

**Monoclonal Mouse
Anti-Human Podoplanin
Clone D2-40**

Code M3619

Intended use

For In Vitro Diagnostic Use

Monoclonal Mouse Anti-Human Podoplanin, Clone D2-40 is intended for use in immunohistochemistry. This antibody labels the lymphatic endothelium marker podoplanin in normal and neoplastic tissues. The antibody may be useful in the identification of lymphatic invasion of a variety of cancers (1, 2). 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.

Summary and explanation

Podoplanin is a ~38 kDa O-linked transmembrane sialoglycoprotein which is expressed in the endothelium of lymphatic capillaries, but not in the blood vasculature (3). Besides the expression in lymphatic endothelium, podoplanin is also found in a variety of other tissues, including mesothelial cells, reticular cells, follicular dendritic cells, ovarian and testicular germ cells (4). Anti-Podoplanin has also been demonstrated to react with lymphatic endothelium and is unreactive with vascular endothelium (1, 2). In neoplastic tissue, immunostaining of lymphatic endothelium by Anti-Podoplanin has been shown to be useful in identifying lymphatic invasion of primary tumors (1, 2). The use of calretinin and podoplanin markers in conjunction has been shown to improve differentiation of mesothelioma versus metastatic adenocarcinoma (5). Podoplanin has also been shown to be a useful marker for the differential identification of seminomas and follicular dendritic cell tumors (6).

Refer to Dako's *General Instructions for Immunohistochemical Staining* or the detection system instructions of IHC procedures for: 1) Principle of Procedure, 2) Materials Required, Not Supplied, 3) Storage, 4) Specimen Preparation, 5) Staining Procedure, 6) Quality Control, 7) Troubleshooting, 8) Interpretation of Staining, 9) General Limitations.

Reagent provided

Monoclonal Mouse antibody provided in liquid form as tissue culture supernatant in 0.05 mol/L Tris-HCl, pH 7.2 and 0.015 mol/L sodium azide. This product contains stabilizing protein.

Clone: D2-40 (7) Isotype: IgG₁, kappa
Mouse IgG concentration mg/L: See label on vial.

M3619 may be used at a dilution 1:100–1:200 when performing IHC using the EnVision+™ detection system. These are guidelines only. Optimal antibody concentrations may vary depending on specimen and preparation method, and should be determined individually in each laboratory.

Immunogen

Dysgerminoma tissue (7).

Specificity

Clone D2-40 was tested by Western blotting of cell lysates from a variety of tumor cell lines. D2-40 identified a 40 kD band in immunoblots of HEY ovarian epithelial carcinoma cells and a slightly higher molecular weight form in blots of MGH-U3 cells. D2-40 immunoreactivity has also been observed in Western blots of SK-OV-3 and Caov-3 ovarian epithelial carcinoma cells, PA-1PA-1 ovarian teratocarcinoma cells, Tera-1 and Tera-2 testicular teratocarcinoma cells, 833 embryonal carcinoma cells, RT-4 bladder transitional carcinoma cells and U-2 OS osteosarcoma cells. No reactivity was observed in Western blots of other tumor cell lines derived from a variety of cancers (7).

The effect of enzyme digestion on the immunoreactivity of D2-40 was tested using affinity purified antigen from HEY cells and intact HEY cells. The immunoreactivity of D2-40 with Western blots of purified antigen and with cells by flow cytometry was unaffected by the removal of sialic acid residues through neuraminidase treatment of the cells or protein. Treatment of protein or cells with O-sialoglycoprotease destroyed the immunoreactivity of D2-40 in both Western blotting and flow cytometry, demonstrating that the antigen recognized by D2-40 is an O-linked glycoprotein (7).

Materials required, but not supplied

Refer to Dako's *General Instructions for Immunohistochemical Staining* and/or the detection system instructions. Suggested diluent(s) for IHC procedures:

Antibody Diluent (code S0809)

The following negative control is recommended for IHC procedures:

Mouse IgG₁ (code X0931)

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, NaN₃ 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 reagents 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

Paraffin sections

Anti-Podoplanin can be used on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. Pretreatment of tissue with proteolytic enzymes is not recommended.

The deparaffinized tissue sections must be treated with heat prior to the IHC staining procedure. Heat-induced epitope retrieval (HIER) involves immersion of tissue sections in a pre-heated buffer solution and maintaining heat in a water bath or steamer (95–99 °C). Use a 20-minute heating protocol for HIER performed at 95–99 °C; after thermal treatment, allow the jar with buffer and slides to cool for 20 minutes at room temperature. Rinse well with buffer or deionized water following HIER. For greater adherence of tissue sections to glass slides, the use of Silanized Slides (code S3003) is recommended. Target Retrieval Solution (code S1700) or 10x Concentrate (code S1699) is recommended.

