Instructions for Use

IL-10 ELISA

IVD

REF EIA-4699

Σ 96

DRG Instruments GmbH, Germany
Frauenbergstraße 18, 35039 Marburg
Phone: +49 (0)6421-1700 0, Fax: +49 (0)6421-1700 50
Website: www.drg-diagnostics.de
E-mail: drg@drg-diagnostics.de

DRG International, Inc., USA
841 Mountain Ave., Springfield, NJ 07081
Phone: (973) 564-7555, Fax: (973) 564-7556
Website: www.drg-international.com
E-mail: corp@drg-international.com

(230123)

Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit.
Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung.
Si prega di usare la versione valida delle istruzioni per l'uso a disposizione con il kit.
Por favor, use sólo la versión válida de las instrucciones de uso que se suministran con el kit.
Utilisez seulement la version valide des Instructions d'utilisation fournies avec le kit.

Table of Contents / Tabella die Contenuti

1 INTENDED USE 2
2 CLINICAL BACKGROUND 2
3 PRINCIPLES OF THE METHOD 2
4 REAGENTS PROVIDED 3
5 SUPPLIES NOT PROVIDED 3
6 REAGENT PREPARATION 3
7 STORAGE AND EXPIRATION DATING OF REAGENTS 4
8 SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION 4
9 PROCEDURE 4
10 CALCULATION OF RESULTS 5
11 TYPICAL DATA 6
12 PERFORMANCE AND LIMITATIONS 6
13 INTERNAL QUALITY CONTROL 7
14 REFERENCE INTERVALS 7
15 PRECAUTIONS AND WARNINGS 7

1 USO DEL KIT 8
2 INFORMAZIONI CLINICHE 8
3 PRINCIPIO DEL METODO 8
4 REATTIVI FORNITI 9
5 REATTIVI NON FORNITI 9
6 PREPARAZIONE DEI REATTIVI 9
7 CONSERVAZIONE E SCADENZA DEI REATTIVI 10
8 RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI 10
9 METODO DEL DOSAGGIO 10
10 CALCOLO DEI RISULTATI 11
11 CARATTERISTICHE TIPICHE 12
12 CARATTERISTICHE E LIMITI DEL METODO 12
13 CONTROLLO DI QUALITA' INTERNO 13
14 INTERVALLI DI RIFERIMENTO 13
15 PRECAUZIONI PER L'USO 13

16 BIBLIOGRAPHY / RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI 14
17 SUMMARY OF THE PROTOCOL 14

SYMBOLS USED 15

1 INTENDED USE

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

2 CLINICAL BACKGROUND

2.1 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.

2.2 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.

3 PRINCIPLES OF THE METHOD

The IL-10 ELISA is a solid phase Enzyme Amplified Sensitivity Immunoassay (EASIA) 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 ELISA 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.

4 REAGENTS PROVIDED

	Reagents	96 tests	Reconstitution
MICROTITER PLATE	**Microtiterplate** with 96 anti-IL-10 (monoclonal antibodies) breakable coated wells	96 wells	**Ready** for use
Ab HRP	**Conjugate**: HRP labelled anti-IL-10 (monoclonal antibodies) in TRIS-Maleate buffer with bovine serum albumin and thymol	1 vial 6 mL	**Ready** for use
CAL N	**Calibrator** N = 0 to 5 (see exact values on vial labels) in human plasma with benzamidin and thymol	6 vials lyophil.	**Add** 1 mL distilled water
DIL SPE	**Specimen Diluent**: human plasma with benzamidin and thymol	3 vials lyophil.	**Add** distilled water (see on the label for the exact volume)
INC BUF	**Incubation Buffer**: Phosphate buffer with bovine serum albumin and thymol	1 vial 11 mL	**Ready** for use
WASH SOLN CONC	**Wash Solution Conc**. (Tris-HCl)	1 vial 10 mL	**Dilute** 200 x with distilled water (use a magnetic stirrer).
CONTROL N	**Control** - N = 1 or 2 in human plasma with thymol	2 vials lyophil.	**Add** 1 mL distilled water
CHROM TMB	**Chromogen TMB** (Tetramethylbenzydine)	1 vial 12 mL	**Ready** for use
STOP SOLN	**Stop Solution**: HCl 1.0 N	1 vial 6 mL	**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.

