

TDM APV / FOS-APV (ELISA AMPRENAVIR / FOS-AMPRENAVIR)

1	CAMPO DI APPLICAZIONE.....	2
2	PRINCIPIO DEL TEST	2
3	PRESTAZIONI DEL TEST	2
4	LIMITI DEL TEST.....	3
5	MATERIALI FORNITI	3
6	COMPOSIZIONE DEI MATERIALI FORNITI	3
7	MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI.....	4
8	CONDIZIONI DI CONSERVAZIONE	4
9	PREPARAZIONE DEI REAGENTI.....	4
10	CAMPIONI E LORO PREPARAZIONE.....	5
11	PROCEDIMENTO	5
12	METODO MATEMATICO DA APPLICARE PER IL CALCOLO DEI RISULTATI.....	6
13	PRECAUZIONI	7

1 CAMPO DI APPLICAZIONE

Il kit TDM APV (ELISA AMPRENAVIR / FOS-AMPRENAVIR) è un test immunoenzimatico competitivo in colorimetria per la determinazione della concentrazione plasmatica del farmaco Amprenavir. Il kit è utile per la gestione della terapia in pazienti infetti da HIV-1 e per il monitoraggio della aderenza terapeutica.

Il kit può essere anche impiegato per il dosaggio dell'Amprenavir in pazienti in terapia con Fos-Amprenavir; il profarmaco Fosamprenavir somministrato per via orale viene infatti rapidamente e quasi completamente idrolizzato ad Amprenavir a livello della mucosa intestinale prima di raggiungere la circolazione sistemica.

Per uso di ricerca.

2 PRINCIPIO DEL TEST

Il kit ELISA Amprenavir / Fos-Amprenavir è basato sulla competizione tra il farmaco ed il farmaco coniugato con l'enzima rivelatore; essi competono per il legame con il medesimo anticorpo policlonale specifico. La fase solida specie-specifica (pozzetti su una micropiastro) cattura l'anticorpo specifico. Il campione ed i reagenti in eccesso vengono allontanati tramite lavaggio. Il rilevamento del coniugato legato alla fase solida viene effettuato con l'aggiunta di una soluzione cromogena. L'attività enzimatica produce una soluzione colorata la cui assorbanza (O.D.) viene letta tramite un colorimetro per micropiastre. Il valore di assorbanza è inversamente proporzionale alla concentrazione del farmaco nel campione.

3 PRESTAZIONI DEL TEST

Il metodo permette la determinazione della concentrazione del farmaco Amprenavir nel plasma umano.

- Il range dinamico del sistema va da 0,6 a 5 microgrammi di farmaco per millilitro di plasma.
- L'accuratezza è di $\pm 20\%$
- La riproducibilità inter-saggio calcolata su n.3 campioni ripetuti in n.5 sedute successive è presentata nella tabella seguente.

Campione	Conc. seduta 1	Conc. seduta 2	Conc. seduta 3	Conc. seduta 4	Conc. seduta 5	Conc. media	Dev. Std	C.V.
1	0,53	0,551	0,544	0,505	0,659	0,56	0,06	10,62
2	2,92	3,056	2,793	3,151	2,761	2,94	0,17	5,70
3	1,164	1,248	1,143	1,244	1,214	1,202	0,05	4

- La riproducibilità inter-lotto calcolata sullo StO analizzato n°3 lotti diversi è presentata nella tabella seguente.

	O.D. 1	O.D. 2	O.D. 3	media	Dev.std.	C.V.
St 0	1,24	1,17	1,3	1,24	0,07	5,3

- La ripetibilità (intra-saggio) calcolata su n.3 campioni analizzati in triplicato nella medesima seduta è presentata nella tabella seguente.

Campione	OD 1	OD 2	OD 3	OD media	Dev.std.	C.V.
1	1,512	1,44	1,512	1,49	0,04	2,8
2	1,336	1,39	1,38	1,37	0,03	2,1
3	0,585	0,546	0,54	0,56	0,02	4,4

4 LIMITI DEL TEST

- Non sono state individuate cross-reattività significative (superiori allo 0,01% espresso come rapporto percentuale tra gli IC₅₀ dei farmaci) con altri farmaci antivirali utilizzati nella terapia di HIV-1 a concentrazioni plasmatiche considerate terapeutiche. I farmaci analizzati sono: Ritonavir, Nelfinavir, Saquinavir, Indinavir e Lopinavir.

