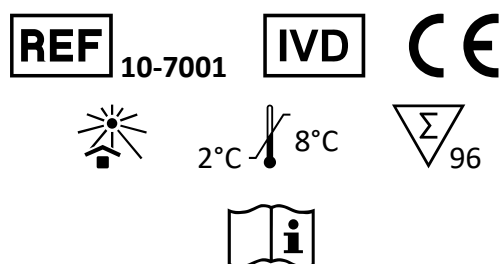




NF-light® (Neurofilamento leggero) ELISA per campioni FCS

Saggio immunoenzimatico (ELISA) per la quantificazione
del neurofilamento leggero in campioni FCS

Istruzioni per l'uso




umandiagnosics.com/products/ifu-ce



UmanDiagnostics AB
Tvistevägen 48C
907 36 Umeå, Svezia

Telefono: +46(0)90 777 880
info@umandiagnosics.com
www.umandiagnosics.com

Le istruzioni per l'uso in altre lingue sono disponibili per il download diretto sul sito web dell'azienda.
 umandiagnosics.com/products/ifu-ce

1. Cronologia delle revisioni delle istruzioni per l'uso

Modifiche dalla versione precedente **2021-11** alla versione attuale **2026-03**

Tutti i capitoli – Aggiornati

Capitolo 5 – Dati aggiornati e aggiuntivi

Capitolo 7 – Capitolo aggiuntivo: Avvertenze e precauzioni

Capitolo 10 – Elenco dei materiali aggiornato

Capitolo 12 – Informazioni aggiornate/aggiuntive

Capitolo 15 – Informazioni aggiornate/aggiuntive

Capitolo 16 – Informazioni aggiornate/aggiuntive

Capitolo 17 – Dati aggiornati e aggiuntivi

Capitolo 19 – Bibliografia aggiornata

2. Uso previsto

NF-light® ELISA è un dispositivo diagnostico *in vitro* non automatizzato usato per le determinazioni quantitative della proteina del neurofilamento leggero (NF-L) umano nel fluido cerebrospinale (FCS). L'aumento dei livelli NF-L indica la degenerazione delle cellule nervose e il risultato viene utilizzato come **ausilio per la diagnosi** di patologie neurologiche quali la sclerosi laterale amiotrofica (ALS), la sclerosi multipla (MS), le demenze e la malattia di Parkinson (PD). NF-L è un biomarcatore aspecifico del danno neuronale. La popolazione del dosaggio comprende soggetti di età superiore ai 18 anni con sospetta patologia neurologica.

Il kit è destinato all'uso professionale, ossia riservato solo al personale del laboratorio di analisi cliniche addestrato all'impiego della tecnologia ELISA e alle procedure diagnostiche *in vitro*.

3. Informativa per gli utilizzatori

In caso di gravi incidenti correlati a questo dispositivo, inviare una segnalazione al fabbricante e all'autorità competente dello Stato membro in cui risiede l'utilizzatore e/o il paziente. La segnalazione al fabbricante deve essere inviata ai recapiti riportati al termine delle presenti istruzioni.

4. Background

I neurofilamenti sono i componenti citoscheletrici principali nelle cellule neuronali. Essi sono importanti per il mantenimento del calibro neuronale e dell'integrità morfologica, che influenza la velocità e la fedeltà delle trasmissioni neuronali. Esistono tre diverse catene del neurofilamento, denominate in base alle loro dimensioni. Esse sono, rispettivamente, neurofilamento leggero, medio e pesante. Il neurofilamento leggero costituisce l'ossatura su cui sono co-assemblate le catene più pesanti, formando la fibra del neurofilamento [1]. In seguito a lesioni delle cellule nervose causate da traumi diretti o da processi degenerativi lenti, il contenuto della cellula viene rilasciato nel comparto adiacente così da consentire le determinazioni quantitative delle proteine neuronali. Livelli aumentati di NF-L sono stati osservati in varie malattie degenerative quali la sclerosi laterale amiotrofica, la malattia di Alzheimer e la sclerosi multipla [2-4].

5. Descrizione del metodo


Il dosaggio NF-light® ELISA di UmanDiagnostics è un dosaggio immunoenzimatico progettato per le misure quantitative del NF leggero nel fluido cerebrospinale. Il test utilizza due anticorpi monoclonali non competitivi altamente specifici [5]. L'anticorpo di cattura forma la copertura di una superficie solida e si lega a NF-L presente nel campione. L'anticorpo secondario/di rilevazione è coniugato con la biotina e l'aggiunta di streptavidina coniugata con HRP (perossidasi di rafano) consente la determinazione quantitativa mediante turnover enzimatico di un substrato incolore (tetrametilbenzidina, TMB) in un prodotto colorato. I valori di assorbanza possono essere correlati alla quantità di NF-L nel campione utilizzando una curva di calibrazione.

