



IL-10-EASIA

KAP1321

LOT : 110221/3

Read entire protocol before use.

IL-10-EASIA

I. INTENDED USE

Immunoenzymetric assay for the in vitro quantitative measurement of human interleukin-10 (IL-10) in serum.

II. GENERAL INFORMATION

- A. **Proprietary name :** DIAsource IL-10-EASIA Kit
- B. **Catalogue number :** KAP1321 : 96 tests
- C. **Manufactured by :** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

For technical assistance or ordering information contact :
Tel : +32 (0)10 84.99.11 Fax : +32 (0)10 84.99.91

III. CLINICAL BACKGROUND

A. *Biological activities*

Human interleukin-10 (IL-10) is a 19 kDA lymphokine produced by T helper lymphocytes, by monocytes, macrophages and B-lymphocytes. IL-10 was first characterized as a cytokine synthesis inhibitory factor (CSIF) able to inhibit cytokine synthesis by TH1 clones activated in the presence of antigen presenting cells. However, in the absence of monocytes, IL-10 directly inhibits the growth of T-cells triggered by immobilized anti-CD3 MoAb. This proliferation inhibition was found to be a result of specific inhibition of IL-2 production by the responding T-cells. In vitro, IL-10 is a very powerful inhibitor of monokines (including TNF- α , IL-1, IL-6 and IL-8) produced by LPS-activated monocytes and macrophages. The addition of IL-10 to B lymphocytes results in limited cell proliferation but most importantly in very high immunoglobulin production, a result of the transformation of B-cells into plasma cells. Finally, natural killer (NK) cells appear to be another target for the anti-inflammatory properties of IL-10. Indeed, recent data have shown that IL-10 can inhibit antigen induced IFN- γ production by NK-cells by inhibiting not only production but also the stimulatory effects of IL-12 and TNF on IFN- γ production.


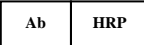
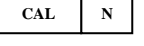
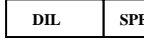
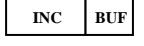

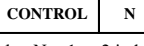
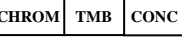
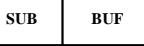
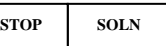
B. *Clinical application*

So far, circulating levels of IL-10 have been found in serum of patients suffering of Non-Hodgkin's lymphoma, multiple myeloma, cerebral malaria or septic shock.

IV. PRINCIPLES OF THE METHOD

The DIIASource IL-10-EASIA is a solid phase Enzyme Amplified Sensitivity Immunoassay performed on microtiterplate. The assay uses monoclonal antibodies (MAbs) directed against distinct epitopes of IL-10. Calibrators and samples react with the capture monoclonal antibody (MAB 1) coated on microtiter well and with a monoclonal antibody (MAB 2) labelled with horseradish peroxidase (HRP). After an incubation period allowing the formation of a sandwich: coated MAB 1 – human IL-10 – MAB 2 – HRP, the microtiterplate is washed to remove unbound enzyme labelled antibody. Bound enzyme-labelled antibody is measured through a chromogenic reaction. Chromogenic solution (TMB) is added and incubated. The reaction is stopped with the addition of Stop Solution and the microtiterplate is then read at the appropriate wavelength. The amount of substrate turnover is determined colourimetrically by measuring the absorbance, which is proportional to the IL-10 concentration. A calibration curve is plotted and IL-10 concentration in samples is determined by interpolation from the calibration curve. The use of the EASIA reader (linearity up to 3 OD units) and a sophisticated data reduction method (polychromatic data reduction) result in a high sensitivity in the low range and in an extended calibration range.

V. REAGENTS PROVIDED

Reagents	96 tests Kit	Color Code	Reconstitution
 Microtiterplate with 96 anti IL-10 (monoclonal antibodies) coated wells	96 wells	blue	Ready for use
 Conjugate: HRP labelled anti-IL-10 (monoclonal antibodies) in TRIS-Maleate buffer with bovine serum albumin and thymol	1 vial 6 ml	red	Ready for use
 Calibrator N = 0 to 5 (see exact values on vial labels) in human plasma with benzamidine and thymol	6 vials lyophil.	yellow	Add 1 ml distilled water
 Specimen Diluent: human plasma with benzamidine and thymol	3 vials lyophil.	black	Add distilled water (see on the label for the exact volume)
 Incubation Buffer: Phosphate buffer with bovine serum albumin and thymol	1 vial 11 ml	black	Ready for use
 Wash Solution (Tris-HCl)	1 vial 10 ml	brown	Dilute 200 x with distilled water (use a magnetic stirrer).
 Controls - N = 1 or 2 in human plasma with thymol	2 vials lyophil.	silver	Add 1 ml distilled water
 Chromogen TMB (Tetramethylbenzidine) in Dimethylformamide	1 vial 1 ml	green	Dilute 0.2 ml into 1 vial of substrate buffer
 Substrate buffer: H ₂ O ₂ in acetate / citrate buffer	3 vials 21 ml	white	Ready for use
 Stop Solution: H ₂ SO ₄ 1.8N	1 vial 6 ml	black	Ready for use

Note: 1. Use Specimen Diluent for sample dilutions.
2. 1 pg of the calibrator preparation is equivalent to 5 mIU of the NIBSC 1st RR 93/722.

VI. SUPPLIES NOT PROVIDED

The following material is required but not provided in the kit:

- High quality distilled water
- Pipettes for delivery of: 50 µl, 100 µl, 200 µl, 1 ml and 10 ml (the use of accurate pipettes with disposable plastic tips is recommended)
- Vortex mixer
- Magnetic stirrer
- Horizontal microtiterplate shaker capable of 700 rpm ± 100 rpm
- Washer for Microtiterplates
- Microtiterplate reader capable of reading at 450 nm, 490 nm and 650 nm (in case of polychromatic reading) or capable of reading at 450 nm and 650 nm (bichromatic reading)
- Optional equipment: The ELISA-AID™ necessary to read the plate according to polychromatic reading (see paragraph XIA.) can be purchased from Robert Maciels Associates, Inc. Mass. 0.2174 USA.

VII. REAGENT PREPARATION

- Calibrators:** Reconstitute calibrators with 1 ml distilled water.
- Controls:** Reconstitute the controls with 1 ml distilled water.
- Specimen Diluent:** Reconstitute specimen diluent to the volume specified on the vial label with distilled water
- Working Wash solution:** Prepare an adequate volume of Working Wash solution by adding 199 volumes of distilled water to 1 volume of Wash Solution (200x). Use a magnetic stirrer to homogenize. Discard unused Working Wash solution at the end of the day.
- Revelation Solution:** pipette 0.2 ml of the chromogen TMB into one of the vials of substrate buffer (H₂O₂ in acetate/citrate buffer). Extemporaneous preparation is recommended.

VIII. STORAGE AND EXPIRATION DATING OF REAGENTS

- Before opening or reconstitution, all kits components are stable until the expiry date, indicated on the vial label, if kept at 2 to 8°C.
- Unused strips must be stored, at 2-8°C, in a sealed bag containing a desiccant until expiration date.
- After reconstitution, calibrators, controls and Specimen Diluent are stable for 4 days at 2 to 8°C. For longer storage periods, aliquots should be made and kept at -20°C for maximum 2 months. Avoid successive freeze thaw cycles.
- The concentrated Wash Solution is stable at room temperature until expiration date.
- Freshly prepared Working Wash solution should be used on the same day.
- After its first use, the conjugate is stable until expiry date, if kept in the original well-closed vial at 2 to 8°C.
- The freshly prepared revelation solution is stable, before use, for maximum 15 minutes at room temperature and must be discarded afterwards.
- Alterations in physical appearance of kit reagents may indicate instability or deterioration.

IX. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

- Serum must be removed as soon as possible from the clot of red cells after clotting and centrifugation, and kept at 4°C. If the samples are not used immediately, they must be kept at -20°C for maximum 2 months, and at -70°C for longer storage (maximum one year).
- Avoid subsequent freeze thaw cycles.
- Prior to use, all samples should be at room temperature. It is recommended to vortex the samples before use.
- Sampling conditions can affect values, therefore, strict precautions have to be taken during sampling to avoid impurities contained in sampling materials that would stimulate IL-10 production by blood cells and thus falsely increase serum IL-10 values.
- Collection tubes must be pyrogen-free.

X. PROCEDURE

A. Handling notes

Do not use the kit or components beyond expiry date.
Do not mix materials from different kit lots.
Bring all the reagents to room temperature prior to use.
Thoroughly mix all reagents and samples by gentle agitation or swirling.
Perform calibrators, controls and samples in duplicate. Vertical alignment is recommended.
Use a clean plastic container to prepare the Wash Solution.
In order to avoid cross-contamination, use a clean disposable pipette tip for the addition of each reagent and sample.
For the dispensing of the Revelation Solution and the Stop Solution avoid pipettes with metal parts.

High precision pipettes or automated pipetting equipment will improve the precision.

Respect the incubation times.

To avoid drift, the time between pipetting of the first calibrator and the last sample must be limited to the time mentioned in section XIII paragraph E (Time delay).

Prepare a calibration curve for each run, do not use data from previous runs.

The Revelation Solution should be colourless. If a blue colour develops within a few minutes after preparation, this indicates that the reagent is unusable, and must be discarded.

Dispense the Revelation Solution within 15 minutes following the washing of the microtiterplate.

During incubation with Revelation Solution, avoid direct sunlight on the microtiterplate.

B. Procedure

- Select the required number of strips for the run. The unused strips should be resealed in the bag with a desiccant and stored at 2-8°C.
- Secure the strips into the holding frame.
- Pipette 100 µl of Incubation Buffer into all the wells
- Pipette 100 µl of each Calibrator, Control and Sample into the appropriate wells.
- Incubate for 2 hours at room temperature on a horizontal shaker set at 700 rpm ± 100 rpm.
- Aspirate the liquid from each well.
- Wash the plate 3 times by:
 - Dispensing 0.4 ml of Wash Solution into each well
 - Aspirating the content of each well
- Pipette 100 µl specimen diluent and then 50 µl of anti-IL-10-HRP conjugate into all the wells.
- Incubate for 2 hours at room temperature on a horizontal shaker set at 700 rpm ± 100 rpm.
- Aspirate the liquid from each well.
- Wash the plate 3 times by:
 - Dispensing 0.4 ml of Wash Solution into each well
 - Aspirating the content of each well
- Pipette 200 µl of the freshly prepared revelation solution into each well within 15 minutes following the washing step.
- Incubate the microtiterplate for 30 minutes at room temperature on a horizontal shaker set at 700 rpm ± 100 rpm, avoid direct sunlight.
- Pipette 50 µl of Stop solution into each well.
- Read the absorbencies at 450 nm and 490 nm (reference filter 630 nm or 650 nm) within 3 hours and calculate the results as described in section XI.

XI. CALCULATION OF RESULTS

A. Polychromatic Reading:

- In this case, the ELISA-AID™ software will do the data processing.
- The plate is first read at 450 nm against a reference filter set at 650 nm (or 630 nm).
- A second reading is performed at 490 nm against the same reference filter.
- The ELISA-AID™ Software will drive the reader automatically and will integrate both readings into a polychromatic model. This technique can generate OD's up to 10.
- The principle of polychromatic data processing is as follows:
 - $X_i = OD$ at 450 nm
 - $Y_i = OD$ at 490 nm
 - Using a standard unweighted linear regression, the parameters A & B are calculated: $Y = A \cdot X + B$
 - If $X_i < 3$ OD units, then X calculated = X_i
 - If $X_i > 3$ OD units, then X calculated = $(Y_i - B)/A$
 - A 4-parameter logistic curve fitting is used to build up the calibration curve.
 - The IL-10 concentration in samples is determined by interpolation on the calibration curve.

