

C€

Monoclonal Mouse Anti-Human CD20cy Clone L26 Code M0755

ENGLISH

Intended use

For in vitro diagnostic use.

Monoclonal Mouse Anti-Human CD20cy, Clone L26, is intended for use in immunohistochemistry. The antibody labels cells of the B-cell lineage, and is a very useful tool for the identification of neoplasms of B-cell derivation (1). Differential identification is aided by the results from a panel of antibodies. The clinical interpretation of any staining or its absence should be complemented by morphological studies using proper controls and should be evaluated within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a qualified pathologist.

Synonym for antigen

L26 (2).

Summary and explanation

CD20 is a transmembrane, non-glycosylated protein expressed on B-cell precursors and mature B cells, but is lost following differentiation into plasma cells (3). In resting B cells, CD20 appears in a 33 kDa non-phosphorylated form. After mitogen stimulation, CD20 becomes heavily phosphorylated (35-37 kDa isoforms), and it is a dominant phosphoprotein in activated B cells, B-cell lines, and hairy cell leukaemias (2). The long N- and C-terminal ends of the protein are located on the cytoplasmic side of the membrane and only a minor portion of the protein is exposed on the cell surface (3). Antibodies reacting with CD20 cytoplasmic epitopes are designated CD20cy (2). It is suggested that CD20 plays a direct role in regulating the transmembrane conductive Ca²⁺ flux of B cells which indicates a possible function for CD20 as a regulator of proliferation and differentiation (3).

Reagent provided

Monoclonal mouse antibody provided in liquid form as cell culture supernatant dialysed against 0.05 mol/L Tris/HCI, pH 7.2, and containing 15 mmol/L NaN₃.

Clone: L26 (1, 4). <u>Isotype:</u> IgG2a, kappa.

Mouse Ig concentration: see label on vial.

The protein concentration between lots may vary without influencing the optimal dilution. The titer of each individual lot is compared and adjusted to a reference lot to ensure a consistent immunohistochemical staining performance from lot-to-lot.

Immunogen

Human tonsil B cells (4).

Specificity

The antibody was clustered as anti-CD20 at the Fifth International Workshop and Conference on Human Leucocyte Differentiation Antigens held in Boston 1993 (2). SDS-PAGE analysis of immunoprecipitates formed between ¹²⁵I-labelled tonsil cell lysate and the antibody shows reaction primarily with 30 kDa and 33 kDa polypeptides (4).

Studies using COS-1 cells transfected with cDNA encoding the CD20 molecule, indicate that the antibody labels an intracytoplasmic epitope localized on the CD20 molecule (5).

Precautions

- 1. For professional users.
- 2. This product contains sodium azide (NaN₃), a chemical highly toxic in pure form. At product concentrations, though not classified as hazardous, sodium azide may react with lead and copper plumbing to form highly explosive build-ups of metal azides. Upon disposal, flush with large volumes of water to prevent metal azide build-up in plumbing.
- 3. As with any product derived from biological sources, proper handling procedures should be used.
- 4. Wear appropriate Personal Protective Equipment to avoid contact with eyes and skin.5. Unused solution should be disposed of according to local, State and Federal regulations.

Storage

Store at 2-8 °C. Do not use after expiration date stamped on vial. If reagents are stored under any conditions other than those specified, the conditions must be verified by the user. There are no obvious signs to indicate instability of this product. Therefore, positive and negative controls should be run simultaneously with patient specimens. If unexpected staining is observed which cannot be explained by variations in laboratory procedures and a problem with the antibody is suspected, contact Dako Technical Services.

Specimen preparation

<u>Paraffin sections</u>: The antibody can be used for labelling paraffin-embedded tissue sections fixed in formalin or B5-fixative (6). Pre-treatment of tissues with heat-induced epitope retrieval is recommended. For tissues fixed in formalin, optimal results are obtained with Dako Target Retrieval Solution, code S1700, Dako Target Retrieval Solution, High pH, code S3308, 10 mmol/L citrate buffer, pH 6.0, or 10 mmol/L Tris buffer, 1 mmol/L EDTA, pH 9.0. Pre-treatment of tissues with proteinase K was found destructive of the epitope. The tissue sections should not dry out during the treatment or during the following immunohistochemical staining procedure.