Intervallo di quantificazione della curva di calibrazione	125 pg/ml – 2500 pg/ml
Intervallo della curva di calibrazione	50 pg/ml – 5000 pg/ml
LoB (Limite del bianco)	16 pg/ml
LoD (Limite di rilevazione)	25 pg/ml
LoQ (Limite di quantificazione)	62 pg/ml
Precisione: CV% intra-dosaggio	< 3%
Precisione: CV% inter-dosaggio	< 6%
Tempo di incubazione	2 ore e 30 minuti
Volume del campione	50 µl/replica
Diluizione minima del campione	2X

6. Informazioni importanti!

- Il prodotto deve essere utilizzato attenendosi strettamente alle presenti istruzioni per l'uso (IFU). Attenersi alle buone pratiche di laboratorio e alle linee guida di sicurezza. Indossare camici da laboratorio, guanti monouso e occhiali protettivi quando necessario.
- Se la confezione del kit dovesse risultare seriamente danneggiata, contattare per iscritto il fornitore di zona entro e non oltre una settimana dal ricevimento del kit. Non utilizzare componenti danneggiati. Conservare i componenti danneggiati per le questioni correlate ai reclami. La perdita del vuoto della piastra non ha effetti negativi sulle prestazioni del saggio.
- NF-light® ELISA è destinato esclusivamente all'uso diagnostico *in vitro* e non deve essere impiegato per uso interno negli esseri umani o negli animali.
- Non mescolare reagenti appartenenti a lotti diversi.

7. Avvertenze e precauzioni

- Il kit non contiene sostanze di origine umana o animale che presentano rischi di infezione.
- Tutti i campioni da analizzare devono essere considerati potenzialmente infettivi. Pertanto, adottare adeguate misure di sicurezza durante la manipolazione e lo smaltimento dei campioni biologici. In caso di versamento, disinfettare immediatamente con ipoclorito di sodio allo 0,5% o con una soluzione equivalente.
- Smaltire tutto il materiale venuto a contatto con campioni e reagenti conformemente alle normative nazionali, regionali e locali in materia.
-  **AVVERTIMENTO (H290, H315, H319, P280, P305+P351+P338, P337+P313, P390)**
Il reagente di arresto può essere corrosivo per i metalli. Provoca irritazione cutanea. Provoca grave irritazione oculare. Indossare i guanti protettivi resistenti agli agenti chimici e le protezioni oculari. IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente con acqua per diversi minuti. Se presenti e se possibile, rimuovere le lenti a contatto e continuare a sciacquare. Consultare un medico se l'irritazione oculare persiste. Assorbire il materiale versato per prevenire danni ai materiali. La scheda di sicurezza relativa ai materiali di questo prodotto è disponibile sul sito web di UmanDiagnostics e può essere inviata anche via e-mail su richiesta.

8. Periodo di validità e conservazione dei reagenti

Conservare il kit a +2–8 °C e tenerlo lontano da fonti di calore o dalla luce solare diretta. Non congelare i componenti. Il calibratore ricostituito e il controllo positivo devono essere utilizzati immediatamente e non possono essere riutilizzati.

Una volta aperto, il kit deve essere utilizzato entro 4 settimane.

Le piastre aperte devono essere sigillate con nastro adesivo per evitare un'eccessiva umidità e conservate a +2–8 °C. Il periodo di validità del kit è indicato sull'etichetta della confezione e può essere consultato anche nel certificato di analisi (CoA) incluso.

9. Prelievo e conservazione dei campioni

Dopo la puntura lombare, i campioni devono essere conservati a -80 °C in provette di polipropilene. Evitare azioni di congelamento/scongelo ripetute.

La stabilità del campione è stata valutata in 5 diversi campioni clinici. La reattività del campione dopo diversi trattamenti è stata confrontata con quella dello stesso campione conservato a -80 °C.

