

Code M0755

ENGLISH

Intended use	<p>For in vitro diagnostic use.</p> <p>Monoclonal Mouse Anti-Human CD20cy, Clone L26, is intended for use in immunohistochemistry (IHC). The antibody labels cells of the B-cell lineage and is a useful aid for the classification of neoplasms of B-cell derivation (1). Differential classification 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. This antibody is intended to be used after the primary diagnosis has been made by conventional histopathology using nonimmunologic histochemical stains.</p>
Synonyms for antigen	L26 (2).
Summary and explanation	<p>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 leukemias (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).</p> <p>Refer to <i>Dako General Instructions for Immunohistochemical Staining</i> or the detection system instructions of IHC procedures for: Principle of Procedure, Materials Required, Not Supplied, Storage, Specimen Preparation, Staining Procedure, Quality Control, Troubleshooting, Interpretation of Staining, General Limitations.</p>
Reagent provided	<p>Monoclonal mouse antibody provided in liquid form as cell culture supernatant dialysed against 0.05 mol/L Tris-HCl, pH 7.2, and containing 15 mmol/L Na₃N.</p> <p><u>Clone:</u> L26 (1, 4). <u>Isotype:</u> IgG2a, kappa.</p> <p><u>Mouse Ig concentration:</u> see label on vial.</p> <p>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.</p>
Immunogen	Human tonsil B cells (4).
Specificity	<p>The antibody was clustered as anti-CD20 at the Fifth International Workshop and Conference on Human Leucocyte Differentiation Antigens held in Boston 1993 (2).</p> <p>SDS-PAGE analysis of immunoprecipitates formed between ¹²⁵I-labeled tonsil cell lysate and the antibody shows reaction primarily with 30 kDa and 33 kDa polypeptides (4).</p> <p>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).</p>
Precautions	<ol style="list-style-type: none"> 1. For in vitro diagnostic use. 2. For professional users. 3. This product contains sodium azide (Na₃N), 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. 4. As with any product derived from biological sources, proper handling procedures should be used. 5. Wear appropriate Personal Protective Equipment to avoid contact with eyes and skin. 6. 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 Support.
Specimen preparation	<p><u>Paraffin sections:</u> The antibody can be used for labeling paraffin-embedded tissue sections fixed in formalin or B5-fixative (6). Pre-treatment of deparaffinized tissues with heat-induced epitope retrieval is recommended. For tissues fixed in formalin, optimal results are obtained with Dako Target Retrieval Solution, Code S1700, 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.</p> <p><u>Frozen sections and cell preparations:</u> The antibody can be used for labeling acetone-fixed frozen sections (1) and acetone-fixed cell preparations (1, 4). The user must validate the staining procedure.</p>
Staining procedure	<p>These are guidelines only. Optimal conditions may vary depending on specimen type and preparation method, and should be validated individually by each laboratory. The performance of this antibody should be established by the user when utilized with other manual staining systems or automated platforms.</p> <p><u>Dilution:</u> 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, and 30 minutes incubation at room temperature with the primary antibody. 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.</p> <p><u>Visualization:</u> Dako EnVision+HRP kits, e.g. Code K4005, are recommended. Follow the procedure enclosed with the selected visualization kit.</p> <p><u>Quality control:</u> Positive and negative control tissues as well as negative control reagent should be run simultaneously using the same protocol as the patient specimens.</p>
Product-specific limitations	Rare cases of CD20-expressing peripheral T-cell lymphomas have been reported (7, 8).
Staining interpretation	B cells labeled by the antibody display staining of the cytoplasmic side of the cell surface membrane.

