

**Monoclonal Mouse  
Anti-Human  
Cytokeratin, High Molecular Weight  
Clone 34βE12**

**ENGLISH**  
**Code M0630**

**Intended use**

For In Vitro Diagnostic Use.

Monoclonal mouse anti-human cytokeratin, High Molecular Weight (HMW), clone 34βE12 (anti-CK HMW, 34βE12) is intended for laboratory use to identify qualitatively, by light microscopy, the 66, 57, 51 and 49 kD proteins corresponding to cytokeratins 1, 5, 10 and 14 of the Moll catalog, in normal and neoplastic tissues in frozen or formalin-fixed paraffin-embedded tissue using immunohistochemical (IHC) test methods. Positive results aid in the subclassification of neoplastic tissue as carcinoma or epithelial in origin. Because anti-CK HMW, 34βE12 does not react with all carcinomas, another marker for simple epithelium must be incorporated into a panel of antibodies with anti-CK HMW, 34βE12 to aid in the differential diagnosis of anaplastic tumors of unknown origin. The clinical interpretation of any positive staining or its absence should be complemented by morphological and histological studies with proper controls. Evaluations should be made within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a qualified individual.

**Summary and explanation**

Cytokeratins are intermediate filament cytoskeletal proteins essential to development and differentiation of epithelial cells. Approximately twenty different cytokeratins have been identified and are classified and numbered according to molecular weight and isoelectric points.<sup>2</sup> In general, most low molecular weight cytokeratins (40-54 kD) are distributed in nonsquamous epithelium, Moll's catalog numbers 7-8 and/or 17-20.<sup>3</sup> High molecular weight cytokeratins (48-67 kD) are found in the squamous epithelium, Moll's catalog numbers 1-6 and/or 9-16.<sup>3</sup>

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: 34βE12<sup>1</sup> Isotype: IgG<sub>1</sub>, kappa  
Mouse IgG concentration mg/L: See label on vial.

M0630 may be used at a dilution of 1:50 when performing IHC using the LSAB<sup>TM</sup>2, EnVision<sup>TM</sup> or EnVision<sup>TM</sup> Doublestain detection systems. These are guidelines only. Optimal antibody concentrations may vary depending on specimen and preparation method and should be determined individually in each laboratory.

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

**Immunogen**

Solubilized immunogen keratin extracted from human stratum corneum

**Specificity**

Anti-CK HMW, 34βE12 has been shown to react with the 66, 57, 51 and 49 kD<sup>1</sup> proteins corresponding to cytokeratins 1, 5, 10 and 14 of the Moll catalog.<sup>1,2,4</sup>

Shah et al. suggested clinical usefulness of anti-CK HMW, 34βE12 as an aid in the differentiation of Paget's disease and Bowen's disease (carcinoma in situ) from Pagetoid superficial spreading melanoma.<sup>5</sup> Anti-CK HMW, 34βE12 positivity was reported in Paget's disease of the breast (5/5) and Bowen's disease (10/10), although 25% (1/4) of Paget's disease of the vulva and 0/6 of the Pagetoid superficial spreading melanomas stained.<sup>5</sup>

**Materials required, but not supplied**

Refer to Dako's *General Instructions for Immunohistochemical Staining* and/or the detection system instructions.

**Precautions**

1. For professional users.
2. This product contains sodium azide (NaN<sub>3</sub>), a chemical highly toxic in pure form. At product concentrations, though not classified as hazardous, NaN<sub>3</sub> 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.<sup>6</sup>
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-Cytokeratin HMW, 34βE12 can be used on formalin-, Methacarn- or Carnoy's-fixed, paraffin-embedded tissue sections. Tissue pretreatment for epitope enhancement is required.

The following enzymes can be used for pretreatment of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue: Proteolytic Enzyme, RTU (code S3007) or Proteinase K, RTU (code S3020), Pepsin (code S3002), Pronase (code S2013) or Trypsin (code S2012) for 5 minutes. Rinse thoroughly with distilled water and continue with the staining procedure of the detection system instructions.

As an alternative to enzyme pretreatment, heat-induced epitope retrieval can be used. Heat-induced epitope retrieval involves immersion of tissue sections in a pre-heated buffer solution and maintaining heat, either in a water bath (95–99 °C), a steamer (95–99 °C) or an autoclave (121 °C). 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 using a 20-minute heating protocol. After thermal treatment, allow the jar with buffer and slides to cool for 20 minutes at room temperature. Rinse well with buffer.

### Cryostat Sections and Cell Smears

Anti-CK HMW, 34βE12 can be used for labelling acetone- or methanol-fixed cryostat sections or fixed cell smears.

## Staining procedure

Follow the procedure for the detection system selected.

## Staining interpretation

The cellular staining pattern for anti-CK HMW, 34βE12 is cytoplasmic.