		% media del controllo a -80 °C	Intervallo medio %
Congelamento-scongelo	≤4 cicli	98.0	96–101
Conservazione	+ 5–8 °C ≤1 settimana	99.7	95–108
	24 ore a TA (+22 °C)	100	91–106
	-20 °C 1 mese	95.8	89–109

10. Materiali

Componenti del kit forniti

Colore tappo	Nome abbreviato	Nome completo	Descrizione	Quantità
N/D	Piastra	Piastra anti-NF-L	Pre-rivestita con anticorpo monoclonale anti NF-L murino, coperta con un coperchio e sigillata in astuccio in plastica.	12 x 8 pozzetti
Grigio	Stop	Reagente di arresto	H ₂ SO ₄ (8 % v/v) diluito	1 x 6 ml
Nero	TMB	Substrato TMB	Substrato di tetrametilbenzidina	1 x 12 ml
Nero	ELISA-Dil	Diluente ELISA	Soluzione acquosa tamponata con detergente.	1 x 40 ml
Rosso	Conj Dil	Diluente del coniugato	Soluzione acquosa tamponata stabilizzante priva di biotina.	1 x 12 ml
Rosso	Conj	Coniugato concentrato	Streptavidina coniugata con perossidasi di rafano in soluzione acquosa tamponata stabilizzante priva di biotina. Diluire come da istruzioni sull'etichetta.	1 x 350 µl
Nero	Det	Anticorpo di rilevazione	Anticorpo monoclonale anti NF-L marcato con biotina in soluzione acquosa tamponata stabilizzante priva di biotina. Diluire secondo l'etichetta.	1 x 300 µl
Verde	bNFL-Cal	Calibratore bNF-L	Ricostituire secondo quanto indicato sull'etichetta del flaconcino. (Contiene materiale bovino di origine tedesca negativo per encefalopatia spongiforme bovina (BSE) e afta epizootica).	2 flaconcini
Bianco	Pos Ctrl	Controllo positivo hrNF-L	NF-L umano ricombinante, da ricostituire secondo quanto indicato sull'etichetta del flaconcino.	2 flaconcini
Bianco	Wash	Tampone di lavaggio	Soluzione acquosa tamponata con detergente (10×).	2 x 40 ml

Materiali aggiuntivi forniti

Provetta 15 ml per la diluizione del coniugato, 2 pz.

Dispositivi essenziali non forniti

Lettore per piastre di microtitolazione da 450 nm (lunghezza d'onda di riferimento, 620-650 nm)

Micropipette da 10-1000 µl

Miscelatore vortex

Agitatore da banco orbitale per test ELISA (800 rpm)

Acqua deionizzata

Bottiglia di lavaggio, sistema di lavaggio automatico o semi-automatico per piastre di microtitolazione

Puntali per pipette e cronometro

Provette in polistirene o polipropilene per la diluizione del calibratore e del campione

11. Procedura di dosaggio

Preparazione e note importanti

- Tutti i reagenti del dosaggio devono essere portati a temperatura ambiente (RT, +18–25 °C) prima dell'uso.
- Il kit è stato progettato per poter essere utilizzato in due sessioni di analisi separate. Se il kit è destinato a essere utilizzato in due sessioni, non devono essere preparati più di 500 µl di volume aggiuntivo delle soluzioni di lavoro di coniugato e di anticorpo di rilevazione. Le provette contenenti le soluzioni di lavoro di coniugato e di anticorpo di rilevazione devono essere centrifugate prima dell'uso, per garantire volumi di reagente sufficienti per la seconda sessione di analisi.
- Si consiglia di analizzare campioni e calibratori in duplicato. Se si osservano ampie deviazioni tra le repliche, ripetere il dosaggio.
- Con il kit viene fornito un coperchio per la piastra. Questo deve essere utilizzato per coprire la piastra durante le fasi di incubazione, al fine di proteggerla da contaminazioni. Tutte le fasi di incubazione devono essere eseguite a temperatura ambiente.

• Durante le fasi di incubazione, utilizzare un **agitatore orbitale da banco per ELISA a 800 rpm**. **L'agitazione della piastra a 800 rpm è di ESTREMA IMPORTANZA per ottenere risultati affidabili**. Un'incubazione a una velocità inferiore comporterà valori di assorbanza ridotti e risultati non affidabili.

• **Utilizzare la provetta Sarstedt da 15 ml fornita (62.554.502) per la preparazione della soluzione di coniugato. Altre provette potrebbero influire negativamente sull'attività del coniugato, causando una diminuzione del livello complessivo di assorbanza e rendendo non affidabili le letture dei campioni. Si noti tuttavia che i serbatoi per reagenti possono essere utilizzati per facilitare il pipettaggio in tutte le fasi.**

- Assicurarsi che non siano presenti bolle nei pozzetti prima della misurazione dell'assorbanza.

Preparazione di 1x tampone di lavaggio:

Diluire il contenuto totale di una bottiglia di **tampone di lavaggio** con acqua deionizzata fino a un volume finale di 400 ml. Il **tampone di lavaggio** diluito non utilizzato può essere conservato a temperatura ambiente e deve essere utilizzato entro due mesi. Il concentrato del tampone di lavaggio 10x può apparire opalescente a causa della concentrazione elevata di sale (nessun effetto sulle prestazioni del dosaggio).

