

## FOGLIO INFORMATIVO SUL PRODOTTO

### Anticorpi monoclonali rilevanti antigeni umani

#### IL-10

PURE	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">RUO</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">REF</span>	IQP-165P	▽	50 tests
FITC	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">RUO</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">REF</span>	IQP-165F	▽	50 tests
R-PE	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">RUO</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">REF</span>	IQP-165R	▽	50 tests

RUO **Ad esclusivo uso di ricerca**

#### **Descrizione**

**Clone** B-N10  
**Isotipo** Mouse IgG1  
**Specificità** Human IL-10

#### **Distribuzione dell'antigene**

L'interleuchina 10 (IL-10) appartiene al gruppo delle citochine prodotte dalle cellule T<sub>H</sub>2 monociti e macrofagi e pesa 18 kDa .

#### **Riepilogo**

Il sistema immune reagisce ad un patogeno attraverso l'attivazione di una rete bilanciata di risposte immuni di tipo umorale e cellulare. Conseguentemente le condizioni di attivazione del sistema immune saranno, dopo l'eliminazione del patogeno, di nuovo sottoregolate ad una situazione bilanciata.

Il controllo della risposta immune richiede un'efficiente comunicazione tra le differenti cellule coinvolte in questa risposta.

Questa interazione è fornita dal contatto cellula-cellula e da una complessa fila di mediatori. Tra questi mediatori le citochine, fattori solubili prodotti da queste cellule, giocano un ruolo importante.

Le citochine possono agire su altre cellule localmente o a distanza, ma possono essere perfino auto regolatorie.

Le citochine possono comportarsi da stimolatori o inibitori o addirittura possono eseguire entrambe le attività, che dipendono dallo stadio di preattivazione delle cellule target.<sup>3,4</sup>

I linfociti giocano un ruolo importante nelle risposte immuni antigene-specifiche.

Molto interesse viene focalizzato sull'attività delle cellule T helper. All'interno di questa popolazione di cellule bianche del sangue, le cellule sono definite sulla base dei tipi di citochine che esse esprimono e a quali azioni partecipano.

I due estremi in questo spettro delle cellule T helper sono le cellule T<sub>H</sub>1 e T<sub>H</sub>2 .

Le cellule T<sub>H</sub>1 sono coinvolte nelle risposte immuni cellulo-mediate, mentre le cellule T<sub>H</sub>2 hanno un importante ruolo nelle risposte immuni umorali. Le cellule tipo T helper esprimono gli antigeni sia del CD3 sia del CD4, e ulteriori differenziazioni non possono essere fatte con

l'immunofenotipo. Comunque, funzionalmente, queste cellule possono essere distinte in base alle citochine prodotte da ogni sottotipo<sup>5,6,7,8</sup>. La produzione di un numero selezionato di citochine dalle cellule T è illustrato nella tabella 1. Sia le cellule T<sub>H</sub>1 che le cellule T<sub>H</sub>2 si sviluppano da un reciproco precursore, le cellule naïve T helper, che non producono molti tipi di citochine. Sotto stimolazione, le citochine come messaggeri, inducono la cellula naïve T helper a cambiare nella direzione di una cellula effettrice T helper come da tabella seguente:

Tabella 1 - Produzione di citochine da cellule umane T helper di tipo 1 e 2.

<i>Cytokine</i>	<i>T helper 1 cells</i>	<i>T helper 2 cells</i>
IL-2	++	+
IFN-γ	++	-
TNF-β	++	-
TNF-α	++	-
IL-4	-	++
IL-5	-	++
IL-13	-	++
IL-3	+/-	+
IL-6	+/-	+
IL10	+/-	+

Clinicamente le cellule T<sub>H</sub>1 e T<sub>H</sub>2 giocano un ruolo importante in una varietà di malattie. Come dimostrato qui sopra, le cellule T<sub>H</sub>1 sembrano essere coinvolte nelle risposte immuni cellulo-mediate quali le infezioni batteriche, lo sviluppo delle malattie autoimmuni e il rigetto da trapianto.

Le cellule T<sub>H2</sub>, invece, sembrano essere coinvolte nella risposta della protezione agli allergeni, ma potrebbero anche condurre a reattività allergenica<sup>9, 10</sup>. Inoltre lo sviluppo di malattie progressive nei pazienti con infezione da HIV, potrebbe essere accompagnato da uno spostamento da risposta cellulare T<sub>H1</sub> a risposta cellulare T<sub>H2</sub>. Queste scoperte possono essere importanti per l'approccio terapeutico durante la malattia HIV<sup>11</sup>.

