

## TDM NFV (ELISA NELFINAVIR)

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	ATTREZZATURE E MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI .....	4
8	CONDIZIONI DI CONSERVAZIONE .....	4
9	PREPARAZIONE DEI REAGENTI.....	5
9.1	REAGENTI PER LA PREPARAZIONE DEL CAMPIONE.....	5
9.2	REAGENTI PER L'ESECUZIONE DEL TEST ELISA.....	5
10	CAMPIONI E LORO PREPARAZIONE .....	5
11	PROCEDIMENTO .....	6
12	METODO MATEMATICO DA APPLICARE PER IL CALCOLO DEI RISULTATI.....	7
13	PRECAUZIONI .....	7

## 1 CAMPO DI APPLICAZIONE

Il kit TDM NFV (ELISA Nelfinavir) è un test immunoenzimatico competitivo in colorimetria per la determinazione della concentrazione plasmatica del farmaco Nelfinavir e del suo maggiore metabolita (hydroxy-t-butylamide, M8) ; è utile per la gestione della terapia in pazienti infetti da HIV-1 e per il monitoraggio della aderenza terapeutica.

**Per uso di ricerca**

## 2 PRINCIPIO DEL TEST

Il kit ELISA Nelfinavir è basato sulla competizione tra il farmaco ed il suo maggiore metabolita M8 nel plasma 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 micropiastre) 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 Nelfinavir e del metabolita M8 nel plasma umano.

- Il range dinamico del sistema va da 0,8 a 3 microgrammi di farmaco per millilitro di plasma.
- La riproducibilità inter-saggio calcolata su n.2 campioni di plasma negativo addizionati con quantità note di farmaco, ripetuti in n.5 sedute successive, è presentata nella tabella seguente (concentrazioni espresse in ug/ml).

Conc. campione	Conc. seduta 1	Conc. seduta 2	Conc. seduta 3	Conc. seduta 4	Conc. seduta 5	Conc. media	Dev. Std	C.V.
1,5	1,3	1,4	1,1	1	1,3	1,2	0,2	13,5
3	2,4	2,5	2	1,7	2,9	2,3	0,5	20,2

- La ripetibilità (intra-saggio) calcolata su n.2 campioni di plasma negativo addizionati con quantità note di farmaco, analizzati in triplicato nella medesima seduta, è presentata nella tabella seguente (concentrazioni espresse in ug/ml).

Conc. campione	Conc.1	Conc.2	Conc. 3	Conc. media	Dev.std.	C.V.
1,5	1,5	1,4	1,6	1,5	0,1	6,7
3	2,7	2,4	2,5	2,5	0,2	6

#### 4 LIMITI DEL TEST

- Non sono state individuate cross-reattività significative (superiori allo 0,01% espresso come rapporto percentuale tra gli IC<sub>50</sub> dei farmaci) con altri farmaci antivirali utilizzati nella terapia di HIV-1 a concentrazioni plasmatiche considerate terapeutiche. I farmaci analizzati sono: Ritonavir, Amprenavir, Saquinavir, Indinavir e Lopinavir.
- L'antisiero di coniglio anti-Nelfinavir utilizzato nel sistema presenta cross-reattività fino al 200% con il metabolita M8.

#### 5 MATERIALI FORNITI

Micropiastra adsorbita con Anticorpi	12x8 pozzetti
Antisiero NFV	1x 12ml
Enzima NFV	1x 10ml
Calibratori Nelfinavir/Curva Standard (0, 0.8, 1.6, 3.1, 6.2 e 12.5 ng/ml)	6x 0,15ml
TMB 10X	1x 3ml
Soluzione di sviluppo	1x 30ml
Soluzione di lavaggio 10X	1x 100ml
Soluzione di arresto	1x 7ml

#### 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 NFV**

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

##### **Enzima NFV**

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

##### **Calibratori Nelfinavir/Curva standard**

6 fiale contenenti ciascuna 0,15 ml di Nelfinavir in soluzione con solvente organico. 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 100 ml di soluzione tamponata concentrata 10X.

##### **Soluzione di arresto**

Una fiala contenente 7 ml di soluzione 1M di acido solforico.

## 7 ATTREZZATURE E MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI

- Lettore per micropiastre con filtri a 450 e 620 nm in grado di leggere valori di assorbanza in un intervallo tra 0.05 e 3.0 D.O. e preferibilmente dotato di software per il calcolo dei risultati.
- Lavatore per micropiastre.
- Dispositivo per portare a secco i campioni (ad esempio, evaporatore centrifugo sotto vuoto, linea azoto o altro).
- Pipette di precisione (volumi tra 10 e 1000 $\mu$ l, accuratezza  $\pm$  5%) equipaggiate di puntali adatti.
- Pipetta multicanale da 8 puntali (volume di 80 e 100 $\mu$ l, accuratezza  $\pm$  5%).
- Agitatore Vortex.
- Agitatore basculante.
- Centrifuga da banco (1.500 x g).
- Provette Eppendorf da 1.5 ml.
- Tubi in vetro per estrazione completi di tappo a vite.
- Vaschette per pipetta multicanale.
- Cilindri in vetro da 500 e 1000ml.
- Pipette da 10 ml e propipetta.
- Timer (range 60 min.).
- Stativo per tubi e provette.
- Carta da filtro e foglio d'alluminio.
- Guanti usa e getta.
- Metanolo (99.8%).
- Esano (99%).
- Etile-acetato (99.5%).
- Acido borico.
- Soluzione di Sodio-idrossido 1N (NaOH 1N).
- Ghiaccio secco.
- Acqua deionizzata (tipo MilliQ).