Ricostituzione del calibratore e del controllo positivo:

Immediatamente prima dell'uso, ricostituire il **calibratore bNFL** e il **controllo positivo** secondo quanto indicato sull'etichetta di ciascun flaconcino utilizzando il **diluyente ELISA**.

Miscelare brevemente con vortex e mantenere a temperatura ambiente. Il **controllo positivo** non deve essere ulteriormente diluito. Il **calibratore bNFL** e il **controllo positivo** non possono essere riutilizzati.

Il **calibratore bNFL** ricostituito ha una concentrazione di 5000 pg/ml. La concentrazione del **controllo positivo** è indicata nel CoA.

Preparazione della serie di diluizioni del calibratore:

Deve essere inclusa una curva di calibrazione su ogni piastra analizzata. Il punto di calibrazione più alto (5000 pg/ml) si ottiene ricostituendo una fiala di **calibratore bNFL** liofilizzato con il volume di **diluyente ELISA** indicato sull'etichetta della fiala. Etichettare sette microprovette, una per ciascun punto di calibrazione (2500 pg/ml, 1250 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 50 pg/ml) e una per il calibratore zero, escludendo il calibratore da 5000 pg/ml, che viene utilizzato direttamente dalla fiala. Diluire il calibratore ricostituito secondo la tabella riportata di seguito utilizzando il **diluyente ELISA**.

Preparare una diluizione seriale come descritto di seguito.

Numero della provetta	Concentrazione pg/ml	Volume diluyente ELISA	Volume calibratore dal numero della provetta
Calibratore bNFL (flaconcino)	5000	Ricostituire con il diluyente ELISA-Dil come indicato sull'etichetta del flaconcino del calibratore	
1	2500	300 µl	300 µl (flaconcino)
2	1250	300 µl	300 µl (1)
3	500	360 µl	240 µl (2)
4	250	300 µl	300 µl (3)
5	125	300 µl	300 µl (4)
6	50	360 µl	240 µl (5)
7	0	300 µl	0 µl


Tabella schematica del dosaggio

Lavaggio 3 x 300 µl			
Calibratore bnFL (Direttamente dal flaconcino e dalle provette 1-6) Aggiunta di 100 µl	Diluente ELISA Calibratore zero (provetta 7) Aggiunta di 100 µl	Controllo positivo Direttamente dalla provetta Aggiunta di 100 µl	Campioni di FCS / campione di controllo interno (diluizione 1+1) Aggiunta di 100 µl
Incubazione 1 ora, 800 rpm			
Lavaggio 3 x 300 µl			
Aggiunta di 100 µl di anticorpo di rilevazione			
Incubazione 45 minuti, 800 rpm			
Lavaggio 3 x 300 µl			
Aggiunta di 100 µl di coniugato			
Incubazione 30 minuti, 800 rpm			
Lavaggio 3 x 300 µl			
Aggiunta di 100 µl di TMB			
Incubazione 15 minuti, 800 rpm			
Aggiunta di 50 µl di reagente di arresto			
Leggere la piastra a 450 nm (lunghezza d'onda di riferimento 620-650 nm) direttamente dopo aggiunta del Reagente di Arresto			

Protocollo dettagliato del dosaggio:

1. Il calibratore **bnFL**, ricostituito e diluito secondo la tabella di diluizione del calibratore, e il **controllo positivo** ricostituito sono pronti per l'uso (ossia non vanno ulteriormente diluiti).
2. Diluire i campioni di FCS con un volume uguale (1+1) di **diluente ELISA** fino a ottenere un volume totale minimo di 210 µl.
3. Lavare i pozzetti da utilizzare con 1x **tampone di lavaggio** (3x300 µL). Il lavaggio può essere eseguito mediante sistema di lavaggio automatico o pipettatura manuale. Se il lavaggio viene eseguito manualmente, assicurarsi di rimuovere l'eccesso di tampone di lavaggio tra un lavaggio e l'altro picchiando la piastra su carta assorbente. La presenza di tampone di lavaggio residuo e/o un lavaggio insufficiente possono influire sulla reattività del reagente aggiunto successivamente.
4. Per ogni pozzetto, aggiungere 100 µl dei seguenti elementi: punti calibratore (direttamente dal flaconcino e dalle provette 1-6), calibratore zero (provetta 7), controllo positivo (flaconcino) e campione. Aggiungere in duplicato.
→ Incubare per 1 ora a temperatura ambiente agitando (800 rpm).
5. Lavare i pozzetti con 1x **tampone di lavaggio** (3x300 µl), vedere punto 3.
6. Immediatamente prima dell'uso, preparare il volume richiesto (100 µl per pozzetto) di anticorpo di rilevazione 1x diluendo l'anticorpo di **rilevazione** concentrato con il **diluente ELISA**. Miscelare accuratamente capovolgendo la provetta o usando il vortex.
→ Aggiungere 100 µL di anticorpo di **rilevazione** appena diluito in ciascun pozzetto.
→ Incubare per 45 minuti a temperatura ambiente agitando (800 rpm).
7. Lavare i pozzetti con 1x **tampone di lavaggio** (3x300 µl), vedere punto 3.