Cryostat sections and cell smears

Anti-Podoplanin can be used for labeling acetone-fixed cryostat sections or fixed cell smears.

Staining procedure

Follow the recommended procedure for the detection system selected.

Staining interpretation

The cellular staining pattern for Anti-Podoplanin is cytoplasmic and sometimes membranous.

Performance characteristics

Normal tissues⁽⁸⁾

Anti-Podoplanin strongly immunostains lymphatic endothelium, ganglion cells and nerve in many normal tissue types. Vascular endothelial cells were negative in all tissues (8).

Tissue Type (# tested)	Positively Staining Tissue Elements
Adrenal (3)	2/3 cytoplasm of capsular fibroblasts; 1/3 cytoplasm of interstitial fibroblasts; 1/3 cytoplasm of pericapsular lymphocytes
Bone marrow (3)	3/3 negative
Brain, cerebellum (3)	3/3 cytoplasm of neuropil
Brain, cerebrum (3)	3/3 nuclei of rare astrocytes
Breast (3)	3/3 cytoplasm of myoepithelial cells
Cervix (3)	3/3 membrane and/or cytoplasm of basilar epithelial cells, 3/3 cytoplasm of stromal fibroblasts
Colon (3)	2/3 lymphocytes
Esophagus (3)	1/3 cytoplasm of ganglion cells in muscle; 1/3 cytoplasm of basilar epithelium
Heart (3)	2/3 cytoplasm of myocytes
Kidney (3)	1/3 cytoplasm of pericapsular fibroblasts
Liver (3)	3/3 negative
Lung (3)	2/3 cytoplasm of bronchial epithelial cells, 3/3 cytoplasmic edge of alveolar cells
Mesothelial cells (3)	1/3 cytoplasm of mesothelial cells
Ovary (3)	3/3 cytoplasm of ovarian stromal cells; 1/3 cytoplasm of surface epithelium of inclusion cysts
Pancreas (3)	2/3 cytoplasm of periductal fibroblasts; 1/3 cytoplasm of ductal myoepithelial cells
Parathyroid (3)	3/3 negative
Peripheral nerve (3)	2/3 cytoplasm of perineurium
Pituitary (3)	1/3 cytoplasm of pericapsular fibroblasts in neurohypophysis; 1/3 cytoplasm of neuropil in neurohypophysis
Prostate(3)	3/3 cytoplasm of basal cells of ducts; 3/3 cytoplasm of stromal fibroblasts
Salivary gland (3)	3/3 cytoplasm of ductal and acinar myoepithelial cells
Skeletal muscle (3)	3/3 cytoplasm of perimysium
Skin (3)	3/3 cytoplasm of myoepithelial cells of adnexal structures
Small intestine (3)	3/3 cytoplasm of myenteric plexus
Spleen (3)	3/3 negative
Stomach (3)	3/3 cytoplasm of periglandular fibroblasts; 1/3 cytoplasm of myenteric plexus; 1/3 cytoplasm and membrane of germinal center lymphocytes
Testes (3/3)	3/3 cytoplasm of peritubular fibroblasts
Thymus (3)	3/3 cytoplasm and membrane of medullary lymphocytes
Thyroid (3)	3/3 negative
Tonsil (3)	3/3 cytoplasm and membrane of basilar epithelial cells and germinal center lymphocytes
Uterus (3)	3/3 cytoplasm of myometrium; 1/3 cytoplasm of endometrial glands

Abnormal tissues^{2,7}

Tissue Type (# tested)	Positively Staining Tissue
Kaposi's Sarcoma (24): Patch, plaque and nodular stages	24/24
Lymphangioma (10)	10/10 endothelium lining the sinusoidal spaces
Angiosarcoma (7)	3/7
Leiomyosarcoma (10)	3/10
Dermatofibroma (6)	2/6
Malignant fibrous histiocytoma (2)	1/2
Hemangioma (10)	0/10
Glomus tumor (3)	0/3
Angiolipoma (2)	0/2
Pyogenic granuloma (2)	0/2
Vascular malformation (2)	0/2
Hemangiopericytoma (1)	0/1
Hemangioendothelioma (1)	0/1
Dermatofibrosarcoma protuberans (4)	0/4
Neurofibromas (6)	0/6
<i>Pure Germ cell tumors</i>	
Seminomas (35)	34/35
Embryonal carcinomas (5)	1/5
Immature and mature teratoma (1)	0/1
<i>Mixed germ cell tumors</i>	
Seminomas (12)	12/12
Embryonal carcinomas (21)	17/21
Immature and mature teratoma (16)	5/16
Yolk sac tumor (4)	1/4
Choriocarcinoma (2)	0/2

FRANÇAIS

Réf. M3619

Utilisation prévue

Pour utilisation diagnostique in vitro

L'anticorps Monoclonal Mouse Anti-Human Podoplanin, Clone D2-40, est destiné à être utilisé en immunohistochimie. Cet anticorps marque la podoplanine, marqueur de l'endothélium lymphatique, dans les tissus sains et néoplasiques. L'anticorps peut être utile dans le cadre de l'identification d'une invasion lymphatique de divers cancers (1, 2). 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.

