

RCR 2020

ISTITUTI VIRTUALI NAZIONALI

DEMENZE

**MALATTIA DI PARKINSON E DISORDINI DEL MOVIMENTO
SCLEROSI MULTIPLA E DISORDINI NEUROIMMUNOLOGICI**

WP3

SOP Dosaggio dei Neurofilamenti su Piattaforma

Simoa SR-X™

**Istituto Virtuale Nazionale
Malattie Neurologiche Rare**

**SOP adottata da IVN Malattie Neurologiche Rare
Progetto 2021 - WP5, Task 3 –**

Documento redatto da:

- Federico Verde
- Luisa Benussi

WP3

Biochimica – Armonizzazione delle metodiche di analisi dei campioni biologici per studio di biomarcatori SOP per dosaggio di NFL su piattaforma Simoa SR-X™

Indice

- I. Scopo e applicazione
- II. Protocollo
- III. Bibliografia

I. Scopo e applicazione

La presente SOP si riferisce al dosaggio della catena leggera dei neurofilamenti (NFL) su piattaforma Simoa e in particolare con lo strumento da banco SR-X™ (Quanterix). NFL è il principale neurofilamento utilizzato come biomarcatore. È una proteina strutturale del citoscheletro degli assoni neuronali ed i suoi livelli liquorali aumentano in caso di degenerazione o danno degli assoni. L'aumento dei livelli liquorali determina a valle un aumento anche dei livelli ematici, che sono però molto più bassi data la derivazione neuronale dell'analita. Le tecnologie ultrasensibili come Simoa (single molecule array, o ELISA digitale) consentono di misurare analiti presenti nei liquidi biologici in concentrazioni molto basse, incluso appunto NFL su plasma o siero (anche nei soggetti neurologicamente sani). Con tecnologia Simoa NFL può comunque essere misurato anche sul liquor. La presente SOP si riferisce al dosaggio di NFL effettuato con lo strumento SR-X, che prevede l'utilizzo di un kit diverso rispetto al corrispondente saggio effettuato con altri strumenti Simoa Quanterix (HD-1 e HD-X). Infatti lo strumento SR-X è il più diffuso tra gli IRCCS degli Istituti Virtuali Neurologici. Anche la bibliografia in calce alla presente SOP si riferisce a pubblicazioni effettuate misurando NFL con lo strumento SR-X.

II. Protocollo

Biomateriali nei quali può essere effettuato il dosaggio: liquor, plasma (EDTA), siero.

1. Preparazione del lavatore di piastre. Se i contenitori del lavatore di piastre contengono buffer o acqua distillata da > 1 mese, il contenuto va eliminato, i contenitori vanno sciacquati con acqua distillata e riempiti nuovamente con nuovi buffer o acqua distillata (a seconda dei contenitori).

2. Accendere il lavatore di piastre e la sua pompa.

3. Passaggio opzionale: test “dispense and aspirate” sul lavatore di piastre. Questo passaggio va fatto se il lavatore è inutilizzato da almeno 2 settimane. Il test serve ad escludere disfunzioni nel sistema di aspirazione ed erogazione di liquidi del lavatore di piastre, dovute a intasamento dei rispettivi capillari. Utilizzare una piastra dedicata a questo test. Il liquido erogato è buffer C (acqua distillata; pertanto va rifornito il relativo contenitore prima di svolgere il test). Ispezionare la piastra dopo il passaggio di erogazione e dopo quello di aspirazione per escludere la presenza di pozzetti che rispettivamente non si sono riempiti di liquido o nei quali il liquido rimane indebitamente non venendo aspirato. In questi casi, disostruire con gli appositi specilli i rispettivi capillari. Ripetere quindi il test per verificare l’avvenuta correzione della disfunzione.

4. Effettuare il protocollo “system flush” che serve a sciacquare il sistema di condutture del lavatore con acqua distillata. NB: il protocollo deve essere effettuato con il sistema di tubi nell’assetto di riposo ovvero con tubo A e tubo B connessi alle rispettive imboccature del contenitore del risciacquo (e non ai contenitori dei buffer A e B) e tubo C connesso al contenitore del buffer C (acqua distillata). Volumi richiesti per il protocollo “system flush”:

- buffer A: 0 mL
- buffer B: 0 mL
- buffer C (acqua distillata): 300 mL
- acqua distillata nel contenitore di risciacquo: 300 mL

5. Cambiare l’assetto delle connessioni dei tubi dalla posizione di riposo (o del “system flush”) a quella dei dosaggi, cioè connettere il tubo A con il contenitore del buffer A e connettere il tubo B con il contenitore del buffer B; lasciare il tubo C connesso con il contenitore del buffer C.