Frozen sections and cell preparations: The antibody can be used for labelling acetone-fixed frozen sections (1) and acetone-fixed cell preparations (1, 4).

Staining procedure

Dilution: Monoclonal Mouse Anti-Human CD20cy, code M0755, may be used at a dilution range of 1:200-1:400 when applied on formalin-fixed, paraffin-embedded sections of human tonsil and using 20 minutes heat-induced epitope retrieval in Dako Target Retrieval solution, code S1700, pH 6.0, and 30 minutes incubation at room temperature with the primary antibody. Optimal conditions may vary depending on specimen and preparation method, and should be determined by each individual laboratory.

The recommended negative control is Dako Mouse IgG2a, code X0943, diluted to the same mouse IgG concentration as the primary antibody. Unless the stability of the diluted antibody and negative control has been established in the actual staining procedure, it is recommended to dilute these reagents immediately before use, or dilute in Dako Antibody Diluent, code S0809. Positive and negative controls should be run simultaneously with patient specimen.

<u>Visualization:</u> Dako LSAB™+/HRP kit, code K0679, and Dako EnVision™+/HRP kits, codes K4004 and K4006, are recommended. For frozen sections and cell preparations, the Dako APAAP kit, code K0670, is a good alternative if endogenous peroxidase staining is a concern. Follow the procedure enclosed with the selected visualization kit.

 $\underline{\text{Automation:}} \ \text{The antibody is well-suited for immunohistochemical staining using automated platforms, such as the Dako Autostainer.}$

Product-specific limitations

Rare cases of CD20-positive peripheral T-cell lymphomas have been reported (8, 9).

Performance characteristics

B cells labelled by the antibody display staining of the cytoplasmic side of the cell surface membrane.

Normal tissues: In normal lymphoid tissue, the antibody labelled germinal centre cells, mantle zone lymphocytes, and scattered interfollicular lymphocytes, but not T cells, histiocytes and plasma cells (6, 8). No labelling was observed in epidermis, sebaceous glands, hair follicles and eccrine glands in the skin, follicular epithelium in the thyroid, pneumocytes and bronchial epithelium of the lung, and a large number of other normal non-lymphoid tissues tested (6).

Abnormal tissues: Positive reaction with the antibody was revealed in most of 131 B-cell neoplasms tested (1). Labelling with the antibody shows that in the differentiation of B cells, the CD20 antigen is not expressed on very immature lymphoid cells (0/6 acute undifferentiated leukaemias), but begins to be expressed on early maturational stages

(102294-003) M0755/EFG/KRM/2008.09.30 p. 1/4

Dako Denmark A/S | Produktionsvej 42 | DK-2600 Glostrup | Denmark | Tel. +45 44 85 95 00 | Fax +45 44 85 95 95 | CVR No. 33 21 13 17

(14/34 common acute lymphoblastic and 7/9 pre-B acute lymphoblastic leukaemias), and then, the CD20 antigen is fully expressed on mature B cells (15/15 chronic lymphocytic, 3/3 prolymphocytic, 3/3 hairy cell, 6/7 lymphosarcoma cell leukaemias, and 45/46 B-cell malignant lymphomas including Burkitt, Waldenström, and immunoblastic B-cell lymphomas. The CD20 antigen disappears on plasma cells, and only 1/2 plasma cell leukaemias and 0/12 myelomas were labelled by the antibody (1). Other studies have provided comparable results showing positive labelling of 44/44 large cell and immunoblastic B-cell lymphomas (6), and all of 40 B-cell lymphomas, with the exception of common acute lymphoblastic leukaemias and malignant lymphoma plasmacytic (8). In Hodgkin's disease, strong surface membrane staining of Reed-Sternberg cells was observed in 9/27 cases (8). Of lymphoproliferative diseases of T-cell lineage, 0/73 were labelled by the antibody (1), whereas other studies showed 1/18 (8) and 1/111 (9) positive cases.

FRANCAIS

Intérêt

Pour diagnostic in vitro.

