0,14	12,19
0,625	0,68	0,543	0,5	0,5625	0,6	0,58	0,07	11,76

Dati di precisione intra-saggio calcolata su n.3 Spike ripetuti 5 volte nella medesima seduta

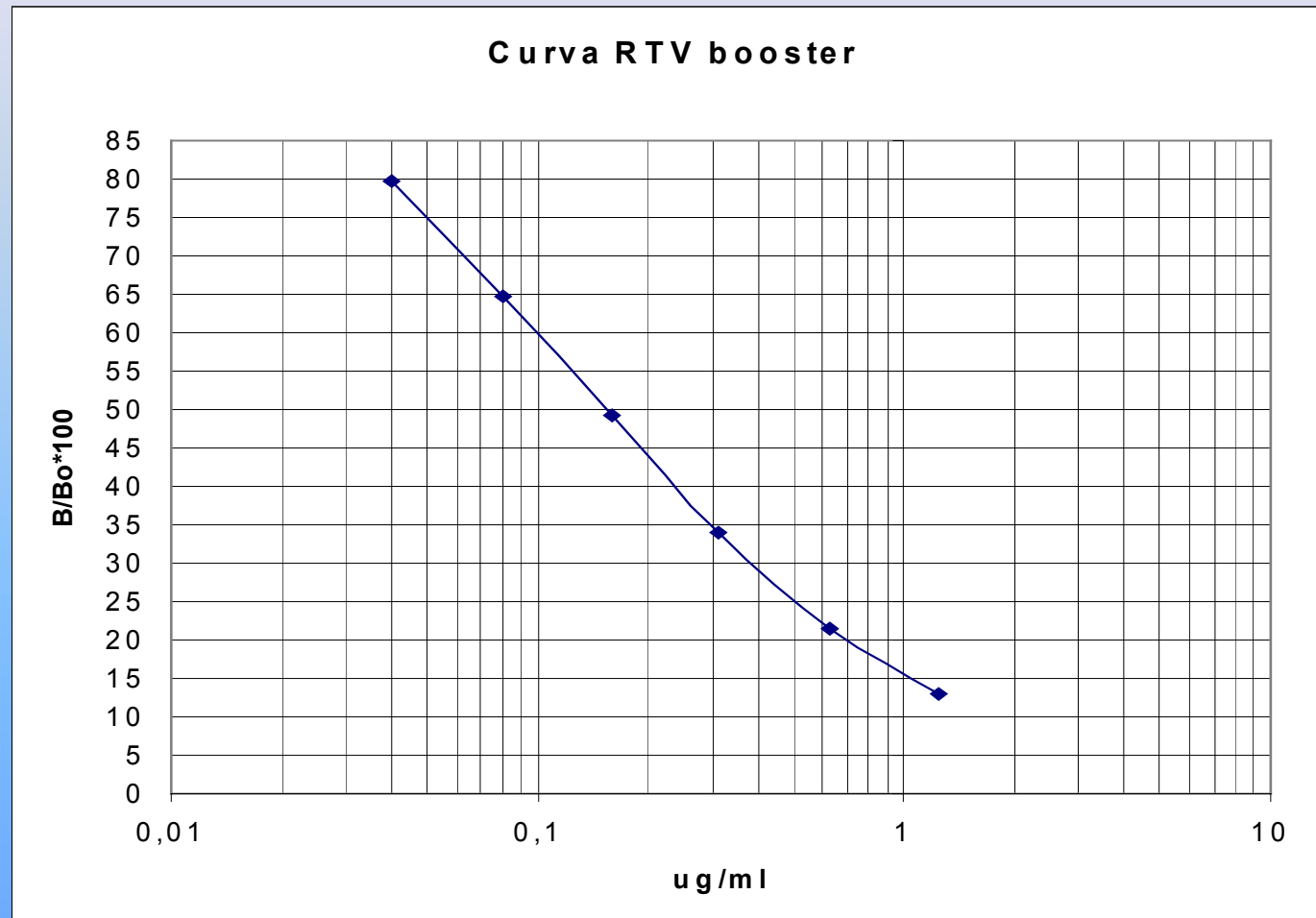
Spike	Valore 1	Valore 2	Valore 3	Valore 4	Valore 5	Media	DEV ST	CV
5	4,38	4,3	3,75	4,75	4,55	4,346	0,38	8,6
2,5	2,53	2,38	2,11	2,25	2,34	2,322	0,16	6,7
1,25	1,4	1,1	1,25	1,25	1,23	1,246	0,11	8,5