8. Immediatamente prima dell'uso, preparare il volume richiesto (100 µl per pozzetto) di **coniugato concentrato 1×** nella provetta **Sarstedt** da 15 ml fornita, diluendo secondo quanto indicato sull'etichetta del flaconcino con il diluente del **coniugato** fino a ottenere una soluzione 1×. Miscelare accuratamente capovolgendo la provetta o usando il vortex.
→ Aggiungere a ogni pozzetto 100 µl di **coniugato concentrato** appena diluito.
→ Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente agitando (800 rpm).
9. Lavare i pozzetti con 1x **tampone di lavaggio** (3x300 µl), vedere punto 3.
10. Aggiungere a ogni pozzetto 100 µl di **TMB**.
→ Incubare per 15 minuti a temperatura ambiente agitando (800 rpm).
11. Aggiungere a ogni pozzetto 50 µl di reagente di arresto (Stop) e leggere l'assorbanza a 450 nm (lunghezza d'onda di riferimento 620-650 nm).

 **Il reagente di arresto contiene acido solforico diluito ed è corrosivo.**

12. Calcolo dei risultati

I risultati possono essere calcolati automaticamente utilizzando un software dedicato per gli immunodosaggi. Un **algoritmo a 4 parametri pesato $1/y^2$ fornisce il miglior adattamento della curva** (si veda sotto una curva di calibrazione tipica). Se non è disponibile un software di questo tipo, la concentrazione di NF-L può essere calcolata tracciando la DO media ($\lambda 450$ meno $\lambda 620-650$ di riferimento) in funzione delle concentrazioni note dei calibratori, ad esempio in Excel. *Si noti che un modello di questo tipo non sarà accurato quanto un modello a 4 parametri nella parte bassa della curva.* Tracciare una curva di calibrazione lin-log con l'assorbanza sull'asse y e la concentrazione sull'asse x. Aggiungere una linea di tendenza lineare e utilizzare l'equazione della linea di tendenza per calcolare manualmente la concentrazione dei campioni a partire dai rispettivi valori di assorbanza.

Per tutti i calcoli, tenere presente quanto segue:

- L'assorbanza del calibratore zero non deve essere sottratta dai dati di misurazione. Deve essere utilizzata solo come indicatore dei livelli di fondo, da confrontare con i valori attesi riportati nel CoA.
- **I valori dei campioni ricavati dalla curva devono essere moltiplicati per il fattore di diluizione del campione, in modo da ottenere la concentrazione nel campione originale.**
- L'intervallo di quantificazione della curva è compreso tra 125 e 2500 pg/ml. I campioni con valori superiori a questo intervallo devono essere opportunamente diluiti e rianalizzati. I campioni con valori inferiori a questo intervallo sono troppo bassi per essere quantificati con accuratezza mediante questo metodo. Per maggiori dettagli, vedere la sezione 12.

La concentrazione ottenuta dalla curva di calibrazione deve essere moltiplicata per 2 per ottenere la concentrazione nel campione (in ragione della diluizione 1+1 prima dell'analisi).

13. Controllo della qualità

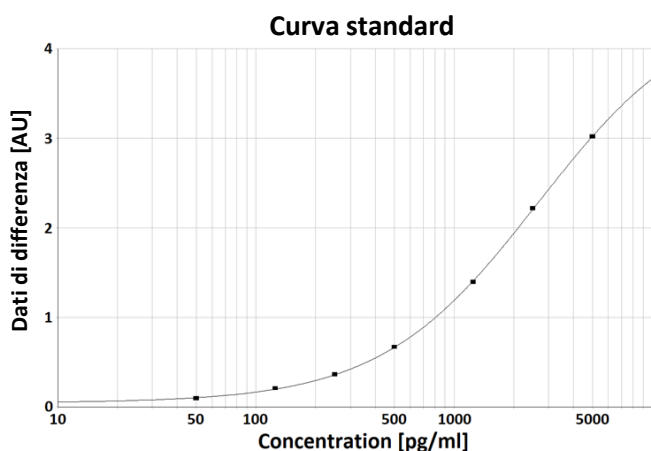
Per verificare le prestazioni del saggio, occorre soddisfare i seguenti criteri per ciascuna procedura di analisi. Si noti che i valori di assorbanza si riferiscono ai dati di differenza ($\lambda 450$ meno λ di riferimento):