Monoclonal Mouse Anti-Human CD20cy, Clone L26, est destiné pour un usage en immunohistochimie. L'anticorps marque les cellules de lignage cellulaire B, et est un outil très utile pour la détermination des néoplasmes à dérivation cellulaire B (1). L'identification différentielle s'appuie sur les résultats obtenus à l'aide d'un panel d'anticorps. L'interprétation clinique de toute coloration ou son absence doit être complétée par des études morphologiques en utilisant des contrôles appropriés et doit être évaluée en fonction des antécédents cliniques du patient et d'autres tests diagnostiques par un pathologiste qualifié

Synonyme pour l'antigène

L26 (2).

Résumé et explication

CD20 est une protéine transmembranaire, non-glycosylée, exprimée sur les précurseurs de cellules B et les cellules B matures, mais est éliminée suite à la différenciation en plasmocytes. (3). Dans les cellules B au repos, CD20 apparaît sous une forme de 33 kDa non-phosphorylée. Après stimulation du mitogène, CD20 devient lourdement phosphorylé (isoformes de 35-37 kDa), et c'est une phosphoprotéine dominante dans les cellules B activées, les lignées à cellules B, et les leucémies tricholeucocytaires (2). Les longues extrémités N-terminale et C-terminale de la protéine sont situées sur le côté cytoplasmique de la membrane et seulement une faible partie de la protéine est exposée sur la face cellulaire (3). Les anticorps montrant une réaction aux épitopes cytoplasmiques CD20 sont du type CD20cy (2). Il est suggéré que CD20 joue un rôle directe dans la régulation du flux de Ca²⁺ conducteur transmembranaire des cellules B indiquant la possibilité que CD20 fonctionne comme un régulateur de prolifération et de différenciation (3).

Réactif fourr

L'anticorps de souris monoclonale fourni à l'état liquide comme culture cellulaire surnageante dialisée contre 0,05 mol/L Tris/HCI, pH 7.2, et contenant 15 mmol/L NaN3.

Clone: L26 (1,4) . Isotype: IgG2a, kappa.

Concentration de l'IgG de souris: Voir l'étiquette sur le flacon de l'échantillon.

La concentration en protéines peut varier d'un lot à l'autre sans que cela influence la dilution optimale. Le titre de chaque lot est comparé et ajusté par rapport à un lot de référence pour assurer des performances de coloration immunohistochimiques cohérentes d'un lot à l'autre.

Immunogèn

Cellules B de l'amygdale humaine (4).

Spécificité

L'anticorps était groupé comme anti-CD20 à la « Fifth International Workshop and Conference on Human Leucocyte Differentiation Antigens » tenue à Boston en 1993 (2).

L'analyse SDS-PAGE des immunoprécipités formée entre le lysat cellulaire marqué à l'I¹²⁵ de l'amygdale et l'anticorps présente une réaction principalement avec des polypeptides de 30 kDa et 33 kDa (4).

Des études utilisant des cellules COS-1 transfectées avec l'ADNc encodant la molécule CD20, indiquent que l'anticorps marque un épitope intracytoplasmique localisé sur la molécule CD20 (5).

Précautions d'emploi

- 1. Pour utilisateurs professionnels.
- 2. Ce produit contient de l'azide de sodium (NaN₃), un produit chimique hautement toxique à l'état pur. Aux concentrations du produit, bien qu'il ne soit pas classé comme étant nuisible, l'azide de sodium peut réagir avec la tuyauterie en plomb et en cuivre pour former des dépots hautement explosifs d'azides métallisés. Lors de l'élimination du produit, laisser couler l'eau à flot pour éviter toute accumulation d'azides métallisés dans la tuyauterie.
- 3. Comme pour tout dérivé biologique dangereux à manipuler, une précision s'impose.
- 4. Porter un vêtement de protection approprié pour éviter le contact avec les yeux et la peau.
- 5. Les solutions non utilisées doivent être éliminées conformément aux réglementations locales et nationales.

Stockage

Stocker entre 2 et 8 °C. Ne pas utiliser après la date de péremption mentionnée sur le flacon. Dans le cas où les réactifs sont conservés sous d'autres conditions que celles spécifiées, les conditions doivent être vérifiées par l'utilisateur. Il n'existe pas de signe particulier pour indiquer l'instabilité de ce produit. Par conséquent, les contrôles doivent être opérés simultanément avec les échantillons du patient. En cas de résultats imprévus qui ne peuvent pas être expliqués par des changements de procédures de laboratoire et qu'un problème avec le produit est suspecté, contactez nos Services Techniques.