5 SUPPLIES NOT PROVIDED

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

1. High quality distilled water
2. 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)
3. Vortex mixer
4. Magnetic stirrer
5. Horizontal microtiterplate shaker capable of 700 rpm ± 100 rpm
6. Washer for Microtiterplates
7. 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)

6 REAGENT PREPARATION

A. **Calibrators**:
Reconstitute Calibrators with 1 mL distilled water.

B. **Controls**:
Reconstitute the controls with 1 mL distilled water.

C. **Specimen Diluent**:
Reconstitute specimen diluent to the volume specified on the vial label with distilled water

D. **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.

7 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 °C to 8 °C.
- Unused strips must be stored, at 2 °C - 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 °C 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 18 °C - 25 °C 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 °C to 8 °C.
- Alterations in physical appearance of kit reagents may indicate instability or deterioration.

8 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 18 °C - 25 °C. 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.

9 PROCEDURE

9.1 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 18 °C - 25 °C 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 12.5 (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.

9.2 Procedure

1. 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 °C - 8 °C.
2. Secure the strips into the holding frame.
3. Pipette 100 µL of *Incubation Buffer* into all the wells
4. Pipette 100 µL of each *Calibrator, Control* and Sample into the appropriate wells.
5. Incubate for 2 hours at 18 °C - 25 °C on a horizontal shaker set at 700 rpm ± 100 rpm.
6. Aspirate the liquid from each well.
7. Wash the plate 3 times by:
   Dispensing 0.4 mL of Wash Solution into each well
   Aspirating the content of each well
8. Pipette 100 µL *Specimen Diluent* and
   then 50 µL of anti-IL-10-HRP *Conjugate* into all the wells.
9. Incubate for 2 hours at 18 °C - 25 °C on a horizontal shaker set at 700 rpm ± 100 rpm.
10. Aspirate the liquid from each well.
11. Wash the plate 3 times by:
    Dispensing 0.4 mL of Wash Solution into each well
    Aspirating the content of each well
12. Pipette 100 µL of the Chromogenic solution into each well within 15 minutes following the washing step.
13. Incubate the microtiterplate for 15 minutes at 18 °C - 25 °C on a horizontal shaker set at 700 rpm ± 100 rpm, avoid direct sunlight.
14. Pipette 100 µL of *Stop Solution* into each well.
15. Read the absorbencies at 450 nm and 490 nm (reference filter 630 nm or 650 nm) within 30 minutes and calculate the results as described in section 10.

10 CALCULATION OF RESULTS

10.1 Polychromatic Reading

1. In this case, the software will do the data processing.
2. The plate is first read at 450 nm against a reference filter set at 650 nm (or 630 nm).
3. A second reading is performed at 490 nm against the same reference filter.
4. The software will drive the reader automatically and will integrate both readings into a polychromatic model. This technique can generate OD's up to 10.
5. The principle of polychromatic data processing is as follows:

- Xi = OD at 450 nm
- Yi = OD at 490 nm
- Using a Calibrator unweighted linear regression, the parameters A & B are calculated : $Y = A \times X + B$
- If $Xi < 3$ OD units, then X calculated = Xi
- If $Xi > 3$ OD units, then X calculated = $(Yi - B)/A$
- 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.

10.2 Bichromatic Reading

1. Read the plate at 450 nm against a reference filter set at 650 nm (or 630 nm).
2. Calculate the mean of duplicate determinations.
3. 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.
4. Read the concentration for each control and sample by interpolation on the calibration curve.
5. Computer assisted data reduction will simplify these calculations. If automatic result processing is used, a 4-parameter logistic function curve fitting is recommended.

11 TYPICAL DATA

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

IL-10 ELISA		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

12 PERFORMANCE AND LIMITATIONS

12.1 Detection Limit

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

12.2 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 BRCF1 (viral IL-10) at a concentration of 70000pg/mL. BCRF1 gave a signal corresponding to 134 pg/mL of IL-10.

12.3 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: Calibrator Deviation; CV: Coefficient of variation

12.4 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.

12.5 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

12.6 Hook effect

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

13 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.

14 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 mean value of 0.2 pg/mL.

15 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 HCl. 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.

1 USO DEL KIT

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

2 INFORMAZIONI CLINICHE

2.1 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 monochine (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.

2.2 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.

3 PRINCIPIO DEL METODO

IL-10-ELISA 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 ELISA (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.