Dati intrasaggio. Test su 7 campioni di controllo da Ring Test a concentrazione nota di LPV per 7-10 volte nella stessa piastra

# 1	# 2	# 3	# 4	# 5	# 6	# 7	# 8	# 9	# 10	Target Value	Media	Dev St	CV	Inaccuracy
8240	7649	7516	8842	8681	8681	7709	8681	6962		8195	8106,8	668,5	8,2	-1,1
# 1	# 2	# 3	# 4	# 5	# 6	# 7	# 8	# 9	# 10	Target Value	Media	Dev St	CV	Inaccuracy
7085	7827	7440	7287	7709	8053	6387	7515	7929		7990	7470,2	511,5	6,8	-6,5
# 1	# 2	# 3	# 4	# 5	# 6	# 7	# 8	# 9	# 10	Target Value	Media	Dev St	CV	Inaccuracy
3155	3171	2863	3194	3185	3521	3528	3478	3444	3419	2930	3295,8	216,1	6,6	12,5
# 1	# 2	# 3	# 4	# 5	# 6	# 7	# 8	# 9	# 10	Target Value	Media	Dev St	CV	Inaccuracy
1569	1808	1831	1822	1776	1873	1822	1799	1849	1901	1639	1805,0	90,4	5,0	10,1
# 1	# 2	# 3	# 4	# 5	# 6	# 7	# 8	# 9	# 10	Target Value	Media	Dev St	CV	Inaccuracy
785	792	864	1011	841	854	892	869	900	864	737	867,2	63,0	7,3	17,7
# 1	# 2	# 3	# 4	# 5	# 6	# 7	# 8	# 9	# 10	Target Value	Media	Dev St	CV	Inaccuracy
3057	3329	3049	3027	3393	3777	3768	3486	3328	3695	3296	3390,9	290,9	8,6	2,9
# 1	# 2	# 3	# 4	# 5	# 6	# 7	# 8	# 9	# 10	Target Value	Media	Dev St	CV	Inaccuracy
15950	16080	15860	16210	16760	17760	18210				16214	16690	939,8	5,6	2,9

Dati ottenuti nel Laboratorio di Medicina di Düsseldorf (<http://www.labor-duesseldorf.de>) - Dr Kuschak

TDM-Elisa RTV booster



Range di quantificazione del kit: da 0.09 a 0.9 $\mu\text{g/ml}$

Dati interni di precisione inter-saggio calcolata su n.4 campioni negativi addizionati di Ritonavir (Spike) ripetuti in n.5 sedute successive

Spike	ELISA 1	ELISA 2	ELISA 3	ELISA 4	ELISA 5	Media	Inaccuratezza
0,09	0,068	0,083	0,051	0,102	0,077	0,08	-15,33
0,18	0,142	0,185	0,128	0,18	0,151	0,16	-12,67
0,36	0,344	0,409	0,327	0,413	0,356	0,37	2,72
0,72	0,684	0,93	0,675	0,881	0,78	0,79	9,72

Dati di precisione intra-saggio calcolata su n.3 Spike ripetuti 3 volte nella medesima seduta

Spike	ELISA 1	ELISA 2	ELISA 3	Media	Dev. S.	CV %
0.09	0,077	0,085	0,075	0,08	0,005	6,7
0.18	0,151	0,157	0,162	0,16	0,006	3,5
0.36	0,356	0,327	0,33	0,34	0,016	4,7