Performance characteristics Normal tissues: In normal lymphoid tissue, the antibody labeled germinal centre cells, mantle zone lymphocytes, and scattered interfollicular lymphocytes, but not T cells, histiocytes and plasma cells (6, 8). No labeling 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: Reaction with the antibody was revealed in most of 131 B-cell neoplasms tested (1). Labeling 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 leukemias), but begins to be expressed on early maturational stages (14/34 common acute lymphoblastic and 7/9 pre-B acute lymphoblastic leukemias), 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 leukemias, 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 leukemias and 0/12 myelomas were labeled by the antibody (1). Other studies have provided comparable results showing labeling 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 leukemias and malignant lymphoma plasmacytic. In Hodgkin's disease, strong surface membrane staining of Reed-Sternberg cells was observed in 9/27 cases (7). Of lymphoproliferative diseases of T-cell lineage, 0/73 were labeled by the antibody (1), whereas other studies showed 1/18 (7) and 1/111 (8) labeled cases.

FRANÇAIS

Utilisation prévue	<p>Pour utilisation diagnostique in vitro.</p> <p>L'anticorps Monoclonal Mouse Anti-Human CD20cy, Clone L26, est destiné à être utilisé en immunohistochimie (IHC). Cet anticorps marque les cellules de la lignée des lymphocytes B et facilite la classification des néoplasmes dérivés des lymphocytes B (1). La classification différentielle est facilitée par les résultats provenant 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. Cet anticorps est destiné à être utilisé après un diagnostic primaire par histopathologie traditionnelle utilisant des colorations histochimiques non immunologiques.</p>
Synonymes de l'antigène	L26 (2).
Résumé et explication	<p>La CD20 est une protéine transmembranaire, non glycosylée exprimée sur les précurseurs des lymphocytes B et les lymphocytes B matures, mais qui est perdue après la différenciation en cellules plasmiques (3). Dans les lymphocytes B au repos, la CD20 apparaît sous une forme non phosphorylée de 33 kDa. Après stimulation mitogène, la CD20 devient fortement phosphorylée (isoformes de 35-37 kDa), et est une phosphoprotéine dominante dans les lymphocytes B activés, les lignées de lymphocytes B, et les leucémies à cellules chevelues (2). Les extrémités N-terminale et C-terminale longues de la protéine sont situées sur le côté cytoplasmique de la membrane et seule une partie mineure de la protéine est exposée sur la surface cellulaire (3). Les anticorps réagissant avec les épitopes cytoplasmiques de la CD20 sont désignés CD20cy (2). Il semble que la CD20 joue un rôle direct dans la régulation du flux transmembranaire Ca^{2+} conducteur des lymphocytes B, ce qui indiquerait que la CD20 agirait comme régulateur de prolifération et de différenciation (3).</p> <p>Consulter le document <i>General Instructions for Immunohistochemical Staining</i> (Instructions générales de coloration immunohistochimique) de Dako ou les instructions du système de détection pour les procédures IHC : Principe de la procédure, Matériel requis mais non fourni, Conservation, Préparation des échantillons, Procédure de coloration, Contrôle de qualité, Dépannage, Interprétation de la coloration, Limites générales.</p>
Réactif fourni	<p>Anticorps monoclonal de souris, fourni sous forme liquide en tant que surnageant de culture cellulaire, dialysé contre 0,05 mol/L de Tris-HCl à pH 7,2 et contenant 15 mmol/L d'azide de sodium (NaN_3).</p> <p><u>Clone</u> : L26 (1, 4). <u>Isotype</u> : IgG2a, kappa.</p> <p><u>Concentration en IgG de souris</u> : Voir l'étiquette sur le flacon.</p> <p>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.</p>
Immunogène	Lymphocytes B d'amygdale humaine (4).
Spécificité	<p>L'anticorps a été classifié comme un anti-CD20 aux Fifth International Workshop and Conference on Human Leucocyte Differentiation Antigens (2) (Cinquième Conférence et Atelier International sur les antigènes de différenciation des leucocytes humains) qui se sont tenus à Boston (États-Unis) en 1993.</p> <p>L'analyse par immunoblot PAGE en présence de SDS d'immunoprécipités formés entre le lysat cellulaire d'amygdale marqué à l'iode ^{125}I et l'anticorps indique une réaction aux polypeptides de 30 kDa et 33 kDa principalement (4).</p> <p>Les études utilisant des cellules COS-1 transfectées par l'ADNc et codant pour la molécule CD20, indiquent que l'anticorps marque un épitope intracytoplasmique localisé sur la molécule CD20 (5).</p>