5 MATERIALI FORNITI

Micropiastra adsorbita con Anticorpi	12x8 pozzetti
Antisiero APV	1x 12ml
Enzima APV	1x 10ml
Diluyente del campione	1x 50ml
Calibratori Amprenavir/Curva Standard (0, 2.5, 5, 10, 25, 50 e 100 ng/ml)	7x 0,15ml
TMB 10X	1x 3ml
Soluzione di sviluppo	1x 30ml
Soluzione di lavaggio 10X	1x 120ml
Soluzione di arresto	1x 8ml

6 COMPOSIZIONE DEI MATERIALI FORNITI

Micropiastra

12 strips da 8 pozzetti cadauna adsorbite con anticorpi anti-specie (IgG di pecora diretti contro IgG di coniglio), sigillate sotto vuoto in un sacchetto di polietilene

Antisiero APV

Un flacone contenente 12 ml di anticorpi di coniglio anti-Amprenavir in soluzione tamponata con aggiunta di conservante.

Enzima APV

Un flacone contenente 10 ml di anticorpi di coniugato Amprenavir-perossidasi di rafano in soluzione tamponata con aggiunta di conservante.

Diluyente del campione

Un flacone contenente 50 ml di soluzione tamponata.

Calibratori Amprenavir/Curva standard

7 fiale contenenti ciascuna 0,15 ml di Amprenavir in soluzione tamponata. I valori dei calibratori sono riportati in etichetta. I calibratori sono pronti per l'uso.

TMB 10X

Una fiala ambrata contenente 3 ml di soluzione cromogena tamponata concentrata 10X.

Soluzione di sviluppo

Un flacone contenente 30 ml di soluzione tamponata.

Soluzione di lavaggio 10X

Un flacone contenente 120 ml di soluzione tamponata concentrata 10X.

Soluzione di arresto

Una fiala contenente 8 ml di soluzione 1M di acido solforico.

7 MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI

- Lettore per micropiastre con filtro a 450 e 620 nm, preferibilmente dotato di software per il calcolo dei risultati.
- Pipette di precisione (volumi tra 10 e 1000 μ l, accuratezza \pm 5%) equipaggiate di puntali adatti
- Pipetta multicanale da 8 puntali (volume 100 μ l, accuratezza \pm 5%)
- Acqua deionizzata
- Agitatore Vortex
- Microcentrifuga per provette Eppendorf da 1.5 ml (10.000 x g)
- Provette Eppendorf da 1.5 ml
- Vaschette per pipetta multicanale
- Cilindro in vetro da 1 litro
- Pipette da 10 ml e propipetta
- Timer (range 60 min.)
- Stativo per tubi e provette (per tubi da 50 e provette Eppendorf da 1.5ml)
- Carta da filtro e foglio d'alluminio
- Guanti usa e getta

8 CONDIZIONI DI CONSERVAZIONE

- Il kit deve essere conservato a 2-8 $^{\circ}$ C ed utilizzato prima della data di scadenza indicata sull'etichetta della confezione.
- La spedizione del dispositivo deve essere effettuata a temperatura controllata (2-8 $^{\circ}$ C); l'esposizione per brevi periodi (inferiori alle 6 ore) a temperature sino a 30 $^{\circ}$ C non riducono le prestazioni del dispositivo.
- Il dispositivo non deve essere congelato.
- Il periodo di validità è indicato sull'etichetta della confezione; di norma la validità non è superiore a 9 mesi dalla data di produzione.
- Dopo il primo utilizzo (apertura dei reagenti), il kit deve essere utilizzato entro un mese dall'apertura se correttamente conservato a 2-8 $^{\circ}$ C.
- La soluzione di lavaggio diluita non può essere conservata; dopo la diluizione deve essere utilizzata entro 4 ore.
- Il substrato cromogeno diluito non deve essere riutilizzato.
- I campioni diluiti non possono essere conservati; dopo la diluizione devono essere analizzati entro 4 ore.