6. Riempire i contenitori dei buffer con i quantitativi di buffer necessari per il saggio. Essendo il saggio a 2 step, i quantitativi necessari sono i seguenti:

- buffer A: 665 mL
- buffer B: 350 mL
- buffer C (acqua distillata): 1330 mL

7. Verificare che il contenitore di scarto abbia sufficiente volume disponibile e che quello supplementare sia vuoto.

8. Portare i reagenti, i calibratori, i controlli di qualità e i campioni a temperatura ambiente per almeno 1 ora. I reagenti sono conservati a 2-8°C, i calibratori e i controlli di qualità sono conservati a -80°C. I calibratori non possono essere riutilizzati dopo essere stati usati (scongelati) una volta.

9. Inserire la boccetta di RGP nello shaker e avviare la sua incubazione a 30°C a 800 rpm per almeno 30 minuti (va bene anche per tutta la durata della preparazione della piastra fino all’avvio della corsa, ma la durata complessiva dello shaking non deve superare 4 ore). NB: la boccetta di RGP non può essere riutilizzata dopo un singolo saggio.

10. Se non già salvato precedentemente nell’analizzatore SR-X, scaricare dal sito internet di Quanterix il protocollo di analisi del saggio per NFL (Simoa NF-Light Advantage Kit for SR-X, item 103400). Scaricare il certificato di analisi del

kit (che è lotto-specifico) inserendo il relativo numero di lotto del kit. Il certificato di analisi contiene le concentrazioni dei calibratori.

11. Predisporre una piastra Quanterix da 96 pozzetti.

12. Centrifugare i campioni a 10.000 x g per 5 minuti per eliminare eventuali residui.

13. Dispensare i volumi richiesti di calibratori, controlli di qualità e campioni nei pozzetti. I calibratori dovrebbero essere utilizzati in triplo; è accettabile anche usarli in doppio. I controlli di qualità e i campioni debbono essere usati in doppio. Pipettare i calibratori in quantità di 100 uL per pozzetto (non vanno diluiti). I controlli di qualità e i campioni di siero o plasma vanno diluiti 1:4 con il sample diluent (25 uL di controllo/campione e 75 uL di sample diluent). I campioni di liquor vanno diluiti 1:100 (1 uL di campione e 99 uL di sample diluent). In particolare i controlli e i campioni possono essere diluiti in rispettive provette per poi dispensarli già diluiti nei pozzetti della piastra, oppure possono essere dispensati non diluiti nella quantità di 25 uL nei rispettivi pozzetti della piastra (1 uL per il liquor) e poi ivi diluiti dispensando in ogni pozzetto 75 uL (99 uL per il liquor) di sample diluent.

14. Aggiunta delle capture beads (biglie di cattura). Vortexare le biglie di cattura (nel loro contenitore di plastica) per 30 secondi. Versare le biglie in un recipiente allungato per pipetta multicanale. Con una pipetta multicanale dispensare 25 uL di biglie in ogni pozzetto (toccando il contenuto dei pozzetti e pertanto sostituendo i puntali tra una colonna e l'altra). NB: l'intero processo di dispensazione delle biglie nei 96 pozzetti della piastra deve essere compiuto in max 120 secondi.

15. Aggiunta del detector reagent. Versare il detector reagent in un recipiente allungato per pipetta multicanale. Con una pipetta multicanale dispensare 20 uL di detector reagent in ogni pozzetto, toccando il contenuto dei pozzetti e pertanto sostituendo i puntali tra una colonna e l'altra.

16. Coprire la piastra con l'apposito coperchio nero, metterla nello shaker fissandola, ed incubarla a 30°C con velocità di 800 rpm per 30 minuti. NB: il conteggio dei minuti nello shaker deve partire dal momento del raggiungimento della velocità di 800 rpm.

17. Una volta avviata la prima incubazione, avviare il protocollo 2-step sul washer. NB: il washer aiuterà nella esecuzione del protocollo fornendo suggerimenti sulle azioni da compiere.

18. Una volta completata la prima incubazione (30 minuti), rimuovere la piastra dallo shaker, rimuovere il coperchio nero dalla piastra (non tralasciare questo gesto anche nelle occasioni successive), posizionare la piastra sul magnete del washer ed eseguire il primo lavaggio del protocollo 2-step.

19. Una volta avvenuta l'ultima aspirazione nel washer, mantenere la piastra nel washer. Versare l'SBG in un recipiente allungato per pipette multicanale. Usando una pipetta multicanale dispensare 100 uL di SBG in ogni pozzetto della piastra, mantenendo quest'ultima nel washer.

