

FLEX
Monoclonal Mouse
Anti-Human
BCL6 Protein
 Clone PG-B6p
Ready-to-Use
 (Dako Omnis)

Code GA625

ENGLISH

Intended use

For in vitro diagnostic use.

FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human BCL6 Protein, Clone PG-B6p, Ready-to-Use (Dako Omnis), is intended for use in immunohistochemistry (IHC) together with the Dako Omnis instrument. Results aid in the classification of diffuse large B-cell lymphoma, follicular lymphoma and Burkitt's lymphoma (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 of tumor has been made by conventional histopathology using nonimmunologic histochemical stains.

Summary and explanation

The proto-oncogene *BCL6* encodes a 92-98 kDa POZ/zinc finger protein. Through its six C-terminal zinc-finger motifs, the BCL6 protein binds to specific DNA sequences of target genes, where it acts as a transcriptional repressor (2, 3).

BCL6 expression may be ubiquitous, as low levels are detected in many tissues. However, high levels of *BCL6* expression are limited to cells of the B-lymphoid lineage and skeletal muscle. In the B-lymphoid cell lineage, *BCL6* expression seems to be tightly regulated during differentiation, and strong expression is observed preferentially in germinal centre (GC) B cells, but not in plasma cells, and precursor, mantle zone, and memory B cells. Neoplastic counterparts of GC B cells, including diffuse large B-cell lymphomas, follicular and Burkitt's lymphomas, may also display high levels of *BCL6* expression (3).

BCL6 may be implicated in chromosomal translocations where the regulatory region of the *BCL6* gene is replaced by a heterologous reciprocal partner such as the immunoglobulin genes. Promotor substitution leads to deregulation of the *BCL6* expression, which may be associated with lymphomagenesis (3). *BCL6* rearrangement is one of the most common genetic abnormalities in B-cell non-Hodgkin's lymphoma, with an especially high frequency in diffuse large cell lymphoma (2).

Refer to Dako *General Instructions for Immunohistochemical Staining* 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.

Reagent provided

Ready-to-use monoclonal mouse antibody provided in liquid form in a buffer containing stabilizing protein and 0.015 mol/L sodium azide.

Clone: PG-B6p (1). Isotype: IgG1, kappa.

Immunogen

Recombinant glutathione S-transferase (GST)-BCL6 protein corresponding to amino acids 3-484 of the human BCL6 protein (1).

Specificity

In Western blotting of total lysates of Bjab cells and BCL6 transfected EB3 cells, or control transfected EB3 cells, the antibody did not label any bands, suggesting lack of reactivity with denatured BCL6 protein (1).

Western blotting of immunoprecipitates formed between total lysates of Bjab cells (BCL6+) and BCL6-transfected EB3 cells and the antibody, shows a ~95 kDa band corresponding to BCL6 (1).

Precautions

1. For in vitro diagnostic use.
2. For professional users.
3. 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.
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. During storage the cap should be closed. Do not use after expiration date stamped on vial. Onboard stability is 375 hours. Onboard time is tracked by the Dako Omnis software. 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.

Staining procedure overview*

Step		Comments
Fixation/embedding	Formalin-fixed, paraffin-embedded	Onboard deparaffinization
Pre-treatment	EnVision FLEX, High pH (Code V804)	30 in HIER
Antibody	Ready-to-use	12.5 min incubation
Negative Control	FLEX Negative Control, Mouse (Code GA750)	12.5 min incubation
Visualization	EnVision FLEX (Code V800) + EnVision FLEX+ Mouse LINKER (Code V821)	Block: 3 min; Link: 10 min; Polymer: 20 min; Chromogen: 5 min
Counterstain	Hematoxylin (Code C808)	3 min incubation
Control Tissue	Tonsil	Nuclear staining
Slides	FLEX IHC Microscope Slides (Code 8020)	Recommended for greater adherence of tissue sections to glass slides
Mounting	Non-aqueous, permanent mounting required	After staining, the sections must be dehydrated, cleared and mounted using permanent mounting medium
Instrumentation	Dako Omnis	Reagents are provided in instrument-specific vials

*The user must always read the package insert for detailed instructions of the staining procedure and handling of the product.

Specimen preparation

Paraffin sections: The antibody can be used for labeling formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. Tissue specimens should be cut into sections of 4 µm.