## Product specific limitations

1. Anti-CK HMW, 34βE12 cannot be used as the sole epithelial marker in the differential diagnosis of carcinomas from non-epithelial tumors because it does not react with simple epithelial tissues. It must be used in a panel of antibodies that includes a marker for simple epithelium, e.g. Cytokeratin clone 35βH11.<sup>7</sup>
2. Anti-CK HMW, 35βE12 displays its unique staining pattern in epithelial tissue. It can be used to differentiate the basal cell layer of the prostate, present in normal prostate and variable or absent in cases of prostate adenocarcinoma as well as benign conditions including inflamed acini, atypical adenomatous hyperplasia and postatrophic hyperplasia.<sup>11</sup>
3. Epithelioid sarcoma and synovial sarcoma have been shown to exhibit positive staining with various cytokeratin antibodies due to their epithelial nature.<sup>9,12</sup>
4. False-positive staining of glial cells and tumors with anti-CK HMW, 34βE12 has been reported on formalin-fixed frozen tissue when proteolytic pretreatment was employed. It was shown by immunocytochemical and biochemical methods that these cells and tumors do not express cytokeratins.<sup>10</sup>
5. An ascites preparation of clone anti-CK HMW, 34βE12 demonstrated unexpected positive staining of smooth muscle cells of normal human myometrium in methanol fixed frozen sections. In the same tissue fixed in methacarn and paraffin embedded, no reactivity was observed.<sup>13</sup>
6. It has been reported that antibodies specific for cytokeratin 8 and possibly 18 and 19 gave unexpected positive staining with leiomyomas and leiomyosarcomas.<sup>13,14</sup> The staining of these neoplasms is more apparent on frozen tissue than on formalin-fixed or paraffin-embedded tissue.<sup>13,14</sup> The anti-CK HMW, 34βE12 antibody is rarely positive with leiomyosarcomas; however, these results underscore the importance of using a panel of monoclonal antibodies in the analysis of poorly differentiated neoplasms. The incorporation of anti-muscle specific antibodies, e.g. desmin, into an antibody panel would aid in the correct interpretation of results.<sup>13</sup>

## Performance characteristics

### Normal Tissues

Normal epithelial tissue reactive with anti-CK HMW, 34βE12 include: squamous epithelium and sweat ducts in skin,<sup>4</sup> all epithelial layers including luminal and basal epithelium and ductal cells in breast,<sup>15</sup> some pneumocytes, mesothelium and bronchial epithelium in lung, collecting duct epithelia in kidney and ductal cells in the pancreas, bile ducts in the liver, and mesothelium and a portion of epithelium (cells with a more basal location) of the gastrointestinal tract.<sup>4</sup> Hepatocytes, pancreatic acinar cells, proximal renal tubules and nonepithelial normal tissues are not labeled by anti-CK HMW, 34βE12.<sup>4</sup>

Anti-CK HMW, 34βE12 stained mammary gland of the breast, squamous epithelia of the cervix, prostate gland, excretory duct of the lingual salivary gland, squamous epithelia of the skin, reticular cells and Hassall's bodies of the thymus, and squamous epithelium of the tonsil. No staining was demonstrated on adrenal, bone marrow, brain cerebellum or cerebrum, colon, heart, kidney, liver, lung, mesothelial cells, ovary, pancreas, parathyroid, pericardium, peripheral nerve, pituitary, skeletal muscle, small intestine, spleen, stomach, testis, thyroid or uterus.

### Abnormal Tissues

The anti-CK HMW, 34βE12 antibody positivity has been reported for squamous cell and ductal or transitional cell carcinomas including: squamous cell carcinoma of the skin, lung and nasopharynx, ductal carcinoma of the breast, pancreas, bile duct and salivary gland as well as transitional cell carcinomas of the bladder and nasopharynx and thymomas.<sup>8,13</sup> Anti-CK HMW, 34βE12 stained epithelial mesotheliomas, but failed to react with sarcomatoid or desmoplastic mesotheliomas.<sup>14</sup> Anti-CK HMW, 34βE12-negative epithelial tumors are either "acinar" type adenomas (e.g., pituitary) or adenocarcinomas of simple epithelia (e.g., endometrial carcinomas, renal and hepatocellular carcinomas) or neuroendocrine tumors.<sup>4,9,13</sup> Thus, anti-CK HMW, 34βE12 may be used as an aid in the subclassification of carcinomas.<sup>13</sup> It has been suggested also that anti-CK HMW, 34βE12 is useful in the differential diagnosis of small acinar lesions of the prostate gland.<sup>16</sup> Its diagnostic value may lie in the identification of basal cells. O'Malley et al.<sup>16</sup> saw positive staining of basal cells in 47 examples of benign prostatic lesions including atypical adenomatous hyperplasia (13), basal cell hyperplasia (11), atrophy (16), post-sclerotic hyperplasia (5) and (105464-004)

fibroepithelial nodule (2), while 21 cases of small-acinar adenocarcinomas showed no reactivity. It was stressed that loss of basal cell layer is not uniform in all prostatic adenocarcinomas. Basal cells are lost only in small-acinar adenocarcinomas. It was recommended that complete absence of staining of prostate lesions with anti-CK HMW, 34βE12 should be regarded as very suggestive, but not diagnostic of malignancy.

---

## FRANÇAIS

### Code M0630

#### Utilisation prévue

Pour diagnostic in vitro.