9 PREPARAZIONE DEI REAGENTI

- Utilizzare un opportuno schema sperimentale per registrare la posizione dei calibratori/curva standard, bianchi e campioni sulla micropiastra. Calibratori/curva standard, bianchi e campioni vanno analizzati in duplicato.
- Prelevare un numero opportuno di strips dalla micropiastra. Richiudere con cura nel sacchetto quelle inutilizzate e riporle immediatamente a 2-8 $^{\circ}$ C. Se il kit non viene utilizzato in un'unica seduta analitica, provvedere a prelevare da ogni reagente solo il quantitativo necessario per il test e riporre immediatamente a 2-8 $^{\circ}$ C le fiale rimanenti. Nel prelevare i calibratori utilizzare puntali sterili.

- Portare tutti i reagenti 30' a temperatura ambiente prima dell'uso.
- Preparare la soluzione di lavaggio diluendo la Soluzione di lavaggio 10X 1:10 in acqua deionizzata utilizzando un cilindro in vetro graduato.
- Preparare la quantità richiesta di soluzione cromogena, diluendo 10 volte la TMB 10X con la Soluzione di Sviluppo.
Nota: effettuare la diluizione poco prima dell'uso (dopo aver lavato la piastra alla fine della prima incubazione). Tenere al riparo dalla luce.
- Indossare sempre i guanti.
- Una volta utilizzati riporre immediatamente tutti i reagenti a 2-8°C.

10 CAMPIONI E LORO PREPARAZIONE

- Il dispositivo è concepito per l'analisi di plasma umano.
- Non è necessaria alcuna preparazione del paziente al prelievo.
- Il prelievo deve essere effettuato con tecnica non traumatica.
- E' importante conservare l'integrità chimica e biologica del campione fino al momento dell'utilizzo.
- *Attenzione: campioni emolizzati non sono idonei ad essere analizzati con questa metodica.*
- Non è necessario aggiungere conservanti al campione.
- *Attenzione: la sodio-azide è un potente inibitore della perossidasi di rafano e NON deve essere utilizzata.*
- I campioni devono essere conservati a 2-8°C ed utilizzati entro 24 ore. Se ciò non fosse possibile, congelare i campioni e mantenerli a -20°C.
- Evitare ripetuti cicli di congelamento/scongelo.
- Scongelo i campioni, se congelati a -20°C, miscelarli accuratamente e centrifugarli per 5 minuti a 10.000 x g.
- Diluire i campioni di plasma 1:100 con il Diluente del campione; preparare le diluizioni (10µl di plasma limpido in 990µl di Diluente del Campione) nelle provette Eppendorf. Mescolare bene per inversione oppure utilizzare un agitatore Vortex.
- *Attenzione: si è notato che nei pazienti in terapia con Fosamprenavir i livelli plasmatici di Amprenavir risultano mediamente più elevati rispetto a pazienti in terapia con Amprenavir. In questo caso, come anche per campioni a concentrazione superiore a 5µg (fino a 10 µg), è possibile ricorrere ad una diluizione finale 1:200 (diluire 100 µl della prima diluizione 1:100 con ulteriori 100 µl del Diluente del Campione). Per ottenere il valore di concentrazione finale i valori vanno moltiplicati quindi per il fattore di diluizione 200.*
- I campioni vanno analizzati in duplicato.
- Indossare sempre i guanti.

11 PROCEDIMENTO

- Seguire le indicazioni dello schema di lavoro.
- Trasferire 20 µl dei campioni diluiti e dei Calibratori nei relativi pozzetti.
- Cambiare puntale alla pipetta tra un campione ed il successivo.