L'interleuchina 10 (IL-10) appartiene al gruppo delle citochine prodotte dalle cellule T<sub>H2</sub> e dai monoliti. Essa gioca un ruolo nella proliferazione delle cellule B e nelle risposte anticorpali. IL-10 è una molecola pleiotropica che inibisce la risposta immune cellulo mediata attraverso la soppressione delle risposte T helper tipo 1.

In presenza di elevati livelli di IL-2 i cloni sia di T<sub>H1</sub> che T<sub>H2</sub> rispondono con livelli di proliferazione incrementati, mentre l'aggiunta di IL-10 risulta in una diminuita crescita delle cellule tipo T<sub>H</sub>.

### Principi della procedura

Il livello della maggior parte delle citochine prodotte dalle cellule immuni non stimolate è troppo basso per essere determinato dalle analisi di citofluorimetria<sup>19</sup>. Dopo stimolazione il livello delle citochine è in aumento e dipende da: modo di stimolazione, popolazione cellulare, inibitore di secrezione che è utilizzato e parecchi altri fattori; numerose citochine sono sottoregolate e possono essere presenti in concentrazioni determinabili.

Comunque è stato sviluppato un metodo per analizzare le cellule che sono state stimolate per determinare possibili citochine espresse intracellularmente.

Il Cytodetect™ kit basis (IQP-367) sviluppato da IQ Products fornisce reagenti per la stimolazione delle cellule, la fissazione e la permeabilizzazione.

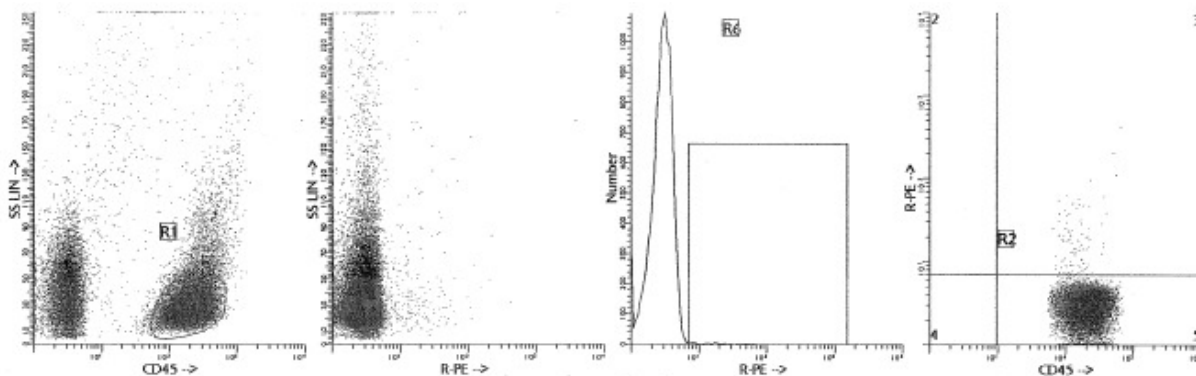
I reagenti forniti nel Cytodetect™ kit permettono di processare 50 campioni di sangue. Ogni campione può essere ulteriormente analizzato per 5 differenti antigeni intracellulari utilizzando immunoconiugati direttamente marcati con PE e analizzati al citofluorimetro.

### Utilizzo

Tutti questi reagenti sono formulati per la colorazione di immunofluorescenza diretta di tessuto umano per analisi in citometria a flusso: utilizzare per singola colorazione 10 µl/10<sup>6</sup> di leucociti e 20 µl/10<sup>6</sup> di leucociti nel caso di doppie o triple combinazioni. Se le applicazioni variano, ogni utilizzatore dovrebbe titolare il reagente per ottenere il risultato ottimale.

### Dati Rappresentativi

Il clone B-N10 (anti-IL-10) è stato analizzato in citometria a flusso seguendo il protocollo del kit Cytodetect. Linfociti di sangue periferico sono stati isolati da campioni di sangue ottenuto da volontari sani e successivamente attivati, fissati e permeabilizzati. La colorazione diretta è stata eseguita utilizzando 10 µl di anticorpo monoclonale coniugato con R-PE in combinazione con 10 µl di CD45 FITC per campione.