Le clone 34βE12 anti-cytokératine humaine monoclonale de souris (anti-CK HMW, 34βE12) à poids moléculaire élevé (HMW) est destiné à une utilisation en laboratoire pour identifier qualitativement, par microscopie optique, les protéines à poids moléculaire de 66, 57, 51 et 49 kD correspondant aux cytokératines 1, 5, 10 et 14 du catalogue Moll dans les tissus normaux et néoplastiques dans des coupes congelées ou fixées au formol incluses en paraffine, à l'aide de méthodes de tests immunohistochimiques (IHC). Des résultats positifs contribuent à établir une sous-classification des tissus néoplastiques (carcinome ou origine épithéliale). Comme le clone anti-CK HMW, 34βE12 ne réagit pas avec tous les carcinomes, il convient d'inclure un autre marqueur de l'épithélium simple dans un panel d'anticorps comportant le clone anti-CK HMW, 34βE12 afin de permettre un diagnostic différentiel des tumeurs anaplastiques d'origine indéterminée. L'interprétation clinique de tout marquage positif ou de toute absence doit être complétée par des études morphologiques et histologiques à l'aide de témoins appropriés. Les évaluations doivent être réalisées uniquement par un professionnel agréé dans le contexte de l'historique clinique du patient et d'autres examens.

#### Résumé et explication

Les cytokératines sont des protéines cytosquelettiques des filaments intermédiaires qui jouent un rôle déterminant dans le développement et la différenciation des cellules épithéliales. Près de vingt cytokératines différentes ont été identifiées, classées et numérotées en fonction de leur poids moléculaire et de leurs points isoélectriques.<sup>2</sup> En règle générale, les cytokératines dont le poids moléculaire est le plus faible (40 à 54 kD) sont réparties dans l'épithélium non squameux et portent les numéros 7-8 et/ou 17-20 dans le catalogue de Moll.<sup>3</sup> Les cytokératines d'un poids moléculaire élevé (48 à 67 kD) se situent dans l'épithélium squameux et portent les numéros 1-6 et/ou 9-16 dans le catalogue de Moll.<sup>3</sup>

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.

#### Réactif fourni

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: 34βE12<sup>1</sup> Isotype: IgG<sub>1</sub>, kappa  
Concentration de l'IgG de souris en mg/L : Voir l'étiquette sur le flacon.

Le produit M0630 peut être utilisé, à un taux de dilution de 1 :50, pour les IHC sur les systèmes de détection LSAB™2, EnVision™ ou EnVision™ Doublestain. Il ne s'agit là que de recommandations. Les concentrations d'anticorps optimales peuvent varier selon l'échantillon et la méthode de préparation, et doivent être déterminées par chaque laboratoire particulier.

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.

#### Immunogène

Kératine immunogène dissoute extraite de la couche stratum corneum humaine

#### Spécificité

Le clone 34βE12 anti-CK HMW s'est avéré réactif en présence des protéines d'un poids moléculaire de 66, 57, 51 et 49 kD<sup>1</sup> correspondant aux cytokératines 1, 5, 10 et 14 du catalogue de Moll.<sup>1,2,4</sup>

Shah et al. ont suggéré que le clone 34βE12, anti-CK HMW pourrait s'avérer utile et aider à différencier la maladie de Paget et la maladie de Bowen (carcinome in situ) d'un mélanome superficiel pagetoïde se propageant.<sup>5</sup> La positivité du clone 34βE12 anti-CK HMW a été établie dans les cas de maladie de Paget du sein (5/5) et de maladie de Bowen (10/10), bien que 25 % (1/4) des cas de maladie de Paget de la vulve et que 0 cas sur 6 de mélanomes superficiels pagetoïdes se propageant aient été colorés.<sup>5</sup>

#### Matériel requis non fourni

Se référer aux Dako's *Instructions Générales relatives à la procédure de Marquage Immunohistochimique* et/ou aux instructions du système de détection.

#### Précautions

1. Pour utilisateurs professionnels.
2. Ce produit contient de l'azide de sodium (NaN<sub>3</sub>), produit chimique hautement toxique dans sa forme pure. Aux concentrations du produit, bien que non classé comme dangereux, le NaN<sub>3</sub> 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.<sup>6</sup>
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

Conserver 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*

Le clone 34βE12 anti-cytokératine HMW peut s'employer sur des coupes de tissus incluses en paraffine fixées à l'aide de formol, de méthacarne ou dans du liquide de carnoy. Il est nécessaire de prétraiter les tissus pour la facilitation de l'épitope.

Les enzymes suivantes peuvent être utilisées dans le cadre du prétraitement de tissus inclus en paraffine fixés au formol : Enzyme protéolytique, RTU (code S3007) ou Protéinase K, RTU (code S3020), Pepsine (code S3002), Pronase (code S2013) ou Trypsine (code S2012) : pendant 5 minutes. Rincer soigneusement à l'eau distillée et poursuivre la procédure de coloration selon les instructions du système de détection.

Il est également possible de procéder à une restauration de l'épitope par la chaleur au lieu de procéder à un prétraitement enzymatique. La restauration de l'épitope par la chaleur implique d'immerger les coupes de tissus dans une solution tampon préalablement chauffée et de maintenir une température élevée, soit dans un bain-marie (95 à 99 °C), soit dans un four à vapeur (95 à 99 °C), soit encore dans un autoclave (121 °C). Pour assurer une meilleure adhérence des coupes de tissus sur les lames de verre, il est conseillé d'utiliser des lames silanisées (code S3003). Dans le cadre d'un protocole de chauffage durant 20 minutes, il est recommandé d'utiliser la solution de restauration cible (code S1700) ou 10x concentrée (code S1699). Après le traitement par la chaleur, laisser le tube contenant le tampon et les lames refroidir pendant 20 minutes à température ambiante. Rincer soigneusement avec le tampon.