- Dispensare 80 µl di Enzima APV in tutti i pozzetti eccetto in quelli del bianco usando la pipetta multicanale
- Dispensare 100 µl di Antisiero APV in tutti i pozzetti, eccetto nei bianchi, utilizzando la pipetta multicanale.
- Incubare per 60 min. a temperatura ambiente.
- Lavare i pozzetti 5 volte riempiendo completamente (circa 350µl) i pozzetti con la soluzione di lavaggio diluita 1 X. Se il lavaggio viene effettuato manualmente, svuotare bene la piastra invertendola su un foglio di carta assorbente.
- Dispensare 200 µl di soluzione cromogena diluita in ciascun pozzetto utilizzando la pipetta multicanale.
- Incubare per 30 min. a temperatura ambiente al riparo dalla luce (utilizzare come copertura un foglio di alluminio).
- Aggiungere 50 µl di Soluzione di arresto in ciascun pozzetto utilizzando la pipetta multicanale.
- Leggere i valori di assorbanza a 450 nm con il lettore per micropiastre.
Nota 1: è possibile monitorare lo sviluppo del colore utilizzando un filtro a 620 nm prima della aggiunta della Soluzione di arresto.
Nota 2: i valori di assorbanza finali devono essere letti a 450 nm entro 15 minuti dalla aggiunta della Soluzione di arresto.
- Utilizzare un opportuno software per calcolare la curva standard ed i valori in concentrazione di Amprenavir relativi ai campioni.
- Il test è considerato valido se vengono rispettati i seguenti parametri di controllo:
 - Valore di assorbanza relativo al calibratore 0 superiore a 0,8 D.O.
 - Valore del Bianco non superiore a 0,2 D.O.
 - IC₅₀ (valore di concentrazione del farmaco che inibisce al 50% il segnale di assorbanza) tra 10 e 20 ng/ml

12 METODO MATEMATICO DA APPLICARE PER IL CALCOLO DEI RISULTATI

- Se il calcolo viene effettuato con un software apposito, utilizzare preferibilmente un metodo 4-Parametri Logit-Log.
- Se si effettua il calcolo manualmente, calcolare per ogni pozzetto il valore B/B₀ secondo la seguente formula:

$$\frac{\text{Media delle assorbanze dei Calibratori o Campioni} \times 100}{\text{Media dell'assorbanza del Calibratore 0}}$$

- Utilizzare carta millimetrata semi-logaritmica assegnando all'asse X i valori di concentrazione dei Calibratori (come da etichetta) ed all'asse Y i valori di B/B₀. Disegnare la curva standard di riferimento ed interpolare su di essa i valori di concentrazione relativi ai campioni.
- **I valori di concentrazione così determinati devono essere moltiplicati per il fattore di diluizione dei campioni (X 100) per ottenere la concentrazione plasmatica.**

I campioni a concentrazione superiore a 5µg (fino a 10 µg) possono essere diluiti 1/200 finale (diluire 100 µl della prima diluizione 1:100 con ulteriori 100 µl del Diluente del Campione). Per ottenere il valore di concentrazione finale vanno moltiplicati quindi per il

fattore di diluizione 200. Questa diluizione più spinta può essere utile nel caso del dosaggio di campioni da pazienti in terapia Fosamprenavir.

13 PRECAUZIONI

- Per uso di ricerca.
- Il dispositivo è concepito per essere utilizzato da personale di laboratorio con addestramento di base.
- Il dispositivo ed i suoi componenti devono essere smaltiti come rifiuti sanitari secondo la normativa vigente.
- Il dispositivo non necessita di disattivazione.
- Utilizzare sempre i guanti durante l'utilizzo del dispositivo.
- In caso di ingestione o contatto con occhi e mucose, consultare la scheda di sicurezza del dispositivo e contattare un medico.
- Se il kit non viene utilizzato completamente, rimuovere soltanto il numero di strips necessarie all'analisi e riporre il rimanente a 2-8 °C nella bustina sigillando bene con del nastro adesivo.
- Prelevare solo le aliquote di reagenti necessarie; lasciare il resto nei contenitori originali ben chiusi e riporre subito a 2-8 °C.
- Nella preparazione dei reagenti da dispensare con la pipetta multicanale, aumentare il volume di un millilitro.

TDM APV / FOS-APV (ELISA Amprenavir / Fosamprenavir)

96 pozzetti, codice AR/BI-9600-A

Rev.: 2

Data: 03.08.2004