Résumé et explications

La podoplanine est une O-sialoglycoprotéine transmembranaire d'environ ~38 kDa exprimée dans l'endothélium des capillaires lymphatiques, mais pas dans le système vasculaire sanguin (3). Outre l'expression dans l'endothélium lymphatique, la podoplanine est également présente dans plusieurs autres tissus, notamment les cellules mésothéliales, les cellules réticulaires, les cellules dendritiques folliculaires, les cellules germinales ovariennes et les cellules germinales testiculaires (4). Il a également été démontré que l'anticorps Anti-Podoplanin réagit avec l'endothélium lymphatique et n'est pas réactif avec l'endothélium vasculaire (1, 2). Dans le tissu néoplasique, il a été démontré que la coloration immunologique de l'endothélium lymphatique par l'anticorps Anti-Podoplanin est utile dans le cadre de l'identification d'une invasion lymphatique des tumeurs primitives (1, 2). L'utilisation conjointe des marqueurs calrétinine et podoplanine s'est révélée améliorer la différenciation entre le mésothéliome et l'adénocarcinome métastatique (5). Il a également été montré que la podoplanine est un marqueur utile dans le cadre de l'identification différentielle entre les séminomes et les tumeurs des cellules dendritiques folliculaires (6).

Se référer aux *Instructions générales de coloration immunohistochimique* de Dako ou aux instructions du système de détection concernant les procédures IHC pour : 1) Principe de procédure, 2) Matériaux requis mais non fournis, 3) Conservation, 4) Préparation des échantillons, 5) Procédure de coloration, 6) Contrôle qualité, 7) Dépannage, 8) Interprétation de la coloration, 9) Limites générales.

Réactifs fournis

Anticorps monoclonal de souris fourni sous forme liquide comme surnageant de culture tissulaire dans un tampon Tris-HCl à 0,05 mol/L, de pH 7,2, contenant de l'azide de sodium à 0,015 mol/L. Ce produit contient une protéine stabilisante.

Clone: D2-40 (7) Isotype : IgG₁, kappa

Concentration des IgG de souris en mg/l : Voir l'étiquette sur le flacon.

Le M3619 peut être utilisé à une dilution de 1:100 à 1:200 lors de la procédure IHC faisant appel au système de détection EnVision+™. Il ne s'agit là que de conseils. Les concentrations d'anticorps optimales peuvent varier en fonction de l'échantillon et de la méthode de préparation et doivent être déterminées par chaque laboratoire de manière indépendante.

Immunogène

Tissu dysgerminome (7).

Spécificité

Le clone D2-40 a été testé par analyse Western blot de lysats cellulaires provenant de diverses lignées cellulaires tumorales. La D2-40 a identifié une bande de 40 kD dans les immunoblots de cellules HEY de carcinome épithélial ovarien et une forme de poids moléculaire légèrement supérieur dans les blots de cellules MGH-U3. L'immunoréactivité de la D2-40 a également été observée lors d'analyses Western blot de cellules SK-OV-3 et Caov-3 de carcinome épithélial ovarien, de cellules PA-1PA-1 de tératocarcinome ovarien, de cellules Tera-1 et Tera-2 de tératocarcinome testiculaire, de cellules 833 de carcinome embryonnaire, de cellules RT-4 de carcinome transitionnel de la vessie et de cellules U-2 OS d'ostéosarcome. Aucune réactivité n'a été observée dans les tests Western blot d'autres lignées cellulaires tumorales provenant de divers cancers (7).

L'effet de la digestion enzymatique sur l'immunoréactivité de la D2-40 a été testé en utilisant un antigène purifié par affinité provenant de cellules HEY et de cellules HEY intactes. L'immunoréactivité de la D2-40 avec les tests Western blot d'antigène purifié et avec les cellules analysées par cytométrie de flux n'a pas été affectée par l'élimination des résidus d'acide sialique via un traitement par neuraminidase des cellules ou des protéines. Le traitement des protéines ou des cellules par O-sialoglycoprotéase détruit l'immunoréactivité de la D2-40 lors d'un Western blot et d'une cytométrie de flux, prouvant que l'antigène reconnu par la D2-40 est une O-glycoprotéine (7).