TDM-ELISA RTV Booster

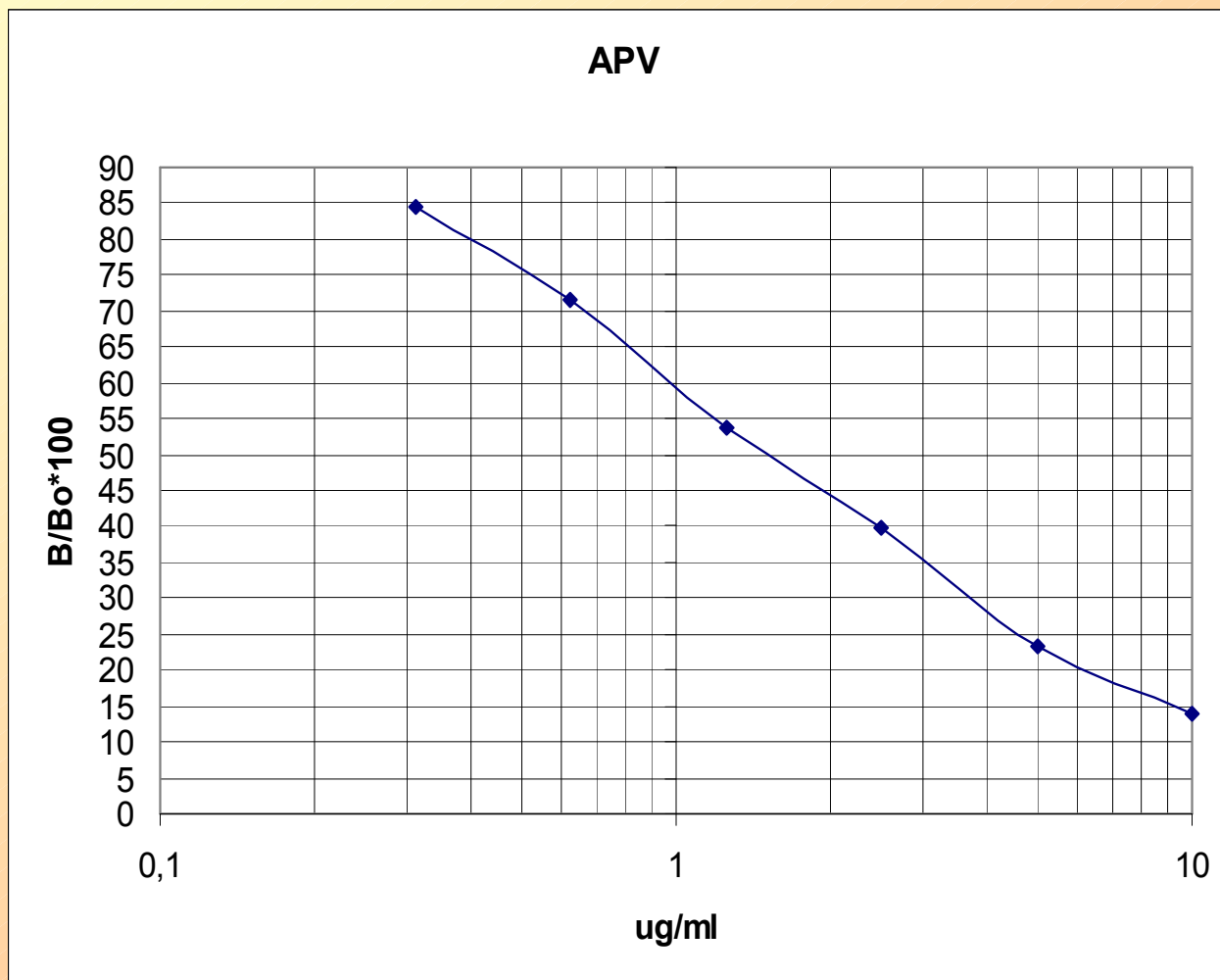
Tabella riassuntiva

Utilizzati 7 campioni da Ring Test a concentrazione nota per 10 volte nella stessa piastra (intrasaggio)