4 REATTIVI FORNITI

	Reattivi	Kit da 96 test	Volume di ricostituzione
MICROTITER PLATE	Piastra di microtitolazione con 96 pozzetti separabili, rivestiti anti IL-10 (anticorpi monoclonani)	96 pozzetti	**Pronte** per l'uso
Ab HRP	Coniugato: anti-IL-10 (anticorpi monoclonali) marcato con HRP in tampone TRIS-maleato con albumina di siero bovino e timolo.	1 flacone 6 mL	**Pronte** per l'uso
CAL N	Calibratore N= 0 - 5 (le concentrazioni esatte degli calibratore sono riportate sulle etichette dei flaconi), in plasma umano con benzamidina e timolo.	6 flaconi liofiliz.	**Aggiungere** 1 mL di acqua distillata
DIL SPE	Diluente del Campione: plasma umano con benzamidina e timolo.	3 flacone liofiliz.	**Aggiungere** acqua distillata (vedi etichetta per volumi esatti)
INC BUF	Tampone di Incubazione: Tampone fosfato con albumina di siero bovino e timolo.	1 flacone 11 mL	**Pronte** per l'uso
WASH SOLN CONC	Tampone di lavaggio (TRIS HCl)	1 flacone 10 mL	**Diluire** 200 x con acqua distillata usando un agitatore magnetico).
CONTROL N	Controlli: N = 1 o 2, in plasma umano con timolo	2 flaconi liofiliz.	**Aggiungere** 1 mL di acqua distillata
CHROM TMB	Soluzione Cromogena TMB (tetrametilbenzidina)	1 flacone 12 mL	**Pronte** per l'uso
STOP SOLN	Soluzione di arresto: HCl 1.0N	1 flacone 12 mL	**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

5 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).

6 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.

7 CONSERVAZIONE E SCADENZA DEI REATTIVI

- I reattivi non utilizzati sono stabili a 2 °C - 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 °C - 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-scongelamento dei campioni.
- La soluzione di lavaggio concentrata è stabile a 18 °C - 25 °C 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 °C - 8 °C nel flacone originale ben tappato.
- Alterazioni dell'aspetto fisico dei reattivi possono indicare una loro instabilità o deterioramento.

8 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 18 °C - 25 °C. 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.

9 METODO DEL DOSAGGIO

9.1 Avertenze 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 18 °C - 25 °C.

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 cromogena 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 12.5 (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 cromogena 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 cromogena entro 15 minuti dopo il lavaggio della piastra di microtitolazione.

Durante l'incubazione con la Soluzione di cromogena evitare la luce diretta del sole sulla piastra di microtitolazione.

9.2 Metodo del dosaggio

1. Selezionare il numero di strisce reagenti necessario per il test. Le strisce reagenti inutilizzate devono essere risigillate nel contenitore con un essiccante e conservate a 2 °C - 8 °C.
2. Assicurare le strisce reagenti nel telaio di supporto.
3. Pipettare 100 µL di Tampone di Incubazione in ogni pozzetto
4. Pipettare 100 µL di ogni calibratore, controllo e campione nei pozzetti adeguati.
5. Incubare per 2 ore a 18 °C - 25 °C su agitatore orizzontale regolato a 700 ± 100 rpm.
6. Aspirare il liquido da ogni pozzetto.
7. Lavare la piastra 3 volte:
   versando 0,4 mL di soluzione di lavaggio in ogni pozzetto
   aspirando il contenuto di ogni pozzetto
8. Pipettare 100 µL del diluente del campione e
   poi 50 µL di conjugato anti-IL-10-HRP in tutti i pozzetti
9. Incubare la piastra di microtitolazione per 2 ores a 18 °C - 25 °C su un agitatore orizzontale a 700 ± 100 rpm
10. Aspirare il liquido da ogni pozzetto.
11. Lavare la piastra 3 volte:
    versando 0,4 mL di soluzione di lavaggio in ogni pozzetto
    aspirando il contenuto di ogni pozzetto
12. Pipettare 100 µL della soluzione di cromogena in ciascun pozzetto.
13. Incubare la piastra di microtitolazione per 15 minuti a 18 °C - 25 °C su un agitatore orizzontale a 700 ± 100 rpm; evitare la luce diretta del sole.
14. Pipettare 100 µL di soluzione di arresto in ogni pozzetto.
15. Leggere le assorbanze a 450 nm a 490 nm (filtro di riferimento a 630 nm o 650 nm) entro 30 minuti e calcolare i risultati come descritto nella sezione 10.

10 CALCOLO DEI RISULTATI

10.1 Lettura policromatica

1. In questo caso, l'elaborazione dati verrà effettuata dal software.
2. La piastra viene letta a 450 nm rispetto a un filtro di riferimento regolato a 650 nm (o 630 nm).
3. Verrà quindi effettuata una seconda lettura a 490 nm rispetto allo stesso filtro di riferimento.
4. Il Software guiderà automaticamente il lettore e integrerà le due letture utilizzando un modello policromatico. Tale tecnica può generare valori fino a 10 OD.
5. Il principio dell'elaborazione policromatica dei dati è la seguente:

   Xi = OD a 450 nm

   Yi = OD at 490 nm

   Utilizzando una regressione lineare standard non pesata, i parametri A & B sono calcolati: $Y = A \times X + B$

   Se Xi < 3 unità OD, X calcolato = Xi

   Se Xi > 3 unità OD, X calcolato = (Yi - 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.