Précautions d'emploi	<ol style="list-style-type: none">1. Pour utilisation diagnostique in vitro.2. Pour utilisateurs professionnels.3. Ce produit contient de l'azide de sodium (NaN_3), un produit chimique hautement toxique à l'état pur. Aux concentrations du produit, bien que non classé comme dangereux, l'azide de sodium peut réagir avec le cuivre et le plomb des canalisations et former des accumulations d'azides métalliques hautement explosives. Lors de l'élimination, rincer abondamment à l'eau pour éviter toute accumulation d'azide métallique dans les canalisations.4. Comme avec tout produit d'origine biologique, des procédures de manipulation appropriées doivent être respectées.5. Porter un équipement de protection individuelle approprié pour éviter tout contact avec les yeux et la peau.6. Les solutions non utilisées doivent être éliminées conformément aux réglementations locales, nationales et européennes.
Conservation	Conservé entre 2 et 8 °C. Ne pas utiliser après la date de péremption imprimée sur le flacon. Si les réactifs sont conservés dans des conditions autres que celles indiquées, celles-ci doivent être validées par l'utilisateur. Il n'existe pas de signe particulier pour indiquer l'instabilité de ce produit. Par conséquent, des contrôles positifs et négatifs doivent être testés en même temps que les échantillons de patient. Si une coloration inattendue est observée, qui ne peut être expliquée par des différences dans les procédures du laboratoire et qu'un problème lié à l'anticorps est suspecté, contacter l'assistance technique de Dako.
Préparation des échantillons	<p><u>Coupes en paraffine</u> : L'anticorps peut être utilisé pour le marquage des coupes de tissus incluses en paraffine et fixées au formol ou au fixateur B5 (6). Le prétraitement des tissus déparaffinés avec une restauration d'épitope induite par la chaleur est recommandé. Pour les tissus fixés au formol, des résultats optimaux sont obtenus avec le produit Dako Target Retrieval Solution, réf. S1700, dans un tampon citrate à 10 mmol/L à pH 6,0 ou dans un tampon Tris à 10 mmol/L, EDTA à 1 mmol/L, à pH 9,0. Le prétraitement des tissus par la protéinase K s'est révélé détruire l'épitope. Les coupes de tissus ne doivent pas sécher lors du traitement ni lors de la procédure de coloration immunohistochimique suivante.</p> <p><u>Coupes congelées et préparations cellulaires</u> : L'anticorps peut être utilisé pour marquer des coupes congelées, fixées à l'acétone (1) et des préparations cellulaires fixées à l'acétone (1, 4). L'utilisateur doit valider la procédure de coloration.</p>
Procédure de coloration	<p>Il ne s'agit là que de conseils. Les conditions optimales peuvent varier en fonction du type de prélèvement et de la méthode de préparation, et doivent être validées individuellement par chaque laboratoire. Les performances de cet anticorps doivent être établies par l'utilisateur lorsqu'il est utilisé avec d'autres systèmes de coloration manuelle ou plates-formes automatisées.</p> <p><u>Dilution</u> : Le Monoclonal Mouse Anti-Human CD20cy, réf. M0755, peut être utilisé à une gamme de dilution de 1:200 à 1:400 lorsqu'il est appliqué sur des coupes d'amygdale humaine fixées au formol et incluses en paraffine, en utilisant une restauration d'épitope induite par la chaleur de 20 minutes dans le produit Dako Target Retrieval solution, réf. S1700, et une incubation de 30 minutes avec l'anticorps primaire à température ambiante. Le contrôle négatif recommandé est le produit Dako Mouse IgG2a, réf. X0943, dilué à la même concentration en IgG de souris que l'anticorps primaire. À moins que la stabilité de l'anticorps dilué et du contrôle négatif n'ait été établie dans la procédure de coloration en cours, il est recommandé de diluer ces réactifs immédiatement avant utilisation ou de les diluer avec le produit Dako Antibody Diluent, réf. S0809.</p>

Visualisation: Il est recommandé d'utiliser les kits Dako EnVision+HRP, réf. K4005. Suivre la procédure incluse dans le kit de visualisation sélectionnée.