Pre-treatment: Pre-treatment of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections with heat-induced epitope retrieval (HIER) is required. Pretreating tissues with HIER using diluted EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Dako Omnis), Code GV804, is recommended. Deparaffinization, rehydration and target retrieval are performed onboard Dako Omnis. Please refer to Dako Omnis Basic User Guide.

Dako Omnis ensures that the tissue sections do not dry out during the pre-treatment process or during the following immunohistochemical staining procedure. For greater adherence of tissue sections to glass slides, the use of FLEX IHC Microscope Slides, Code K8020 is recommended.

Staining procedure

Program: The staining steps and incubation times are pre-programmed into the Dako Omnis software. Please refer to the Dako Omnis Basic User Guide for detailed instructions on loading slides and reagents. If the protocols are not available in the Dako Omnis system, please contact Dako Technical Support. All incubation steps are performed at 32 °C onboard Dako Omnis.

Visualization: The recommended visualization system is EnVision FLEX, High pH (Dako Omnis), Code GV800 in combination with EnVision FLEX+ Mouse LINKER (Dako Omnis), Code GV821. The visualization is performed onboard Dako Omnis.

Counterstaining: The recommended counterstain is Hematoxylin (Dako Omnis), Code GC808. The counterstaining is performed onboard Dako Omnis.

Mounting: After staining onboard Dako Omnis the sections must be dehydrated, cleared and mounted using a permanent mounting medium.

Quality control: Positive and negative control tissues as well as negative control reagent should be run simultaneously using the same protocol as the patient specimens. The positive control tissue should include tonsil and the cells/structures should display reaction patterns as described for this tissue in the "Performance characteristics" section. The recommended negative control reagent is FLEX Universal Negative Control, Mouse (Dako Omnis), Code GA750.

Staining interpretation

Cells labeled by the antibody show a diffuse/microgranular staining confined to the nucleus. Cytoplasmic staining may be observed in neoplastic cells in mitosis (1).

Performance characteristics

Normal tissues: In tonsil, the antibody strongly labels the nuclei of centroblasts in the dark zone and centrocytes in the basal and apical light zones of germinal centres. In addition the antibody labels approximately 10% of germinal centre T cells. No labeling was observed in plasma cells, macrophages, follicular dendritic cells, and IgD+/IgM+ follicular mantle lymphocytes. In spleen, the staining pattern was similar to that of tonsil, but in addition the antibody labeled a few scattered lymphoid-like cells of undefined phenotype. In extra-lymphoid tissues, the antibody faintly labeled squamous epithelia in the tonsil, thymus, and skin. No labeling was observed in liver, thyroid, striated muscle, or kidney (1). In tonsil, germinal center B cells show a moderate to strong staining reaction, whereas squamous epithelial cells show a weak to moderate staining reaction.

Abnormal tissues: 173 cases of human lymphoid neoplasms were tested with the antibody. Of B-cell lymphomas or leukemias, 24/24 follicle centre lymphomas, 29/30 diffuse large cell lymphomas, and 13/13 Burkitt's lymphomas, were labeled. No labeling was observed in 7/7 pre-B acute lymphoblastic leukemias, 16/16 small lymphocytic/B-CLL, 6/6 hairy cell leukemias, 22/22 mantle cell leukemias, and 14/14 marginal zone lymphomas. Of T-cell lymphomas or leukemias, 4/8 anaplastic large cell lymphomas were labeled, whereas no labeling was observed in 10/10 acute lymphoblastic lymphomas, 3/3 mycosis fungoides, 6/6 peripheral T-cell lymphomas, and 2/2 peripheral T-cell (AILD-like) lymphomas. In Hodgkin's disease, 5/5 nodular, lymphocyte predominance, 1/4 nodular sclerosis, and 1/3 mixed cellularity types were labeled (1).

In systemic AIDS-related non-Hodgkin's lymphoma, the antibody labeled 11/11 small noncleaved cell lymphomas, 7/7 large noncleaved cell lymphomas (LNCCCL), and 2/9 large cell immunoblastic lymphoma plasmacytoid (IBLP). In AIDS-related primary central nervous system lymphomas, the antibody labeled 4/4 LNCCCL and none of 4 cases of IBLP. No labeling was observed in 5 cases of primary effusion lymphoma (PEL) and in 6 AIDS-PEL cell lines (4).

FRANÇAIS

Utilisation prévue

Pour utilisation diagnostique in vitro.