B. Bichromatic Reading

- Read the plate at 450 nm against a reference filter set at 650 nm (or 630 nm).
- Calculate the mean of duplicate determinations.
- On semi-logarithmic or linear graph paper plot the OD values (ordinate) for each calibrator against the corresponding concentration of IL-10 (abscissa) and draw a calibration curve through the calibrator points by connecting the plotted points with straight lines.
- Read the concentration for each control and sample by interpolation on the calibration curve.
- Computer assisted data reduction will simplify these calculations. If automatic result processing is used, a 4-parameter logistic function curve fitting is recommended.

XII. TYPICAL DATA

The following data are for illustration only and should never be used instead of the real time calibration curve.

IL-10-EASIA		OD units Polychromatic model
Calibrator	0 pg/ml	0.047
	20.5 pg/ml	0.119
	60.0 pg/ml	0.265
	204.0 pg/ml	0.726
	691.0 pg/ml	2.077
	1976.0 pg/ml	4.138

XIII. PERFORMANCE AND LIMITATIONS

A. Detection Limit

Twenty zero calibrators were assayed along with a set of other calibrators. The detection limit, defined as the apparent concentration two standard deviations above the average OD at zero binding, was 1.6 pg/ml.

B. Specificity

No significant cross-reaction was observed in presence of 50 ng of IL-1α, IL-1β, IL-1ra, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, TNF-α, TNF-β, IFN-α, IFN-β, IFN-γ, TGF-β, GM-CSF, OSM, MIP-1α, MIP-1β, LIF, MCP-1, G-CSF, RANTES, PF-4, βTG, GRO, IP-10 and SCF. This IL-10 assay is specific for human natural and recombinant IL-10.

A very low level (<0.2%) of cross-reaction was observed with BCRF1 (viral IL-10) at a concentration of 70000pg/ml. BCRF1 gave a signal corresponding to 134 pg/ml of IL-10.

C. Precision

INTRA ASSAY				INTER ASSAY			
Serum	N	<X> ± SD (pg/ml)	CV (%)	Serum	N	<X> ± SD (pg/ml)	CV (%)
Serum 1	24	86 ± 2.4	2.8	Serum 1	12	90 ± 2.5	2.8
2	24	324 ± 12	3.7	2	14	335 ± 9	2.7

SD: Standard Deviation; CV: Coefficient of variation

D. Accuracy

RECOVERY TEST

Sample	Added IL-10 (pg/ml)	Recovered IL-10 (pg/ml)	Recovery (%)
serum	0	0	-
	60	56	93
	215	215	100
	760	745	98

DILUTION TEST

Sample	Dilution	Theoretical Concent. (pg/ml)	Measured Concent. (pg/ml)
serum	1/1	910	910
	1/2	455	390
	1/4	228	213
	1/8	114	107
	1/16	57	57

Samples were diluted with Specimen Diluent.

E. Time delay between last calibrator and sample dispensing

As shown hereafter, assay results remain accurate even when a sample is dispensed 30 minutes after the calibrators have been added to the coated wells.

TIME DELAY

sample	0 min	15 min	30 min
1	91	90	88
2	341	330	341
3	202	194	208
4	47	50	51
5	1141	1196	1228
6	284	294	297
7	136	133	137
8	263	263	291

F. Hook effect

A sample with an IL-10 concentration of 870 ng/ml gives a higher OD than the last calibrator point.

XIV. INTERNAL QUALITY CONTROL

- If the results obtained for Control 1 and/or Control 2 are not within the range specified on the vial label, the results cannot be used unless a satisfactory explanation for the discrepancy has been given.
- If desirable, each laboratory can make its own pools of control samples, which should be kept frozen in aliquots. Controls that contain azide will interfere with the enzymatic reaction and cannot be used.
- Acceptance criteria for the difference between the duplicate results of the samples should rely on Good Laboratory Practises
- It is recommended that controls be routinely assayed as unknown samples to measure assay variability. The performance of the assay should be monitored with quality control charts of the controls.
- It is good practise to check visually the curve fit selected by the computer.

XV. REFERENCE INTERVALS

These values are given only for guidance; each laboratory should establish its own normal range of values.

For guidance, the results of 32 serum samples from apparently healthy persons with low CRP levels, ranged between 0 and 3.3 pg/ml with a lean value of 0.2 pg/ml.

XVI. PRECAUTIONS AND WARNINGS

Safety

For *in vitro* diagnostic use only.

The human blood components included in this kit have been tested by European approved and/or FDA approved methods and found negative for HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 and 2. No known method can offer complete assurance that human blood derivatives will not transmit hepatitis, AIDS or other infections. Therefore, handling of reagents, serum or plasma specimens should be in accordance with local safety procedures.

All animal products and derivatives have been collected from healthy animals. Bovine components originate from countries where BSE has not been reported. Nevertheless, components containing animal substances should be treated as potentially infectious.

Avoid any skin contact with all reagents, Stop Solution contains H₂SO₄, the chromogen contains TMB in Dimethylformamide, Substrate buffer contains H₂O₂. In case of contact, wash thoroughly with water.

Do not smoke, drink, eat or apply cosmetics in the working area. Do not pipette by mouth. Use protective clothing and disposable gloves.

XVII. BIBLIOGRAPHY

1. MOORE K.W., O'GARRA A., DE WAAL-MALEFYT R., VIEIRA P., MOSMANN T.R. (1993).
Interleukin-10
Annu. Rev. Immunol., 11:165-190.
2. BLAY J.Y., BURDIN N., ROUSSET F., LENOIR G., BIRON P., PHILIP T., BANCHEREAU J., FAVROT M.C. (1993).
Serum Interleukin-10 in Non-Hodgkin's Lymphoma : a prognostic factor.
Blood, 82:2169-2174.
3. BOGDAN C., BODOVOTZ Y., NATHAN C., (1991).
Macrophage deactivation by Interleukin-10.
J. Exp. Med., 174:1549-1555.
4. MELVILLE P., ROUSSET F., BANCHEREAU J., KLEIN B., BATAILLE R., (1992).
Serum Interleukin-10 in early stage multiple myeloma.
Lancet, 340:1544-1545.
5. PEYRON F., BURDIN N., RINGWALD P., VUILLEZ J.P., ROUSSET F., BANCHEREAU J., (1994).
High levels of circulating IL-10 in human malaria.
Clin. Exp. Immunol., 95:300-303.
6. MARCHANT A., DEVIERE J., BYL B., DE GROOTE D., VINCENT J.L., GOLDMAN M., (1994).
Interleukin-10 production during septicaemia.
Lancet, 343:707-708.
7. DE GROOTE D., MARCHANT A., FAUCHET F., JADOUL M., DEHART I., GERARD C., GEVAERT Y. et al. (1994).
Characterisation of monoclonal antibodies against human interleukin-10 and their use in an ELISA for the measurement of this cytokine.
J. of Immunol. Methods, 177:225-234.

XVIII. SUMMARY OF THE PROTOCOL

	CALIBRATORS (µl)	SAMPLE(S) CONTROLS (µl)
Incubation Buffer	100	100
Calibrators (0-5)	100	-
Samples, Controls	-	100
Incubate for 2 hours at room temperature with continuous shaking at 700 rpm. Aspirate the contents of each well. Wash 3 times with 400 µl of Wash Solution and aspirate.		
Specimen Diluent	100	100
Anti-IL-10 -HRP conjugate	50	50
Incubate for 2 hours at room temperature with continuous shaking at 700 rpm. Aspirate the contents of each well. Wash 3 times with 400 µl of Wash Solution and aspirate.		
Revelation Solution	200	200
Incubate for 30 min at room temperature with continuous shaking at 700 rpm.		
Stop Solution	50	50
Read on a microtiterplate reader and record the absorbance of each well at 450 nm (and 490 nm) versus 630 (or 650 nm)		

DIAsource Catalogue Nr : KAP1321	P.I. Number : 1702102/en	Revision nr : 110221/1
-------------------------------------	-----------------------------	---------------------------

Revision date : 2011-02-21



Prima di utilizzare il kit leggere attentamente le istruzioni per l'uso

IL-10-EASIA

I. USO DEL KIT

Kit immunoenzimetrico per la determinazione quantitativa in vitro dell'interleuchina-10 umana (IL-10) in siero.

II. INFORMAZIONI DI CARATTERE GENERALE

- A. Nome commerciale:** Diasource IL-10-EASIA Kit
- B. Numero di catalogo:** KAP1321 : 96 tests
- C. Prodotto da:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

For technical assistance or ordering information contact :
Tel : +32 (0)10 84.99.11 Fax : +32 (0)10 84.99.91

II. INFORMAZIONI CLINICHE

A. Attività biologiche

L'interleuchina 10 (IL-10) umana è una linfochina di 19 kDA prodotta dai linfociti T helper, dai monociti, dai macrofagi e dai linfociti B. Inizialmente l'IL-10 è stata caratterizzata come fattore di inibizione della sintesi delle citochine (CSIF) in grado di inibire la sintesi di citochine da parte dei cloni di cellule TH1 attivati in presenza delle cellule di presentazione dell'antigene. Tuttavia, in assenza di monociti, l'IL-10 inibisce direttamente la crescita dei linfociti T innescata da MoAb anti-CD3 immobilizzati. È stato scoperto che tale effetto sulla proliferazione è il risultato dell'inibizione specifica della produzione di IL-2 da parte dei linfociti T deputati alla risposta. In vitro, l'IL-10 è un inibitore molto potente delle monocine (inclusi TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-8) prodotte dai monociti e dai macrofagi attivati da LPS. L'aggiunta di IL-10 ai linfociti B determina una limitata proliferazione cellulare, ma, soprattutto, una produzione molto elevata di immunoglobuline, come conseguenza della trasformazione dei linfociti B in plasmacellule. Infine, le cellule natural killer (NK) risultano essere un ulteriore bersaglio delle proprietà antinfiammatorie dell'IL-10. Infatti, dati recenti hanno dimostrato che l'IL-10 può inibire la sintesi di IFN- γ indotta dall'antigene da parte delle cellule NK, agendo non solo sulla produzione ma anche sugli effetti stimolatori esercitati dall'IL-12 e dal TNF sulla produzione di IFN- γ .


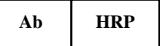
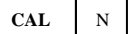

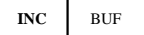

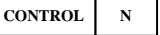


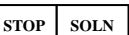
B. Applicazione clinica

Ad oggi, livelli circolanti di IL-10 sono stati rilevati nel siero di pazienti affetti da linfoma non Hodgkin, mieloma multiplo, malaria cerebrale o shock settico.