- La forma della curva deve corrispondere alla figura riportata sotto.
- Il **controllo positivo** deve presentare una concentrazione compresa entro il criterio di accettazione indicato nel CoA (la concentrazione deve essere determinata direttamente dalla curva di calibrazione; non moltiplicare per alcun fattore di diluizione).
- L'assorbanza per 5000 pg/ml deve essere $>2,0$ AU.

L'assorbanza del calibratore zero deve essere $< 0,1$ AU.

Se il kit viene utilizzato per analisi cliniche di routine, è opportuno stabilire campioni di controllo interni ottenuti da controlli sani e/o campioni contenenti livelli elevati ottenuti dai pazienti. Si raccomanda di stabilire almeno un campione di controllo nell'intervallo di concentrazione 1000–3000 pg/ml. I campioni di controllo possono essere preparati raccogliendo campioni del fluido cerebrospinale e analizzando ripetutamente il pool per stabilire i livelli di concentrazione e i criteri di accettazione. Il pool deve essere aliquotato e conservato a -80 °C.

Di seguito viene riportata una curva tipica di calibrazione al momento del rilascio insieme ai livelli di assorbanza approssimativi.



Livello di calibrazione (pg/ml)	% di segnale per 5000 pg/ml.
5000 (punto di ancoraggio)	100
2500	71
1250	44
500	20
250	11
125	5.7
50 (punto di ancoraggio)	2.7

14. Intervallo di misurazione

La curva di calibrazione copre l'intervallo di 50–5000 pg/ml di NF-L. I calibratori da 5000 pg/ml e 50 pg/ml servono come punti di ancoraggio e la quantizzazione deve essere eseguita entro l'intervallo 125 - 2500 pg/ml della curva di calibrazione, tenendo conto del fattore di diluizione (2) del campione corrispondente a 250–5000 pg/ml di NFL nel campione originale. Non è consentita l'estrapolazione oltre la curva e ciò implica che i campioni esterni alla curva devono essere ulteriormente diluiti e rianalizzati.

15. Limiti di utilizzo

Per i campioni clinici, occorre tenere conto dei seguenti criteri:

- In caso di qualsiasi procedura diagnostica, i risultati ottenuti con questo saggio devono essere interpretati insieme ad altri riscontri clinici.
- Non confrontare i risultati di questo saggio con quelli ottenuti utilizzando kit di altri produttori.
- I livelli NF-L sono marcatamente elevati in un PD atipico rispetto a PD [6].
- Tipi diversi di demenza sono associati a livelli diversi di NF-L [7].

La potenziale interferenza prodotta dagli anticorpi eterofili può determinare errori nei risultati. I pazienti che sono stati esposti al contatto regolare con animali, o che sono stati sottoposti a immunoterapia o procedure diagnostiche basate sull'uso di immunoglobuline o frammenti di immunoglobulina, possono produrre anticorpi umani anti-anticorpi di animali, p.e. HAMA, che interferiscono con questo immunodosaggio. Un'altra potenziale fonte di interferenza può riguardare i pazienti sottoposti a terapia con biotina. Valutare attentamente i risultati qualora si sospetti che i campioni possano essere soggetti a questi tipi di interferenze.

16. Prestazioni cliniche

I livelli di NF-L in FCS sono stati analizzati per 35 condizioni neurologiche e psichiatriche diverse utilizzando il kit UmanDiagnostics NF-light® ELISA [8]. Il meta studio era basato su 47 gruppi di dati e comprendeva dati ottenuti da 10 059 individui. I risultati dimostrano un aumento dei livelli NF-L rispetto ai controlli sani per la maggior parte delle condizioni. I livelli più elevati di NF-L sono stati riscontrati in individui HIV-positivi con compromissione cognitiva, nella SLA, nella demenza frontotemporale e nella malattia di Huntington [8]. Altri studi hanno ulteriormente dimostrato l'utilità clinica di NF-L nella SLA [9], nelle demenze [10], nella sclerosi multipla (SM) [11] e nella malattia di Parkinson (PD) [12].