Préparation de l'échantillon

Coupes en paraffine: L'anticorps peut être utilisé pour le marquage des coupes de tissus inclues dans la paraffine fixées au formol ou fixateur B5 (6). Le prétraitement des tissus par desquamage des épitopes par la chaleur est requis. Pour les tissus fixés au formol, des résultats optimaux sont obtenus avec Dako Target Retrieval Solution, pH Elevé, code S3308, ou 10 mmol/L tampon citrate, pH 6.0.ou 10 mmol/L tampon tris, 1 mmol/L EDTA, pH 9.0. Le prétraitement des tissus à la Protéinase K a entrainé la destruction de l'épitope. Les coupes de tissus ne doivent pas sécher pendant le traitement ou la procédure d'immunomarquage immunocytochimique suivante.

Coupes congelées et préparations cellulaires: L'anticorps peut être utilisé pour le marquage des coupes en congélation fixées à l'acétone (1) et les préparations cellulaires fixées à l'acétone. (1, 4).

rocédure d'immunomarquage

<u>Dilution:</u> Monoclonal Mouse Anti-Human CD20cy, code M0755, peut être dilué entre 1:200 et 1:400 pour application sur les coupes incluses en paraffine, fixées au formol de l'amygdale humaine pendant 20 minutes de démasquage de l'épitope par la chaleur dans Dako Target Retrieval Solution, code S1700S, pH 6.0, et 30 minutes d'incubation à température ambiante avec l'anticorps primaire. Les conditions optimales peuvent varier selon l'échantillon et la méthode de préparation, et doivent être déterminées par chaque laboratoire particulier.

Le contrôle négatif requis est Dako Mouse IgG2a, code X0943, dilué à la même concentration d'IgG de souris que l'anticorps primaire. A moins que la stabilité de l'anticorps dilué et du contrôle négatif ait été établie dans la procédure d'immunomarquage réelle, il est recommandé de diluer ces réactifs juste avant leur emploi, ou de les diluer dans Dako Antibody Diluent, code S0809. Les contrôles positifs et négatifs doivent être opérés simultanément avec l'échantillon du patient.

Révélation: Dako LSAB™+/HRP kit, code K0679, et Dako EnVision™+/HRP kits, codes K4004 et K4006, sont requis. Pour les coupes en congélation et préparations cellulaires, Dako APAAP kit, code K0670, est une alternative valable si le marquage endogène péroxydasique est à craindre. Suivre la procédure inclue avec le kit de

Automatisation: L'anticorps est bien adapté au marquage immunohistochimique sur des plates-formes automatisées comme le Dako Autostainer.

Limitations spécifiques du produit

Des cas rares de lymphomes à cellules T périphériques positifs à CD20 ont été reportés (8, 9).

Performance

(102294-003)

Les cellules B marquées par l'anticorps révèlent un marquage cytoplasmique de la membrane externe cellulaire.

Dako Denmark A/S | Produktionsvej 42 | DK-2600 Glostrup | Denmark | Tel. +45 44 85 95 00 | Fax +45 44 85 95 95 | CVR No. 33 21 13 17

M0755/EFG/KRM/2008.09.30 p. 2/4

Tissus normaux: Dans le tissu lympho¿de normal, l'anticorps marquait les cellules centro-germinales, les lymphocytes de zone en mantelet et les lymphocytes dispersés interfolliculaires, mais ne marquait pas les cellules T, les histiocytes et les plasmocytes (6, 8). Aucun marquage n'a été observé dans l'épiderme, les glandes sébacées, les follicules pileux et les glandes eccrines dans la peau, l'épithélium folliculaire dans la thyroïde, les pneumocytes et l'épithélium bronchique du poumon, et un grand nombre de tissus normaux non-lymphoïdiens testés. (6).