Matériels requis mais non fournis

Se référer aux Dako's *Instructions Générales relatives à la procédure de Marquage Immunohistochimique* et/ou aux instructions du système de détection. Diluant recommandé pour les procédures IHC :

Antibody Diluent (Diluant d'anticorps) (réf. S0809)

Le contrôle négatif suivant est recommandé pour les procédures IHC :

Mouse IgG₁ (IgG₁ de souris) (réf. X0931)

Précautions

1. Pour utilisateurs professionnels.
2. 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, le NaN₃ peut réagir avec le cuivre et le plomb des canalisations pour former des azides métalliques hautement explosifs. Lors de l'élimination, rincer abondamment à l'eau pour éviter toute accumulation d'azide métallique dans les canalisations.
3. Comme avec tout produit d'origine biologique, respecter les procédures de manipulation appropriées.
4. Porter un vêtement de protection approprié pour éviter le contact avec les yeux et la peau.
5. Les réactifs non utilisés doivent être éliminés conformément aux réglementations locales et nationales.

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'y a aucun signe évident indiquant l'instabilité de ce produit. Par conséquent, les contrôles positifs et négatifs doivent être testés en même temps que des échantillons de patient. Si une coloration inattendue est observée, qui ne peut être expliquée par un changement des procédures du laboratoire, et en cas de suspicion d'un problème lié à l'anticorps, contacter l'assistance technique de Dako.

Préparation des échantillons

Coupes en paraffine

L'anticorps Anti-Podoplanin peut être utilisé sur des coupes de tissus fixés au formol et inclus en paraffine. Le prétraitement des tissus par des enzymes protéolytiques n'est pas recommandé.

Les coupes de tissus déparaffinées doivent être traitées à la chaleur avant d'appliquer la procédure de coloration IHC. La restauration de l'épitope par la chaleur (HIER) implique l'immersion des coupes de tissus dans une solution tampon préchauffée et le maintien de la chaleur dans un bain-marie ou un incubateur (95-99 °C). Suivre un protocole de chauffage de 20 minutes pour la procédure HIER effectuée entre 95 et 99 °C, après traitement thermique, laisser la cuve contenant le tampon et les lames refroidir pendant 20 minutes à température ambiante. Rincer abondamment à l'aide de tampon ou d'eau déionisée après la procédure HIER. Pour une meilleure adhérence des coupes de tissus sur les lames de verre, il est recommandé d'utiliser des Silanized Slides (lames silanisées) (réf. S3003). La Target Retrieval Solution (Solution de restauration des cibles) (réf. S1700) ou le 10x Concentrate (Concentré 10x) (réf. S1699) sont recommandés.

Coupes cryostat et frottis cellulaires

L'anticorps Anti-Podoplanin peut être utilisé pour le marquage des coupes cryostat fixées à l'acétone ou des frottis cellulaires fixés.

Procédure de coloration

Suivre la procédure recommandée pour le système de détection sélectionné.

Interprétation de la coloration

Le schéma de coloration cellulaire pour l'anticorps Anti-Podoplanin est cytoplasmique et parfois membranaire.

Caractéristiques de performance

Tissus sains⁽⁶⁾

L'anticorps Anti-Podoplanin colore fortement l'endothélium lymphatique, les cellules ganglionnaires et les nerfs dans de nombreux types de tissus sains. Les cellules endothéliales vasculaires étaient négatives dans tous les tissus (8).

Type de tissu (nbre testés)	Éléments de tissus colorés positivement
Surrénale (3)	2/3 cytoplasme de fibroblastes capsulaires ; 1/3 cytoplasme de fibroblastes interstitiels ; 1/3 cytoplasme de lymphocytes péri capsulaires
Moelle osseuse (3)	3/3 négatifs
Cerveau, cervelet (3)	3/3 cytoplasme du neuropile
Cerveau, cerebrum (3)	3/3 noyaux de quelques astrocytes
Sein (3)	3/3 cytoplasme de cellules myoépithéliales
Col de l'utérus (3)	3/3 membrane et/ou cytoplasme des cellules épithéliales basilaires, 3/3 cytoplasme de fibroblastes du stroma
Côlon (3)	2/3 lymphocytes
Œsophage (3)	1/3 cytoplasme de cellules ganglionnaires du muscle ; 1/3 cytoplasme d'épithélium basilaire
Cœur (3)	2/3 cytoplasme de myocytes
Rein (3)	1/3 cytoplasme de fibroblastes péri capsulaires
Foie (3)	3/3 négatifs
Poumon (3)	2/3 cytoplasme de cellules épithéliales bronchiques, 3/3 bord du cytoplasme des cellules alvéolaires
Cellules mésothéliales (3)	1/3 cytoplasme de cellules mésothéliales
Ovaire (3)	3/3 cytoplasme de cellules du stroma ovarien ; 1/3 cytoplasme d'épithélium de surface de kystes d'inclusion
Pancréas (3)	2/3 cytoplasme de fibroblastes péri canaux ; 1/3 cytoplasme de cellules myoépithéliales canaux
Parathyroïde (3)	3/3 négatifs
Nerf périphérique (3)	2/3 cytoplasme de périnèvre
Hypophyse (3)	1/3 cytoplasme de fibroblastes péri capsulaires dans la neurohypophyse ; 1/3 cytoplasme de neuropile dans la neurohypophyse
Prostate (3)	3/3 cytoplasme de cellules basales canaux ; 3/3 cytoplasme de fibroblastes du stroma
Glande salivaire (3)	3/3 cytoplasme de cellules myoépithéliales acinaires et canaux
Muscle squelettique (3)	3/3 cytoplasme de périnèvre
Peau (3)	3/3 cytoplasme de cellules myoépithéliales des structures annexielles
Intestin grêle (3)	3/3 cytoplasme de muscle myentérique
Rate (3)	3/3 négatifs
Estomac (3)	3/3 cytoplasme de fibroblastes péri glandulaires ; 1/3 cytoplasme de plexus myentérique ; 1/3 cytoplasme et membrane de lymphocytes du centre germinatif
Testicules (3/3)	3/3 cytoplasme de fibroblastes péri tubulaires
Thymus (3)	3/3 cytoplasme et membrane de lymphocytes médullaires
Thyroïde (3)	3/3 négatifs
Amygdale (3)	3/3 cytoplasme et membrane de cellules épithéliales basilaires et lymphocytes du centre germinatif
Utérus (3)	3/3 cytoplasme de myomètre ; 1/3 cytoplasme de glandes endométriales