L'anticorps FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human BCL6 Protein, Clone PG-B6p, Ready-to-Use (Dako Omnis) est destiné à une utilisation en immunohistochimie (IHC) avec l'instrument Dako Omnis. Les résultats obtenus facilitent la classification du lymphome à grands lymphocytes B diffus, du lymphome folliculaire et du lymphome de Burkitt (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 de tumeur par histopathologie traditionnelle utilisant des colorations histo-chimiques non immunologiques.

Résumé et explication

Le proto-oncogène *BCL6* code pour une protéine POZ/doigt de zinc de 92-98 kDa. Par l'intermédiaire de six motifs doigt de zinc C-terminaux, la protéine BCL6 se lie à des séquences spécifiques de l'ADN des gènes cibles, où elle agit comme un répresseur de transcription (2, 3).

L'expression de la *BCL6* peut être générale, étant donné que des niveaux faibles sont détectés dans de nombreux tissus. Cependant, les taux d'expression élevés de *BCL6* se limitent aux cellules de la lignée lymphoïde de type B et aux cellules de muscle squelettique. Dans la lignée lymphoïde de type B, l'expression de la *BCL6* semble être fermement régulée au cours de la différenciation, et une forte expression est observée de préférence dans les lymphocytes B du centre germinatif (CG), mais pas dans les cellules plasmiques ni dans les lymphocytes B précurseurs, de la zone du manteau et à mémoire. Les équivalents néoplasiques des lymphocytes B du CG, y compris les lymphomes diffus à grands lymphocytes B, les lymphomes folliculaires et de Burkitt, peuvent également présenter des taux d'expression élevés de la *BCL6* (3).

La *BCL6* pourrait être impliquée dans les translocations chromosomiques où la région du gène *BCL6* est remplacée par un partenaire réciproque hétérologue comme les gènes d'immunoglobuline. La substitution du promoteur entraîne une dérégulation de l'expression de la *BCL6*, ce qui peut être associé à la lymphomagenèse (3). La réorganisation de la *BCL6* est l'une des anomalies génétiques les plus courantes dans le lymphome non hodgkinien à lymphocytes B, avec une fréquence particulièrement élevée dans les cas de lymphomes diffus à grandes cellules (2).

Consulter le document *General Instructions for Immunohistochemical Staining* (Instructions générales de coloration immunohisto-chimique) de Dako ou les instructions du kit 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.

Réactif fourni

Anticorps monoclonal de souris prêt à l'emploi fourni sous forme liquide dans un tampon contenant une protéine stabilisante et 0,015 mol/L d'azide de sodium.

Clone : PG-B6p (1). **Isotype :** IgG1, kappa.

Immunogène

Protéine BCL6 recombinante glutathione-S-transférase (GST) correspondant aux acides aminés 3-484 de la protéine BCL6 humaine (1).

Spécificité

Dans les analyses par Western blot des lysats totaux de cellules Bjab et de cellules EB3 transfectées par la BCL6, ou de cellules EB3 de contrôle transfectées, l'anticorps n'a marqué aucune bande, se qui laisse penser à un manque de réactivité à une protéine BCL6 dénaturée (1).

Les analyses par Western blot d'immunoprécipités formés entre les lysats totaux de cellules Bjab (BCL6+) et les cellules EB3 transfectées par la BCL6 et l'anticorps a révélé une bande d'environ 95 kDa correspondant à la BCL6 (1).

Précautions d'emploi

1. Pour utilisation diagnostique in vitro.
2. Pour utilisateurs professionnels.
3. Ce produit contient de l'azide de sodium (NaN₃), produit chimique hautement toxique dans sa forme pure. 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, respecter les procédures de manipulation appropriées.
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. Pendant la conservation, le bouchon doit être fermé. Ne pas utiliser après la date de péremption imprimée sur le flacon. La stabilité sur l'appareil est de 375 heures. La stabilité sur l'appareil est suivie par le logiciel Dako Omnis. 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.