Contrôle de qualité: Les tissus de contrôle positifs et négatifs, ainsi que le réactif de contrôle négatif, doivent être testés en parallèle selon le même protocole que pour les échantillons de patients.

Limitations spécifiques du produit De rares cas de lymphomes périphériques à lymphocytes T exprimant la CD20 ont été signalés (7, 8).

Interprétation de la coloration Les lymphocytes B marqués par l'anticorps montrent une coloration du côté cytoplasmique de la membrane de la surface cellulaire.

Performances **Tissus sains:** Dans le tissu lymphoïde sain, l'anticorps marque les cellules des centres germinatifs, les lymphocytes de la zone manteau, et les lymphocytes interfolliculaires disséminés, mais pas les lymphocytes T, les histiocytes et les cellules plasmiques (6, 8). Aucun marquage n'est observé dans l'épiderme, les glandes sébacées, les follicules pileux et les glandes eccrines de la peau, l'épithélium folliculaire de la thyroïde, les pneumocytes et l'épithélium bronchique du poumon, ainsi qu'un grand nombre d'autres tissus non lymphoïdes sains testés (6).

Tissus anormaux: Une réaction à l'anticorps a été révélée dans la plupart des 131 néoplasmes à lymphocytes B testés (1). Le marquage avec l'anticorps montre que, dans la différenciation des lymphocytes B, l'antigène CD20 n'est pas exprimé sur les cellules lymphoïdes très immatures (0/6 leucémies aiguës non différenciées), mais commence à être exprimé aux stades précoces de maturation (14/34 leucémies lymphoblastiques aiguës courante et 7/9 leucémies lymphoblastiques aiguës à pré-lymphocytes B), puis, l'antigène CD20 est entièrement exprimé sur les lymphocytes B matures (15/15 leucémies lymphocytaires chroniques, 3/3 leucémies prolymphocytaires, 3/3 leucémies à cellules chevelues, 6/7 lymphosarcomes, et 45/46 lymphomes malins à lymphocytes B y compris les lymphomes de Burkitt, de Waldenström et les lymphomes immunoblastiques à lymphocytes B. L'antigène CD20 disparaît des cellules plasmiques et seulement 1 cas de leucémie à cellules plasmiques sur 2 et 0 cas de myélome sur 12 ont été marqués par l'anticorps (1). D'autres études ont fourni des résultats comparables indiquant un marquage de 44/44 lymphomes immunoblastiques à lymphocytes B et de lymphomes à grandes cellules (6), et 40/40 lymphomes à lymphocytes B, à l'exception des leucémies lymphoblastiques aiguës courantes et des lymphomes malins plasmocytaires. Dans la maladie de Hodgkin, une forte coloration de la surface membranaire des cellules de Reed-Sternberg a été observée dans 9 cas sur 27 (7). Parmi les maladies lymphoprolifératives appartenant à la lignée des lymphocytes T, 0 cas sur 73 ont été marqués par l'anticorps (1), alors que d'autres études ont montré 1 cas positif sur 18 (7) et 1 cas positif sur 111 (8).

