

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

Kód GA625

Použití	Pro diagnostiku in vitro. FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human BCL6 Protein, Clone PG-B6p, Ready-to-Use (Dako Omnis) je určen pro použití v imunohistochemii (IHC), společně s přístrojem Dako Omnis. Výsledky napomáhají klasifikaci difuzních lymfomů z velkých B-buněk, folikulárních lymfomů a Burkittových lymfomů (1). Diferenční klasifikaci napomáhají výsledky z panelu protilátek. Klinickou interpretaci zbarvení nebo jeho nepřítomnosti je třeba doplnit morfologickým vyšetřením s využitím patřičných kontrol a vyhodnotit s přihlédnutím k pacientově klinické anamnéze a k dalším diagnostickým testům provedeným kvalifikovaným patologem. Tato protilátka je určena k použití po primární diagnóze nádoru provedené konvenční histopatologií za použití neimunologických histochemických zbarvení.
Souhrn a vysvětlení	Proto-onkogen <i>BCL6</i> kóduje 92-98 kDa POZ/protein lapače zinku. Napříč jeho motivem 6 C-konce zinkového lapače se <i>BCL6</i> protein váže ke specifické DNA sekvenci cílových genů, kde působí jako transkripční represor (2, 3). Přestože nízké hladiny <i>BCL6</i> byly prokázány v mnoha tkáních, jeho exprese může být všudypřítomná. Avšak vysoké hladiny <i>BCL6</i> exprese se omezení na buňky B-lymfoidní linie a kosterního svalstva. V B-lymfoidní buněčné linii se exprese <i>BCL6</i> jeví jako pevně regulovaná po dobu diferenciace a silná exprese je pozorována především v germinativním centru (GC) B buněk, ale ne v plazmě buněk, v prekurzorech, v plášťové zóně a v paměťových B buňkách. Neoplastické protějšky GC B buněk, včetně difuzních lymfomů z velkých B-buněk, folikulárních a Burkittových lymfomů, též mohou vykazovat vysokou hladinu exprese <i>BCL6</i> (3). <i>BCL6</i> může být implikovaný v chromozomálních translokacích, ve kterých je regulační region <i>BCL6</i> genu nahrazený heterologním recipročním partnerem, jako u imunoglobulinových genů. Substituce promotoru vede k deregulaci <i>BCL6</i> exprese, která může být spojená s lymfogenézí (3). Nové uspořádání <i>BCL6</i> je jedna z nejčastějších genetických abnormalit v non-Hodgkinových lymfomech z B-buněk, s obzvlášť vysokou frekvencí (28–40 %) v difuzních lymfomech z velkých buněk (2). V příručce <i>General Instructions for Immunohistochemical Staining (Obecné pokyny pro imunohistochemické barvení)</i> nebo v návodu k systému detekce pro IHC metody naleznete informace týkající se těchto témat: Princip metody; Potřebné materiály, které nejsou součástí dodávky; Skladování, Příprava vzorků; Postup barvení; Kontrola kvality; Řešení problémů; Interpretace zbarvení; Obecná omezení.
Dodávaná reagencie	Monoklonální myší protilátka připravená k použití se dodává v kapalné podobě v pufru s obsahem stabilizujícího proteinu a 0,015 mol/l azidu sodného. <u>Klon:</u> PG-B6p (1). <u>Izotyp:</u> IgG1, kappa.
Imunogen	Rekombinantní glutation S-transferáza (GST)-BCL6 protein koresponduje s aminokyselinami 3-484 lidského BCL6 proteinu (1).
Specifita	Ve Western blotu totálního lyzátu Bjab buněk a BCL6 transfekovaných EB3 buněk, nebo kontrolovaných transfekovaných EB3 buněk, protilátka neznačila žádné pruhy, což poukazuje na nedostatek reaktivity denaturovaného BCL6 proteinu (1). SDS-PAGE analýza imunoprecipitátů formovaných mezi celkovými lyzáty Bjab buněk (BCL6+) a BCL6 transfekovaných EB3 buněk a protilátkou vykazuje reakce -95 kDa fragment korespondující s BCL6.
Bezpečnostní opatření	1. K diagnostice in vitro 2. Určeno pro profesionální uživatele. 3. Tento výrobek obsahuje azid sodný (NaN ₃), který je v čisté formě vysoce toxický. Koncentrace azidu sodného v produktu není sice klasifikována jako nebezpečná, nicméně sloučenina může reagovat s olovem a mědí v odpadním potrubí a vytvářet vysoce explozivní azidy těchto kovů. Při likvidaci splachujte dostatečným množstvím vody, aby nedocházelo k usazování azidů kovů v potrubí. 4. Jako u každého výrobku biologického původu je nutno dodržovat správné postupy zacházení. 5. Používejte odpovídající osobní ochranné prostředky, aby nedošlo k zasažení očí nebo pokožky. 6. Nespotřebované roztoky je nutno likvidovat v souladu s místními a celostátními předpisy.
Uchovávání	Skladujte při teplotě 2–8 °C. Během skladování musí být víčko uzavřené. Nepoužívejte po datu expirace uvedeném na lahvičce. Aplikační stabilita je 375 hodin. Aplikační stabilitu sleduje software Dako Omnis. Pokud se reagencie skladují za jakýchkoli jiných než uvedených podmínek, musí uživatel tyto podmínky ověřit. Případná nestabilita výrobku se neprojevuje žádnými známkami. Proto je nutno provádět současně s testováním vzorků pacienta pozitivní a negativní kontroly. Pokud zpozorujete neočekávané zbarvení, které nelze vysvětlit změnami laboratorních postupů, a máte podezření, že se jedná o problém s protilátkou, obraťte se na technickou podporu společnosti Dako.