Tissus anormaux: Une réaction positive à l'anticorps s'est révélée dans la plupart des 131 néoplasmes à cellules B testés (1). Le marquage avec l'anticorps révèle que dans la différenciation des cellules B, l'antigène CD20 n'est pas exprimé sur des cellules lymphoïdes très immatures (0/6 de leucémies indifférenciées aigues), mais commence à être exprimé durant les phases de maturation préliminaire (14/34 leucémies lymphoblastiques aigues communes et 7/9 leucémies lymphoblastiques aigues pre-B), ensuite l'antigène CD20 est entièrement exprimé sur les cellules B matures (15/15 de leucémies chroniques lymphocytiques, 3/3 de leucémies prolymphocytiques, 3/3 leucémies à tricholeucocytes, 6/7 de leucémies à cellules de lymphosarcome, et 45/46 lymphomes malins à cellules B, y compris les lymphomes de Burkitt, de Waldenström, et à cellules B immunoblastiques. L'antigène CD20 disparaît sur les plasmocytes, et seulement 1/2 de leucémies à plasmocytes et 0/12 de myélomes étaient marqués par l'anticorps (1). D'autres études ont fourni des résultats comparables montrant un marquage positif de 44/44 de lymphomes à grande cellule et au lymphocyte B immunoblastique (6), et 40 lymphomes à cellules B, à l'exception de leucémies communes lymphoblastiques aigues et des lymphomes malins plasmacytiques (8). Dans la maladie de Hodgkin, un marquage fort de la face membranaire des cellules de Reed Sternberg était observée dans 9/27 de cas (8). Dans la maladie de Hodgkin, un marquage fort de la face externe membranaire des cellules de Reed-Sternberg a été observé dans 9/27 de cas (8). Des maladies lympho-prolifératives de lignage à cellule T, 0/73 ont été marquées par l'anticorps (1), alors que d'autres études ont révélé 1/18 (7) et 1/111 (8) de cas positifs.

DEUTSCH

Zweckbestimmung

Zur Verwendung für In-vitro-Untersuchungen

Monoclonal Mouse Anti-Human CD20cy, Clone L26, ist für den immunhistochemischen Gebrauch bestimmt. Der Antikörper markiert Zellen der B-Zelllinie und ist sehr nützlich in der Identifizierung von Neoplasien, die sich von B-Zellen herleiten (1). Die differentielle Identifizierung wird durch die mit einem Antikörper-Panel erhaltenen Resultate unterstützt. Die klinische Auswertung einer eventuell eintretenden Färbung sollte durch morphologische Studien mit geeigneten Kontrollen ergänzt werden und von einem qualifizierten Pathologen unter Berücksichtigung der Krankengeschichte und anderer diagnostischer Tests des Patienten vorgenommen werden.

Synonyme Bezeichnungen des Antigens

L26 (2).

Zusammenfassung und Erklärung

CD20 ist ein transmembranisches, nicht glykolysiertes Protein, welches auf B-Zellen-Vorläufern und auf reifen B-Zellen exprimiert wird, jedoch nach der Differenzierung zu Plasmazellen verloren geht (3). In ruhenden B-Zellen erscheint CD20 in 33 kDa schwerer, nicht phosphorylierter Form. Nach mitogener Stimulierung wird CD20 stark phosphoryliert (35 - 37 kDa schwere Isoformen) und ist bei aktivierten B-Zellen, B-Zelllinien und Haarzellen-Leukämien ein dominantes Phosphoprotein (2). Die langen Nterminalen und C-terminalen Enden des Proteins sind auf der zytoplasmatischen Seite der Membran lokalisiert und nur ein kleiner Teil des Proteins liegt auf der Zelloberfläche frei (3). Mit den zytoplasmatischen Epitopen des CD20 reagierende Antikörper werden als CD20cy bezeichnet (2). Es wird nahegelegt, dass CD20 eine direkte Rolle bei der Regulation des transmembranischen konduktiven Ca2+-Flusses der B-Zellen spielt, was auf eine mögliche Funktion des CD20 als Regulator der Proliferation und Differenzierung verweist (3).

Geliefertes Reagenz

Der monoklonale Mausantikörper wird in flüssiger Form als Zellkulturüberstand geliefert, wurde gegen 0,05 mol/l Tris/HCl, pH-Wert 7,2 dialysiert und enthält 15 mmol/l NaN3.

Klon: L26 (1, 4). Isotyp: IgG2a, Kappa

Murine Ig-Konzentration: Siehe Produktetikett.

Die Proteinkonzentration kann bei den Chargen verschieden ausfallen, ohne die optimale Verdünnung zu beeinflussen. Der Titer wird bei jeder einzelnen Charge mit einer Referenzcharge verglichen und dieser angeglichen, um konstante immunhistochemische Färbeergebnisse zwischen den Chargen zu gewährleisten

Menschliche B-Zellen aus den Tonsillen (4).