DEUTSCH

Verwendungszweck	Zur In-vitro-Diagnostik. Monoclonal Mouse Anti-Human CD20cy, Clone L26, ist zur Verwendung in der Immunhistochemie (IHC) bestimmt. Dieser Antikörper markiert Zellen der B-Zelllinie und ist hilfreich bei der Klassifikation von Neoplasmen mit B-Zell-Abstammung (1). Die Differenzialklassifikation wird durch die Ergebnisse eines Antikörper-Panels unterstützt. Die klinische Auswertung einer eintretenden oder ausbleibenden 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. Dieser Antikörper kommt nach der Primärdiagnose durch konventionelle Histopathologie unter Verwendung von nicht immunologischen histochemischen Färbungen zum Einsatz.
Synonyme Bezeichnungen des Antigens	L26 (2).
Zusammenfassung und Erklärung	CD20 ist ein nichtglykosyliertes Transmembranprotein, das in B-Zell-Vorläufern und reifen B-Zellen exprimiert wird, jedoch nach der Differenzierung zu Plasmazellen verloren geht (3). In ruhenden B-Zellen erscheint CD20 in einer nicht phosphorylierten Form mit der molekularen Masse 33 kDa. Nach mitogener Stimulation wird CD20 stark phosphoryliert (35-37 kDa schwere Isoformen) und ist bei aktivierten B-Zellen, B-Zelllinien und Haarzellenleukämien ein dominantes Phosphoprotein (2). Die langen N- und C-terminalen Enden des Proteins befinden sich auf der zytoplasmatischen Seite der Membran, und nur ein kleiner Teil des Proteins liegt auf der Zelloberfläche (3). Mit den zytoplasmatischen CD20-Epitopen reagierende Antikörper werden als CD20cy bezeichnet (2). Es wird nahegelegt, dass CD20 eine direkte Rolle bei der Regulierung des transmembranen konduktiven Ca^{2+} -Flusses der B-Zellen spielt, was auf eine mögliche Funktion von CD20 als Regulator der Proliferation und Differenzierung verweist (3). Folgende Angaben bitte den <i>General Instructions for Immunohistochemical Staining</i> (Allgemeine Richtlinien zur immunhistochemischen Färbung) von <i>Dako</i> bzw. den Anweisungen des Detektionssystems für IHC-Verfahren entnehmen: Verfahrensprinzipien; Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien; Lagerung; Gewebepreparation; Färbeverfahren; Qualitätskontrolle; Fehlerbehandlung; Auswertung der Färbung; Allgemeine Beschränkungen.
Geliefertes Reagenz	Monoklonale Mausantikörper in flüssiger Form als gegen 0.05 mol/L Tris-HCl, pH 7.2 und 15 mmol/L $NaNO_3$ dialysierter Zellkulturüberstand. Klon: L26 (1, 4). Isotyp: IgG2a, Kappa. Konzentration von Maus-Ig: Siehe Behälteretikett. Die Proteinkonzentration kann zwischen Chargen abweichen, ohne die optimale Verdünnung zu beeinflussen. Der Titer jeder Charge wird mit dem einer Referenzcharge verglichen und dieser angeglichen, um konstante immunhistochemische Färberegebnisse zwischen den Chargen zu gewährleisten.
Immunogen	B-Zellen von menschlichem Mandelgewebe (4).
Spezifität	Der Antikörper wurde beim Fifth International Workshop and Conference on Human Leucocyte Differentiation Antigens (5. Internationaler Workshop und Konferenz über menschliche Leukozyten-Differenzierungsantigene), der 1993 in Boston stattfand, als Anti-CD20 geclustert (2). Die SDS-PAGE-Analyse der Immunpräzipitate, die zwischen ^{125}I -markiertem Mandelzelllysate und dem Antikörper gebildet werden, zeigt eine primäre Reaktion mit den 30 kDa und 33 kDa schweren Polypeptiden (4). Studien unter Verwendung von COS-1-Zellen, die mit dem CD20-Molekül kodierender cDNA transfiziert wurden, deuten darauf hin, dass der Antikörper ein intrazytoplasmatisch lokalisiertes Epitop auf dem CD20-Molekül markiert (5).
Vorsichtsmaßnahmen	1. Zur In-vitro-Diagnostik. 2. Für Fachpersonal. 3. Dieses Produkt enthält Natriumazid ($NaNO_2$), eine in reiner Form äußerst giftige Chemikalie. Bei den in diesem Produkt verwendeten Konzentrationen kann Natriumazid, obwohl nicht als gefährlich klassifiziert, mit in Wasserleitungen vorhandenem Blei oder Kupfer reagieren und zur Bildung von hochexplosiven Metallazid-Anreicherungen führen. Nach der Entsorgung muss mit reichlich Wasser nachgespült werden, um Metall-Azid-Anreicherung zu vermeiden. 4. Wie alle Produkte biologischen Ursprungs müssen auch diese entsprechend gehandhabt werden. 5. Geeignete persönliche Schutzausrüstung (PSA) tragen, um Augen- und Hautkontakt zu vermeiden. 6. Nicht verwendete Lösung ist entsprechend örtlichen, staatlichen und EU-rechtlichen Richtlinien zu entsorgen.
Lagerung	Bei 2-8 °C lagern. Nach Ablauf des auf dem Behälter aufgedruckten Verfallsdatums nicht mehr verwenden. Werden die Reagenzien unter anderen als den angegebenen Bedingungen aufbewahrt, müssen diese Bedingungen vom Benutzer überprüft werden. Es gibt keine offensichtlichen Anhaltspunkte für die mögliche Instabilität dieses Produkts. Es sollten daher die Positiv- und Negativkontrollen gleichzeitig mit den Patientengewebeproben mitgeführt werden. Wenn eine unerwartete Anfärbung beobachtet wird, welche durch Änderungen in den Labormethoden nicht erklärt werden kann, und falls Verdacht auf ein Problem mit dem Antikörper besteht, ist Kontakt mit dem technischen Kundendienst von Dako aufzunehmen.
Gewebepreparation	Paraffinschnitte: Der Antikörper kann zur Markierung von paraffineingebetteten, in Formalin oder B5 fixierten Gewebeschnitten verwendet werden (6). Die Vorbehandlung des entparaffinierten Gewebes durch hitzeinduzierte Epitopdemaskierung wird empfohlen. Bei formalinfixierten Geweben werden optimale Resultate mit Dako Target Retrieval Solution, Code-Nr. S1700, 10 mmol/L Citratpuffer, pH 6.0, oder 10 mmol/L Tris-Puffer, 1 mmol/L EDTA, pH 9.0, erzielt. Durch die Vorbehandlung des Gewebes durch Proteinase K wurde das Epitop zerstört. Während