### *Coupes au cryostat et frottis cellulaires*

Le clone 34βE12 anti-CK HMW peut être utilisé pour le marquage de coupes au cryostat fixées à l'acétone ou au méthanol, ou pour celui de frottis cellulaires fixés.

## Protocole d'immunomarquage

Suivre la procédure recommandée pour le système de détection sélectionné.

## Interprétation du marquage

Le modèle de coloration cellulaire du clone 34βE12 anti-CK HMW est cytoplasmique.

## Limites du produit

1. Le clone 34βE12 anti-CK HMW ne doit pas être le seul marqueur épithélial utilisé dans le cadre d'un diagnostic visant à différencier les carcinomes de tumeurs non épithéliales car il ne réagit pas avec les tissus épithéliaux simples. Il convient de l'utiliser dans un panel d'anticorps incluant un marqueur de l'épithélium simple tel que le clone 35βH11 cytokératine.<sup>7</sup>
2. Le clone 35βE12 anti-CK HMW affiche son modèle de coloration unique dans les tissus épithéliaux. Il permet également de différencier la couche de cellules basales de la prostate qui est présente dans les prostatites normales, et variable ou absente lorsqu'existent des adénocarcinomes prostatiques ou en présence de conditions bénignes telles que l'inflammation des acini, une hyperplasie adénomateuse atypique ou une hyperplasie postatrophique.<sup>11</sup>
3. Du fait de leur nature épithéliale, les sarcomes épithélioïdes et synoviaux présentent une coloration positive avec divers anticorps de la cytokératine.<sup>9,12</sup>
4. Une coloration faussement positive des cellules gliales et des tumeurs par le clone 34βE12 anti-CK HMW a été notée sur des coupes de tissus congelées fixées au formol en cas de prétraitement protéolytique. L'utilisation de méthodes immunocytochimiques et biochimiques a établi que ces cellules et tumeurs n'expriment pas les cytokératines.<sup>10</sup>
5. Les préparations d'ascites et de clone 34βE12 anti-CK HMW ont révélé une coloration positive inattendue des cellules du muscle lisse dans des coupes congelées fixées au méthanol de myomètre humain normal. Les mêmes tissus, fixés cette fois à la méthacarne et inclus en paraffine n'ont montré aucune réactivité.<sup>13</sup>
6. Il a été rapporté que les anticorps spécifiques de la cytokératine 8, et peut-être également des cytokératines 18 et 19 présentent une coloration positive inattendue en présence de léiomyomes et de leiomyosarcomes.<sup>13,14</sup> La coloration de ces néoplasmes est plus évidente sur les tissus congelés fixés au formol ou inclus en paraffine.<sup>13,14</sup> L'anticorps 34βE12 anti-CK HMW s'avère rarement positif en présence de léiomyosarcomes ; cependant, ces résultats mettent en évidence la nécessité d'utiliser un panel d'anticorps monoclonaux pour l'analyse des néoplasmes faiblement différenciés. L'ajout d'anticorps anti-muscle spécifiques, tels que la desmine, à un panel d'anticorps s'avérerait utile pour interpréter correctement les résultats obtenus.<sup>13</sup>

## Performances

### *Tissus normaux*

Parmi les tissus épithéliaux normaux réagissant au clone 34βE12 anti-CK HMW figurent : l'épithélium squameux et les canaux sudorifères de la peau ;<sup>4</sup> toutes les couches épithéliales, notamment l'épithélium luminal et basal et les cellules canalaire du sein ;<sup>15</sup> certains pneumocytes, mésothéliums et épithéliums bronchiques du poumon ; les épithéliums des canaux collecteurs rénaux et les cellules canalaire du pancréas ; les canaux biliaires du foie ainsi que le mésothélium et une partie de l'épithélium (cellules présentant une position plus basale) du tractus gastro-intestinal.<sup>4</sup> Les hépatocytes, les cellules acineuses pancréatiques, les tubules rénaux proximaux et les tissus normaux non épithéliaux ne sont pas marqués par le 34βE12 anti-CK HMW.<sup>4</sup>

Le clone 34βE12 anti-CK HMW a coloré les glandes mammaires du sein, les épithéliums squameux du col, la prostate, le canal d'excrétion de la glande salivaire linguale, les épithéliums squameux de la peau, les cellules réticulaires et les corpuscules de Hassal du thymus ainsi que l'épithélium squameux des amygdales. Aucune coloration n'a été notée sur les glandes surrénales, la moelle osseuse, le cerveau ou les hémisphères cérébraux du cerveau, le côlon, le cœur, les reins, le foie, les poumons, les cellules mésothéliales, les ovaires, le pancréas, la parathyroïde, le péricarde, les nerfs périphériques, l'hypophyse, les muscles squelettiques, l'intestin grêle, la rate, l'estomac, les testicules, la thyroïde ou l'utérus.