10.2 Lettura bicromatica

1. Leggere la piastra a 450 nm rispetto a un filtro di riferimento regolato a 650 nm (o 630 nm).
2. Calcolare la media delle determinazioni in duplicato.
3. Costruire la curva di calibrazione 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.
4. Determinare le concentrazioni e controlli per interpolazione sulla curva di taratura.
5. E' possibile utilizzare un sistema di interpolazione dati automatizzato. Con un sistema automatico di interpolazione dati, utilizzare la curva a 4 parametri.

11 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 ELISA		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

12 CARATTERISTICHE E LIMITI DEL METODO

12.1 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.

12.2 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.

Un livello molto basso (<0.2%) di reazione crociata è stata osservata BRCF1 (viral IL-10) alla concentrazione di 70000 pg/mL. BCRF1 ha dato un segnale corrispondente a 134 pg/mL di IL-10.

12.3 Precisione

INTRA SAGGIO				INTER SAGGIO			
Siero	N	<X> ± SD (pg/mL)	CV (%)	Siero	N	<X> ± SD (pg/mL)	CV (%)
Siero 1	24	86 ± 2.4	2.8	Siero 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

12.4 Accuratezza

TEST DI RECUPERO

Sample	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.

12.5 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

Campione	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

12.6 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.

13 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.

14 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 siero appartenenti a soggetti apparentemente sani con bassi livelli di PCR sono risultati compresi nel range 0 - 3.3 pg/mL con un valore magro di 0,2 pg/mL.

15 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 HCl. In caso di contatto, lavare abbondamentemente 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.

16 BIBLIOGRAPHY / RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

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.

17 SUMMARY OF THE PROTOCOL

	CALIBRATORS (µL)	**SAMPLE(S) CONTROLS (µL)**
Incubation Buffer Calibrators (0-5) Samples, Controls	100 100 -	100 - 100
Incubate for 2 hours at 18 °C - 25 °C 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 Anti-IL-10 -HRP Conjugate	100 50	100 50
Incubate for 2 hours at 18 °C - 25 °C with continuous shaking at 700 rpm. Aspirate the contents of each well. Wash 3 times with 400 µL of Wash Solution and aspirate.		
Chromogenic Solution	100	100
Incubate for 15 min at 18 °C - 25 °C with continuous shaking at 700 rpm.		
Stop Solution	100	100
Read on a microtiterplate reader and record the absorbance of each well at 450 nm (and 490 nm) versus 630 (or 650 nm)		

SYMBOLS USED

Symbol	English	Deutsch	Italiano	Español	Français
CE	European Conformity	CE-Konformitäts-kennzeichnung	Conformità europea	Conformidad europea	Conformité normes européennes
	Consult instructions for use *	Gebrauchsanweisung beachten *	Consultare le istruzioni per l'uso	Consulte las instrucciones de uso	Consulter les instructions d'utilisation
IVD	*In vitro* diagnostic medical device *	*In-vitro*-Diagnostikum *	Dispositivo medico-diagnostico in vitro	Producto sanitario para diagnóstico In vitro	Dispositif médical de diagnostic in vitro
REF	Catalogue number *	Artikelnummer *	Numero di Catalogo	Nûmero de catálogo	Référence de catalogue
LOT	Batch code *	Chargencode *	Codice del lotto	Codigo de lote	Numéro de lot
Σ	Contains sufficient for <n> tests *	Ausreichend für <n> Prüfungen *	Contenuto sufficiente per "n" saggi	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenu suffisant pour "n" tests
	Temperature limit *	Temperaturbegrenzung *	Temperatura di conservazione	Temperatura de conservacion	Température de conservation
	Use-by date *	Verwendbar bis *	Utilizzare prima del	Establa hasta	Utiliser jusque
	Manufacturer *	Hersteller *	Fabbricante	Fabricante	Fabricant
	Caution *	Achtung *			
RUO	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Solo a scopo di ricerca	Sólo para uso en investigación	Seulement dans le cadre de recherches
	Distributed by	Vertreiber	Distributore	Distribuidor	Distributeur
Content	Content	Inhalt	Contenuto	Contenido	Contenu
Volume/No.	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Quantità	Volumen/Número	Volume/Quantité