der Gewebepreparierung oder während des anschließenden immunhistochemischen Färbeverfahrens dürfen die Gewebeschnitte nicht austrocknen.

Gefrierschnitte und Zellpräparate: Der Antikörper eignet sich zur Markierung von azetonfixierten Gefrierschnitten (1) und azetonfixierten Zellpräparaten (1, 4). Das Färbeverfahren muss vom Anwender validiert werden.

Färbeverfahren

Diese Angaben sind nur Richtlinien. Optimale Bedingungen können je nach Gewebetyp und Vorbereitungsverfahren unterschiedlich sein und sollten vom jeweiligen Labor selbst ermittelt werden. Die Leistung dieses Antikörpers sollte vom Benutzer bei einem Einsatz mit anderen manuellen Färbesystemen oder automatisierten Systemen ermittelt werden.

Verdünnung: Monoclonal Mouse Anti-Human CD20cy, Code-Nr. M0755, kann auf formalinfixierten, paraffineingebetteten Schnitten von menschlichem Mandelgewebe bei einer hitzeinduzierten Epitopdemaskierung von 20 Minuten in Dako Target Retrieval Solution, Code-Nr. S1700, und einer 30-minütigen Inkubation mit dem primären Antikörper bei Raumtemperatur in einem Verdünnungsbereich zwischen 1:200 und 1:400 verwendet werden. Als Negativkontrolle wird Dako Mouse IgG2a, Code-Nr. X0943 empfohlen, das auf dieselbe Konzentration von Maus-IgG wie der primäre Antikörper verdünnt wurde. Falls die Stabilität des verdünnten Antikörpers und der Negativkontrolle für das verwendete Färbeverfahren nicht erwiesen ist, wird empfohlen, diese Reagenzien unmittelbar vor der Verwendung bzw. in Dako Antibody Diluent, Code-Nr. S0809, zu verdünnen.

Detektionssystem: Dako EnVision+HRP Kits (z. B. Code-Nr. K4005) werden empfohlen. Das für das ausgewählte Detektionssystem beschriebene Verfahren befolgen.