# 1	# 2	# 3	# 4	# 5	# 6	# 7	# 8	# 9	# 10	Target Value	Media	Dev St	CV	Inaccuracy
1039	1127	1250	927	986	1067	1144	1177	1144	1160	1100	1102	100,4	9,1	0,2
# 1	# 2	# 3	# 4	# 5	# 6	# 7	# 8	# 9	# 10	Target Value	Media	Dev St	CV	Inaccuracy
492	447	511	477	500	614	492	573	532	532	550	517,0	51,0	9,9	-6,0
# 1	# 2	# 3	# 4	# 5	# 6	# 7	# 8	# 9	# 10	Target Value	Media	Dev St	CV	Inaccuracy
197	187	186	218	169	187	209	210	190	210	220	196,3	15,2	7,7	-10,8
# 1	# 2	# 3	# 4	# 5	# 6	# 7	# 8	# 9	# 10	Target Value	Media	Dev St	CV	Inaccuracy
1025	1122	1210	1115	1115	1161	971	1087	947	965	1172	1071,8	90,0	8,4	-8,5
# 1	# 2	# 3	# 4	# 5	# 6	# 7	# 8	# 9	# 10	Target Value	Media	Dev St	CV	Inaccuracy
77,4	88	95,7	85,9	85,3	84,8	49,7	91,9	77,7	112	110	84,8	15,8	18,7	-22,9
# 1	# 2	# 3	# 4	# 5	# 6	# 7	# 8	# 9	# 10	Target Value	Media	Dev St	CV	Inaccuracy
55,2	51,8	48,5	46,1	83	48,1	50,2	50,6	51,3	50,6	73,3	53,5	10,6	19,9	-27,0
# 1	# 2	# 3	# 4	# 5	# 6	# 7	# 8	# 9	# 10	Target Value	Media	Dev St	CV	Inaccuracy
30,5	37,7	45,9	39,7	38,5	39,4	44,3	43,3	43,6	40,8	52,4	40,3	4,7	11,6	-23,0

Dati ottenuti nel Laboratorio di Medicina di Düsseldorf - dr Kuschak

TDM-Elisa APV (Amprenavir)



Range di quantificazione del kit: da 0.4 a 5 $\mu\text{g/ml}$

Dati interni di precisione inter-saggio calcolata su n. 5 campioni negativi addizionati di APV (Spike) ripetuti in n. 5 sedute successive

Spike	ELISA 1	ELISA 2	ELISA 3	ELISA 4	ELISA 5	Media	DEV ST	CV	Inaccuratezza
400	510	387	365	483	505	450	68,75	15,28	12,5
800	806	754	741	810	760	774,2	31,64	4,09	-3,2
1600	1640	1760	1690	1610	1580	1656	70,92	4,28	3,5
2500	2450	2480	2020	2350	2360	2332	183,22	7,86	-6,72
5000	5440	5190	5510	5310	5510	5392	139,36	2,58	7,84

Dati di precisione intra-saggio calcolata su n.5 Spike ripetuti 5 volte nella medesima seduta

Spike	# 1	# 2	# 3	# 4	# 5	mean	ST DEV	CV	Inaccuratezza
400	346	365	509	495	504	443,8	81,04	18,26	10,95
800	906	806	720	757	648	767,4	96,58	12,59	-4,075
1600	1640	1520	1580	1510	1420	1534	82,34	5,37	-4,125
2500	2450	2890	2690	2470	2100	2520	295,63	11,73	0,8
5000	5400	4600	5000	4090	5110	4840	507,99	10,50	-3,2