Přehled postupů barvení*

Krok		Komentáře
Fixace/zalítí	Fixováno ve formalínu, zalito v parafínu	Odstranění parafínu v přístroji
Předběžné zpracování	EnVision FLEX, FLEX, High pH (kód V804)	30 v HIER
Protilátka	Ready-to-use	12,5minutová inkubace
Negative Control	FLEX Negative Control, Mouse (kód GA750)	12,5minutová inkubace
Vizualizace	EnVision FLEX (kód V800) + EnVision FLEX+ Mouse LINKER (kód V821)	Blok: 3 min; Link: 10 min; Polymer: 20 min; Chromogen: 5 min
Kontrastní barvivo	Hematoxylin (kód C808)	3minutová inkubace
Kontrolní tkáň	Mandle	Nukleární zbarvení
Sklička	FLEX IHC Microscope Slides (kód K8020)	Doporučeno kvůli lepší přilnavosti řezů tkání k podložním sklům.
Montáž	Je vyžadována bezvodá permanentní montáž	Po provedení barvení se řezy musí dehydratovat, vyčistit a namontovat pomocí permanentního montážního média
Vybavení	Dako Omnis	Cínidla se dodávají v ampulkách určených pro příslušný přístroj

*Uživatel se musí vždy seznámit s podrobnými pokyny k barvicímu postupu a s pokyny týkajícími se zacházení s produktem, které jsou uvedené v příbalové informaci.

Příprava vzorku

Parafinové řezy: Protilátku lze používat ke značení řezů tkání fixovaných ve formalínu a zalitých v parafínu. Vzorky tkání je nutno rozřezat na řezy o tloušťce 4 µm.

Předběžné zpracování: Je vyžadováno předběžné zpracování tkáňových řezů fixovaných ve formalínu a zalitých v parafínu tepelně indukovaným vyhledáváním epitopu (HIER). Doporučuje se předběžné zpracování tkání HIER pomocí naředěného roztoku EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Dako Omnis), kód GV804. Odstranění parafínu, rehydratace a vyhledání cíle se provádějí v přístroji Dako Omnis. Viz Základní uživatelská příručka Dako Omnis.

Přístroj Dako Omnis zajistí, aby tkáňové řezy během předběžného zpracování a následného imunohistochemického barvení nevyschly. Z důvodu vyšší přilnavosti řezů tkání k podložním sklům se doporučuje používat podložní skla FLEX IHC Microscope Slides, kód K8020.

Postup barvení

Program: V softwaru přístroje Dako Omnis jsou předem naprogramovány kroky barvení a inkubační doby. Podrobné pokyny ke vkládání podložních skl a plnění činidel naleznete v Základní uživatelské příručce Dako Omnis. Pokud není v systému Dako Omnis připraven protokol, kontaktujte technickou

podporu výrobce Dako. Všechny kroky inkubace se provádějí při teplotě 32 °C v přístroji Dako Omnis.

Vizualizace: Doporučený vizualizační systém je EnVision FLEX, High pH (Dako Omnis), kód GV800 v kombinaci s EnVision FLEX+ Mouse LINKER (Dako Omnis), kód GV821. Vizualizace se provádí v přístroji Dako Omnis.