Spezifität

Der Antikörper wurde anlässlich des "Fifth International Workshop and Conference on Human Leucocyte Differentiation Antigens" (Boston, 1993) als Anti-CD20 aufgenommen (2).

Die SDS-PAGE-Analyse der Immunpräzipitate, die zwischen 125 narkiertem Tonsillenzelllysat und dem Antikörper gebildet worden waren, zeigte primäre Reaktion mit den 30 kDa und 33 kDa schweren Polypeptiden (4).

Studien unter Nutzung von COS-1-Zellen, die mit dem das CD20-Molekül kodierenden cDNA transfiziert wurden, deuten darauf hin, dass der Antikörper ein intrazytoplasmatisch lokalisiertes Epitop auf dem CD20-Molekül markiert (5).

Hinweise und Vorsichtsmaßnahmer

- 1. Für geschultes Fachpersonal.
- 2. Dieses Produkt enthält Natrium-Azid (NaN₃), eine in reiner Form hochtoxische chemische Verbindung. Bei den in diesem Produkt verwendeten Konzentrationen kann Natrium-Azid, obwohl nicht als gefährlich klassifiziert, mit in Wasserleitungen vorhandenem Blei oder Kupfer reagieren und zur Bildung von hochexplosiven Metall-Azid-Anreicherungen führen. Nach der Entsorgung muss mit reichlich Wasser nachgespült werden, um Metall-Azid-Anreicherung zu vermeiden.
- 3. Wie bei allen aus biologischen Materialien gewonnenen Produkten müssen die ordnungsgemäßen Handhabungsverfahren eingehalten werden.
- 4. Geeignete Schutzkleidung tragen, um Augen- und Hautkontakt zu vermeiden.
- 5. Nicht verwendete Lösung ist entsprechend örtlichen, bundesstaatlichen und staatlichen Richtlinien zu entsorgen.

Lagerung

Bei 2 – 8 C lagern. Nicht nach dem auf dem Fläschchen a ngegebenen Verfallsdatum verwenden. Sollten die Reagenzien unter anderen Bedingungen als den beschriebenen aufbewahrt worden sein, so müssen diese vom Anwender verifiziert werden. Es gibt keine offensichtlichen Anhaltspunkte für die mögliche Instabilität dieses Produktes. Es sollten daher die Positiv- und Negativkontrollen gleichzeitig mit den Patientenproben mitgeführt werden. Wenn unerwartete Verfärbung beobachtet wird, welche durch Änderungen in den Labormethoden nicht erklärt werden kann und falls Verdacht auf ein Problem mit dem Antikörper besteht, ist bitte Kontakt mit unserem technischen Kundendienst aufzunehmer

Paraffinschnitte: Der Antikörper kann für die Markierung von paraffineingebetteten, in Formalin oder B5 fixierten histologischen Schnitten genutzt werden (6). Es wird eine Vorbehandlung der Gewebe mit hitzeinduzierter Epitopdemaskierung empfohlen. Für fomalinfixierte Gewebeschnitt werden optimale Resultate erzielt mit Dako Target Retrieval Solution, pH 6,1, Code-Nr. S1700, Dako Target Retrieval Solution, pH 9,9, Code-Nr. S3308, 10 mmol/l Citratpuffer, pH 6,0, oder 10 mmol/l Trispuffer, 1 mmol/l EDTA, pH 9,0. Dagegen wurde festgestellt, dass die Gewebevorbereitung mit Proteinase K zur Zerstörung des Epitops führt. Während der Gewebevorbehandlung oder während der sich anschließenden immunhistochemischen Färbeprozedur dürfen die Gewebeschnitte nicht austrocknen.

Gefrierschnitte und zytologische Präparate: Der Antikörper kann für die Markierung von azetonfixierten Gefrierschnitten (1) und azetonfixierten Zellpräparaten verwendet werden (1, 4).