Tissus tumoraux^{2,7}

Type de tissu (nbre testés)	Tissus colorés positivement
Sarcome de Kaposi (24) taches, plaques et nodules	24/24
Lymphangiome (10)	10/10 endothélium dans les espaces sinusoïdaux
Angiosarcome (7)	3/7
Léiomyosarcome (10)	3/10
Dermatofibrome (6)	2/6
Histiocytome fibreux malin (2)	1/2
Hémangiome (10)	0/10
Tumeur glomique (3)	0/3
Angiolipome (2)	0/2
Granulome pyogénique (2)	0/2
Malformation vasculaire (2)	0/2
Hémangiopéricytome (1)	0/1
Hémangioendothéliome (1)	0/1
Dermatofibrosarcome protuberans (4)	0/4
Neurofibromes (6)	0/6
<i>Tumeurs pures des cellules germinales</i>	
Séminomes (35)	34/35
Carcinomes embryonnaires (5)	1/5
Téatome immature et mature (1)	0/1
<i>Tumeurs mixtes des cellules germinales</i>	
Séminomes (12)	12/12
Carcinomes embryonnaires (21)	17/21
Téatome immature et mature (16)	5/16
Tumeur du sac vitellin (4)	1/4
Choriocarcinome (2)	0/2

DEUTSCH

Code M3619

Zweckbestimmung

Für die In-vitro-Diagnostik

Monoclonal Mouse Anti-Human Podoplanin, Clone D2-40 ist für die Verwendung in der Immunhistochemie vorgesehen. Dieser Antikörper markiert den lymphatischen Endothel-Marker Podoplanin in normalem und neoplastischem Gewebe. Der Antikörper kann zur Identifikation eines Lymphknotenbefalls durch verschiedene Krebsarten dienen (1, 2). Die klinische Auswertung einer eventuell eintretenden Färbung sollte durch morphologische Studien mit ordnungsgemäßen Kontrollen ergänzt werden und von einem qualifizierten Pathologen unter Berücksichtigung der Krankengeschichte und anderer Diagnostiktests des Patienten vorgenommen werden.

Zusammenfassung und Erklärung

Podoplanin ist ein ~38 kDa O-gebundenes Transmembran-Sialoglycoprotein, **das im Endothel von Lymphgefäßkapillaren, jedoch nicht in der Blutgefäßverteilung exprimiert wird (3). Neben der Expression in lymphatischem Endothel ist Podoplanin auch in verschiedenen anderen Gewebetypen nachweisbar, unter anderem in Mesothelzellen, Retikulumzellen, follikulären dendritischen Zellen, ovariellen- und testikulären Keimzellen (4).** Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass Anti-Podoplanin mit lymphatischem Endothel reagiert, mit vasculärem Endothel jedoch keine Reaktion zeigt (1, 2). In neoplastischem Gewebe hat sich die Immunfärbung von lymphatischem Endothel mit Anti-Podoplanin beim Nachweis des Lymphknotenbefalls durch primäre Tumore als hilfreich erwiesen (1, 2). Die Verwendung von Calretinin- und Podoplanin-Markern in Kombination hat gezeigt, dass dadurch die Unterscheidung von Mesotheliomen gegenüber metastatischen Adenokarzinomen verbessert wird (5). Podoplanin hat sich darüber hinaus als nützlicher Marker zur Differenzialdiagnose von Seminomen und follikulären dendritischen Zelltumoren erwiesen (6).