Vue d'ensemble de la procédure de coloration*

Étape		Commentaires
Fixation/inclusion	Fixation au formol, inclusion en paraffine	Déparaffinage intégré
Prétraitement	EnVision FLEX, High pH (réf. V804)	HIER de 30 minutes
Anticorps	Prêt à l'emploi	Incubation de 12,5 minutes
Contrôle négatif	FLEX Negative Control, Mouse (réf. GA750)	Incubation de 12,5 minutes
Visualisation	EnVision FLEX (réf. V800) + EnVision FLEX+ Mouse LINKER (réf. V821)	Bloc : 3 min ; Link : 10 min ; Polymère : 20 min ; Chromogène : 5 min
Contre-coloration	Hematoxylin (réf. C808)	Incubation de 3 min
Tissu de contrôle	Amygdale	Coloration nucléaire
Lames	FLEX IHC Microscope Slides (réf. 8020)	Recommandées pour une meilleure adhérence des coupes de tissus aux lames de verre.
Montage	Milieu de montage permanent non aqueux requis	Une fois la procédure de coloration terminée, les coupes doivent être déshydratées, éclaircies et montées à l'aide d'un milieu de montage permanent
Appareillage	Dako Omnis	Les réactifs sont fournis dans des flacons propres à l'appareil

*L'utilisateur doit toujours lire la notice pour obtenir des instructions détaillées sur la procédure de coloration et sur la manipulation du produit.

P02230EFG_02_GA625/2017.02 p. 2/4

Préparation des échantillons	<p>Coupes en paraffine : L'anticorps peut être utilisé pour le marquage des coupes de tissus incluses en paraffine et fixées au formol. L'épaisseur des coupes d'échantillons tissulaires doit être de 4 µm.</p> <p>Prétraitement : Le prétraitement des coupes de tissus fixés au formol et inclus en paraffine par restauration d'épitope induit par la chaleur (HIER) est nécessaire. Il est recommandé de prétraiter les tissus par la méthode HIER à l'aide de la solution diluée EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Dako Omnis), réf. GV804. Le déparaffinage, la réhydratation et la restauration des cibles sont effectués sur l'appareil Dako Omnis. Se reporter au Guide d'utilisation de base du Dako Omnis.</p> <p>Le Dako Omnis s'assure que les coupes de tissus ne sèchent pas lors du prétraitement ni lors de la procédure de coloration immunohistochimique suivante. Pour une meilleure adhérence des coupes tissulaires sur les lames de verre, il est recommandé d'utiliser les lames FLEX IHC Microscope Slides (réf. K8020).</p>
Procédure de coloration	<p>Programme : Les étapes de coloration et les temps d'incubation sont préprogrammés dans le logiciel Dako Omnis. Se reporter au Guide d'utilisation de base du Dako Omnis pour plus de détails sur le chargement des lames et des réactifs. Si les protocoles ne sont pas disponibles sur le système Dako Omnis, contacter l'assistance technique Dako. Toutes les étapes d'incubation sont effectuées à 32 °C sur l'appareil Dako Omnis.</p> <p>Visualisation : Le système de visualisation recommandé est le système EnVision FLEX, High pH (Dako Omnis), réf. GV800, associé au système EnVision FLEX+ Mouse LINKER (Dako Omnis), réf. GV821. La visualisation est effectuée sur l'appareil Dako Omnis.</p> <p>Contre-coloration : Le contre-colorant recommandé est le produit Hematoxylin (Dako Omnis), réf. GC808. La contre-coloration est effectuée sur l'appareil Dako Omnis.</p> <p>Montage : Après la coloration sur l'appareil Dako Omnis, les coupes doivent être déshydratées, éclaircies et montées à l'aide d'un milieu de montage permanent.</p> <p>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. Le tissu de contrôle positif doit comprendre l'amygdale et les cellules/structures doivent présenter des schémas de réaction tels que ceux décrits pour ce tissu à la section "Performances". Le réactif de contrôle négatif recommandé est le FLEX Universal Negative Control, Mouse (Dako Omnis), réf. GA750.</p>