### Limitazioni

1. I coniugati con fluorocromi più brillanti quali PE e APC, presenteranno una maggiore separazione rispetto ai coniugati con i fluorocromi quali FITC e CyQ. Quando le popolazioni si sovrappongono, il calcolo della percentuale delle cellule positive per un determinato marcatore può essere influenzato dalla scelta del fluorocromo.
2. L'utilizzo di anticorpi monoclonali nel trattamento di pazienti può interferire con il riconoscimento degli antigeni bersaglio da parte di questo reagente. Questo dovrebbe essere preso in considerazione quando i campioni analizzati sono di pazienti trattati in questo modo. IQ Products non ha verificato l'effetto della presenza di anticorpi terapeutici sul funzionamento di questo reagente.
3. I reagenti possono essere utilizzati in diverse combinazioni; pertanto, gli operatori di laboratorio dovranno acquistare familiarità con le caratteristiche di ciascun anticorpo in relazione ai marcatori combinati in campioni normali e anormali.
4. I dati relativi all'attività del reagente si basano su sangue trattato con EDTA. L'attività del reagente può essere influenzata se vengono utilizzati altri anticoagulanti.

## Reagenti e materiali necessari ma non in dotazione

- 1 Citometro a flusso
- 2 Provetta da test con tappo in polistirene monouso 12 x 75 mm per citometro a flusso
- 3 Micropipetta con puntali monouso
- 4 Miscelatore a vortice
- 5 Centrifuga
- 6 IQ Lyse – soluzione lisante di eritrociti (IQP-199)
- 7 IQ Starfiqs – soluzione permeabilizzante e fissante (IQP-200)
- 8 PBS (soluzione salina di tampone fosfato)
- 9 1% di soluzione paraformaldeide in PBS (conservare a 2-8 °C in vetro ambrato per un massimo di 1 settimana)

## Procedura del test

**Note:** A meno che non vengano dichiarati altrimenti, i reagenti (incluso PBS) dovrebbero essere utilizzati a temperatura ambiente.

### 1. Isolamento dei linfociti del sangue

- Raccogliere 5 - 10 ml di sangue venoso in provetta eparinizzata o trattata con EDTA, utilizzando il prelievo sterile. Processare il sangue entro 6 ore dal prelievo. In pazienti con severa neutrociopenia (conta assoluta neutrofili meno di 200/mm<sup>3</sup>) almeno 10 ml di sangue dovrebbero essere richiesti.
- Diluire il campione di sangue 1:1 con PBS (Tampone fosfato salino).
- Aggiungere Ficoll-Paque (5 ml) in una provetta da centrifuga.
- Depositare attentamente 5 ml del campione di sangue diluito su 5 ml di Ficoll-Paque.
- Centrifugare a 600 g per 20 minuti.
- Trasferire lo strato dei linfociti in una provetta pulita da centrifuga.
- Aggiungere 5 ml di HBSS e centrifugare a 400 g per 15 minuti.
- Rimuovere il surnatante e aggiungere 10 ml di RPMI 1640.
- Centrifugare a 300 g per 10 minuti e rimuovere il surnatante.
- Risospendere le cellule in RPMI 1640 fino a una concentrazione di 2 x 10<sup>6</sup> cellule/ml.
- 1 ml di sospensione cellulare è sufficiente per la determinazione intracellulare di 5 differenti citochine; assicurarsi che siano disponibili controlli non stimolati oltre alle cellule stimolate.

### 2. Stimolazione delle cellule

- Mettere un 1 ml della sospensione cellulare in una piastra da coltura da 24 pozzetti e aggiungere uno stimolo appropriato e un inibitore di secrezione quale Brefeldina A o Monensina. Miscelare attentamente con una pipetta.
- Incubare per 5 ore a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>.

**Note:** 5 ore di incubazione sono suggerite nel kit Cytodetect™. Questa è un'indicazione, il tempo ottimale di stimolazione dovrebbe essere determinato dall'utilizzatore. L'ottimo può differire dallo stato delle cellule e dal tipo di cellule.

- Dopo la stimolazione trasferire le cellule in una provetta da centrifuga e aggiungere 5 ml di HBSS.
- Centrifugare a 300 g per 10 minuti e rimuovere il surnatante.