Folgende Angaben bitte den *Allgemeinen Richtlinien zur immunhistochemischen Färbung* von Dako bzw. den Anweisungen des Detektionssystems für IHC-Verfahren entnehmen: 1) Verfahrensprinzip, 2) Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien, 3) Aufbewahrung, 4) Vorbereitung der Probe, 5) Färbeverfahren, 6) Qualitätskontrolle, 7) Fehlersuche und -behebung, 8) Auswertung der Färbung, 9) Allgemeine Beschränkungen.

Geliefertes Reagenz

Monoklonaler Maus-Antikörper in flüssiger Form als Gewebekulturüberstand in 0,05 mol/L Tris-HCl-Puffer, pH 7,2 und 0,015 mol/L Natriumazid. Dieses Produkt enthält Proteine zur Stabilisierung.

Klon: D2-40 (7) Isotyp: IgG₁, Kappa
Konzentration Maus-IgG mg/l: Siehe Produktetikett.

M3619 kann in der IHC mit dem EnVision+™ Detektionssystem bei einer Verdünnung von 1:100 bis 1:200 verwendet werden. Diese Angaben sind nur Richtlinien. Optimale Antikörperkonzentrationen können je nach Probe und Vorbereitungsmethode unterschiedlich sein und sollten von jedem Labor selbst bestimmt werden.

Immunogen

Dysgerminom-Gewebe (7)

Spezifität

Klon D2-40 wurde durch Western-Blotting von Zelllysaten verschiedener Tumorzelllinien getestet. In Immunoblots von HEY-Karzinomzellen des Eierstockepithels identifizierte D2-40 ein 40 kD Band und in Blots von MGH-U3 Zellen eine Form mit einem etwas höheren Molekulargewicht. D2-40 Immunreaktivität wurde ebenfalls in Western-Blots von SK-OV-3 und Caov-3 Eierstockepithel-Karzinomzellen, PA-1PA-1 Eierstock-Teratokarzinomzellen, Tera-1- und Tera-2-Hoden-Teratokarzinomzellen, 883 Embryo-Karzinomzellen, RT-4 Blasen-Übergangszellkarzinom und U-2 OS Knochensarkomzellen beobachtet. In Western-Blots anderer Tumorzelllinien aus unterschiedlichen Krebsarten kam es zu keiner Reaktivität (7).

Die Auswirkung der Enzymbehandlung auf die Immunreaktivität von D2-40 wurde mit affinitätsgereinigtem HEY-Zellen-Antigen und intakten HEY-Zellen getestet. Die Immunreaktivität von D2-40 mit Western-Blots aus gereinigtem Antigen und von Zellen mit Durchflusszytometrie wurde durch die Entfernung der Sialinsäurerückstände mittels Neuraminidasebehandlung der Zellen oder Proteine nicht beeinflusst. Die Behandlung der Zellen oder Proteine mit O-Sialoglykoprotease zerstörte die Immunreaktivität von D2-40 sowohl in Western-Blots als auch in der Durchflusszytometrie und zeigte, dass es sich bei dem von D2-40 erkannten Antigen um ein O-gebundenes Glykoprotein handelt (7).

Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien

Siehe *Allgemeinen Richtlinien zur immunhistochemischen Färbung* von Dako oder den Anweisungen des Detektionssystems. Empfohlene Verdünnungsmittel für IHC-Verfahren:

Antibody Diluent (Code-Nr. S0809)

Die folgende Negativkontrolle wird für IHC-Verfahren empfohlen:

Mouse IgG₁ (Code-Nr. X0931)

Vorsichtsmaßnahmen

1. Für Fachpersonal.
2. Dieses Produkt enthält Natriumazid (NaN₃), eine in reiner Form äußerst giftige Chemikalie. Ansammlungen von NaN₃ können auch in Konzentrationen, die nicht als gefährlich klassifiziert sind, mit Blei- und Kupferabflussrohren reagieren und hochexplosive Metallazide bilden. Nach der Entsorgung stets mit viel Wasser nachspülen, um Ansammlungen von Metallaziden in den Leitungen vorzubeugen.
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 Reagenzien sind entsprechend örtlichen, staatlichen und bundesstaatlichen Richtlinien zu entsorgen.

Lagerung

Bei 2–8 °C aufbewahren. Nach Ablauf des auf dem Fläschchen aufgedruckten Verfalldatums nicht mehr verwenden. Werden die Reagenzien nicht entsprechend den angegebenen Bedingungen aufbewahrt, müssen die Bedingungen vom Anwender geprüft werden. Es gibt keine offensichtlichen Anzeichen für eine eventuelle Produktinstabilität. Es sollten daher die Positiv- und Negativkontrollen gleichzeitig mit den Patientenproben mitgeführt werden. Falls es zu einer unerwarteten Färbung kommt, die sich nicht durch Unterschiede bei Laborverfahren erklären lässt und auf ein Problem mit dem Antikörper hindeutet, ist der technische Kundendienst von Dako zu verständigen.