Interprétation de la coloration	Les cellules marquées par l'anticorps présentent une coloration diffuse/microgranulaire limitée au noyau. Une coloration cytoplasmique peut être observée dans les cellules néoplasiques pendant la mitose (1).
Performances	<p>Tissus sains : Dans l'amygdale, l'anticorps marque fortement les noyaux des centroblastes dans la zone sombre et les centrocytes dans les zones claires basale et apicale des centres germinatifs. En outre, l'anticorps marque environ 10% des lymphocytes T du centre germinatif. Aucune coloration n'a été observée dans les cellules plasmiques, les macrophages, les cellules folliculaires dendritiques, et les lymphocytes du manteau folliculaire IgD+/IgM+. Dans la rate, le motif de coloration était similaire à celui observé dans l'amygdale mais, par ailleurs, l'anticorps a marqué quelques cellules lymphoïdes isolées de phénotype non défini. Dans les tissus extra-lymphoïdes, l'anticorps a marqué légèrement les épithéliums squameux de l'amygdale, du thymus et de la peau. Aucune coloration n'a été observée dans le foie, la thyroïde, le muscle strié ou le rein (1). Les lymphocytes B et T du centre germinatif dans les amygdales ont présenté une coloration modérée à forte, tandis que la coloration des cellules épithéliales squameuses était faible à modérée.</p> <p>Tissus anormaux : 173 cas de néoplasmes lymphoïdes humains ont été testés avec l'anticorps. Dans les lymphomes ou les leucémies à lymphocytes B, 24 cas de lymphomes du centre folliculaire sur 24, 29 cas de lymphomes diffus à grandes cellules sur 30 et 13 cas de lymphomes de Burkitt sur 13 ont été marqués. Aucune coloration n'a été observée dans 7/7 leucémies aiguës lymphoblastiques à pré-lymphocytes B, 16/16 lymphomes lymphocytaires à lymphocytes B/LLC-B, 6/6 leucémies à cellules chevelues, 22/22 leucémies à cellules du manteau et 14/14 lymphomes de la zone marginale. Dans les lymphomes ou leucémies à lymphocytes T, 4 cas de lymphomes anaplasiques à grandes cellules sur 8 ont été marqués, alors qu'aucune coloration n'a été observée dans 10 cas de lymphomes lymphoblastiques aigus sur 10, 3 cas de mycoses fongicoïdes sur 3, 6 cas de lymphomes périphériques à lymphocytes T sur 6, et 2 cas de lymphomes périphériques à lymphocytes T sur 2 (de type AILD). Dans la maladie de Hodgkin, 5 cas de type nodulaire sur 5, à prédominance lymphocytaire, 1 cas à sclérose nodulaire sur 4 et 1 cas à cellularité mixte sur 3 ont été marqués (1).</p> <p>Parmi les lymphomes non hodgkiniens liés au SIDA, l'anticorps a marqué 11 lymphomes à petites cellules non clivées sur 11, 7 lymphomes à grandes cellules non clivées (LNCCL) sur 7 et 2 lymphomes malins à larges cellules immunoblastiques (plasmacytoïdes) (IBLP) sur 9. Parmi les lymphomes du système nerveux central primitifs associés au SIDA, l'anticorps a marqué 4 LNCCL sur 4 et aucun des 4 cas d'IBLP. Aucun marquage n'a été observé dans 5 cas de lymphomes à effusion primaire (LIP) et 6 lignées cellulaires de LIP associées au SIDA (4).</p>