### 3. Fissazione delle cellule

- Aggiungere 500 µl di fissativo freddo (4 °C) e incubare per 10 minuti a temperatura ambiente.
- Aggiungere 9 ml di HBSS e centrifugare a 300 g per 10 minuti.
- Rimuovere il surnatante e risospendere le cellule in 500 µl di HBSS.
- Le cellule possono essere conservate tutta notte a 4 °C o processate ulteriormente.

### 4. Colorazione degli antigeni di superficie cellulare

- Quando le cellule sono state conservate tutta notte in frigorifero si consiglia di lavarle una volta con 5 ml di HBSS. Risospendere il pellet dopo aver rimosso il surnatante in 500 µl di HBSS di nuovo.
- Aggiungere a 3 ml, 10 µl di anticorpo monoclonale coniugato scelto contro un antigene di superficie in una provetta da citofluorimetro.
- Aggiungere 100 µl di sospensione cellulare alla provetta e miscelare bene con vortex, e incubare per 20 minuti a temperatura ambiente e al buio.

### 5. Permeabilizzazione delle cellule

- Aggiungere 1.5 ml di soluzione permeabilizzante.
- Centrifugare a 200 g per 5 minuti.
- Rimuovere il surnatante e risospendere le cellule in 500 µl di soluzione permeabilizzante, utilizzare 100 µl per la colorazione degli antigeni intracellulari.

### 6. Colorazione di antigeni intracellulari

- Aggiungere alla provetta del reagente, 10 µl di anticorpo monoclonale coniugato con R-PE contro antigeni intracellulari, e agitare bene con vortex.
- Incubare per 20 minuti a 4 °C al buio.
- Aggiungere 1,5 ml di soluzione permeabilizzante e centrifugare a 200 g per 5 minuti.
- Rimuovere il surnatante e risospendere le cellule in 100 - 300 µl di HBSS.

#### 7. Analisi con il citofluorimetro

- Analizzare le cellule con il citometro a flusso.
- Utilizzare appropriati controlli per l'immunocolorazione e processare i dati.



#### Manipolazione e conservazione

Gli anticorpi sono forniti come fiala per 50 test (0.5 ml) per combinazioni singole. Sono forniti in 0,01 M fosfato di sodio, 0,15 M NaCl; pH 7.3, 0,2% BSA, 0,9% sodio azide (NaN<sub>3</sub>). Conservare le fiale a 2-8 °C. Gli anticorpi monoclonali dovranno essere protetti dall'esposizione prolungata alla luce. I reagenti sono stabili per il periodo indicato sull'etichetta della fiala, se conservati correttamente.

**Garanzia** La sola garanzia offerta è di conformità a quantità e contenuti indicati sull'etichetta al momento della fornitura al cliente. Non vengono concessi altri tipi di garanzia, espressi o impliciti, che esulino dalla descrizione riportata sull'etichetta del prodotto. IQ Products non sarà responsabile di danni alla proprietà, ferite personali o perdite economiche causate dal prodotto.

#### Caratterizzazione

Per garantire un livello qualitativo costantemente elevato, ciascun lotto di anticorpi monoclonali è testato circa la conformità con le caratteristiche di un reagente standard. Dati rappresentativi relativi alla citometria a flusso sono inclusi nella presente scheda.















**Attenzione** Tutti i prodotti contengono sodio azide, sostanza chimica velenosa e pericolosa. L'uso sarà consentito esclusivamente a operatori specializzati.