IV. PRINCIPIO DEL METODO

DIASource IL-10-Easia è un immunosaggio a sensibilità amplificata a fase solida eseguito su piastre di microtitolazione. Il dosaggio utilizza anticorpi monoclonali (Mabs) diretti contro epitopi distinti dell'IL-10. I calibratori e i campioni reagiscono con la cattura dell'anticorpo monoclonale (MAB 1) che riveste il pozzetto di microtitolazione e con un anticorpo monoclonale (MAB 2) marcato con horseradish perossidasi (HRP). Dopo un periodo di incubazione che consenta la formazione di un sandwich: MAB 1 di rivestimento – IL-10 umana – MAB 2 – HRP, la piastra di microtitolazione viene lavata per rimuovere l'anticorpo marcato con enzima non legato. L'anticorpo marcato con enzima non legato viene misurato attraverso una reazione cromogenica. Si procede quindi con l'aggiunta della soluzione cromogena (TMB) e successiva incubazione. La reazione viene interrotta con l'aggiunta di Soluzione di arresto; quindi la piastra di microtitolazione viene letta alla lunghezza d'onda adeguata. La quantità di turnover del substrato viene determinata colorimetricamente misurando l'assorbanza che è proporzionale alla concentrazione di IL-10. Viene tracciata una curva di calibrazione e la concentrazione IL-10 nei campioni viene determinata per interpolazione dalla curva di calibrazione. L'utilizzo del lettore EASIA (linearità fino a 3 unità OD) associato all'impiego di un sofisticato metodo di riduzione dati (riduzione dati policromatica) garantisce un'elevata sensibilità nel range basso dei valori e un esteso range di calibrazione.

V. REATTIVI FORNITI

Reattivi	Kit da 96 test	Codice colore	Volume di ricostituzione
 Piastra di microtitolazione con 96 pozzetti, rivestiti anti IL-10 (anticorpi monoclonali)	96 pozzetti	Blu	Pronte per l'uso
 Coniugato: anti-IL-10 (anticorpi monoclonali) marcato con HRP in tampone TRIS-maleato con albumina di siero bovino e timolo.	1 flacone 6 ml	Rosso	Pronte per l'uso
 Calibratore N= 0 - 5 (le concentrazioni esatte degli calibratore sono riportate sulle etichette dei flaconi), in siero umano con benzamidina e timolo.	6 flaconi liofiliz.	Giallo	Aggiungere 1 ml di acqua distillata
 Diluente del Campione: siero umano con benzamidina e timolo.	3 flacone liofiliz.	nero	Aggiungere acqua distillata (vedi etichetta per volumi esatti)
 Tampone di Incubazione: Tampone fosfato con albumina di siero bovino e timolo.	1 flacone 11 ml	nero	Pronte per l'uso
 Tampone di lavaggio (TRIS HCl)	1 flacone 10 ml	Bruno	Diluire 200 x con acqua distillata usando un agitatore magnetico).
 Controlli: N = 1 o 2, in siero umano con timolo	2 flaconi liofiliz.	Argento	Aggiungere 1 ml di acqua distillata
 Soluzione Cromogena TMB (tetrametilbenzidina) in Dimetilformammide	1 flacone 1 ml	Verde	Diluire 0,2 ml in 1 flacone di tampone del substrato
 Tampone del Substrato: H ₂ O ₂ in tampone acetato / citrato	3 flaconi 21 ml	Bianco	Pronte per l'uso
 Soluzione di arresto: H ₂ SO ₄ 1.8N	1 flacone 6 ml	nero	Pronto per l'uso

- Note: 1. Usare Diluente del Campione per diluire i campioni.
2. 1 pg della preparazione standard è equivalente a 1 mU dell'NIBSC 1st RR 93/722

VI. REATTIVI NON FORNITI

Il seguente materiale è richiesto per il dosaggio ma non è fornito nel kit.

1. Acqua distillata di qualità elevata
2. Pipette per dispensare 50 µl, 100 µl 200 µl, 1 ml e 10 ml (Si raccomanda di utilizzare pipette accurate con puntale in plastica monouso).
3. Agitatore tipo vortex.
4. Agitatore magnetico.
5. Agitatore orizzontale per micropiastre da 700 ± 100 rpm.
6. Lavatrice per piastra di microtitolazione
7. Lettore di micropiastre per letture a 450, 490 e 650 nm (in caso di lettura policromatica) o per letture a 450 e 650 nm (in caso di lettura bicromatica).
8. Strumentazione aggiuntiva: l' ELISA-AID™ necessario per la lettura policromatica delle piastre (vedi paragrafo XI.A) è acquistabile presso Robert Maciels Associates, Inc. Mass. 0.2174 USA.

VII. PREPARAZIONE DEI REATTIVI

- A. Calibratore:** Ricostituire i calibratori con 1 ml di acqua distillata.
- B. Controlli:** Ricostituire i controlli con 1 ml di acqua distillata.
- C. Diluente del Campione:** Ricostituire il Diluente del Campione aggiungendo acqua distillata fino al volume riportato sull'etichetta del flacone.
- D. Soluzione di lavoro del tampone di lavaggio:** Preparare la quantità necessaria di soluzione di lavoro del tampone di lavaggio aggiungendo 199 parti di acqua distillata ad una parte di tampone di lavaggio concentrato (200x). Usare un agitatore magnetico per rendere la soluzione omogenea. La soluzione di lavoro va scartata al termine della giornata.
- E. Soluzione di Rivelazione:** pipettare 0,2 ml di soluzione cromogena TMB in uno dei flaconi del tampone del substrato (H₂O₂ in tampone acetato/citrato). Si raccomanda la preparazione estemporanea.

VIII. CONSERVAZIONE E SCADENZA DEI REATTIVI

- I reattivi non utilizzati sono stabili a 2-8°C fino alla data riportata su ciascuna etichetta.
- Le strisce reattive inutilizzate devono essere conservate a 2-8°C, in un contenitore sigillato che contenga un essiccante fino alla data di scadenza.
- Dopo la ricostituzione, i calibratori, i controlli e il Diluente del Campione sono stabili 4 giorni a 2-8°C. Per periodi di conservazione molto lunghi, preparare e mantenere le aliquote a -20°C per un massimo di 2 mesi. Evitare ripetuti cicli di congelamento-scongelo dei campioni.
- La soluzione di lavaggio concentrata è stabile a temperatura ambiente fino alla data di scadenza.
- La soluzione di lavoro del tampone di lavaggio deve essere preparata fresca ogni volta e usata nello stesso giorno della preparazione.
- Dopo apertura del flacone, il coniugato è stabile fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta, se conservato a 2-8°C nel flacone originale ben tappato.
- La soluzione di rivelazione preparata di fresco rimane stabile prima dell'uso per un massimo di 15 minuti a temperatura ambiente. Superato tale limite dovrà essere eliminata.
- Alterazioni dell'aspetto fisico dei reattivi possono indicare una loro instabilità o deterioramento.

IX. RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

- Dopo la coagulazione e la centrifugazione, il siero va rimosso il prima possibile dal coagulo di eritrociti e mantenuto alla temperatura di 4 °C. Se i campioni non vengono usati subito, vanno conservati a -20 °C per un periodo massimo di 2 mesi oppure a -70 °C per periodi più lunghi (al massimo 1 anno).
- Evitare cicli ripetuti di congelamento e scongelamento.
- Prima dell'uso, tutti i campioni devono essere portati a temperatura ambiente. Si raccomanda inoltre di vortexarli prima dell'uso.
- Le condizioni in cui viene eseguita la raccolta dei campioni possono influenzare i valori, pertanto durante le procedure di raccolta vanno prese tutte le precauzioni necessarie per evitare la contaminazione con impurità presenti nei materiali di raccolta dei campioni che potrebbero stimolare la produzione di IL-10 da parte delle cellule ematiche e quindi portare a valori sierici falsamente elevati di IL-10.
- Le provette di raccolta devono essere apirogene.

X. METODO DEL DOSAGGIO

A. Avvertenze generali

Non usare il kit o suoi componenti oltre la data di scadenza.
Non mescolare reattivi di lotti diversi.
Prima dell'uso portare tutti i reattivi a temperatura ambiente.
Mescolare delicatamente i campioni per inversione o rotazione.
Eseguire calibratori, controlli e campioni in doppio. Si raccomanda l'allineamento verticale.
Utilizzare un contenitore di plastica pulito per preparare la soluzione di lavaggio.
Per evitare cross-contaminazioni, cambiare il puntale della pipetta ogni volta che si usi un nuovo reattivo o campione.
Per la distribuzione della Soluzione di Rivelazione e la Soluzione di arresto evitare pipette con parti metalliche.
L'uso di pipette ben tarate e ripetibili o di sistemi di pipettamento automatici migliora la precisione del dosaggio.
Rispettare i tempi di incubazione.
Per evitare derive, l'intervallo tra il pipettaggio del primo calibratore e l'ultimo campione deve essere limitato ai tempi riportati nella sezione XIII, paragrafo E (Tempo Trascorso).
Allestire una curva di calibrazione per ogni seduta analitica, in quanto non è possibile utilizzare per un dosaggio curve di calibrazione di sedute analitiche precedenti.
La Soluzione di Rivelazione deve essere incolore. L'eventuale sviluppo di un colore blu entro pochi minuti dalla preparazione indica che il reagente è inutilizzabile e deve essere eliminato.
Distribuzione della Soluzione di Rivelazione entro 15 minuti dopo il lavaggio della piastra di microtitolazione.
Durante l'incubazione con la Soluzione di Rivelazione evitare la luce diretta del sole sulla piastra di microtitolazione.

B. Metodo del dosaggio

- Selezionare il numero di strisce reagenti necessario per il test. Le strisce reagenti inutilizzate devono essere sigillate nel contenitore con un essiccante e conservate a 2-8°C.
- Assicurare le strisce reagenti nel telaio di supporto.
- Pipettare 100 µl di Tampone di Incubazione in ogni pozzetto
- Pipettare 100 µl di ogni calibratore, controllo e campione nei pozzetti adeguati.
- Incubare per 2 ore a temperatura ambiente su agitatore orizzontale regolato a 700 ± 100 rpm.
- Aspirare il liquido da ogni pozzetto.
- Lavare la piastra 3 volte :
 - versando 0,4 ml di soluzione di lavaggio in ogni pozzetto
 - aspirando il contenuto di ogni pozzetto
- Pipettare 100 µl del campione diluente e poi 50 µl di conjugato anti-IL-10-HRP in tutti i pozzetti
- Incubare la piastra di microtitolazione per 2 ore a temperatura ambiente su un agitatore orizzontale a 700 ± 100 rpm
- Aspirare il liquido da ogni pozzetto.
- Lavare la piastra 3 volte :
 - versando 0,4 ml di soluzione di lavaggio in ogni pozzetto
 - aspirando il contenuto di ogni pozzetto
- Pipettare 200 µl della soluzione di rivelazione appena preparata in ciascun pozzetto entro 15 minuti dopo la fase di lavaggio Pipettare 50 µl di soluzione di arresto in ogni pozzetto.
- Incubare la piastra di microtitolazione per 30 minuti a temperatura ambiente su un agitatore orizzontale a 700 ± 100 rpm; evitare la luce diretta del sole.
- Pipettare 50 µl di soluzione di arresto in ogni pozzetto.
- Leggere le assorbanze a 450 nm a 490 nm (filtro di riferimento a 630 nm o 650 nm) entro 3 ore e calcolare i risultati come descritto nella sezione XI.