DEUTSCH

Verwendungszweck	<p>Zur In-vitro-Diagnostik.</p> <p>FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human BCL6 Protein, Clone PG-B6p, Ready-to-Use (Dako Omnis) ist zur Verwendung in der Immunhistochemie (IHC) in Verbindung mit dem Dako Omnis Gerät bestimmt. Die Ergebnisse helfen bei der Klassifizierung großzelliger diffuser B-Zell-Lymphome, follikulärer Lymphome und Burkitt-Lymphome (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 ist für den Einsatz nach der Primärdiagnose des Tumors durch konventionelle Histopathologie unter Verwendung von nicht immunologischen histochemischen Färbungen vorgesehen.</p>
Zusammenfassung und Erklärung	<p>Das Proto-Onkogen <i>BCL6</i> kodiert ein 92-98 kDa POZ/Zinkfingerprotein. Über seine sechs C-terminalen Zinkfinger-Motive erfolgt die Bindung des BCL6-Proteins an spezifische DNA-Sequenzen der Zielgene, wo es als die Transkription verändernder Repressor fungiert (2, 3).</p> <p>Die <i>BCL6</i>-Expression kann häufig vorkommen, da niedrige Gehalte in vielen Gewebetypen nachgewiesen werden. Hochgradige <i>BCL6</i>-Expression ist allerdings auf Zellen der B-Lymphoidzelllinie und der Skelettmuskulatur beschränkt. Bei der B-Lymphoidzelllinie scheint die <i>BCL6</i>-Expression während der Differenzierung unter strikter Regulierung zu stehen. Starke Expression wird vorzugsweise in dem Keimzentrum (GC) entstammenden B-Zellen, nicht jedoch in Plasmazellen, Vorläuferzellen, Mantelzonenzellen und B-Gedächtniszellen beobachtet. Neoplastische Entsprechungen der GC-B-Zellen, einschließlich Burkitt-Lymphom, Follikel-Lymphom und diffusum großzelligem B-Zell-Lymphom, zeigen möglicherweise ebenfalls hochgradige <i>BCL6</i>-Expression (3).</p> <p><i>BCL6</i> ist möglicherweise an chromosomalen Translokationen beteiligt, bei denen die regulatorische Region des <i>BCL6</i>-Gens durch einen heterologen reziproken Partner – wie beispielsweise die Immunglobulin-Gene (IG) – ersetzt wird. Die Promotor-Substitution führt zur Deregulierung der <i>BCL6</i>-Expression, die mit der Lymphomentstehung in Zusammenhang stehen könnte (3). Beim <i>BCL6</i>-Rearrangement handelt es sich um eine der häufigsten genetischen Anomalien bei B-Zell-Lymphomen vom Non-Hodgkin-Typ mit einer besonders stark ausgeprägten Auftretenshäufigkeit beim diffusum großzelligem Lymphom (2).</p> <p>Folgende Angaben bitte den <i>General Instructions for Immunohistochemical Staining</i> (Allgemeine Richtlinien zur immunhistochemischen Färbung) von Dako 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.</p>
Geliefertes Reagenz	<p>Gebrauchsfertiger, monoklonaler Maus-Antikörper in flüssiger Form in einem Puffer, der stabilisierendes Protein und 0.015 mol/L Natriumazid enthält.</p> <p>Klon: PG-B6p (1). Isotyp: IgG1, Kappa.</p>
Immunogen	Rekombinantes Glutathion-S-Transferase-(GST)-BCL6-Protein, entsprechend den Aminosäuren 3-484 des menschlichen BCL6-Proteins (1).
Spezifität	<p>Beim Western-Blotting der Gesamtlysate von Bjab-Zellen und mit BCL6 transfizierten EB3-Zellen oder mit Kontrollpräparat transfizierten EB3-Zellen markierte der Antikörper keinerlei Banden. Dies weist auf eine mangelnde Reaktivität mit denaturiertem BCL6-Protein hin (1).</p> <p>Western Blotting der Immunpräzipitate, die zwischen dem Antikörper und den Gesamtlysaten der Bjab-Zellen (BCL6+) und BCL6-transfizierten EB3-Zellen gebildet wurden, zeigt eine Reaktion mit dem BCL6 entsprechenden Fragment von ~95 kDa (1).</p>
Vorsichtsmaßnahmen	<ol style="list-style-type: none"> Zur In-vitro-Diagnostik. Für Fachpersonal. Dieses Produkt enthält Natriumazid (NaN₃), 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. Wie alle Produkte biologischen Ursprungs müssen auch diese entsprechend gehandhabt werden. Geeignete persönliche Schutzausrüstung (PSA) tragen, um Augen- und Hautkontakt zu vermeiden. Nicht verwendete Lösung ist entsprechend örtlichen, staatlichen und EU-rechtlichen Richtlinien zu entsorgen.

P02230EFG_02_GA625/2017.02 p. 3/4

Lagerung Bei 2-8 °C lagern. Während der Lagerung ist der Deckel geschlossen zu halten. Nach Ablauf des auf dem Behälter aufgedruckten Verfallsdatums nicht mehr verwenden. Die Stabilität im Gerät beträgt 375 Stunden. Die Zeitdauer im Gerät wird durch die Dako Omnis Software erfasst. 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.

Übersicht über die Färbeverfahren*

Schritt		Anmerkungen
Fixierung/Einbettung	Fixiert in Formalin, eingebettet in Paraffin	Entparaffinierung im Gerät
Vorbehandlung	EnVision FLEX, High pH (Code-Nr. V804)	30 min HIER
Antikörper	Gebrauchsfertig	12,5 min Inkubation
Negativkontrolle	FLEX Negative Control, Mouse (Code-Nr. GA750)	12,5 min Inkubation
Detektionssystem	EnVision FLEX (Code-Nr. V800) + EnVision FLEX+ Mouse LINKER (Code-Nr. V821)	Block: 3 min; Link: 10 min; Polymer: 20 min; Chromogen: 5 min
Gegenfärbung	Hematoxylin (Code-Nr. C808)	3 min Inkubation
Kontrollgewebe	Mandeln	Nukleare Färbung
Objektträger	FLEX IHC Microscope Slides (Code-Nr. 8020)	Empfohlen zur besseren Haftung der Gewebeschnitte an den Glasobjektträgern
Eindeckung	Nichtwässriges, permanentes Eindeckmedium erforderlich	Nach dem Färben müssen die Schnitte dehydriert, geklärt und unter Verwendung eines permanenten Eindeckmediums auf Objektträger aufgebracht werden
Geräte	Dako Omnis	Reagenzien werden in gerätespezifischen Fläschchen geliefert