Kontrastní barvení: Doporučené kontrastní barvivo je Hematoxylin (Dako Omnis), kód GC808. Kontrastní barvení se provádí v přístroji Dako Omnis.

Montáž: Po provedení barvení v přístroji Dako Omnis se řezy musí dehydratovat, vyčistit a namontovat pomocí permanentního montážního média.

Kontrola kvality: Tkáň pro pozitivní a negativní kontroly a také činidlo pro negativní kontrolu je nutno testovat vždy současně použitím stejného protokolu jako vzorky pacienta. Tkáň pro pozitivní kontrolu musí obsahovat mandle a buňky/struktury musí zobrazovat vzor reakce, jak je stanoveno pro tuto tkáň v části „Charakteristiky účinnosti“. Doporučené činidlo pro negativní kontrolu je FLEX Universal Negative Control, Mouse (Dako Omnis), kód GA750.

Interpretace zbarvení

Buňky značené protilátkou zobrazují difúzní/mikrogranulární zbarvení, které se omezuje na jádro. Cytoplazmatické barvení lze pozorovat u neoplastických buněk v mitóze (1).

Charakteristiky účinnosti

Normální tkáň: Na tonzile protilátka silně značila jádro centroblastů v šedé zóně a centrocytů v bazální a apikální světlé zóně zárodečných center. Protilátka dále značila přibližně 10% T buněk zárodečných center. Žádné značení nebylo pozorováno v plazmě buněk, v makrofázích, ve folikulárních dendritických buňkách a v IgD+/IgM+ folikulárních plášťových lymfocytech. V slezině byl barvicí vzor podobný tomu z mandlí a navíc protilátka značila jemně rozptýlené, lymfocytům podobné buňky nedefinovaného fenotypu. V extra lymfoidních tkáních protilátka slabě značila skvamózní epitel v tonzílách, tymusu a pokožce. Žádné zbarvení nebylo pozorováno v játrech, v štítné žláze, v příčně pruhovaném svalu nebo v ledvině (1). Buňky B zárodečného centra v mandlích vykazují středně silnou až silnou reakci zbarvení, zatímco skvamózní epitelální buňky vykazují slabou až středně silnou reakci zbarvení.









Abnormální tkáň: S touto protilátkou bylo testováno 173 případů lidských lymfoidních novotvarů. U lymfomů z B buněk nebo leukémií bylo značeno 24/24 lymfomů folikulárního centra, 29/30 difúzních lymfomů z velkých buněk a 13/13 Burkittových lymfomů. Žádné zbarvení nebylo pozorováno u 7/7 pre-B akutních lymfoblastických leukémií, 16/16 malo lymfocitických/B-CLL, 6/6 leukémií z vlasatých buněk, 22/22 leukémií z plášťových buněk a 14/14 lymfomů marginální zóny. U lymfomů T-buněk nebo leukémií bylo značeno 4/8 anaplastických lymfomů z velkých buněk, zatímco žádné zbarvení nebylo pozorováno v 10/10 případech akutních lymfoblastických lymfomů, v 3/3 houbových mykóz, v 6/6 lymfomů z periferních T-buněk a v 2/2 lymfomů z periferních T-buněk (ALLD-podobné). V Hodgkinově chorobě bylo značeno 5/5 nodulárních případů, především lymfocyty, 1/4 nodulárních skleróz a 1/3 případů se smíšeným typem buněk (1).

V systémových non-Hodgkinových lymfomech spojených s AIDS značila protilátka 11/11 lymfomů z malých nerozštěpených buněk, 7/7 lymfomů z velkých nerozštěpených buněk (LNCCL) a 2/9 imunoblastických lymfomových plazmaticoidů z velkých buněk (IBLP). U lymfomů AIDS centrálního nervového systému značila protilátka 4/4 LNCCL a žádný ze 4 případů IBLP. Žádné zbarvení nebylo pozorováno v 5 případech primárního efüzního lymfomu (PEL) a v 6 AIDS-PEL buněčných liniích (4).

Literatura

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.

Vysvětlivky k symbolům

 REF	Katalogové číslo	 2 °C - 8 °C	Teplotní rozmezí od do	 Použitelné do
 IVD	In vitro diagnostický zdravotnický prostředek	 LOT	Číslo šarže	 Výrobce
	Viz návod k použití	 EC REP	Autorizovaný zástupce v Evropské unii	



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

Revize 2020.11