## 8 CONDIZIONI DI CONSERVAZIONE

- Il kit deve essere conservato a 2-8°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°C); l'esposizione per brevi periodi (inferiori alle 6 ore) a temperature sino a 30°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°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

### 9.1 Reagenti per la preparazione del campione

- Preparare una soluzione di esano/etile acetato (50/50) considerando circa un volume di 30 ml per ogni 10 campioni.
- Preparare un tampone borato 0,19M a pH 9,6 (pesando la quantità opportuna di acido borico e portando a pH con NaOH 1N); considerare circa un volume di 6 ml ogni 10 campioni.
- Preparare una soluzione di metanolo al 30% in acqua deionizzata MilliQ considerando circa 20 ml ogni 10 campioni.

### 9.2 Reagenti per l'esecuzione del test ELISA

- 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 a 2-8°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°C le fiale rimanenti. Nel prelevare i calibratori utilizzare puntali sterili.
- Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente per 30 minuti prima dell'uso.
- Preparare la soluzione di lavaggio 1X 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 inattivato al calore secondo procedura standard (56°C per 30').
- 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.
- 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.
- Indossare sempre i guanti.
- Scongelo i campioni, se congelati a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Miscelarli accuratamente usando il Vortex.
- Prelevare 250  $\mu\text{l}$  di plasma e dispensarli nei tubi di vetro.
- Addizionarli con 500  $\mu\text{l}$  di tampone borato 0,19M a pH 9,6 e 2,5 ml di esano/etile acetato 50/50; chiudere le provette con il tappo.
- Agitare bene con un agitatore basculante per 10 min.
- Centrifugare 5 min. a 1500 x g per separare le due fasi.
- Porre le provette in ghiaccio secco per 30-60 sec. fino a quando la fase sottostante si congela; versare quindi la fase liquida superiore (surnatante) in una provetta pulita.
- Portare a secco il surnatante con azoto o con un evaporatore centrifugo.
- Risospendere il campione con 250  $\mu\text{l}$  di metanolo 30%. Mescolare molto bene usando l'agitatore Vortex per almeno 30 sec.  
*Attenzione: il campione evaporato non risulta di solito visibile.*
- Prelevare 10  $\mu\text{l}$  ed addizionarli a 990  $\mu\text{l}$  di metanolo 30%; mescolare bene con un agitatore Vortex.
- Prelevare 50  $\mu\text{l}$  della diluizione precedente ed addizionarli a 250  $\mu\text{l}$  di metanolo 30% (diluizione finale 1:600). Mescolare bene con un agitatore Vortex. I campioni vanno analizzati in duplicato.

## 11 PROCEDIMENTO

- Seguire le indicazioni dello schema di lavoro.
- Trasferire 20  $\mu\text{l}$  dei campioni diluiti e dei Calibratori (pronti all'uso) nei relativi pozzetti.
- Cambiare puntale tra una dispensazione e la successiva.
- Dispensare 80  $\mu\text{l}$  di Enzima NFV in tutti i pozzetti eccetto in quelli del bianco usando la pipetta multicanale
- Dispensare 100  $\mu\text{l}$  di Antisiero NFV in tutti i pozzetti, eccetto nei bianchi, utilizzando la pipetta multicanale.
- Incubare per 60 min. a temperatura ambiente.
- Lavare i pozzetti 5 volte riempiendoli completamente (circa 350 $\mu\text{l}$ ) con la soluzione di lavaggio diluita 1 X.
- Dispensare 200  $\mu\text{l}$  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).
- Leggere i valori di assorbanza a 620 nm con il lettore per micropiastre.
- Aggiungere 50  $\mu\text{l}$  di Soluzione di arresto in ciascun pozzetto utilizzando la pipetta multicanale.
- Leggere i valori di assorbanza a 450 nm con il lettore per micropiastre ed utilizzare tali dati per il calcolo della concentrazione dell'analita nel campione

*Nota 1: nel caso i valori di assorbanza rilevati dal lettore di micropiastre a 450 nm avessero superato il valore di assorbanza massimo dello strumento, utilizzare la lettura a 620 nm per elaborare i dati*

*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 Nelfinavir 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 0,3 D.O.
  - IC<sub>50</sub> (valore di concentrazione del farmaco che inibisce al 50% il segnale di assorbanza) tra 1,5 e 5 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/B<sub>0</sub> 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/B<sub>0</sub>. 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 600) per ottenere la concentrazione plasmatica.**

## 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 NFV (ELISA Nelfinavir)

96 pozzetti, codice AR/BI-9600-N

Rev.: 6

Data: 27.05.2004