I livelli dei controlli sani sono dipendenti dall'età e dal sesso. Nei controlli sani, è noto che i livelli di NF-L nel FCS aumentano in rapporto all'età in ragione della degenerazione neuronale. L'esperienza derivante dall'analisi clinica di routine dal primo sviluppo del prodotto ha portato a stabilire i seguenti livelli di cut-off;

Età		Valore di riferimento
Adulti	< 30 anni	< 380 pg/ml
	30 – < 40 anni	< 560 pg/ml
	40 – < 60 anni	< 890 pg/ml
	≥ 60 anni	<1850 pg/ml

I risultati sono validi solo se il test è stato eseguito secondo le istruzioni per l'uso e devono essere correlati ad altre osservazioni cliniche e test diagnostici. L'utilizzatore deve attenersi strettamente alle norme della BPL (Buona Pratica di Laboratorio) o ad altri standard/regolamenti applicabili.

17. Caratteristiche prestazionali

Tracciabilità del calibratore

Il test è standardizzato usando campioni di qualità interni di fluido cerebrospinale prelevati da pazienti (campioni raccolti). Non è disponibile in commercio alcun metodo di riferimento o materiale di riferimento degli standard. Di seguito è riportata la variazione tra le partite per l'assorbanza e i campioni QC.

Lotto kit	Ab 5000 pg/ml (AU)	Conc. QC-campione 1 (pg/ml)	Conc. QC-campione 2 (pg/ml)	Conc. QC-campione 3 (pg/ml)
70940/70950	3.26	2179	1332	-
70966/70976	3.23	2289	1458	2303
70986/70996	3.16	2242	1475	2307
71017/71027	3.29	2169	1415	2196
71037/71047	3.22	--	1475	2200
71068CE/71069RUO	3.18	2270	1471	2253
71092CE/71093RUO	3.24	2309	1448	2223
Media:	3.23	2243	1439	2247
SD:	0.04	58	52	49
CV:	1.4 %	2.6 %	3.6 %	2.2 %

Specificità analitica

Le interferenze e la reattività crociata riportate nella tabella seguente sono state determinate secondo la linea guida EP07 del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) [13].

Sostanza	Concentrazione della sostanza	Bias dovuto alla sostanza
Biotina	191 ng/ml	3,8%
Emoglobina	27 ng/ml	6,4%
Bilirubina daretta	3 mg/dl	3,1%
Bilirubina indiretta	2 mg/ml	0,1%
Albumina	0,3 g/dl	4,6%
Neurofilamento medio	50000 pg/ml	-0,7%
Neurofilamento pesante	50000 pg/ml	0,5%
Tau	2500 pg/ml	0,7%

Sensibilità analitica

Limite del bianco (LoB): 16 pg/ml

Limite di rilevazione (LoD): 25 pg/ml

Limite di quantificazione (LoQ): 62 pg/ml Il LoB e il LoD sono stati determinati come descritto nella linea guida CLSI EP17-A2 [14]. Il **LoQ** è stato determinato utilizzando i risultati del bianco ottenuti durante la valutazione del LoB ed è stato calcolato come $media_{bianco} + 10 \times DS_{bianco}$.

Precisione

Precisione intra-saggio: 2,8% (intervallo di concentrazione 239–4223 pg/ml). Precisione inter-saggio: 6,0% (intervallo di concentrazione 242–4938 pg/ml). Precisione inter-lotto: 1 campione su 5: 19,2% (304 pg/ml); 4 campioni su 5: 4,7% (730–4753 pg/ml).

La precisione intra-saggio è stata determinata come CV% medio ottenuto da 20 misurazioni replicate di cinque campioni di liquido cerebrospinale.

La precisione inter-saggio è stata determinata come descritto nella linea guida CLSI EP05-A3 [15]. I campioni per la valutazione inter-saggio sono stati analizzati secondo un disegno 5×2×2 utilizzando tre lotti distinti. È riportata la media dei risultati ottenuti.

La precisione inter-lotto è stata determinata utilizzando i risultati ottenuti durante la valutazione inter-saggio ed è stata calcolata come CV% per i rispettivi campioni. Il limite massimo di precisione inter-lotto accettabile è $CV \leq 20\%$ per campioni < 500 pg/ml e $CV \leq 10\%$ per campioni ≥ 500 pg/ml.

Linearità di diluizione

La linearità di diluizione è presente nell'intervallo di concentrazione 53 – 21 000 pg/ml.

Parallellismo

La diluizione dei campioni FCS segue lo stesso andamento della diluizione dei campioni addizionati. La diluizione non influisce sulla determinazione della concentrazione di NFL endogeno nell'intervallo di concentrazione investigato 171–6900 pg/mL.