XI. CALCOLO DEI RISULTATI

A. Lettura policromatica:

- In questo caso, l'elaborazione dati verrà effettuata dal software ELISA-AID™.
- La piastra viene letta a 450 nm rispetto a un filtro di riferimento regolato a 650 nm (o 630 nm).
- Verrà quindi effettuata una seconda lettura a 490 nm rispetto allo stesso filtro di riferimento.
- Il Software ELISA-AID™ guiderà automaticamente il lettore e integrerà le due letture utilizzando un modello policromatico. Tale tecnica può generare valori fino a 10 OD.
- Il principio dell'elaborazione policromatica dei dati è la seguente:
 - * $X_i = OD$ a 450 nm
 - * $Y_i = OD$ a 490 nm
 - * Utilizzando una regressione lineare standard non pesata, i parametri A & B sono calcolati: $Y = A \cdot X + B$
 - * Se $X_i < 3$ unità OD, X calcolato = X_i
 - * Se $X_i > 3$ unità OD, X calcolato = $(Y_i - B) / A$

* Per tracciare la curva di calibrazione viene utilizzato un modello di adattamento della curva logistica a 4 parametri.

* La concentrazione di IL-10 nel campione viene determinata per interpolazione sulla curva di calibrazione.

B. Lettura bicromatica

- Leggere la piastra a 450 nm rispetto a un filtro di riferimento regolato a 650 nm (o 630 nm).
- Calcolare la media delle determinazioni in duplicato.
- Costruire la curva di calibrazione su carta millimetrata semilogaritmica o lineare ponendo in ordinata le medie dei OD dei replicati degli standard e in ascissa le rispettive concentrazioni di IL-10, collegando i punti tracciati con linee rette.
- Determinare le concentrazioni e controlli per interpolazione sulla curva di taratura.
- E' possibile utilizzare un sistema di interpolazione dati automatizzato. Con un sistema automatico di interpolazione dati, utilizzare la curva a 4 parametri.

XII. CARATTERISTICHE TIPICHE

I dati qui di seguito riportati sono esclusivamente indicativi e non dovranno assolutamente essere utilizzati in sostituzione della curva di calibrazione tracciata in tempo reale.

IL-10-EASIA		Unità OD
		Modello policromatico
Calibratore	0 pg/ml	0,047
	20.5 pg/ml	0,119
	60.0 pg/ml	0,265
	204.0 pg/ml	0,726
	691.0 pg/ml	2,077
	1976.0 pg/ml	4,138

XIII. CARATTERISTICHE E LIMITI DEL METODO

A. Sensibilità

Venti replicati dello standard zero sono stati dosati insieme agli altri standard. La sensibilità, calcolata come concentrazione apparente di un campione con OD pari alla media più 2 deviazioni standard di 20 replicati dello standard zero, è risultata essere 1,6 pg/ml.

B. Specificità

Nessuna reazione crociata significativa è stata osservata in presenza di 50 ng di IL-1α, IL-1β, IL-1ra, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, TNF-α, TNF-β, IFN-α, IFN-β, IFN-γ, TGF-β, GM-CSF, OSM, MIP-1α, MIP-1β, LIF, MCP-1, G-CSF, RANTES, PF-4, βTG, GRO, IP-10 e SCF. Tale test per il dosaggio della IL-10 è specifico per la IL-10 naturale e ricombinante umana ed è in grado di riconoscere la IL-10 di 72 aa.

Un livello molto basso (<0.2%) di reazione crociata è stata osservata BCRF1 (viral IL-10) alla concentrazione di 70000pg/ml. BCRF1 ha dato un segnale corrispondente a 34 pg/ml di IL-10

C. Precisione

INTRA SAGGIO				INTER SAGGIO			
Siero	N	<X> ± SD (pg/ml)	CV (%)	Siero	N	<X> ± SD (pg/ml)	CV (%)
1	24	86 ± 2.4	2.8	1	12	90 ± 2.5	2.8
2	24	324 ± 12	3.7	2	14	335 ± 9	2.7

SD : Deviazione Standard; CV: Coefficiente di Variazione

D. Accuratezza

TEST DI RECUPERO

Campione	IL-10 aggiunta (pg/ml)	IL-10 recuperata (pg/ml)	Recupero (%)
Siero	0	0	-
	60	56	93
	215	215	100
	760	745	98

TEST DI DILUIZIONE

Campione	Diluizione	Concentrazione teorica (pg/ml)	Concentrazione misurata (pg/ml)
Siero	1/1	910	910
	1/2	455	390
	1/4	228	213
	1/8	114	107
	1/16	57	57

I campioni sono stati diluiti con Diluente del Campione.

E. Tempo trascorso tra l'aggiunta dell'ultimo calibratore e il campione

Come mostrato nella seguente tabella, il dosaggio si mantiene accurato anche quando un campione viene aggiunto nelle provette sensibilizzate 30 minuti dopo l'aggiunta del calibratore.

TEMPO DI RITARDO

sample	0 min	15 min	30 min
1	91	90	88
2	341	330	341
3	202	194	208
4	47	50	51
5	1141	1196	1228
6	284	294	297
7	136	133	137
8	263	263	291

F. Effetto hook

Un campione ha cui è stata aggiunta IL-10 fino a 870 ng/ml ha OD superiori a quello dello standard più concentrato.

XIV. CONTROLLO DI QUALITA' INTERNO

- Se i risultati ottenuti dosando il Controllo 1 e il Controllo 2 non sono all'interno dei limiti riportati sull'etichetta dei flaconi, non è opportuno utilizzare i risultati ottenuti per i campioni, a meno che non si trovi una giustificazione soddisfacente.
- Ogni laboratorio può preparare un proprio pool di sieri da utilizzare come controllo, da conservare congelato in aliquote. I controlli che contengono azide interferiscono con la reazione enzimatica e quindi non possono essere utilizzati.
- I criteri di accettazione delle differenze tra i risultati in duplicato dei campioni devono basarsi sulla buona prassi di laboratorio.
- Si raccomanda di saggiare i controlli con regolarità come campioni sconosciuti per misurare la variabilità del saggio. La resa del saggio deve essere monitorata con tabelle di controllo qualità dei controlli.
- È buona pratica verificare visivamente il modello di curva selezionato dal computer.

XV. INTERVALLI DI RIFERIMENTO

Questi valori vengono dati solo come guida; ogni laboratorio deve stabilire i propri intervalli normali di valori.

Come riferimento, i valori di 32 campioni di plasma EDTA appartenenti a soggetti apparentemente sani con bassi livelli di PCR sono risultati compresi nel range 0 – 3.3 pg/ml. Di questi, 32 hanno prodotto valori inferiori a 0.2 pg/ml.

XVI. PRECAUZIONI PER L'USO

Sicurezza

Il kit è solo per uso diagnostico in vitro.

I reattivi di origine umana presenti nel kit sono stati dosati con metodi approvati da organismi di controllo europei o da FDA e si sono rivelati negativi per HBs Ag, anti HCV, anti HIV1 e anti HIV2. Non sono disponibili metodi in grado di offrire la certezza assoluta che derivati da sangue umano non possano provocare epatiti, AIDS o trasmettere altre infezioni. Manipolare questi reattivi o i campioni di siero o plasma secondo le procedure di sicurezza vigenti.

Tutti i prodotti di origine animale o loro derivati provengono da animali sani. I componenti di origine bovina provengono da paesi dove non sono stati segnalati casi di BSE. E' comunque necessario considerare i prodotti di origine animale come potenziali fonti di infezioni.

Evitare qualsiasi contatto della cute con tutti i reagenti, la Soluzione di Arresto contiene H₂SO₄, la soluzione cromogena contiene TMB in Dimetilformamide,

il tampone del substrato contiene H₂O₂. In caso di contatto, lavare abbondantemente con acqua.

Non fumare, bere, mangiare o applicare cosmetici nell'area di lavoro. Non pipettare i reattivi con pipette a bocca. Utilizzare indumenti protettivi e guanti monouso.

XVII. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- MOORE K.W., O'GARRA A., DE WAAL-MALEFYT R., VIEIRA P., MOSMANN T.R. (1993).
Interleukin-10
Annu. Rev. Immunol., 11:165-190.
- BLAY J.Y., BURDIN N., ROUSSET F., LENOIR G., BIRON P., PHILIP T., BANCHEREAU J., FAVROT M.C. (1993).
Serum Interleukin-10 in Non-Hodgkin's Lymphoma : a prognostic factor.
Blood, 82:2169-2174.
- BOGDAN C., BODOVOTZ Y., NATHAN C., (1991).
Macrophage deactivation by Interleukin-10.
J. Exp. Med., 174:1549-1555.
- MELVILLE P., ROUSSET F., BANCHEREAU J., KLEIN B., BATAILLE R., (1992).
Serum Interleukin-10 in early stage multiple myeloma.
Lancet, 340:1544-1545.
- PEYRON F., BURDIN N., RINGWALD P., VUILLEZ J.P., ROUSSET F., BANCHEREAU J., (1994).
High levels of circulating IL-10 in human malaria.
Clin. Exp. Immunol., 95:300-303.
- MARCHANT A., DEVIERE J., BYL B., DE GROOTE D., VINCENT J.L., GOLDMAN M., (1994).
Interleukin-10 production during septicaemia.
Lancet, 343:707-708.
- DE GROOTE D., MARCHANT A., FAUCHET F., JADOUL M., DEHART I., GERARD C., GEVAERT Y. et al. (1994).
Characterisation of monoclonal antibodies against human interleukin-10 and their use in an ELISA for the measurement of this cytokine.
J. of Immunol. Methods, 177:225-234.

XVIII. SCHEMA DEL DOSAGGIO

	CALIBRATORE (μl)	CAMPIONI CONTROLLI (μl)
Tampone di Incubazione	100	100
Calibratore (0 - 5)	100	-
Campioni, controlli	-	100
Incubare per 2 ore a temperatura ambiente in agitazione continua a 700 rpm. Aspirare il contenuto di ogni pozzetto. Lavare 3 volte con 400 μ l di soluzione di lavaggio e aspirare.		
Soluzione di Rivelazione	100	100
Coniugato anti-IL-10-HRP	50	50
Incubare per 2 ore a temperatura ambiente in agitazione continua a 700 rpm. Aspirare il contenuto di ogni pozzetto. Lavare 3 volte con 400 μ l di soluzione di lavaggio e aspirare.		
Soluzione di Rivelazione	200	200
Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente in agitazione continua a 700 rpm.		
Soluzione di arresto	50	50
Leggere su un lettore per piastra da microtitolazione e registrare l'assorbanza di ogni pozzetto a 450 nm (e 490 nm) rispetto a 630 (o 650 nm)		

Numero di catalogo di DIAsource: KAP1321	P.I. numero: 1702102/it	Revisione numero: 110221/3
--	----------------------------	-------------------------------

Data di revisione : 2015-07-06

Διαβάστε ολόκληρο το πρωτόκολλο πριν από τη χρήση.

IL-10-EASIA

I. ΧΡΗΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΟΠΟΙΑ ΠΡΟΟΡΙΖΕΤΑΙ

Ανοσοενζυμομετρικός προσδιορισμός για την *in vitro* ποσοτική μέτρηση της ανθρώπινης ιντερλευκίνης-10 (IL-10) σε ορό.

II. ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

- A. **Εμπορική ονομασία:** Κιτ IL-10-EASIA της DIAsource
- B. **Αριθμός καταλόγου:** KAP1321: 96 προσδιορισμοί
- Γ. **Κατασκευάζεται από την:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

Για τεχνική βοήθεια ή πληροφορίες σχετικά με παραγγελίες επικοινωνήστε στα:
Τηλ.: +32 (0)10 84.99.11 Φαξ: +32 (0)10 84.99.91

III. ΚΛΙΝΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ

A. Βιολογική δράση

Η ανθρώπινη ιντερλευκίνη 10 (IL-10) είναι μία λεμφοκίνη μεγέθους 19 kDA, η οποία παράγεται από βοηθητικά T-λεμφοκύτταρα, μονοκύτταρα, μακροφάγα και B-λεμφοκύτταρα. Η IL-10 είχε καταρχήν χαρακτηριστεί ως ένας ανασταλτικός παράγοντας σύνθεσης κυτταροκινών (CSIF), ικανός να αναστείλει την παραγωγή κυτταροκινών από κλώνους TH1 κυττάρων, ενεργοποιημένων από την παρουσία αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων. Αν απουσιάζουν μονοκύτταρα, ωστόσο, η IL-10 αναστέλλει απευθείας την αύξηση των T-κυττάρων, ενεργοποιημένη από ακινητοποιημένα μονοκλωνικά αντισώματα (MoAb) αντι-CD3. Φάνηκε πως η αναστολή πολλαπλασιασμού ήταν αποτέλεσμα ειδικής αναστολής της παραγωγής IL-2 από τα αποκρινόμενα T-κύτταρα. *In vitro*, η IL-10 είναι ένας πολύ ισχυρός αναστολέας μονοκινών (συμπεριλαμβανομένων των TNF-α, IL-1, IL-6 και IL-8) που παράγεται από ενεργοποιημένα από LPS μονοκύτταρα και μακροφάγα. Η προσθήκη IL-10 σε B-λεμφοκύτταρα επιφέρει περιορισμό του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και, αυτό είναι σημαντικότερο, πολύ υψηλή παραγωγή ανοσοσφαιρινών, ως αποτέλεσμα της μεταμόρφωσης B-κυττάρων σε πλασματοκύτταρα. Τέλος, φαίνεται πως τα κύτταρα φυσικοί φονείς (NK) αποτελούν έναν ακόμη στόχο των αντιφλεγμονωδών ιδιοτήτων της IL-10. Πράγματι, πρόσφατα δεδομένα έχουν δείξει πως η IL-10 μπορεί να αναστείλει επαγόμενη από αντιγόνο παραγωγή IFN-γ από κύτταρα NK, αναστέλλοντας όχι μόνο την παραγωγή αλλά και τα διεγερτικά αποτελέσματα των IL-12 και TNF στην παραγωγή της IFN-γ.

B. Κλινικές εφαρμογές


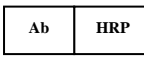
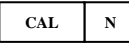
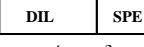
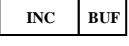
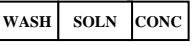
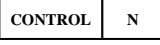
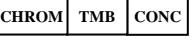
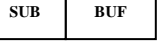
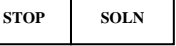
Έως σήμερα, έχουν ανευρεθεί κυκλοφορούντα επίπεδα IL-10 στον ορό πασχόντων από Non-Hodgkin λέμφωμα, πολλαπλούν μυέλωμα, εγκεφαλική ελονοσία και σηπτικό σοκ.

IV. ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Ο προσδιορισμός IL-10-EASIA της DIAsource είναι ένας ενζυμικός ανοσοπροσδιορισμός ενισχυμένης ευαισθησίας, στερεής φάσης, ο οποίος εκτελείται σε πλάκες μικροτιτλοδότησης. Ο προσδιορισμός χρησιμοποιεί μονοκλωνικά αντισώματα (MAbs) που κατευθύνονται εναντίον διακριτών επιτόπων της IL-10. Οι βαθμονομητές και τα δείγματα αντιδρούν με το μονοκλωνικό αντίσωμα σύλληψης (MAb 1) που είναι επιστρωμένο στην υποδοχή της πλάκας μικροτιτλοδότησης και με ένα μονοκλωνικό αντίσωμα (MAb 2) σηματοδοτούμενο με ραφανδική υπεροξειδάση (HRP). Μετά από μια περίοδο επώασης που επιτρέπει το σχηματισμό ενός σάντουιτς: επιστρωμένο MAb 1 – ανθρώπινη IL-10 – MAb 2 – HRP, η πλάκα μικροτιτλοδότησης υποβάλλεται σε πλύση για να απομακρυνθεί το σηματοδοτούμενο με ένζυμο αντίσωμα. Το σηματοδοτούμενο με ένζυμο δεσμευμένο αντίσωμα μετράται μέσω μιας χρωμογόνου αντίδρασης. Προστίθεται και επωάζεται χρωμογόνο διάλυμα (TMB έτοιμο για χρήση). Η αντίδραση σταματά με την προσθήκη ανασχετικού διαλύματος και στη συνέχεια γίνεται ανάγνωση της πλάκας μικροτιτλοδότησης στο κατάλληλο μήκος κύματος. Η ποσότητα μετατροπής του υποστρώματος καθορίζεται χρωματομετρικά μετρώντας την απορρόφηση, η οποία είναι ανάλογη προς τη συγκέντρωση της IL-10.

Παριστάνεται γραφικά μια καμπύλη βαθμονόμησης και προσδιορίζεται η συγκέντρωση της IL-10 στα δείγματα με αναγωγή από την καμπύλη βαθμονόμησης. Η χρήση του συστήματος ανάγνωσης EASIA (γραμμικότητα έως 3 μονάδες OD) και μιας πολύπλοκης μεθόδου αναγωγής δεδομένων (αναγωγή πολυχρωματικών δεδομένων) έχουν ως αποτέλεσμα υψηλή ευαισθησία στο χαμηλό πεδίο τιμών και στο εκτεταμένο πεδίο τιμών βαθμονόμησης.

V. ΠΑΡΕΧΟΜΕΝΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Αντιδραστήρια	Κιτ 96 προσδιορισμών	Χρωματικός κωδικός	Ανασύσταση
 Πλάκα μικροτιτλοδότησης με 96 υποδοχές επιστρωμένες με αντι IL-10 (μονοκλωνικά αντισώματα)	96 υποδοχές	μπλε	Έτοιμο για χρήση
 Σύζευγμα: Αντι-IL-10 (μονοκλωνικά αντισώματα) σηματοδοτούμενα με HRP σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-μυϊκών με βόεια ορολευκοματίνη και θυμόλη	1 φιαλίδιο 6 ml	κόκκινο	Έτοιμο για χρήση
 Βαθμονομητής N = 0 έως 5 (δείτε τις ακριβείς τιμές πάνω στις ετικέτες των φιαλιδίων) σε ανθρώπινο πλάσμα με βενζαμιδίνη και θυμόλη	6 φιαλίδια λυοφιλοποιημένα.	κίτρινο	Προσθέστε 1 ml απεσταγμένου νερού
 Διάλυμα αραιώσεως δειγμάτων: σε ανθρώπινο πλάσμα με βενζαμιδίνη και θυμόλη	3 φιαλίδια λυοφιλοποιημένα	μαύρο	Προσθέστε απεσταγμένο νερό (βλ. ετικέτα στο φιαλίδιο για τον ακριβή όγκο)
 Ρυθμιστικό διάλυμα επώασης: Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με βόεια ορολευκοματίνη και θυμόλη	1 φιαλίδιο 11 ml	μαύρο	Έτοιμο για χρήση
 Διάλυμα πλύσης (Tris-HCl)	1 φιαλίδιο 10 ml	καφέ	Αραιώστε 200 x με απεσταγμένο νερό (χρησιμοποιήστε μαγνητικό αναδευτήρα).
 Οροί ελέγχου - N = 1 ή 2 σε ανθρώπινο πλάσμα με θυμόλη	2 φιαλίδια λυοφιλοποιημένα.	ασημί	Προσθέστε 1 ml απεσταγμένου νερού
 Χρωμογόνο TMB (Τετραμεθυλβενζυδίνη) σε διμεθυλφορμαμίδη	1 φιαλίδιο 1 ml	πράσινο	Αραιώστε 0,2 ml ie 1 φιαλίδιο ρυθμιστικού διαλύματος υποστρώματος
 Ρυθμιστικό διάλυμα υποστρώματος: H ₂ O ₂ σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικού/κιτρικού οξέος	3 φιαλίδια 21 ml	πράσινο	Έτοιμο για χρήση
 Ανασχετικό διάλυμα: H ₂ SO ₄ 1,8N	1 φιαλίδιο 6 ml	μαύρο	Έτοιμο για χρήση

Σημείωση: 1. Χρησιμοποιήστε διάλυμα αραιώσεως δειγμάτων για αραιώση των δειγμάτων.

2.1 pg του παρασκευάσματος του βαθμονομητή είναι ισοδύναμο με 5 mIU του NIBSC 1° RR 93/722.

VI. ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ

Τα ακόλουθα υλικά απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται στο κιτ:

1. Απεσταγμένο νερό υψηλής ποιότητας
2. Πιπέτες για διανομή: 50 μl, 100 μl, 200 μl, 1 ml και 10 ml (συνιστάται η χρήση πιπέτων ακριβείας με αναλώσιμα πλαστικά ρύγχη)
3. Αναμεικτής στροβιλισμού
4. Μαγνητικός αναδευτήρας
5. Οριζόντια συσκευή ανάδευσης πλακών μικροτιτλοδότησης με δυνατότητα 700 rpm ± 100 rpm
6. Συσκευή πλύσης για πλάκες μικροτιτλοδότησης
7. Συσκευή ανάγνωσης πλακών μικροτιτλοδότησης με δυνατότητα ανάγνωσης στα 450 nm, 490 nm και 650 nm (σε περίπτωση πολυχρωματικής ανάγνωσης) ή με δυνατότητα ανάγνωσης στα 450 nm και 650 nm (δichρωματική ανάγνωση)
8. Προαιρετικός εξοπλισμός: Ο εξοπλισμός ELISA-AID™ που είναι απαραίτητος για την πολυχρωματική ανάγνωση (δείτε την παράγραφο XI.A.) μπορεί να αγοραστεί από την Robert Maciels Associates, Inc. Mass. 0.2174 USA.

VII. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ

- A. **Βαθμονομητές:** Ανασυστήστε τους βαθμονομητές με 1 ml απεσταγμένου νερού.
- B. **Οροί ελέγχου:** Ανασυστήστε τους ορούς ελέγχου με 1 ml απεσταγμένου νερού.
- C. **Διάλυμα αραιώσεως δειγμάτων:** Ανασυστήστε το διάλυμα αραιώσεως δειγμάτων στον όγκο που καθορίζεται στην ετικέτα του φιαλιδίου με απεσταγμένο νερό.
- D. **Διάλυμα πλύσεως εργασίας:** Προετοιμάστε επαρκή όγκο διαλύματος πλύσεως εργασίας με προσθήκη 199 όγκων απεσταγμένου νερού σε 1 όγκο διαλύματος πλύσεως (200x). Χρησιμοποιήστε μαγνητικό αναδευτήρα για την ομογενοποίηση. Απορρίψτε το μη χρησιμοποιημένο διάλυμα πλύσεως εργασίας στο τέλος της ημέρας.
- E. **Αποκαλυπτικό Διάλυμα:** Διανείμετε με πιπέτα 0,2 ml του χρωμογόνου TMB σε ένα από τα φιαλίδια ρυθμιστικού διαλύματος υποστρώματος (H₂O₂ σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικού/κιτρικού οξέος). Συνιστάται αυτοσχέδια προετοιμασία.