### Tissus anormaux

L'anticorps 34βE12 anti-CK HMW s'est également avéré positif avec les carcinomes des cellules squameuses et des cellules canalaire ou transitionnelles, notamment avec : les carcinomes des cellules squameuses de la peau, des poumons et du rhinopharynx, le carcinome canalaire du sein, du pancréas, des canaux biliaires et de la glande salivaire ainsi qu'avec les carcinomes des cellules transitionnelles de la vessie, du rhinopharynx et avec les thymomes.<sup>8,13</sup> Le 34βE12 anti-CK HMW a coloré les mésothéliomes épithéliaux, mais il n'a pas réagi avec les mésothéliomes sarcomateux et desmoplastiques.<sup>14</sup> Les tumeurs épithéliales ne réagissant pas au 34βE12 anti-CK HMW sont soit des adénomes de type « acineux » (par exemple de l'hypophyse) ou des adénocarcinomes des épithéliums simples (par exemple les carcinomes endométriaux, rénaux et hépatocellulaires) soit des tumeurs neuroendocriniennes.<sup>4,9,13</sup> C'est pourquoi le 34βE12 anti-CK HMW peut contribuer à établir la sous-classification des carcinomes.<sup>13</sup>

Il a été aussi suggéré que le 34βE12 anti-CK HMW s'avère utile pour différencier les petites lésions acineuses de la prostate.<sup>16</sup> Son intérêt diagnostique réside probablement dans sa capacité à identifier les cellules basales. O'Malley et al.<sup>16</sup> ont noté une coloration positive des cellules basales dans 47 exemples de lésions prostatiques bénignes parmi lesquelles l'hyperplasie adénomateuse atypique (13), l'hyperplasie des cellules basales (11), l'atrophie (16), l'hyperplasie post-scléreuse (5) et les nodules fibroépithéliaux (2), alors que 21 cas de petits adénocarcinomes acineux n'ont manifesté aucune réactivité. Il a été souligné que les pertes de la couche de cellules basales ne sont pas uniformes dans tous les adénocarcinomes prostatiques. Les cellules basales ne sont perdues que dans les petits adénocarcinomes acineux. On en déduit donc que l'absence totale de coloration des lésions prostatiques par le 34βE12 anti-CK HMW est fortement indicative d'une malignité, sans toutefois constituer un diagnostic irréfutable.

---

## DEUTSCH

### Code M0630

#### Zweckbestimmung

Zur Verwendung für In-vitro-Untersuchungen.

Monoclonal Mouse Anti-Human Cytokeratin, High Molecular Weight (HMW), Klon 34βE12 (Anti-CK HMW, 34βE12) ) ist zum Laborgebrauch für den qualitativen Nachweis von 66-, 57-, 51- und 49-kD-Proteinen, die den Cytokeratinen 1, 5, 10 und 14 des Mollschen Katalogs entsprechen, in gefrorenen oder formalinfixierten, paraffineingebetteten gesunden und neoplastischen Geweben mittels Lichtmikroskopie und immunhistochemischer (IHC-) Testmethoden bestimmt. Positive Ergebnisse unterstützen bei der Unterklassifikation neoplastischer Gewebe hinsichtlich ihrer Herkunft aus Karzinomen oder Epithelien. Da Anti-CK HMW, 34βE12, nicht mit allen Karzinomen reagiert, muss ein anderer Marker für einfache Epithelien in das Antikörper-Panel mit Anti-CK HMW, 34βE12, aufgenommen werden, um bei der Differenzialdiagnose anaplastischer Tumore unbekannter Herkunft zu unterstützen. Die klinische Bewertung einer vorhandenen oder fehlenden positiven Färbung sollte durch morphologische und histologische Studien mit entsprechenden Kontrollen ergänzt werden. Die Interpretation muss unter Berücksichtigung der klinischen Anamnese des Patienten und im Kontext weiterer diagnostischer Verfahren durch einen erfahrenen Pathologen erfolgen.

#### Zusammenfassung und Erläuterung

Cytokeratine sind Intermediärfilament-Zytoskelettproteine, die für die Entwicklung und Differenzierung von Epithelzellen bedeutsam sind. Ungefähr zwanzig unterschiedliche Cytokeratine sind bis heute identifiziert und klassifiziert sowie ihrem Molekulargewicht und ihren isoelektrischen Punkten entsprechend nummeriert worden.<sup>2</sup> Allgemein kommt die Mehrzahl der Cytokeratine mit geringem Molekulargewicht (40-54 kD) in Nicht-Plattenepithel vor, Mollsche Katalognummern 7-8 und/oder 17-20.<sup>3</sup> Cytokeratine mit hohem Molekulargewicht (48-67 kD) werden im Plattenepithel gefunden, Mollsche Katalognummern 1-6 und/oder 9-16.<sup>3</sup>

Folgende Angaben bitte den *Allgemeinen Richtlinien zur immunhistochemischen Färbung* von Dako bzw. den Anweisungen des Detektionssystems für IHC-Verfahren entnehmen: 1) Verfahrensprinzipien, 2) Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien, 3) Aufbewahrung, 4) Vorbereitung der Probe, 5) Färbeverfahren, 6) Qualitätskontrolle, 7) Fehlerbehebung, 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 ein Stabilisatorprotein.