---

#### Riferimenti bibliografici

1. Moore JS, Zaki MH. Clinical cytokine network cytometry. *Clin Lab Med* 2001 Dec; 21(4):795-809.
2. Santiago MA, Luca PM, Bertho AL, Azeredo-Coutinho RB, Coutinho SG. Detection of intracytoplasmic cytokines by flow cytometry. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2000 May-Jun; 95(3): 401-2.
3. Haddad JJ. Cytokines and related receptor-mediated signaling pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 2002 Oct 4; 297(4): 700-13.
4. Townsend MJ, McKenzie AN. Unravelling the net? Cytokines and diseases. *J Cell Sci* 2000 Oct; 113 (Pt 20): 3549-50.
5. Prussin C. Cytokine flow cytometry: understanding cytokine biology at the single-cell level. *J Clin Immunol* 1997 May; 17(3): 195-204.
6. Pala P, Hussell T, Openshaw PJ. Flow cytometric measurement of intracellular cytokines. *J Immunol Methods* 2000 Sep 21; 243(1-2): 107-24.
7. Pala P, Hussell T, Openshaw PJ. Flow cytometric measurement of intracellular cytokines. *Immunol Methods* 2000 Sep 21; 243(1-2): 107-24.
8. Romagnani S. T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Ann Allergy Asthma Immunol* 2000 Jul; 85(1):9-18.
9. Del Prete G. The concept of type-1 and type-2 helper T cells and their cytokines in humans. *Int Rev Immunol* 1998; 16(3-4): 427-55.
10. Infante-Duarte C, Kamradt T. Th1/Th2 balance in infection. *Springer Semin Immunopathol* 1999; 21(3): 317-38.
11. Klein SA, Dobmeyer JM, Dobmeyer TS, Pape M, Ottmann OG, Helm EB, Hoelzer D, Rossol R. Demonstration of the Th1 to Th2 cytokine shift during the course of HIV-1 infection using cytoplasmic cytokine detection on single cell level by flow cytometry. *AIDS* 1997 Jul 15; 11(9): 1111-8.
12. Bleesing JJ, Fleisher TA. Cell function-based flow cytometry. *Semin Hematol* 2001 Apr; 38(2): 169-78.
13. Le Moine A, Goldman M, Abramowicz D. Multiple pathways to allograft rejection. *Transplantation* 2002 May 15; 73(9): 1373-8.
14. Zhai Y, Ghobrial RM, Busuttill RW, Kupiec-Weglinski JW. Th1 and Th2 cytokines in organ transplantation: paradigm lost? *Crit Rev Immunol* 1999; 19(2): 155-72.
15. Girolomoni G, Sebastiani S, Albanesi C, Cavani A. T-cell subpopulations in the development of atopic and contact allergy. *Curr Opin Immunol* 2001 Dec; 13(6): 733-7.
16. Kapsenberg ML, Hilkens CM, Jansen HM, Bos JD, Sniijders A, Wierenga EA. Production and modulation of T-cell cytokines in atopic allergy. *Int Arch Allergy Immunol* 1996 Jun; 110(2): 107-13.
17. Sousa AE, Chaves AF, Doroana M, Antunes F, Victorino RM. Kinetics of the changes of lymphocyte subsets defined by cytokine production at single cell level during highly active antiretroviral therapy for HIV-1 infection. *J Immunol* 1999 Mar 15; 162(6): 3718-26.
18. Betts MR, Ambrozak DR, Douek DC, Bonhoeffer S, Brenchley JM, Casazza JP, Koup RA, Picker LJ. Analysis of total human immunodeficiency virus (HIV)-specific CD4(+) and CD8(+) T-cell responses: relationship to viral load in untreated HIV infection. *J Virol* 2001 Dec; 75(24): 11983-91.
19. Rostaing L, Tkaczuk J, Durand M, Peres C, Durand D, de Preval C, Ohayon E, Abbal M. Kinetics of intracytoplasmic Th1 and Th2 cytokine production assessed by flow cytometry following in vitro activation of peripheral blood mononuclear cells. *Cytometry* 1999 Apr 1; 35(4): 318-2.

## Legenda dei simboli

	Consultare le Istruzioni per l'uso
	Numero di catalogo
	Sufficiente per
	Dispositivo medico-diagnostico in vitro
	Attenzione, consultare il documento allegato
	Conservare al riparo dalla luce (solare)
	Rischio biologico
	Limiti di temperatura (°C)
	Ad esclusivo uso di ricerca
	Codice del lotto
	Utilizzare entro aaaa-mm-gg
	Fabbricante
	Mandatario nella Comunità Europea
	Conformité Européenne (Conformità Europea)

		etichetta - tandem	Ex -max (nm)	Em -max (nm)
P	PURE	Materiale purificato	-	-
F	FITC	FITC	488	519
R	R-PE	PE	488, 532	578
C	CyQ	PE-Cy5.18	488, 532	667
A	APC		595, 633, 635, 647	660
PC	PerCP		488, 532	678
PCC	PerCP-Cy5.5		488, 532	695



IQ Products BV  
Rozenburglaan 13a  
9727 DL Groningen, The Netherlands

 +31 (0)50 57 57 000  
 +31 (0)50 57 57 002  
 Technical [marketing@iqproducts.nl](mailto:marketing@iqproducts.nl)  
 Orders [orders@iqproducts.nl](mailto:orders@iqproducts.nl)  
 [www.iqproducts.nl](http://www.iqproducts.nl)