Färbeprozedur

(102294-003)

Verdünnung: Monoclonal Mouse Anti-Human CD20cy, Code-Nr. M0755, kann bei einem Verdünnungsbereich von 1:200-1:400 eingesetzt werden, wenn es für formalinfixierte, paraffineingebettete Schnitte der menschlichen Tonsille genutzt wird und wenn 20 Minuten lang die hitzeinduzierte Epitopdemaskierung mit Dako Target Retrieval Solution, pH 6,1, Code-Nr. S1700, gefolgt von 30 Minuten Inkubation mit dem primären Antikörper bei Raumtemperatur, durchgeführt wird. Die optimalen Bedingungen schwanken je nach Probe und Methode der Probenvorbereitung und sollten von jedem einzelnen Labor bestimmt werden.

Die empfohlene Negativkontrolle ist Dako Mouse IgG2a, Code-Nr. X0943, das auf dieselbe murine IgG-Konzentration wie der primäre Antikörper verdünnt wurde. Solange mit dem eigentlichen Testsystem die Stabilität des verdünnten Antikörpers und der Negativkontrolle nicht sichergestellt ist, wird empfohlen, diese Reagenzien unmittelbar vor Gebrauch zu

M0755/EFG/KRM/2008.09.30 p. 3/4

Dako Denmark A/S | Produktionsvej 42 | DK-2600 Glostrup | Denmark | Tel. +45 44 85 95 00 | Fax +45 44 85 95 95 | CVR No. 33 21 13 17

verdünnen oder die Verdünnung mit Dako Antibody Diluent, Code-Nr. S0809, vorzunehmen. Es sollten die Positiv- und Negativkontrollen gleichzeitig mit den Patientenproben mitgeführt werden

<u>Visualisierung:</u> Folgende Kits werden empfohlen: Dako LSAB™+/HRP-Kit, Code-Nr. K0679 und Dako EnVision™+/HRP-Kits, Code-Nr. K4004 und K4006. Falls bei Gefrierschnitten und Zellpräparaten Probleme mit endogener Peroxidasefärbung auftreten, bietet der Dako APAAP Kit, Code-Nr. K0670, eine gute Alternative. Es ist dem Verfahren zu folgen, das in den Anleitungen des genutzten Kits für die Visualisierung erläutert wird.

Automatisierung: Der Antikörper ist gut für das immunhistochemische Färben unter Nutzung automatisierter Plattformen wie beispielsweise des "Autostainer" von Dako

Produktspezifische Beschränkungen

Es wurden seltene Fälle von CD20-positiven peripheren T-Zell-Lymphomen mitgeteilt (8, 9).

Leistungseigenschaften

Vom Antikörper markierte B-Zellen zeigen Färbung an der zytoplasmatischen Seite der Zelloberflächenmembran.

Normalgewebe: Bei normalen lymphoiden Gewebe markiert der Antikörper Zellen des Keimzentrums, Lymphozyten der Mantelzone sowie interfollikulär verstreute Lymphozyten, nicht aber T-Zellen, Histiozyten und Plasmazellen (6, 8). Es konnte keine Markierung der Epidermis, der Talgdrüsen, Haarfollikeln und ekkrinen Drüsen der Haut, des Schilddrüsenfollikelepithels, der Pneumozyten und des Bronchialepithels der Lungen wie auch einer großen Anzahl anderer untersuchter nicht lymphoider

Anomales Gewebe: Eine positive Reaktion mit dem Antikörper zeigte sich in den meisten 131 getesteten B-Zell-Neoplasien (1). Die Markierung mit dem Antikörper zeigt, dass während der Differenzierung der B-Zellen das CD20-Antigen auf sehr unreifen lymphoiden Zellen nicht exprimiert wird (0/6 akute nicht differenzierte Leukämien), dass seine Expression jedoch in den frühen Reifungsstadien beginnt (14/34 cALL – common acute lymphoblastic leukaemia – und 7/9 akute prä-B-Lymphoblastenleukämien). Später wird das CD20-Antigen voll auf reifen B-Zellen exprimiert (15/15 CLL, 3/3 Polymorphozyten-, 3/3 Haarzellen-, 6/7 Lymphosarkomzell-Leukämien und 45/46 maligne B-Zell-Lymphome, einschließlich Burkitt-, Waldenström- und Immunoblasten-B-Zell-Lymphome). Das CD20-Antigen ist auf Plasmazellen nicht mehr vorhanden und lediglich 1/2 Plasmazell-Leukämien und 0/12 Myelome wurden vom Antikörper markiert (1). Andere Studien lieferten vergleichbare Befunde und erbrachten positive Markierung bei 44/44 Großzellen- und Immunoblasten-B-Zell-Lymphomen (6) sowie bei allen 40 B-Zell-Lymphomen, ausgenommen von cALL (common acute lymphoblastic leukaemias) und plasmazytärem malignem Lymphom (8). Bei 9/27 Fällen des M. Hodgkin wurde eine starke Färbung der Oberflächenmembran der Reed-Sternberg-Zellen beobachtet (8). . Bei lymphoproliferativen Erkrankungen der T-Zelllinie, konnte bei 0/73 eine Markierung mit dem Antikörper festgestellt werden (1), während andere Studien über 1/18 (7) bzw. 1/111 (8) positive Fälle berichteten.