Klon: 34βE12<sup>1</sup> Isotyp: IgG<sub>1</sub>, kappa

Maus IgG-Konzentration mg/L: Siehe Produktetikett.

M0630 kann bei der Durchführung von IHC-Tests unter Verwendung der Nachweissysteme LSAB<sup>TM</sup>2, EnVision<sup>TM</sup> oder EnVision<sup>TM</sup> Doublestain bei einer Verdünnung von 1:50 benutzt werden. Hierbei handelt es sich lediglich um Richtlinien. Die optimalen Antikörperkonzentrationen schwanken je nach Probe und Methode der Probenvorbereitung und sollten von jedem einzelnen Labor bestimmt werden.

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

#### Immunogen

Löslich gemachtes Immunogenkeratin, aus humanem Stratum corneum extrahiert

#### Spezifität

Anti-CK HMW, 34βE12, reagiert nachweislich mit den 66-, 57-, 51- und 49-kD<sup>1</sup>-Proteinen, die den Cytokeratinen 1, 5, 10 und 14 des Mollschen Katalogs entsprechen.<sup>1,2,4</sup>

Shah et al. legten den klinischen Nutzen von Anti-CK HMW, 34βE12, als Unterstützung bei der Differenzierung der Paget- und Bowen-Erkrankung (Karzinom in situ) vom pagetoiden, sich oberflächlich ausbreitenden Melanom nahe.<sup>5</sup> Eine positive Reaktion von Anti-CK HMW, 34βE12, wurde bei der Paget-Erkrankung der Mamma (5/5) und Bowen-Erkrankung (10/10) beschrieben, obwohl 25% (1/4) der Fälle von Paget-Erkrankung der Vulva und 0/6 der pagetoiden, oberflächlich ausbreitenden Melanome gefärbt wurden.<sup>5</sup>

#### **Zusätzlich benötigte Reagenzien und Zubehör (außerhalb des Lieferumfangs)**

Siehe *Allgemeine Richtlinien zur immunhistochemischen Färbung* von Dako und/oder Anweisungen des Detektionssystems.

#### **Vorsichtsmaßnahmen**

1. Nur für Fachpersonal bestimmt.
2. Dieses Produkt enthält Natriumazid (NaN<sub>3</sub>), eine in reiner Form äußerst giftige Chemikalie. Ansammlungen von NaN<sub>3</sub> 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 Azidansammlungen in den Leitungen vorzubeugen.<sup>6</sup>
3. Wie alle Produkte biologischen Ursprungs müssen auch diese entsprechend gehandhabt werden.
4. Entsprechende Schutzkleidung tragen, um Augen- und Hautkontakt zu vermeiden.
5. Nicht verwendete Lösung ist entsprechend örtlichen, bundesstaatlichen und staatlichen Richtlinien zu entsorgen.

#### **Aufbewahrung**

Bei 2–8 °C aufbewahren. Nach Ablauf des auf dem Fläschchen aufgedruckten Verfallsdatums 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. Positiv- und Negativkontrollen sollten daher zur gleichen Zeit wie die Patientenproben getestet 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-Cytokeratin HMW, 34βE12, kann auf formalin-, methacarn- oder carnoyfixierten, paraffineingebetteten Gewebeschnitten verwendet werden. Zur Epitopverstärkung ist eine Gewebepreparatur erforderlich.

Die folgenden Enzyme können für die Vorbehandlung formalinfixierter, paraffineingebetteter Gewebe verwendet werden: Proteolytisches Enzym, RTU (Kode S3007) oder Proteinase K, RTU (Kode S3020), Pepsin (Kode S3002), Pronase (Kode S2013) oder Trypsin (Kode S2012) über einen Zeitraum von 5 Minuten. Gründlich mit destilliertem Wasser spülen und mit der Färbeprozedur gemäß der Anleitung für das Nachweissystem fortfahren.

Als Alternative zur Enzymvorbehandlung kann das hitzeinduzierte Epitope-Retrieval angewandt werden. Das hitzeinduzierte Epitope-Retrieval verlangt das Eintauchen der Gewebeschnitte in eine vorgeheizte Pufferlösung und gleichbleibende Hitze, entweder im Wasserbad (95–99 °C) oder im Dampfgerät (95–99 °C) oder im Autoklav (121 °C). Um eine bessere Haftung der Gewebeschnitte an den Glasobjektträgern zu erzielen, wird der Gebrauch von silanisierten Objektträgern (Silanized Slides, Kode S3003) empfohlen. Unter Anwendung eines 20-minütigen Aufheizverfahrens wird Target Retrieval Solution (Kode S1700) oder Zehnfach-Konzentrat (Kode S1699) empfohlen. Nach der Hitzebehandlung muss das Gefäß mit dem Puffer und den Objektträgern 20 Minuten lang bei Raumtemperatur abkühlen. Mit dem Puffer gut spülen.

##### *Kryostasisschnitte und Zellabstriche*

Anti-CK HMW, 34βE12, kann zur Markierung azeton- oder methanolfixierter Kryostasisschnitte oder fixierter Zellabstriche verwendet werden.

#### **Färbeprozedur**

Folgen Sie der Prozedur für das ausgewählte Nachweissystem.

#### **Bewertung der Färbung**

Das zelluläre Färbemuster für Anti-CK HMW, 34βE12, ist zytoplasmatisch.