20. Coprire nuovamente la piastra con il coperchio nero, riportarla nello shaker, fissarla allo shaker ed avviare l'incubazione a 30°C con velocità 800 rpm per 10 minuti.
21. Una volta terminata l'incubazione di 10 minuti, riportare la piastra sul magnete del washer, rimuovere il coperchio nero dalla piastra, e continuare il protocollo 2-step fino alla prima aggiunta del buffer B.
22. Coprire la piastra con il coperchio nero, rimuovere la piastra dal washer, posizionare la piastra nuovamente nello shaker, fissare la piastra nello shaker, ed agitare la piastra a 30°C e 800 rpm per 1 minuto.
23. Una volta terminata l'agitazione di 1 minuto, riportare la piastra sul magnete del washer, rimuovere il coperchio nero dalla piastra, premere "Continue" e ripetere una volta – seguendo le istruzioni fornite dal washer – il lavaggio con buffer B e la successiva risospensione nello shaker.
24. Dopo aver completato 2 cicli di lavaggio con buffer B e risospensione, riportare la piastra sul magnete del washer, rimuovere il coperchio nero dalla piastra, e procedere alla aspirazione finale.
25. Dopo la aspirazione, controllare che nei pozzetti della piastra non siano presenti volumi residui o bolle in vicinanza dei pellet. Rimuovere eventuali volumi residui aspirandoli con una pipetta. Se si osservano bolle in vicinanza dei pellet, aggiungere manualmente 100 uL di buffer B nel rispettivo pozzetto, lasciare che le biglie formino nuovamente un pellet sul magnete, quindi aspirare il liquido con una pipetta.
26. Lasciare che la piastra si asciughi per 10 minuti sul magnete del washer.
27. Se non già salvato nello strumento SR-X, importare in esso il protocollo di analisi del saggio per NFL scaricato dal sito internet Quanterix.
28. Definire il layout della piastra sullo strumento SR-X. Per le concentrazioni dei calibratori fare riferimento a quelle indicate nel certificato di analisi del lotto del kit scaricato dal sito internet della Quanterix.
29. Trasferire la piastra asciutta e la boccetta di RGP nello strumento SR-X. La corsa nell'SR-X va avviata entro 1 ora dall'asciugatura della piastra. Qualora la piastra asciutta necessiti di essere conservata per un tempo più lungo, lasciare la piastra coperta con il coperchio nero a temperatura ambiente, quindi ripetere i passaggi di lavaggio e risospensione con buffer B e successiva asciugatura prima di avviare la corsa.

III. Bibliografia

- Alcolea D, Delaby C, Muñoz L, et al. Use of plasma biomarkers for AT(N) classification of neurodegenerative dementias. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2021;92:1206-1214. doi: 10.1136/jnnp-2021-326603.
- Altmann P, Ponleitner M, Rommer PS, et al. Seven day pre-analytical stability of serum and plasma neurofilament light chain. *Sci Rep* 2021;11:11034. doi: 10.1038/s41598-021-90639-z.

- Bettcher BM, Olson KE, Carlson NE, et al. Astrogliosis and episodic memory in late life: higher GFAP is related to worse memory and white matter microstructure in healthy aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2021;103:68-77. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2021.02.012.
- Brickman AM, Jennifer J Manly JJ, et al. Plasma p-tau181, p-tau217, and other blood-based Alzheimer's disease biomarkers in a multi-ethnic, community study. *Alzheimers Dement* 2021;17:1353-1364. doi: 10.1002/alz.12301.
- Logan T, Simon MJ, Rana A, et al. Rescue of a lysosomal storage disorder caused by Grn loss of function with a brain penetrant progranulin biologic. *Cell* 2021;184:4651-4668. doi: 10.1016/j.cell.2021.08.002.
- Quadalti C, Calandra-Buonaura C, Baiardi S, et al. Neurofilament light chain and α -synuclein RT-QuIC as differential diagnostic biomarkers in parkinsonisms and related syndromes. *NPJ Parkinsons Dis* 2021;7:93. doi: 10.1038/s41531-021-00232-4.
- Silva-Spínola A, Lima M, Leitão MJ, et al. Serum neurofilament light chain as a surrogate of cognitive decline in sporadic and familial frontotemporal dementia. *Eur J Neurol* 2022;29:36-46. doi: 10.1111/ene.15058.
- Schmitz M, Canaslan S, Villar-Piqué A, et al. Validation of Plasma Neurofilament Light Chain as a Marker for α -Synucleinopathies. *Mov Disord* 2021;36:2701-2703. doi: 10.1002/mds.28724.
- Ullman JC, Arguello A, Getz JA, et al. Brain delivery and activity of a lysosomal enzyme using a blood-brain barrier transport vehicle in mice. *Sci Transl Med* 2020;12:eaay1163. doi: 10.1126/scitranslmed.aay1163.