References/ Références/ Literatur

- 1. Takami T, Qi C-F, Yamada T, Yamashina M, Kon S-I, Ishii Y, et al. B20.3. Reactivity and specificity of L26 (pan-B-cell mAb) on 322 cases of fresh and paraffin-embedded lymphoproliferative diseases. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, Rieber EP, Schmidt RE, Stein H, et al., editors. Leukocyte typing IV. White cell differentiation antigens. Proceedings of the 4th International Workshop and Conference; 1989 Feb 21-25; Vienna, Austria. Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press; 1989. p. 134-6.
- 2. Zhou L-J, Tedder TF. CD20 workshop panel report. In: Schlossman SF, Bournsell L, Gilks W, Harlan JM, Kishimoto T, Morimoto C, et al., editors. Leukocyte typing V. White cell differentiation antigens. Proceedings of the 5th International Workshop and Conference; 1993 Nov 3-7; Boston, USA. Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press: 1995, p. 511-4.
- 3. Tedder TF, Engel P. CD20: a regulator of cell-cycle progression of B lymphocytes. Immunology Today 1994;15:450-4.
- Ishii Y, Takami T, Yuasa H, Takei T, Kikuchi K. Two distinct antigen systems in human B lymphocytes: identification of cell surface and intracellular antigens using monoclonal antibodies. Clin Exp Immunol 1984;58:183-92.
- Mason DY, Comans-Bitter WM, Cordell JL, Verhoeven MAJ, van Dongen JJM. Antibody L26 recognizes an intracellular epitope on the B-cell-associated CD20 antigen. Am J Pathol 1990;136:1215-22.
- 6. Cartun RW, Coles FB, Pastuszak WT. Utilization of monoclonal antibody L26 in the identification and confirmation of B-cell lymphomas. A sensitive and specific marker applicable to formalin- and B5-fixed, paraffin-embedded tissues. Am J Pathol 1987;129:415-21.
- 7. de Leon ED, Alkan S, Huang JC, Hsi ED. Usefulness of an immunohistochemical panel in paraffin-embedded tissues for the differentiation of B-cell non-Hodgkin's I ymphomas of small lymphocytes. Mod Pathol 1998;11:1046-51.
- Norton AJ, Isaacson PG. Monoclonal antibody L26: an antibody that is reactive with normal and neoplastic B lymphocytes in routinely fixed and paraffin wax embedded
- Blakolmer K, Vesely M, Kummer JA, Jurecka W, Mannhalter C, Chott A. Immunoreactivity of B-cell markers (CD79a, L26) in rare cases of extranodal cytotoxic peripheral T- (NK/T-) cell lymphomas. Mod Pathol 2000:13:766-72.

Explanation of symbols/ Légende des symboles/ Erläuterung der Symbole

REF	Catalogue number Référence du catalogue Bestellnummer	2°C - 8°C	Temperature limitation Limites de température Zulässiger Temperaturbereich	ਘ	Manufacturer Fabricant Hersteller
IVD	In vitro diagnostic medical device Dispositif médical de diagnostic in vitro In-Vitro-Diagnostikum	LOT	Batch code Code du Lot Chargenbezeichnung		
[]i	Consult instructions for use Consulter les instructions d'utilisation Gebrauchsanweisung beachten		Use by Utiliser jusque Verwendbar bis		

(102294-003) M0755/EFG/KRM/2008.09.30 p. 4/4