*Der Anwender muss stets die Packungsbeilage lesen, um sich über die detaillierten Anweisungen für das Färbeverfahren und die Handhabung des Produkts zu informieren.

Gewebevorbereitung

Paraffinschnitte: Der Antikörper eignet sich zur Markierung von formalinfixierten und paraffineingebetteten Gewebeschnitten. Gewebeproben sollten in Schnitte von ca. 4 µm Stärke geschnitten werden.

Vorbehandlung: Es ist eine Vorbehandlung der formalinfixierten und paraffineingebetteten Gewebeschnitte durch hitzeinduzierte Epitopdemaskierung (HIER) erforderlich. Die HIER-Vorbehandlung der Gewebe mit EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Dako Omnis), Code-Nr. GV804, wird empfohlen. Entparaffinierung, Rehydrierung und Demaskierung werden im Dako Omnis Gerät selbst durchgeführt. Weitere Informationen finden Sie im Dako Omnis Benutzerhandbuch.

Dako Omnis gewährleistet, dass die Gewebeschnitte während der Vorbehandlungsprozedur und während des anschließenden immunhistochemischen Färbeverfahrens nicht austrocknen. Für eine bessere Haftung der Gewebeschnitte an den Glas-Objektträgern werden FLEX IHC Microscope Slides (Code-Nr. K8020) empfohlen.

Färbeverfahren

Programm: Die Färbeschritte und Inkubationszeiten sind in der Dako Omnis Software vorprogrammiert. Detaillierte Anweisungen zum Laden der Objektträger und Reagenzien sind dem Dako Omnis Benutzerhandbuch zu entnehmen. Wenn die Protokolle im Dako Omnis System nicht verfügbar sind, wenden Sie sich an den technischen Kundendienst von Dako. Alle Inkubationsschritte sind bei 32 °C im Dako Omnis Gerät durchzuführen.

Detektionssystem: Das empfohlene Detektionssystem ist EnVision FLEX, High pH (Dako Omnis), Code-Nr. GV800 in Verbindung mit EnVision FLEX+ Mouse LINKER (Dako Omnis), Code-Nr. GV821. Die Detektion wird im Dako Omnis Gerät durchgeführt.

Gegenfärbung: Die empfohlene Gegenfärbung ist Hematoxylin (Dako Omnis), Code-Nr. GC808. Die Gegenfärbung wird im Dako Omnis Gerät durchgeführt.

Eindecken: Nach dem Färben im Dako Omnis Gerät müssen die Schnitte dehydriert, geklärt und mit permanentem Eindeckmedium auf den Objektträger aufgebracht werden.

Qualitätskontrolle: Positiv- und Negativkontrollgewebe sowie Negativkontrollreagenz sollten zur gleichen Zeit und mit demselben Protokoll wie die Patientengewebe getestet werden. Das Positivkontrollgewebe sollte Mandelgewebe enthalten, und die Zellen/Strukturen sollten die für dieses Gewebe im Abschnitt „Leistungseigenschaften“ beschriebenen Reaktionsmuster aufweisen. Das empfohlene Negativkontrollreagenz ist FLEX Universal Negative Control, Mouse (Dako Omnis), Code-Nr. GA750.

Auswertung der Färbung

Mit diesem Antikörper markierte Zellen weisen eine diffuse, mikrogranuläre und auf den Zellkern begrenzte Färbung auf. Eine zytoplasmatische Färbung kann bei neoplastischen Zellen in der Mitose beobachtet werden (1).