Recupero

Il recupero nell'intervallo di concentrazione del NF-L investigato 1700–6800 pg/ml è compreso tra 88 e 108 %.

Accuratezza

Non è stato possibile confrontare i risultati per questo dosaggio con metodi di altro tipo non essendo disponibili kit o materiali di riferimento standard per NF-L aventi marcatura CE.















18. Garanzia

I dati relativi alle prestazioni qui presentati sono stati ottenuti utilizzando la procedura del saggio descritta. Qualsiasi cambiamento o modifica della procedura che non segua le raccomandazioni di UmanDiagnostics AB potrebbe influire sui risultati, e in questo caso UmanDiagnostics AB non riconosce alcuna altra garanzia espressa, implicita o conforme alla legge, compresa la garanzia implicita di commerciabilità e idoneità all'uso. In tal caso, UmanDiagnostics AB e i suoi distributori autorizzati, non saranno da ritenere responsabili per eventuali danni, diretti, indiretti o consequenziali.

19. Bibliografia

1. Yuan, A., et al., *Neurofilaments and Neurofilament Proteins in Health and Disease*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2017. **9**(4).
2. Feneberg, E., et al., *Multicenter evaluation of neurofilaments in early symptom onset amyotrophic lateral sclerosis*. *Neurology*, 2018. **90**(1): p. e22-e30.
3. Andersson, E., et al., *Blood and cerebrospinal fluid neurofilament light differentially detect neurodegeneration in early Alzheimer's disease*. *Neurobiol Aging*, 2020. **95**: p. 143-153.
4. Gunnarsson, M., et al., *Axonal damage in relapsing multiple sclerosis is markedly reduced by natalizumab*. *Ann Neurol*, 2011. **69**(1): p. 83-9.
5. Norgren, N., et al., *Monoclonal antibodies selective for low molecular weight neurofilaments*. *Hybrid Hybridomics*, 2002. **21**(1): p. 53-9.
6. Hall, S., et al., *Accuracy of a panel of 5 cerebrospinal fluid biomarkers in the differential diagnosis of patients with dementia and/or parkinsonian disorders*. *Arch Neurol*, 2012. **69**(11): p. 1445-52.
7. Khalil, M., et al., *Neurofilaments as biomarkers in neurological disorders*. *Nat Rev Neurol*, 2018. **14**(10): p. 577-589.
8. Bridel, C., et al., *Diagnostic Value of Cerebrospinal Fluid Neurofilament Light Protein in Neurology: A Systematic Review and Meta-analysis*. *JAMA Neurol*, 2019.
9. Kläppe, U., et al., *Neurodegenerative biomarkers outperform neuroinflammatory biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis*. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration*, 2024. **25**: p.150-161.
10. Hüper, L., et al., *Neurofilaments and progranulin are related to atrophy in frontotemporal lobar degeneration – A trandiagnostic study cross-validating atrophy and fluid biomarkers*. *Alzheimer's Dement*.2024 **20**: p. 4461- 4475.
11. Rosenstein, I., et al., *Increased intrathecal neurofilament light and immunoglobulin M predict severe disability in relapsing-remitting multiple sclerosis*. *Frontiers in Immunology*, 2022. **8**: p. 01-12.
12. Compta, Y., et al., *Combined CSF α -SYN RT-QuIC, CSF NFL, and midbrain-pons planimetry in degenerative parkinsonisms: From bedside to bench, and back again*. *Parkinsonism and Related Disorders*, 2022. **5**: p. 33- 41.
13. CLSI. *Interference Testing in Clinical Chemistry*. 3rd ed. CLSI guideline EP07. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018.
14. CLSI. *Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline – Second edition*. CLSI document EP17-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.
15. CLSI. *Evaluation of Precision of Quantitative Measurement Procedures; Approved Guideline – Third edition*. CLSI document EP05-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014.


20. Simboli usati

	Numero di catalogo
	Data di scadenza :
	Numero di lotto
	Contiene materiale sufficiente per <n> test
	Controllo positivo
	Non riutilizzare
	Dispositivo medico diagnostico in vitro.
	Leggere le istruzioni prima dell'uso.
	Tenere al riparo dalla luce solare
	Limite di temperatura
	Fabbricante:
	Paese di produzione
	Attenzione!
	Nocivo



UmanDiagnostics AB
Twistevägen 48C
907 36 Umeå, Svezia

Telefono: +46(0)90 777 880
info@umandiagnosics.com
www.umandiagnosics.com

Le istruzioni per l'uso in altre lingue sono disponibili per il download diretto sul sito web dell'azienda.
 umandiagnosics.com/products/ifu-ce