#### **Produktspezifische Beschränkungen**

1. Anti-CK HMW, 34βE12, kann nicht als alleiniger Epithelmarker bei der Differenzialdiagnose zwischen Karzinomen und Nicht-Epitheltumoren verwendet werden, da es nicht mit einfachen Epithelgeweben reagiert. Es muss als Teil eines Antikörper-Panels verwendet werden, das einen Marker für einfache Epithelien enthält, wie beispielsweise Cytokeratin, Klon 35βH11.<sup>7</sup>
2. Anti-CK HMW, 35βE12, weist im Epithelgewebe ein einzigartiges Färbemuster auf. Es kann zur Differenzierung der Basalzellschicht der Prostata verwendet werden, die in gesunder Prostata vorhanden ist und in Fällen von Prostata-Adenokarzinom sowie bei gutartigen Zuständen, einschließlich entzündeter Azini, atypischer adenomatöser Hyperplasie und postatropher Hyperplasie, variabel sein oder fehlen kann.<sup>11</sup>
3. Epithelsarkom und Synoviasarkom weisen aufgrund ihrer epithelialen Art eine positive Färbung mit verschiedenen Cytokeratin-Antikörpern auf.<sup>9,12</sup>
4. Eine falsch positive Färbung von Gliazellen und Tumoren mit Anti-CK HMW, 34βE12, wurde auf formalinfixiertem gefrorenem Gewebe bei Einsatz einer proteolytischen Vorbehandlung berichtet. Immunzytochemische und biochemische Methoden haben gezeigt, dass diese Zellen und Tumore keine Cytokeratine exprimieren.<sup>10</sup>
5. Ein Aszitespräparat des Klons Anti-CK HMW, 34βE12, zeigte eine unerwartete positive Färbung glatter Muskelzellen von gesundem humanem Myometrium auf methanolfixierten gefrorenen Schnitten. Bei demselben Gewebe, das methacarnfixiert und paraffineingebettet war, wurde keine Reaktivität beobachtet.<sup>13</sup>
6. Es wurde eine unerwartete positive Färbung von spezifischen Antikörpern für Cytokeratin 8 und möglicherweise Cytokeratin 18 und 19 mit Leiomyomen und Leiomyosarkomen berichtet.<sup>13,14</sup> Die Färbung dieser Neoplasmen erscheint deutlicher auf gefrorenem Gewebe als auf formalinfixiertem oder paraffineingebettetem Gewebe.<sup>13,14</sup> Der Anti-CK HMW, 34βE12-Antikörper reagiert selten positiv mit Leiomyosarkomen, jedoch unterstreichen diese Ergebnisse die Bedeutung der Verwendung eines Panels monoklonaler Antikörper bei der Analyse schwach differenzierter Neoplasmen. Die Aufnahme anti-muskel-spezifischer Antikörper wie Desmin in ein Antikörper-Panels würde die korrekte Bewertung von Ergebnissen unterstützen.<sup>13</sup>

## Leistungseigenschaften

### Normalgewebe

Gesunde und mit Anti-CK HMW, 34βE12, reagierende Epithelgewebe umfassen: Plattenzellepithel und Schweißgänge in der Haut,<sup>4</sup> alle Epithelschichten einschließlich luminalem und basalem Epithel und Gangzellen in der Mamma,<sup>15</sup> einige Pneumozyten, Mesothel und Bronchialepithel in der Lunge, Sammelgang-Epithelien in der Niere und Gangzellen im Pankreas, Gallengänge in der Leber und im Mesothel sowie ein Teil des Epithels (Zellen mit einer eher basalen Lokalisierung) des Gastrointestinaltrakts.<sup>4</sup> Hepatozyten, pankreatische Azinzellen, proximale renale Tubuli und gesunde Nicht-Epithelgewebe werden von Anti-CK HMW, 34βE12, nicht markiert.<sup>4</sup>

Anti-CK HMW, 34βE12, färbte Brustdrüse, Plattenzellepithelien des Cervix, Prostata-drüse, exkretorischen Gang der linguale Speicheldrüse, Plattenzellepithelien der Haut, retikuläre Zellen und Hassall-Körperchen des Thymus sowie Plattenzellepithel der Tonsillen. Die folgenden Gewebe zeigten keine Färbung: Nebenniere, Knochenmark, Gehirn (Cerebellum oder Cerebrum), Kolon, Herz, Niere, Leber, Lunge, Mesothelzellen, Ovar, Pankreas, Parathyroidea, Perikard, peripherer Nerv, Hypophyse, Skelettmuskel, Dünndarm, Milz, Magen, Hoden, Thyroidea oder Uterus.