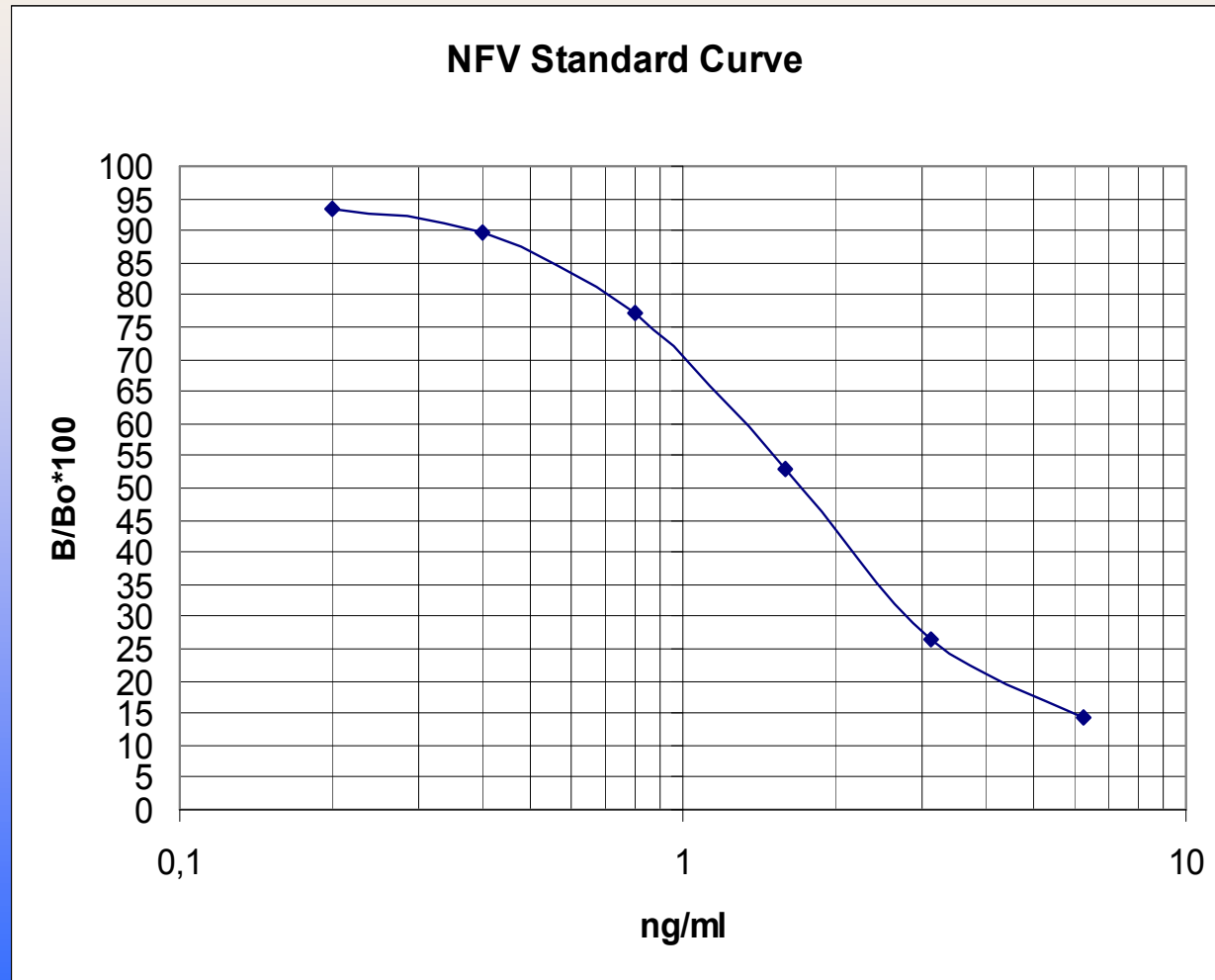
TDM-ELISA APV

Valutazione dei dati intrasaggio ottenuti su 4 campioni da Ring Test ripetuti 9 - 10 volte

# 1	# 2	# 3	# 4	# 5	# 6	# 7	# 8	# 9	# 10	Target Value	Media	Dev St	CV	Inaccuracy
5131	7394		6484	6862	7510	7451	5756	6183	3376	5720	6238,6	1347,6	21,6	9,07
# 1	# 2	# 3	# 4	# 5	# 6	# 7	# 8	# 9	# 10	Target Value	Media	Dev St	CV	Inaccuracy
3887	2489	2409	3077	4357	3560		2660	3609	2896	3600	3216,0	674,1	21,0	-10,67
# 1	# 2	# 3	# 4	# 5	# 6	# 7	# 8	# 9	# 10	Target Value	Media	Dev St	CV	Inaccuracy
3039	1984	3361	2930	2711	3248	2700	2516	3659	2023	2860	2817,1	547,0	19,4	-1,5
# 1	# 2	# 3	# 4	# 5	# 6	# 7	# 8	# 9	# 10	Target Value	Media	Dev St	CV	Inaccuracy
1596	2010	1505	2010	1721	1991	2120	2581	2085	2023	1800	1964,2	304,3	15,5	9,1