Qualitätskontrolle: Positiv- und Negativkontrollgewebe sowie Negativkontrollreagenz sollten zur gleichen Zeit und mit demselben Protokoll wie die Patientengewebe getestet werden.

Produktspezifische Beschränkungen

Es wurde über seltene Fälle von CD20-exprimierenden peripheren T-Zell-Lymphomen berichtet (7, 8).

Auswertung der Färbung

Vom Antikörper markierte B-Zellen weisen eine Färbung an der zytoplasmatischen Seite der Zelloberflächenmembran auf.

Leistungseigenschaften









Normalgewebe: Bei normalem lymphoidem Gewebe markiert der Antikörper Zellen des Keimzentrums, Lymphozyten der Mantelzone sowie interfollikuläre Lymphozyten, jedoch nicht T-Zellen, Histiocyten und Plasmazellen (6, 8). Es wurde keine Markierung der Epidermis, der Talgdrüsen, Haarfollikel und ekkrinen Drüsen der Haut, des Schilddrüsenfollikel epithels, der Pneumozyten und des Bronchialepithels der Lunge wie auch einer großen Anzahl anderer untersuchter nicht-lymphoider Gewebe festgestellt (6).

Anormales Gewebe: Eine Reaktion mit dem Antikörper zeigte sich in den meisten der 131 getesteten B-Zell-Neoplasmen (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 akuten nicht differenzierten Leukämien), dass seine Expression jedoch in den frühen Reifungsstadien beginnt (14/34 akuten lymphoblastischen und 7/9 akuten Prä-B-Lymphoblastenleukämien). Später wird das CD20-Antigen auf reifen B-Zellen exprimiert (15/15 chronischen lymphozytischen, 3/3 prolymphozytischen, 3/3 Haarzell-, 6/7 Lymphosarkomzell-Leukämien und 45/46 malignen B-Zelllymphomen, einschließlich Burkitt-, Waldenström- und Immunoblasten-B-Zelllymphome). Das CD20-Antigen ist auf Plasmazellen nicht mehr vorhanden und lediglich 1/2 Plasmazell-Leukämien und 0/12 Myelomen wurden vom Antikörper markiert (1). Andere Studien lieferten vergleichbare Befunde und erbrachten eine Markierung bei 44/44 Großzellen- und Immunoblasten-B-Zell-Lymphomen (6) sowie bei allen 40 B-Zell-Lymphomen, außer bei akuten lymphoblastischen Leukämien und plasmazytärem, malignem Lymphom. Bei 9/27 Fällen von Morbus Hodgkin wurde eine starke Färbung der Oberflächenmembran der Reed-Sternberg-Zellen beobachtet (7). Bei lymphoproliferativen Erkrankungen der T-Zelllinie konnte bei 0/73 Fällen eine Markierung mit dem Antikörper festgestellt werden (1), während andere Studien über 1/18 (7) bzw. 1/111 (8) markierten Fällen berichteten.

References / Bibliographie / Literaturnachweise

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, Boumsell 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.
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.
5. 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. 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 tissue. J Clin Pathol 1987;40:1405-12.
8. 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 / Explication des symboles / Erläuterung der Symbole

 REF	Catalogue number Référence du catalogue Katalognummer	 2°C - 8°C	Temperature limitation Limites de température Zulässiger Temperaturbereich		Use by Utiliser avant Verwendbar bis
 IVD	In vitro diagnostic medical device Dispositif médical de diagnostic in vitro In-vitro-Diagnostikum	 LOT	Batch code Réf. du lot Chargenbezeichnung		Manufacturer Fabricant Hersteller
 i	Consult instructions for use Consulter les instructions d'utilisation Gebrauchsanweisung beachten	 EC REP	Authorized representative in the European Community Représentant agréé dans la Communauté européenne Autorisierte Vertretung in der Europäischen Gemeinschaft		



Agilent Technologies Singapore (International) Pte Ltd.
No. 1 Yishun Avenue 7
Singapore, 768923
Tel. +44 161 492 7050
www.agilent.com