### Anomale Gewebe









Der Anti-CK HMW, 34βE12-Antikörper zeigte eine positive Reaktion mit Plattenzell- und Gangzell- oder Übergangszellkarzinomen einschließlich: Plattenzellkarzinom von Haut, Lunge und Nasopharynx, Gangzell-Karzinom von Mamma, Pankreas, Gallengang und Speicheldrüse sowie Übergangszellkarzinome von Harnblase und Nasopharynx sowie Thymomen.<sup>8,13</sup> Anti-CK HMW, 34βE12, färbte Epithel-Mesotheliome, zeigte jedoch keine Reaktivität mit sarkomatoiden oder desmoplastischen Mesotheliomen.<sup>14</sup> Anti-CK HMW, 34βE12-negative Epitheltumore sind entweder Adenome vom „azinösen“ Typ (z.B. Hypophyse) oder Adenokarzinome einfacher Epithelien (z.B. Endometriumkarzinome, renale und hepatozelluläre Karzinome) oder neuroendokrine Tumore.<sup>4,9,13</sup> Anti-CK HMW, 34βE12, kann daher unterstützend bei der Unterklassifikation von Karzinomen verwendet werden.<sup>13</sup> Es wurde ebenfalls nahe gelegt, dass Anti-CK HMW, 34βE12, ein wertvolles Werkzeug bei der Differenzialdiagnose kleiner azinöser Läsionen der Prostata-drüse sein kann.<sup>16</sup> Sein diagnostischer Wert könnte im Nachweis von Basalzellen liegen. O'Malley et al.<sup>16</sup> beobachteten eine positive Färbung von Basalzellen in 47 Beispielen benigner Prostataläsionen einschließlich atypischer adenomatöser Hyperplasie (13), Basalzell-Hyperplasie (11), Atrophie (16), postsklerotischer Hyperplasie (5) und fibroepitheliale Nodulus (2), während 21 Fälle kleiner azinöser Adenokarzinome keine Reaktivität zeigten. Es wurde betont, dass der Verlust der Basalzellschicht kein gemeinsames Merkmal aller Prostata-Adenokarzinome ist. Die Basalzellen gehen nur in kleinen azinösen Adenokarzinomen verloren. Es wurde nahe gelegt, das vollständige Fehlen einer Färbung von Prostataläsionen mit Anti-CK HMW, 34βE12, als sehr suggestives, aber nicht als diagnostisches Zeichen einer Malignität aufzufassen.

## References

### Références

### Literatur

1. Gown AM, Vogel AM. Monoclonal antibodies to intermediate filament proteins of human cells: Unique and cross-reacting antibodies. *J Cell Biol* 1982;95(2 Pt 1):414-24
2. Moll R, Franke WW, Schiller DL. The catalog of human cytokeratins: Patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 1982;31(1):11-24
3. Miettinen M. Keratin immunohistochemistry: update of applications and pitfalls. *Pathol Ann* 1993;28 Pt 2:113-43
4. Gown AM, Vogel AM. Monoclonal antibodies to human intermediate filament proteins II. Distribution of filaments in normal human tissues. *Amer J Pathol* 1984;114(2):309-21
5. Shah KD, Tabibzadeh SS, Gergler MA. Immunohistochemical distinction of Paget's Disease from Bowen's Disease and superficial spreading melanoma with the use of monoclonal cytokeratin antibodies. *Amer J Clin Pathol* 1987;88(6):689-95
6. Department of Health, Education and Welfare, National Institute for Occupational Safety and Health, Rockville, MD. "Procedures for the decontamination of plumbing systems containing copper and/or lead azides." DHHS (NIOSH) Publ. No. 78-127, Current 13. August 16, 1976
7. Gown AM, Vogel AM. Monoclonal antibodies to human intermediate filament proteins III. Analysis of tumors. *Amer J Clin Pathol* 1985;84(4):413-24
8. Brawer MK, Peehl DM, Stamey TA, Bostwick DG. Keratin immunoreactivity in the benign and neoplastic human prostate. *Canc Res* 1985;45(8):3663-7
9. Hurlimann J, Gardiol D. Immunohistochemistry in the differential diagnosis of liver carcinomas. *Amer J Surg Pathol* 1991;15(3):280-8
10. Bacchi CA, Zarbo RJ, Jiang JJ, Gown AM. Do glioma cells express cytokeratin? *Appl Immunohistochem* 1995;3(1):45-53
11. Gown AM, Boyd HC, Chang Y, Ferguson M, Reichler B, Tippens D. Smooth muscle cells can express cytokeratins of "simple" epithelium. *Amer J Pathol* 1988;132(2):223-32
12. Brown DC, Theaker JM, Banks PM, Gatter KC, Mason DY. Cytokeratin expression in smooth muscle and smooth muscle tumors. *Histopathol* 1987;11(5):477-86
13. Dairkee SH, Puett L, Hackett AJ. Expression of basal and luminal epithelium-specific keratins in normal, benign and malignant breast tissue. *J Nat Can Inst* 1988;80(9):691-5
14. Bolen JW, Hammar SP, McNutt MA. Reactive and neoplastic serosal tissue: a light-microscopic, ultrastructural, and immunocytochemical study. *Amer J Surg Pathol* 1986;10(1):34-47
15. Varma M, Amin MB, Linden MD, Zarbo RJ. Discriminant staining pattern of small glandular and preneoplastic lesions of the prostate using high molecular weight cytokeratin antibody—A study of 301 consecutive needle biopsies. *Mod Pathol* 1997;10:93A
16. O'Malley FP, Grignon DJ, Shum DT. Usefulness of immunoperoxidase staining with high-molecular-weight cytokeratin in the differential diagnosis of small-acinar lesions of the prostate gland. *Virch Arch Pathol Anat* 1990;417(3):191-6

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

PT0039/Rev C



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

Edition 01/09