VIII. ΦΥΛΑΞΗ ΚΑΙ ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΛΗΞΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

- Πριν από το άνοιγμα ή την ανασύσταση, όλα τα συστατικά του κιτ παραμένουν σταθερά έως την ημερομηνία λήξης, η οποία αναγράφεται στην ετικέτα του φιαλιδίου, εφόσον διατηρούνται σε θερμοκρασία 2 έως 8°C.
- Οι μη χρησιμοποιημένες ταινίες πρέπει να φυλάσσονται στους 2-8°C, σε σφραγισμένη σακούλα που περιέχει αποξηραντικό παράγοντα, μέχρι την ημερομηνία λήξης.
- Μετά την ανασύσταση, οι βαθμονομητές, οι οροί ελέγχου και το διάλυμα αραιώσεως δειγμάτων παραμένουν σταθερά επί 4 ημέρες στους 2-8°C. Για μεγαλύτερες περιόδους φύλαξης, θα πρέπει να δημιουργηθούν κλάσματα/δόσεις μίας χρήσης και να διατηρηθούν σε θερμοκρασία -20°C επί 2 μήνες το μέγιστο. Αποφύγετε τους επανειλημμένους κύκλους απόψυξης-κατάψυξης.
- Το συμπυκνωμένο διάλυμα πλύσεως είναι σταθερό σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι την ημερομηνία λήξης.
- Φρέσκο, παρασκευασμένο διάλυμα πλύσεως εργασίας θα πρέπει να χρησιμοποιείται την ίδια ημέρα.
- Μετά την πρώτη χρήση του, το σύζευγμα παραμένει σταθερό έως την ημερομηνία λήξης, εφόσον διατηρείται στο αρχικό, ερμητικά κλειστό φιαλίδιο σε θερμοκρασία 2 έως 8°C.
- Το μόλις προετοιμασμένο αποκαλυπτικό διάλυμα είναι σταθερό ριν από τη χρήση του, για έως και 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν θα πρέπει να απορρίπτεται.
- Τυχόν μεταβολές της φυσικής εμφάνισης των αντιδραστηρίων του κιτ ενδέχεται να υποδηλώνουν αστάθεια ή αλλοίωση.

IX. ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

- Ο ορός θα πρέπει να αφαιρεθεί όσο το δυνατόν νωρίτερα από το πήγμα των ερυθροκυττάρων μετά την πήξη και τη φυγοκέντρωση και να διατηρηθεί στους 4°C. Εάν τα δείγματα δεν χρησιμοποιηθούν αμέσως, θα πρέπει να φυλαχθούν στους -20°C για έως και 2 μήνες ή στους -70°C για μεγαλύτερης διάρκειας φύλαξη (έως ένα έτος).
- Αποφεύγετε τους επακόλουθους κύκλους κατάψυξης-απόψυξης.
- Φέρετε όλα τα δείγματα σε θερμοκρασία δωματίου πριν από τη χρήση. Συνιστάται η ανάμειξη των δειγμάτων σε συσκευή στροβιλισμού πριν από τη χρήση.

- Οι συνθήκες δειγματοληψίας μπορούν να επηρεάσουν τις τιμές. Για το λόγο αυτό θα πρέπει να λαμβάνονται αυστηρά μέτρα προφύλαξης κατά τη διάρκεια της δειγματοληψίας για την αποφυγή προσμίξεων στα δείγματα λήψης, τα οποία θα διέγειραν την παραγωγή IL-10 από αιμοκύτταρα και θα αύξαναν εσφαλμένα τις τιμές της IL-10 στον ορό.
- Τα σωληνάρια συλλογής θα πρέπει να είναι ελεύθερα πυρογενών.

X. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

A. Σημειώσεις σχετικά με το χειρισμό

Μη χρησιμοποιείτε το κιτ ή τα συστατικά μετά την ημερομηνία λήξης. Μην αναμειγνύετε υλικά από διαφορετικές παρτίδες κιτ.

Φέρτε όλα τα αντιδραστήρια σε θερμοκρασία δωματίου πριν από τη χρήση.

Αναμείξτε καλά όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα με απαλή ανακίνηση ή ανάδευση.

Εκτελέστε εις διπλούν ανάληψη των βαθμονομητών, των ορών ελέγχου και των δειγμάτων. Συνιστάται κάθετη ευθυγράμμιση.

Χρησιμοποιήστε ένα καθαρό, πλαστικό δοχείο για να ετοιμάσετε το διάλυμα πλύσης.

Χρησιμοποιείτε ένα καθαρό αναλώσιμο ρύγχος πιπέτας για την προσθήκη κάθε διαφορετικού αντιδραστήριου και δείγματος προκειμένου να αποφεύγετε την επιμόλυνση.

Αποφύγετε πιπέτες με μεταλλικά μέρη για τη διανομή του Αποκαλυπτικού Διαλύματος και του Ανασχετικού Διαλύματος.

Η ακρίβεια βελτιώνεται με χρήση πιστών υψηλής ακρίβειας ή αυτοματοποιημένου εξοπλισμού διανομής με πιπέτες.

Τηρείτε τους χρόνους επώασης.

Για να αποφύγετε τη μετατόπιση, ο χρόνος μεταξύ της διανομής με πιπέτα του πρώτου βαθμονομητή και του τελευταίου δείγματος πρέπει να περιορίζεται στο χρονικό διάστημα που αναφέρεται στην ενότητα XIII, παράγραφος E (Μεσοδιάστημα).

Προετοιμάστε μια καμπύλη βαθμονόμησης για κάθε ανάλυση και μη χρησιμοποιείτε δεδομένα από προηγούμενες αναλύσεις.

Το Αποκαλυπτικό Διάλυμα θα πρέπει να είναι άχρωμο. Η δημιουργία μπλε χρωματισμού σε διάστημα λίγων λεπτών από την προετοιμασία υποδεικνύει πως το αντιδραστήριο δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί και θα πρέπει να απορριφθεί.

Διανείμετε το Αποκαλυπτικό Διάλυμα εντός 15 λεπτών, μετά την πλύση της πλάκας μικροτιτλοδότησης.

Κατά τη διάρκεια επώασης με το Αποκαλυπτικό Διάλυμα, αποφύγετε την έκθεση της πλάκας μικροτιτλοδότησης στο άμεσο ηλιακό φως.

B. Διαδικασία

1. Επιλέξτε τον απαιτούμενο αριθμό ταινιών για την ανάλυση. Οι μη χρησιμοποιημένες ταινίες πρέπει να ξανασφραγιστούν μέσα στη σακούλα με τον αποξηραντικό παράγοντα και να φυλαχτούν σε θερμοκρασία 2-8°C.
2. Ασφαλίστε τις ταινίες μέσα στο πλαίσιο στήριξης.
3. Διανείμετε με πιπέτα 100 μl ρυθμιστικού διαλύματος επώασης σε όλες τις υποδοχές.
4. Διανείμετε με πιπέτα 100 μl από κάθε βαθμονομητή, ορό ελέγχου και δείγμα στις κατάλληλες υποδοχές.
5. Επώαστε επί 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου επάνω σε οριζόντιο αναδευτήρα, ρυθμισμένο στις 700 rpm ± 100 rpm.
6. Αναρροφήστε το υγρό από κάθε υποδοχή.
7. Πλύνετε την πλάκα 3 φορές:
 - διανέμοντας 0,4 ml διαλύματος πλύσης σε κάθε υποδοχή.
 - αναρροφώντας το περιεχόμενο κάθε υποδοχής
8. Διανείμετε 100 μl διαλύματος αραίωσης δείγματος και κατόπιν 50 μl συζεύγματος αντι-IL-10-HRP σε όλες τις υποδοχές.
9. Επώαστε επί 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου επάνω σε οριζόντιο αναδευτήρα, ρυθμισμένο στις 700 rpm ± 100 rpm.
10. Αναρροφήστε το υγρό από κάθε υποδοχή.
11. Πλύνετε την πλάκα 3 φορές:
 - διανέμοντας 0,4 ml διαλύματος πλύσης σε κάθε υποδοχή.
 - αναρροφώντας το περιεχόμενο κάθε υποδοχής
12. Διανείμετε με πιπέτα 200 μl του μολύβι προετοιμασμένου αποκαλυπτικού διαλύματος σε κάθε υποδοχή, εντός 15 λεπτών από το βήμα πλύσης.
13. Επώαστε την πλάκα μικροτιτλοδότησης επί 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου σε οριζόντιο αναδευτήρα στις 700 rpm ± 100 rpm, αποφύγετε την άμεση έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία.
14. Διανείμετε με πιπέτα 50 μl ανασχετικού διαλύματος σε κάθε υποδοχή.
15. Κάντε ανάγνωση των απορροφήσεων στα 450 nm και 490 nm (φίλτρο αναφοράς 630 nm ή 650 nm) εντός 3 ωρών και υπολογίστε τα αποτελέσματα όπως περιγράφεται στην ενότητα XI.

XI. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

A. Πολυχρωματική ανάγνωση:

1. Στην περίπτωση αυτή, την επεξεργασία των δεδομένων θα κάνει το λογισμικό του ELISA-AID™.
2. Η ανάγνωση της πλάκας γίνεται πρώτα στα 450 nm έναντι ενός φίλτρου αναφοράς που ρυθμίζεται στα 650 nm (ή τα 630 nm).

3. Εκτελείται δεύτερη ανάγνωση στα 490 nm έναντι του ίδιου φίλτρου αναφοράς.
4. Το λογισμικό του ELISA-AID™ θα ενεργοποιήσει αυτόματα τη συσκευή ανάγνωσης και θα ενσωματώσει και τις δύο μετρήσεις σε ένα πολυχρωματικό μοντέλο. Αυτή η τεχνική μπορεί να δημιουργήσει οπτικές πυκνότητες (OD) έως και 10.
5. Βασική αρχή της επεξεργασίας των πολυχρωματικών δεδομένων έχει ως εξής:
 - $X_i = OD$ στα 450 nm
 - $Y_i = OD$ στα 490 nm
 - Χρησιμοποιώντας τυπική μη σταθμισμένη γραμμική παλινδρόμηση, υπολογίζονται οι παράμετροι A & B: $Y = A \cdot X + B$
 - Αν $X_i < 3$ μονάδες OD, τότε υπολογισθέν $X = X_i$
 - Αν $X_i > 3$ μονάδες OD, τότε υπολογισθέν $X = (Y_i - B) / A$
 - Χρησιμοποιείται προσαρμογή λογιστικής καμπύλης 4 παραμέτρων για τη δημιουργία της καμπύλης βαθμονόμησης.
 - Η συγκέντρωση IL-10 στα δείγματα καθορίζεται μέσω αναγωγής στην καμπύλη βαθμονόμησης.