Dati ottenuti nel Laboratorio di Medicina di Düsseldorf - Dr Kuschak

TDM-Elisa NFV e M8



Range di quantificazione del kit: da 0.8 a 3 $\mu\text{g/ml}$

Dati interni di precisione inter-saggio calcolata su n.4 campioni negativi addizionati di NFV (Spike) ripetuti in n.5 sedute successive

I valori degli spike sono espressi in $\mu\text{g/ml}$

Spike	ELISA 1	ELISA 2	ELISA 3	ELISA 4	ELISA 5	Media	DEV ST	CV
0,75	0,72	0,65	0,74	0,86	0,90	0,77	0,104	13,52
1,50	1,77	1,28	1,49	1,82	1,52	1,57	0,222	14,13
3,00	3,15	2,85	3,77	3,15	2,79	3,14	0,386	12,30
6,00	6,64	4,49	7,60	5,80	6,06	6,12	1,145	18,71

Dati di precisione intra-saggio calcolata su n.3 Spike ripetuti 5 volte nella medesima seduta

Spike	Valore 1	Valore 2	ELISA 3	ELISA 4	ELISA 5	Media	DEV ST	CV
0,75	0,72	0,81	0,88	0,77	0,73	0,782	0,065	8,36
1,5	1,77	1,635	1,81	1,71	1,55	1,695	0,105	6,17
3	3,33	3,09	3,6	3,1	3,2	3,26	0,211	6,47

Risultati conclusivi dei dati ottenuti su tutti i TDM

Accuratezza e Precisione

**I dati ottenuti con l'ELISA sono equivalenti ai
dati che caratterizzano le performance dell'HPLC**
(Drose J.A. et. Alt., 32, 287-291 – JAIDS 2003)

**Il test risulta essere rapido e di facile
impiego e può essere introdotto ogni
laboratorio di analisi**

TDM-ELISA

Specificità

Non sono state registrate cross-reattività di ciascun TDM rispetto agli altri IP peptidici

(APV, LPV, RTV, NFV e M8, ATV, IDV, SQV)

e rispetto al **TIPRANAVIR** (nuovo farmaco di una nuova classe di inibitori delle Proteasi *non-peptidici*)

Non sono state registrate cross-reattività con altri farmaci utilizzati nelle terapia HAART

Limite di rilevazione in matrice

TDM - ELISA	ng/ml
LPV	123
APV	400
RTV	40

Ottenuto dalla media di 13 plasmi negativi diversi senza farmaco con -3 Dev St dal valore della media

Range di intervallo di misura

In accordo con le linee Guida Americane (US Therapy – DHHS) di ottobre 2006 i prodotti presentano gli intervalli di misura che tengono conto del limite terapeutico significativo

Intervalli di misura dinamici dei diversi prodotti

Farmaco	Range di quantificazione Accuratezza entro il 20 % (concentrazioni in $\mu\text{g} / \text{ml}$)
LPV	1 – 8
NFV	0,8 - 3
APV	0,4 - 5
RTV booster	0,09 – 0,9
RTV	0,5 - 5

Conclusioni

Gli ELISA TDM sono risultati essere uno strumento rapido e semplice e possono essere considerati un metodo valido e semplice che ogni laboratorio può impiegare routinariamente per il dosaggio terapeutico degli IP

Disponibilità

Prodotti attualmente disponibili:

TDM-ELISA APV

TDM-ELISA LPV

TDM-ELISA NFV

TDM-ELISA RTV booster

TDM-ELISA ATV *