Probenvorbereitung

Paraffinschnitte

Anti-Podoplanin kann auf formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebeschnitten verwendet werden. Eine Vorbehandlung des Gewebes mit proteolytischen Enzymen wird nicht empfohlen.

Vor dem IHC-Färbeverfahren müssen die entparaffinierten Gewebeschnitte mit Wärme behandelt werden. Zur hitzeinduzierten Epitopdemaskierung (Heat-induced Epitope Retrieval, HIER) gehört ein Eintauchen der Gewebeschnitte in eine vorgewärmte Pufferlösung und Wärmeerhaltung in einem Wasser- oder Dampfbad (95–99 °C). Für die bei 95–99 °C durchgeführte HIER ein 20-minütiges Hitzeprotokoll verwenden; das Gefäß mit Puffer und Objektträgern nach der Hitzebehandlung 20 Minuten bei Raumtemperatur abkühlen lassen. Nach der HIER gründlich mit Puffer oder entionisiertem Wasser spülen. Zur besseren Haftung der Gewebeschnitte an den Glasobjektträgern wird die Verwendung von Silanized Slides (Code-Nr. S3003) empfohlen. Es wird die Verwendung von Target Retrieval Solution (Code-Nr. S1700) oder 10x Concentrate (Code-Nr. S1699) empfohlen.

Gefrierschnitte und Zellausstriche

Anti-Podoplanin kann zur Markierung von Azeton-fixierten Gefrierschnitten oder fixierten Zellausstrichen verwendet werden.

Färbeverfahren

Das empfohlene Verfahren des ausgewählten Detektionssystems befolgen.

Auswertung der Färbung

Das zelluläre Färbemuster für Anti-Podoplanin ist zytoplasmatisch und manchmal membranös.

Leistungseigenschaften

Normales Gewebe⁽⁸⁾

Anti-Podoplanin weist in lymphatischem Endothel, Ganglienzellen und Nerven vieler normaler Gewebetypen eine kräftige Immunfärbung auf. Die vaskulären Endothelzellen waren in allen Geweben negativ (8).

Gewebetyp (Anz. getestet)	Gewebeelemente mit positiver Färbung
Nebennieren (3)	2/3 Zytoplasma kapsulärer Fibroblasten; 1/3 Zytoplasma interstitieller Fibroblasten; 1/3 Zytoplasma perikapsulärer Lymphozyten
Knochenmark (3)	3/3 negativ
Gehirn, Kleinhirn (3)	3 von 3, Zytoplasma des Nervenfilzes
Gehirn, Zerebrum (3)	3 von 3, Zellkerne seltener Astrozyten
Mamma (3)	3 von 3, Zytoplasma von Myoepithelzellen
Zervix (3)	3 von 3 Membran und/oder Zytoplasma basaler Epithelzellen; 3 von 3 Zytoplasma stromaler Fibroblasten
Colon (3)	2 von 3, Lymphozyten
Ösophagus (3)	1 von 3 Zytoplasma von Ganglienzellen im Muskel; 1 von 3 Zytoplasma des basalen Epithels
Herz (3)	2 von 3, Zytoplasma von Myozyten
Niere (3)	1 von 3, Zytoplasma perikapsulärer Fibroblasten
Leber (3)	3 von 3 negativ
Lunge (3)	2 von 3 Zytoplasma bronchialer Epithelzellen; 3 von 3 zytoplasmatisches Ende der Alveolarzellen
Mesothelzellen (3)	1 von 3, Zytoplasma der Mesothelzellen
Ovar (3)	3 von 3 Zytoplasma ovarialer Stromazellen; 1 von 3 Zytoplasma des Oberflächenepithels von Einschlusszysten
Pankreas (3)	2 von 3 Zytoplasma periduktaler Fibroblasten; 1 von 3 Zytoplasma duktaler Myoepithelzellen
Parathyroidea (3)	3 von 3 negativ
Peripherer Nerv (3)	2 von 3, Zytoplasma des Perineuriums
Hypophyse (3)	1 von 3, Zytoplasma perikapsulärer Fibroblasten der Neurohypophyse; 1 von 3, Zytoplasma des Nervenfilzes der Neurohypophyse
Prostata (3)	3 von 3 Zytoplasma der Basalzellen der Ductuli prostatici; 3 von 3 Zytoplasma stromaler Fibroblasten
Speicheldrüse (3)	3 von 3, Zytoplasma duktaler und azinärer Myoepithelzellen
Skelettmuskel (3)	3 von 3, Zytoplasma des Perimysiums
Haut (3)	3 von 3, Zytoplasma der Myoepithelzellen von Adnexstrukturen
Dünndarm (3)	3 von 3, Zytoplasma des Auerbach-Plexus
Milz (3)	3 von 3 negativ
Magen (3)	3 von 3 Zytoplasma periglandulärer Fibroblasten; 1 von 3 Zytoplasma des Auerbach-Plexus; 1 von 3 Zytoplasma und Membran des Keimzentrums von Lymphozyten
Hoden (3/3)	3 von 3, Zytoplasma peritubulärer Fibroblasten
Thymus (3)	3 von 3, Zytoplasma und Membran medullärer Lymphozyten
Thyroidea (3)	3 von 3 negativ