B. Διχρωματική ανάγνωση

1. Κάντε ανάγνωση της πλάκας στα 450 nm έναντι ενός φίλτρου αναφοράς που ρυθμίζεται στα 650 nm (ή τα 630 nm).
2. Υπολογίστε τη μέση τιμή των διπλών προσδιορισμών.
3. Σε ημιλογαριθμικό ή γραμμικό χαρτί γραφημάτων, παραστήστε γραφικά τις τιμές OD (τεταγμένη) για κάθε βαθμονομητή έναντι της αντίστοιχης συγκέντρωσης της IL-10 (τεταγμένη) και σχεδιάστε μια καμπύλη βαθμονόμησης μέσω των σημείων του βαθμονομητή, συνδέοντας με ευθείες γραμμές τα ασοτυπωμένα σημεία.
4. Διαβάστε τη συγκέντρωση για κάθε ορό ελέγχου και δείγμα με αναγωγή στην καμπύλη βαθμονόμησης.
5. Αναγωγή δεδομένων με τη βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή θα απλοποιήσει αυτούς τους υπολογισμούς. Εάν χρησιμοποιείται αυτόματη επεξεργασία αποτελεσμάτων, συνιστάται προσαρμογή καμπύλης λογιστικής συνάρτησης 4 παραμέτρων.

XII. ΤΥΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Τα ακόλουθα δεδομένα προορίζονται μόνο ως παράδειγμα και δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται ποτέ αντί της καμπύλης βαθμονόμησης πραγματικού χρόνου

IL-10-EASIA		Μονάδες OD Πολυχρωματικό μοντέλο
Βαθμονομητής	0 pg/ml	0,047
	20,5 pg/ml	0,119
	60,0 pg/ml	0,265
	204,0 pg/ml	0,726
	691,0 pg/ml	2,077
	1976,0 pg/ml	4,138

XIII. ΑΠΟΔΟΣΗ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

A. Όριο ανίχνευσης

Μετρήθηκαν είκοσι μηδενικοί βαθμονομητές μαζί με ένα σύνολο άλλων βαθμονομητών. Το όριο ανίχνευσης, οριζόμενο ως η φαινομενική συγκέντρωση δύο τυπικών αποκλίσεων πάνω από τις μέσες μετρήσεις OD σε μηδενική δέσμευση, ήταν 1,6 pg/ml.

B. Ειδικότητα

Δεν παρατηρήθηκε σημαντική διασταυρούμενη αντίδραση παρουσία 50 ng IL-1α, IL-1β, IL-1ra, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, TNF-α, TNF-β, IFN-α, IFN-β, IFN-γ, TGF-β, GM-CSF, OSM, MIP-1α, MIP-1β, LIF, MCP-1, G-CSF, RANTES, PF-4, βTG, GRO, IP-10 και SCF. Ο παρών προσδιορισμός IL-10 είναι ειδικός για την ανθρώπινη, φυσική και ανασυνδυασμένη IL-10.

Ένα πολύ χαμηλό επίπεδο (<0,2%) διασταυρούμενης αντίδρασης έχει παρατηρηθεί με την BCRF1 (ικη IL-10) σε συγκέντρωση 70000pg/ml. Η BCRF1 παρείχε σήμα που αντιστοιχεί σε 134 pg/ml της IL-10.

C. Ακρίβεια

ΓΙΑ ΤΟΝ ΙΔΙΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ				ΜΕΤΑΞΥ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΩΝ			
Ορός	N	<X> ± T.A. (pg/ml)	Σ.Δ. (%)	Ορός	N	<X> ± T.A. (pg/ml)	Σ.Δ. (%)
Ορός 1	24	86 ± 2,4	2,8	Ορός 1	12	90 ± 2,5	2,8
Ορός 2	24	324 ± 12	3,7	Ορός 2	14	335 ± 9	2,7

T.A.: Τυπική απόκλιση, Σ.Δ.: Συντελεστής διακύμανσης

D. Ορθότητα

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΝΑΚΤΗΣΗΣ

Δείγμα	Προσθεθείσα IL-10 (pg/ml)	Ανακτηθείσα IL-10 (pg/ml)	Ανάκτηση (%)
Ορός	0	0	-
	60	56	93
	215	215	100
	760	745	98

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΡΑΙΩΣΗΣ

Δείγμα	Αραίωση	Θεωρητική συγκέντρωση (pg/ml)	Μετρηθείσα συγκέντρωση (pg/ml)
Ορός	1/1	910	910
	1/2	455	390
	1/4	228	213
	1/8	114	107
	1/16	57	57

Τα δείγματα αραιώθηκαν με διάλυμα αραιώσεως δειγμάτων.

E. Μεσοδιάστημα μεταξύ της διανομής τελευταίου βαθμονομητή και δείγματος

Όπως φαίνεται στη συνέχεια, τα αποτελέσματα του προσδιορισμού παραμένουν αξιόπιστα ακόμα και όταν διανέμεται ένα δείγμα 30 λεπτά μετά την προσθήκη των βαθμονομητών στα επιστρωμένα σωληνάρια.

ΧΡΟΝΙΚΗ ΚΑΘΥΣΤΕΡΗΣΗ

Δείγμα	0 λεπτά	15 λεπτά	30 λεπτά
1	91	90	88
2	341	330	341
3	202	194	208
4	47	50	51
5	1141	1196	1228
6	284	294	297
7	136	133	137
8	263	263	291

F. Φαινόμενο αγκίστρου (hook)

Δείγμα που εμβολιάστηκε με IL-10 έως 870 ng/ml δίνει υψηλότερες μετρήσεις οπτικής πυκνότητας (OD) από το σημείο του τελευταίου βαθμονομητή.

XIV. ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΣ ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

- Εάν τα αποτελέσματα που λαμβάνονται για τον ορό ελέγχου 1 ή/και τον ορό ελέγχου 2 δε βρίσκονται εντός του πεδίου τιμών που καθορίζεται στην ετικέτα του φιαλιδίου, τα αποτελέσματα δεν είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν, εκτός εάν έχει δοθεί ικανοποιητική εξήγηση για την ασυμφωνία.
- Εάν είναι επιθυμητό, κάθε εργαστήριο μπορεί να δημιουργήσει τα δικά του μείγματα δειγμάτων ελέγχου (pools), τα οποία πρέπει να διατηρούνται κατεψυγμένα σε κλάσματα/δόσεις μιας χρήσης. Οροί ελέγχου που περιέχουν αζίδιο θα επιδράσουν στην ενζυμική αντίδραση και δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν.
- Τα κριτήρια αποδοχής για τη διαφορά μεταξύ των διπλών αποτελεσμάτων των δειγμάτων θα πρέπει να βασίζονται σε ορθές εργαστηριακές πρακτικές.
- Συνιστάται οι οροί ελέγχου να υποβάλλονται σε προσδιορισμό τακτικά ως άγνωστα δείγματα για να μετράται η μεταβλητότητα του προσδιορισμού. Η απόδοση του προσδιορισμού πρέπει να παρακολουθείται με διαγράμματα ποιοτικού ελέγχου των ορών ελέγχου.
- Είναι καλό το να ελέγχετε οπτικά την προσαρμογή της καμπύλης που επιλέχθηκε από τον υπολογιστή.

XV. ΤΙΜΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Οι τιμές αυτές παρέχονται μόνον ως οδηγός. Κάθε εργαστήριο θα πρέπει να καθιερώσει το δικό του πεδίο φυσιολογικών τιμών.

Τα παρακάτω αποτελέσματα παρέχονται μόνο ως οδηγός: τα αποτελέσματα 32 δειγμάτων ορού εμφανώς υγιών ατόμων με χαμηλά επίπεδα CRP, κυμάνθηκαν μεταξύ 0 και 3,3 pg/ml με μέση τιμή 0,2 pg/ml.

XVI. ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ

Ασφάλειας

Μόνο για διαγνωστική χρήση *in vitro*.

Τα συστατικά ανθρώπινου αίματος που περιλαμβάνονται στο kit αυτό έχουν ελεγχθεί με μεθόδους εγκεκριμένες στην Ευρώπη ή/και από τον FDA και έχει διαπιστωθεί ότι είναι αρνητικά ως προς την παρουσία HBsAg, αντι-HCV, αντι-HIV-1 και 2. Καμία γνωστή μέθοδος δεν είναι δυνατό να παρέχει πλήρη διασφάλιση ότι παράγωγα του ανθρώπινου αίματος δε θα μεταδώσουν ηπατίτιδα, AIDS ή άλλες λοιμώξεις. Επομένως, ο χειρισμός αντιδραστηρίων, δειγμάτων ορού ή πλάσματος θα πρέπει να γίνεται σύμφωνα με τις τοπικές διαδικασίες περί ασφάλειας.

Όλα τα ζωικά προϊόντα και παράγωγα έχουν συλλεχθεί από υγιή ζώα. Τα βόεια συστατικά προέρχονται από χώρες όπου δεν έχει αναφερθεί BSE. Παρ' όλ' αυτά, συστατικά που περιέχουν ζωικές ουσίες θα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως δυνητικώς μολυσματικά.

Αποφύγετε κάθε επαφή με το δέρμα με όλα τα αντιδραστήρια. Το Ανασχετικό Διάλυμα περιέχει H₂SO₄, το χρωμογόνο περιέχει TMB σε Διμεθυλοφθορμαμίδη, το

ρυθμιστικό διάλυμα υποστρώματος περιέχει H₂O₂. Σε περίπτωση επαφής, πλύνετε σχολαστικά με νερό.

Μην καπνίζετε, μην πίνετε, μην τρώτε και μη χρησιμοποιείτε καλλυντικά στο χώρο εργασίας. Μην διανέμετε με πιπέτα χρησιμοποιώντας το στόμα σας. Χρησιμοποιείτε προστατευτικό ρουχισμό και γάντια μιας χρήσης.

XVII. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- MOORE K.W., O'GARRA A., DE WAAL-MALEFYT R., VIEIRA P., MOSMANN T.R. (1993). **Interleukin-10** Annu. Rev. Immunol., 11:165-190.
- BLAY J.Y., BURDIN N., ROUSSET F., LENOIR G., BIRON P., PHILIP T., BANCHEREAU J., FAVROT M.C. (1993). **Serum Interleukin-10 in Non-Hodgkin's Lymphoma : a prognostic factor.** Blood, 82:2169-2174.
- BOGDAN C., BODOVOTZ Y., NATHAN C., (1991). **Macrophage deactivation by Interleukin-10.** J. Exp. Med., 174:1549-1555.
- MELVILLE P., ROUSSET F., BANCHEREAU J., KLEIN B., BATAILLE R., (1992). **Serum Interleukin-10 in early stage multiple myeloma.** Lancet, 340:1544-1545.
- PEYRON F., BURDIN N., RINGWALD P., VUILLEZ J.P., ROUSSET F., BANCHEREAU J., (1994). **High levels of circulating IL-10 in human malaria.** Clin. Exp. Immunol., 95:300-303.
- MARCHANT A., DEVIERE J., BYL B., DE GROOTE D., VINCENT J.L., GOLDMAN M., (1994). **Interleukin-10 production during septicemia.** Lancet, 343:707-708.
- DE GROOTE D., MARCHANT A., FAUCHET F., JADOUL M., DEHART I., GERARD C., GEVAERT Y. et al. (1994). **Characterisation of monoclonal antibodies against human interleukin-10 and their use in an ELISA for the measurement of this cytokine.** J. of Immunol. Methods, 177:225-234.