Leistungseigenschaften

Normalgewebe: In Mandelgewebe markiert der Antikörper in starkem Ausmaß die Zentroblasten-Zellkerne der dunklen Zone sowie die Zentrozyten der basalen und apikalen hellen Zonen in den Keimzentren. Zudem markiert der Antikörper circa 10% der Keimzentrum-T-Zellen. Keine Markierung wurde festgestellt für Plasmazellen, Makrophagen, follikulär-dendritische Zellen und IgD+/IgM+ follikuläre Mantellymphozyten. Für Milzgewebe verlief das Färbungsmuster ähnlich wie bei Mandelgewebe, der Antikörper markierte jedoch darüber hinaus einige wenige verstreute lymphoidartige Zellen eines nicht definierten Phänotyps. Bei Geweben außerhalb des Lymphsystems erbrachte der Antikörper eine schwache Färbung der Plattenepithelzellen von Mandeln, Thymus und Haut. Für Leber, Schilddrüse, gestreifte Muskulatur oder Niere wurde keine Markierung beobachtet (1). Bei Mandelgewebe zeigen Keimzentrum-B-Zellen eine mäßige bis starke Färbereaktion, während Plattenepithelzellen eine schwache bis mäßige Färbereaktion zeigen.








Anormales Gewebe: Mit dem Antikörper wurden 173 Fälle menschlicher lymphoider Neoplasmen getestet. Von den B-Zell-Lymphomen oder -Leukämien wurden für 24/24 follikulären Lymphomen (zentroblastisch-zentrozytisch, FCL), 29/30 diffusen großzelligen Lymphomen und 13/13 Burkitt-Lymphomen Markierungen erhalten. Keine Markierung erbrachten 7/7 akuten lymphatischen Leukämien vom Prä-B-Typ, 16/16 kleinzellig-lymphozytischen bzw. B-CLL, 6/6 Haarzell-Leukämien, 22/22 Mantelzell-Leukämien und 14/14 Marginalzonen-Lymphomen. Von den T-Zell-Lymphomen oder Leukämien wurden 4/8 anaplastische großzellige Lymphome markiert. Dagegen wurde keine Markierung beobachtet bei 10/10 akuten lymphatischen Lymphomen, 3/3 Mycosis fungoides, 6/6 peripheren T-Zell-Lymphomen und 2/2 peripheren T-Zell-Lymphomen (vom ALD-Typ; angioimmunoblastische Lymphadenopathie mit Dysproteinämie). Für das Hodgkin-Lymphom wurden für 5/5 Fällen des nodulären Typs mit Prädominanz der Lymphozyten, 1/4 Fällen des nodulärsklerosierenden Typs und 1/3 Typen gemischter Zellularität Markierungen erhalten (1).

Beim systemischen AIDS-assoziierten Non-Hodgkin-Lymphom markierte der Antikörper 11/11 kleinzelligen, nicht zentrozytischen Lymphomen (SNCCCL), 7/7 großzelligen, nicht zentrozytischen Lymphomen (LNCCCL) und 2/9 großzelligen, immunoblastischen, lymphoplasmazytoiden Lymphomen (IBLP). Beim AIDS-assoziierten primären Lymphom des Zentralnervensystems (PCNSL) markierte der Antikörper 4/4 LNCCCL und keinen der vier Fälle von IBLP. Keine Markierung ergab sich in 5 Fällen eines primären Erguss-Lymphoms (PEL) und bei 6 AIDS-assoziierten PEL-Zelllinien (4).

References / Bibliographie / Literaturnachweise

1. Flenghi L, Bigerna B, Fizzotti M, Venturi S, Pasqualucci L, Pileri S, et al. Monoclonal antibodies PG-B6a and PG-B6p recognize, respectively, a highly conserved and a formol-resistant epitope on the human BCL-6 protein amino-terminal region. *Am J Pathol* 1996;148:1543-55.
2. Ye BH. BCL-6 in the pathogenesis of non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer Invest* 2000;18:356-65.
3. Nakamura Y. Internal deletions within the BCL6 gene in B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2000;38:505-12.
4. Carbone A, Gaidano G, Ghoghini A, Larocca LM, Capello D, Canzonieri V, et al. Differential expression of BCL-6, CD138/syndecan-1, and Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein-1 identifies distinct histogenetic subsets of acquired immunodeficiency syndrome-related non-Hodgkin's lymphomas. *Blood* 1998;91:747-55.

Explanation of symbols / Erläuterung der Symbole / Explication des symboles

 REF	Catalogue number Référence du catalogue Katalognummer	 2 °C - 8 °C	Temperature limitation Limites de température Zulässiger Temperaturbereich		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		
	Consult instructions for use Consulter le mode d'emploi Gebrauchsanweisung beachten		Use by Utiliser avant Verwendbar bis		