Tonsille (3)	3 von 3, Zytoplasma und Membran basaler Epithelzellen und der Keimzentrum-Lymphozyten
Uterus (3)	3 von 3 Zytoplasma der Uterusmuskulatur; 1 von 3 Zytoplasma endometraner Drüsen

Pathologisches Gewebe ^{2,7}





Gewebetyp (Anz. getestet)	Gewebe mit positiver Färbung
Kaposi-Sarkom (24): Flecken-, Plaque- und Knotenstadium	24/24
Lymphangiom (10)	10 von 10, Endothel der sinusoidalen Gefäßräume
Angiosarkom (7)	3/7
Leiomyosarkom (10)	3/10
Dermatofibrom (6)	2/6
Malignes fibröses Histiozytom (2)	1/2
Hämangiom (10)	0/10
Glomustumor (3)	0/3
Angiolipom (2)	0/2
Teleangiektatisches Granulom (2)	0/2
Vaskuläre Missbildung (2)	0/2
Hämangioperizytom (1)	0/1
Hämangioendotheliom (1)	0/1
Dermatofibrosarcoma protuberans (4)	0/4
Neurofibrom (6)	0/6
<i>Reine Keimzelltumore</i>	
Seminome (35)	34/35
Embryonale Karzinome (5)	1/5
Unreife und reife Teratome (1)	0/1
<i>Gemischte Keimzelltumore</i>	
Seminome (12)	12/12
Embryonale Karzinome (21)	17/21
Unreife und reife Teratome (16)	5/16
Dottersacktumor (4)	1/4
Choriokarzinom (2)	0/2

References

Bibliographie

Literaturangaben

- Kahn HJ, Marks A. A new monoclonal antibody, D2-40, for detection of lymphatic invasion in primary tumors. Lab Invest 2002;82: 1255-7.
- Kahn HJ, Bailey D, Marks A. Monoclonal antibody D2-40, a new marker of lymphatic endothelium, reacts with Kaposi's sarcoma and a subset of angiosarcomas. Mod Pathol 2002; 15:434-40.
- Breiteneder-Geleff S, Soleiman A, Kowalski H, Horvat R, Amann G, Kriehuber E, et al. Angiosarcomas express mixed endothelial phenotypes of blood and lymphatic capillaries: podoplanin as a specific marker for lymphatic endothelium. Am J Pathol 1999; 154:385-94.
- Kalof AN and Cooper K. D2-40 Immunohistochemistry – So Far! Adv Anat Pathol 2009; 16:62-4.
- Chu AY, Litzky LA, Pasha TL, Acs G, Zhang PJ. Utility of D2-40, a novel mesothelial marker, in the diagnosis of malignant mesothelioma, Mod Pathol 2005, 18:105-110.
- Yu H, Gibson JA, Pinkus GS, Hornick JL. Podoplanin (D2-40) is a novel marker for follicular dendritic cell tumors. Am J Clin Pathol 2007; 128:776-82.
- Marks A, Sutherland DR, Bailey D, Iglesias J, Law J, Lei M, et al. Characterization and distribution of an oncofetal antigen (M2A antigen) expressed on testicular germ cell tumours. Br J Cancer 1999; 80:569-78.
- IHC003 Report On File

REF Catalogue number Référence du catalogue Bestellnummer	 Temperature limitation Limites de température Zulässiger Temperaturbereich	 Consult instructions for use Consulter les instructions d'utilisation Gebrauchsanweisung beachten
 Manufacturer Fabricant Hersteller	LOT Batch code Code du lot Chargenbezeichnung	 Use by Utiliser jusque Verwendbar bis
EC REP Authorized representative in the European Community Représentant Autorisé dans la Communauté Européenne Autorisierter Repräsentant in der EU	IVD In vitro diagnostic medical device Dispositif médical de diagnostic in vitro In-vitro-Diagnostikum	


Dako North America, Inc.
6392 Via Real
Carpinteria, California 93013 USA
Tel 805 566 6655
Fax 805 566 6688
Technical Support 800 424 0021
Customer Service 800 235 5763

EC REP
Dako Denmark A/S
Produktionsvej 42
DK-2600 Glostrup Denmark
Tel +45 4485 9500
Fax +45 4485 9595
www.dako.com

PT0039/Rev C

Edition 07/12