XVIII. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΤΟΥ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ

	ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΤΕΣ (µl)	ΔΕΙΓΜΑ(ΤΑ) ΟΡΟΙ ΕΛΕΓΧΟΥ (µl)
Ρυθμιστικό διάλυμα επώσεως	100	100
Βαθμονομητές (0-5)	100	-
Δείγματα, οροί ελέγχου	-	100
Επώστε επί 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου με συνεχή ανάδευση στις 700 rpm. Αναρροφήστε το περιεχόμενο κάθε υποδοχής. Πλύνετε 3 φορές με 400 µl διαλύματος πλύσης και αναρροφήστε.		
Διάλυμα Αραίωσης Δειγμάτων	100	100
Σύζευγμα αντι-IL-10-HRP	50	50
Επώστε επί 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου με συνεχή ανάδευση στις 700 rpm. Αναρροφήστε το περιεχόμενο κάθε υποδοχής. Πλύνετε 3 φορές με 400 µl διαλύματος πλύσης και αναρροφήστε.		
Αποκαλυπτικό Διάλυμα	200	200
Επώστε επί 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με συνεχή ανάδευση στις 700 rpm		
Ανασχετικό διάλυμα	50	50
Διαβάστε σε συσκευή ανάγνωσης πλακών μικροπιτλοδότησης και καταγράψτε την απορρόφηση κάθε υποδοχής στα 450 nm (και 490 nm) έναντι 630 (ή 650 nm)		

Αρ. καταλόγου DIAsource: KAP1321	Αριθμός P.I: 1702102/e1	Αρ. αναθεώρησης: 110221/1
-------------------------------------	----------------------------	------------------------------

Ημερομηνία αναθεώρησης: 2011-02-21

	Used symbols
	Consult instructions for use
	Storage temperature
	Use by
LOT	Batch code
REF	Catalogue number
CONTROL	Control
I V D	In vitro diagnostic medical device
	Manufacturer
	Contains sufficient for <n> tests
WASH SOLN CONC	Wash solution concentrated
CAL 0	Zero calibrator
CAL N	Calibrator #
CONTROL N	Control #
Ag 125I	Tracer
Ab 125I	Tracer
Ag 125I CONC	Tracer concentrated
Ab 125I CONC	Tracer concentrated
	Tubes
INC BUF	Incubation buffer
ACETONITRILE	Acetonitrile
SERUM	Serum
DIL SPE	Specimen diluent
DIL BUF	Dilution buffer
ANTISERUM	Antiserum
IMMUNOADSORBENT	Immunoabsorbent
DIL CAL	Calibrator diluent
REC SOLN	Reconstitution solution
PEG	Polyethylene glycol
EXTR SOLN	Extraction solution
ELU SOLN	Elution solution
GEL	Bond Elut Silica cartridges
PRE SOLN	Pre-treatment solution
NEUTR SOLN	Neutralization solution
TRACEUR BUF	Tracer buffer
µT	Microtiterplate
Ab HRP	HRP Conjugate
Ag HRP	HRP Conjugate
Ab HRP CONC	HRP Conjugate concentrate
Ag HRP CONC	HRP Conjugate concentrate
CONJ BUF	Conjugate buffer
CHROM TMB CONC	Chromogenic TMB concentrate
CHROM TMB	Chromogenic TMB solution
SUB BUF	Substrate buffer
STOP SOLN	Stop solution
INC SER	Incubation serum
BUF	Buffer
Ab AP	AP Conjugate
SUB PNPP	Substrate PNPP
BIOT CONJ CONC	Biotin conjugate concentrate
PREC AGENT	Precipitating Agent
AVID HRP CONC	Avidine HRP concentrate
ASS BUF	Assay buffer
Ab BIOT	Biotin conjugate
Ab	Specific Antibody
SAV HRP CONC	Streptavidin HRP concentrate
NSB	Non-specific binding
2nd Ab	2nd Antibody
ACID BUF	Acidification Buffer
DIST	Distributor
TRAY	Incubation trays
PMSF	PMSF solution
	Protect from light
STRIP	Dot Strip
SUB	Substrate
EXTR SOLN CONC	Extraction Buffer Concentrate
CART	Cartridge
SAV HRP	Streptavidin HRP
PIPETTE	Pipette
WASH SOLN	Wash buffer

	Simboli utilizzati
	Consultare le istruzioni per l'uso
	Limitazioni di temperatura
	Utilizzare entro
LOT	Numero di lotto
REF	Numero di catalogo
CONTROL	Controllo
I V D	Dispositivo medico-diagnostico in vitro
	Fabbricante
	Contenuto sufficiente per <n> saggi
WASH SOLN CONC	Tampone di lavaggio concentrato
CAL 0	Calibratore zero
CAL N	Standard #
CONTROL N	Controllo #
Ag 125I	Marcato
Ab 125I	Marcato
Ag 125I CONC	Marcato concentrato
Ab 125I CONC	Marcato concentrato
	Provette
INC BUF	Tampone incubazione
ACETONITRILE	Acetonitrile
SERUM	Siero
DIL SPE	Diluite campione
DIL BUF	Tampone diluizione
ANTISERUM	Antisiero
IMMUNOADSORBENT	Immunoassorbente
DIL CAL	Diluite calibratore
REC SOLN	Soluzione di ricostituzione
PEG	Polietilenglicole
EXTR SOLN	Soluzione di estrazione
ELU SOLN	Soluzione di eluizione
GEL	Cartucce di silice bond elut
PRE SOLN	Soluzione di pretrattamento
NEUTR SOLN	Soluzione di neutralizzazione
TRACEUR BUF	Tracer Buffer
UUT	Piastra di microtitolazione
Ab HRP	HRP Coniugato
Ag HRP	HRP Coniugato
Ab HRP CONC	HRP Coniugato concentrato
Ag HRP CONC	HRP Coniugato concentrato
CONJ BUF	Buffer coniugato
CHROM TMB CONC	Cromogena TMB concentrato
CHROM TMB	Soluzione cromogena TMB
SUB BUF	Tampone substrato
STOP SOLN	Soluzione di arresto
INC SER	Incubazione con siero
BUF	Buffer
Ab AP	AP Coniugato
SUB PNPP	Substrato PNPP
BIOT CONJ CONC	Concentrato coniugato con biotina
PREC AGENT	Agente precipitante
AVID HRP CONC	Concentrato avidina HRP
ASS BUF	Soluzione tampone per test
Ab BIOT	Coniugato con biotina
Ab	Anticorpo Specifico
SAV HRP CONC	Streptavidina-HRP concentrata
NSB	Legame non-specifico
2nd Ab	2° Anticorpo
ACID BUF	Tampone Acidificante
DIST	Distributore
TRAY	Vassoi di incubazione
PMSF	Soluzione di PMSF
	Proteggere dalla luce
STRIP	Dot strip
SUB	Substrato
EXTR SOLN CONC	Concentrato del tampone di estrazione
CART	Cartuccia
SAV HRP	HRP coniugata a streptavidina
PIPETTE	Pipetta
WASH SOLN	Tampone di lavaggio

	Χρησιμοποιούμενα σύμβολα
	Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης
	Θερμοκρασία αποθήκευσης
	Ημερομηνία λήξης
LOT	Αριθμός παρτίδας
REF	Αριθμός καταλόγου
CONTROL	Πρότυπο ελέγχου
IVD	In Vitro Διαγνωστικό Ιατροτεχνολογικό προϊόν
	Κατασκευαστής
	Περιεχόμενο επαρκές για «n» εξετάσεις
WASH SOLN CONC	Συμπυκνωμένο διάλυμα έκπλυσης
CAL 0	Μηδενικός βαθμονομητής
CAL N	Βαθμονομητής #
CONTROL N	Ορός ελέγχου #
Ag 125I	Ιζηθέτης
Ab 125I	Ιζηθέτης
Ag 125I CONC	Χρωμογόνος Ιζηθέτης
Ab 125I CONC	Χρωμογόνος Ιζηθέτης
	Σωληνάρια
INC BUF	Ρυθμιστικό διάλυμα επώασης
ACETONITRILE	Ακετονιτρίλιο
SERUM	Ορός
DIL SPE	Διάλυμα αραιώσης δειγμάτων
DIL BUF	Ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης
ANTISERUM	Αντιορός
IMMUNOADSORBENT	Ανοσοπροσροφητικό
DIL CAL	Αραιωτικό βαθμονομητών
REC SOLN	Διάλυμα ανασύστασης
PEG	Πολυαιθυλενογλυκόλη
EXTR SOLN	Διάλυμα εκχύλισης
ELU SOLN	Διάλυμα έκλουσης
GEL	Φύσιγγες πυριτίου Bond Elut
PRE SOLN	Διάλυμα προεπεξεργασίας
NEUTR SOLN	Διάλυμα εξουδετέρωσης
TRACEUR BUF	Ρυθμιστικό διάλυμα
μπ	Πλάκα μικροτιλοδόττησης
Ab HRP	HRP Σύζευγμα
Ag HRP	HRP Σύζευγμα
Ab HRP CONC	Χρωμογόνος HRP Σύζευγμα
Ag HRP CONC	Χρωμογόνος HRP Σύζευγμα
CONJ BUF	Ρυθμιστικό διάλυμα συζεύγματος
CHROM TMB CONC	Χρωμογόνος TMB
CHROM TMB	Διάλυμα χρωμογόνου TMB
SUB BUF	Ρυθμιστικό διάλυμα υποστρώματος
STOP SOLN	Ανασχετικό αντιδραστήριο
INC SER	Ορός επώασης
BUF	Ρυθμιστικό διάλυμα
Ab AP	AP Σύζευγμα
SUB PNPP	PNPP υποστρώματος
BIOT CONJ CONC	Συμπυκνωμένο αντιδραστήριο συζευγμένο με βιοτίνη
PREC AGENT	Παράγοντας καθίζησης
AVID HRP CONC	Συμπυκνωμένο διάλυμα αβιδίνης-HRP
ASS BUF	Ρυθμιστικό διάλυμα προσδιορισμού
Ab BIOT	αντιδραστήριο συζευγμένο με βιοτίνη
Ab	Ειδικό Αντίσωμα
SAV HRP CONC	Συμπυκνωμένη στρεπταβιδίνη συνεζευγμένη με HRP
NSB	μη-ειδική δέσμευση
2nd Ab	2ο Αντίσωμα
ACID BUF	Ρυθμιστικό Διάλυμα οξίνου
DIST	Διανομέας
TRAY	Δίσκοι επώασης
PMSF	Διάλυμα PMSF
	Προστατεύετε από το φως
STRIP	Ταινία κουκκίδων
SUB	Υπόστρωμα
EXTR SOLN CONC	Συμπύκνωμα ρυθμ. διαλύματος εκχύλισης
CART	Φύσιγγα
SAV HRP	Στρεπταβιδίνη HRP
PIPETTE	πιπέτα
WASH SOLN	Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης