

FLEX
Monoclonal Mouse
Anti-Human CD21
 Clone 1F8
Ready-to-Use
 (Link)

Code IR608

ENGLISH

Intended use	<p>For in vitro diagnostic use.</p> <p>FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human CD21, Clone 1F8, Ready-to-Use (Dako Autostainer/Autostainer Plus), is intended for use in immunohistochemistry together with Dako Autostainer/Autostainer Plus instruments. This antibody labels CD21-expressing follicular dendritic cells and mature B cells and is a useful aid for the classification of malignant lymphomas (1). Differential classification is aided by the results from a panel of antibodies. The clinical interpretation of any staining or its absence should be complemented by morphological studies using proper controls and should be evaluated within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a qualified pathologist. This antibody is intended to be used after the primary diagnosis has been made by conventional histopathology using nonimmunologic histochemical stains.</p>
Synonyms for antigen	C3d-receptor, CR2, EBV-receptor (2).
Summary and explanation	<p>CD21 is a transmembrane glycoprotein belonging to a family of complement regulatory proteins, comprising CD35, C4-binding protein, factor H and CD55. CD21 has a Mr of 145 000 and in its soluble form, sCD21, a Mr of 130 000. The extracellular region consists of multiple short consensus repeats, which contain several distinct ligand-binding sites. Binding of the specific ligands results in differential transmembrane signalling via the cytoplasmic tail that has potential protein kinase C and tyrosine kinase phosphorylation sites (2, 3).</p> <p>CD21 is expressed by follicular dendritic cells (FDCs) and mature B cells (3). FDCs form a three-dimensional meshwork in B-cell follicles, which apparently defines the structure of the follicular compartment (1). On lymphoid tissue B cells, CD21 expression is strong on marginal zone, and moderate on mantle zone B cells. Germinal centre B cells have been found to be negative with most CD21 mAbs, and bone marrow B cells have little or no CD21 expression. The expression of CD21 is gradually lost, together with IgD, after stimulation of resting B cells in vitro. Further, CD21 has been found on several types of epithelial cells, and with low expression on T-cell acute lymphoblastic leukemic cells, subsets of normal thymocytes, and mature T cells (3).</p> <p>Refer to <i>Dako General Instructions for Immunohistochemical Staining</i> or the detection system instructions of IHC procedures for: Principle of Procedure, Materials Required, Not Supplied, Storage, Specimen Preparation, Staining Procedure, Quality Control, Troubleshooting, Interpretation of Staining, General Limitations.</p>
Reagent provided	<p>Ready-to-use monoclonal mouse antibody provided in liquid form in a buffer containing stabilizing protein and 0.015 mol/L sodium azide.</p> <p><u>Clone:</u> 1F8 (4). <u>IsoType:</u> IgG1, kappa.</p>
Immunogen	CD21 preparation purified from human tonsils to 60% purity (4).
Specificity	<p>In Western blotting of the immunogen, the antibody labels a band of 145 kDa, corresponding to CD21. The epitope recognized by the antibody is located within a 72 kDa C3d-binding fragment (4).</p> <p>The antibody labels cells or cell lines known to express CD21 (Raji, NC 37, tonsil cells), whereas no labeling is observed in the CD21-negative Jurkat cells (T-cell line) and human erythrocytes (4).</p>
Precautions	<ol style="list-style-type: none"> 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	<p>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.</p>
Specimen preparation	<p>The antibody can be used for labeling formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. Tissue specimens should be cut into sections of approximately 4 µm. Pre-treatment with heat-induced epitope retrieval (HIER) is required. Optimal results are obtained by pretreating tissues using EnVision FLEX, Target Retrieval Solution, Low pH (50x) (Link) (Code K8005).</p> <p><u>Deparaffinized sections:</u> Pre-treatment of deparaffinized formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections is recommended using Dako PT Link. For details, please refer to the PT Link User Guide. The following parameters should be used for PT Link: Pre-heat temperature: 65 °C; epitope retrieval temperature and time: 97 °C for 20 (±1) minutes; cool down to 65 °C. Remove Autostainer slide rack with slides from the PT Link tank and immediately dip slides into a jar/tank (e.g., PT Link Rinse Station, Code PT109) containing diluted room temperature EnVision FLEX Wash Buffer (20x) (Link) (Code K8007). Leave slides in Wash Buffer for 1-5 minutes.</p> <p><u>Paraffin-embedded sections:</u> As alternative specimen preparation, both deparaffinization and epitope retrieval can be performed in the PT Link using a modified procedure. See the PT Link User Guide for instructions. After the staining procedure has been completed, the sections must be dehydrated, cleared and mounted using a permanent mounting method.</p> <p>The tissue sections should not dry out during the treatment or during the following immunohistochemical staining procedure. For greater adherence of tissue sections to glass slides, the use of Dako Silanized Slides (Code S3003) is recommended.</p>
Staining procedure	<p>The recommended visualization system is EnVision FLEX+, Mouse, High pH (Link) (Code K8002), replacing the High pH Target Retrieval Solution from this kit with EnVision FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x) (Link) (Code K8005). The staining steps and incubation times are pre-programmed into the Autostainer Link software. Please refer to the proper Autostainer Link User Guide for detailed instructions on loading slides and reagents. If the protocols are not available on the used Autostainer instrument, please contact Dako Technical Support. All incubation steps should be performed at room temperature.</p> <p>Optimal conditions may vary depending on specimen and preparation methods, and should be determined by each individual laboratory.</p> <p>Counterstaining in hematoxylin is recommended using EnVision FLEX Hematoxylin (Link) (Code K8008).</p> <p>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 "Performance characteristics". The recommended negative control reagent is FLEX Negative Control, Mouse (Link) (Code IR750)</p>
Staining interpretation	Cells labeled by the antibody display membrane staining.
Performance characteristics	<p><u>Normal tissues:</u> In reactive lymphoid hyperplasia, the antibody strongly labels germinal centre FDCs in 11/11 cases, with a densely meshed FDC staining of the light zone and a loosely arranged, much less compact FDC staining of the dark zone. The antibody labels plasma cells, and gives a faint and less consistent labeling of lymphocytes in the mantle zone. Sinus-lining cells and monocytoïd B cells are weakly labeled (1). The follicular dendritic cells in the</p>

germinal centers of tonsil show a moderate to strong staining reaction, whereas a subset of activated B cells in the mantle zone show a weak to moderate staining reaction.

Abnormal tissues: In six cases of B-cell chronic lymphocytic leukemia, the antibody showed weak surface labeling of neoplastic cells in four cases, and labeled FDCs in the sparse residual germinal centres in four cases. In 8/8 mantle cell lymphomas, the antibody labeled loosely arranged, ill-defined, and expanded FDC meshworks of either nodular or diffuse patterns, resembling broken-up primary follicles. In 11/11 follicular lymphomas, the abnormal follicles demonstrated dense, sharply defined, expanded and sometimes merging FDC meshworks. However, only loose and patchy FDC labeling was observed in five cases with high-grade transformation in the areas of diffuse large cell lymphoma. In 7/7 low-grade MALT-type B-cell lymphomas, the antibody labeled expanded FDC meshworks, with particularly dense and confluent appearance in cases of primary salivary gland and gastric lymphomas. In 5/5 T-cell and histiocyte-rich B-cell lymphomas, the antibody labeled a few compressed residual follicles at the periphery of the lymphomatous involvement. In 9/9 angioimmunoblastic T-cell lymphomas, clusters of dendritic cells with FDC morphology appeared with frequent incorporation of proliferating postcapillary venules. In 4/4 nodular lymphocyte predominance Hodgkin's lymphomas, the antibody labeled enlarged FDC meshworks overlapping the expanded mantle zones. In 15 cases of Hodgkin's lymphoma of nodular sclerosing subtype, the antibody labeled sharply defined, sometimes irregular FDC meshworks surrounding the negative tumor cells in 11 cases of grade I, and showed sparse or no labeling in 4 cases of grade II disease (1). In follicular dendritic sarcoma, the antibody labeled neoplastic cells in 17/17 cases (5). In another study (6) the antibody labeled Reed-Sternberg and Hodgkin's cells in 7/37 cases of nodular sclerosing, 2/41 cases of mixed cellularity, and 5/12 cases of lymphocyte depletion Hodgkin's lymphoma, whereas no labeling of tumor cells was observed in four cases of lymphocyte predominance type. In nine of the cases where Reed-Sternberg and Hodgkin's cells were labeled by the antibody, the cells expressed no other B- or T-cell associated markers (6).

FRANÇAIS

Utilisation prévue	Pour utilisation diagnostique in vitro. L'anticorps FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human CD21, Clone 1F8, Ready-to-Use (Dako Autostainer/Autostainer Plus), est destiné à une utilisation en immunohistochimie (IHC) avec les instruments Dako Autostainer/Autostainer Plus. L'anticorps marque les lymphocytes B matures et les cellules dendritiques folliculaires exprimant la cellule CD21. Cet anticorps facilite la classification des lymphomes malins (1). La classification différentielle est facilitée par les résultats provenant d'un panel d'anticorps. L'interprétation clinique de toute coloration ou son absence doit être complétée par des études morphologiques en utilisant des contrôles appropriés et doit être évaluée en fonction des antécédents cliniques du patient et d'autres tests diagnostiques par un pathologiste qualifié. Cet anticorps est destiné à être utilisé après un diagnostic primaire par histopathologie traditionnelle utilisant des colorations histochimiques non immunologiques.
Synonymes de l'antigène	récepteur de C3d, CR2, récepteur de l'EBV (2).
Résumé et explication	<p>La CD21 est une glycoprotéine transmembranaire qui appartient à une famille de protéines régulatrices du complément, comprenant la CD35, la protéine de liaison C4, le facteur H et la CD55. La CD21 a une masse moléculaire de 145 000 et, dans sa forme soluble, sCD21, une masse moléculaire de 130 000. La région extracellulaire est constituée de nombreuses répétitions de séquences courtes, qui comportent plusieurs sites distincts de liaison des ligands. La liaison de ligands spécifiques se traduit par une signalisation transmembranaire différentielle via la queue cytoplasmique qui peut comporter des sites de phosphorylation de la protéine kinase C et de la tyrosine kinase (2, 3).</p> <p>La CD21 est exprimée par les cellules dendritiques folliculaires et les lymphocytes B matures (3). Les dendritiques folliculaires forment un tissu tridimensionnel de follicules des lymphocytes B, qui définit apparemment la structure du compartiment folliculaire (1). Sur les lymphocytes B du tissu lymphoïde, l'expression de la CD21 est forte sur une zone marginale et modérée sur les lymphocytes B de la zone du manteau. Les lymphocytes B du centre germinatif se sont avérés être négatifs à la plupart des mAb de la CD21, et les lymphocytes B de la moelle osseuse présentent une expression très faible, voire aucune expression, de la CD21. L'expression de la CD21 se perd progressivement, en même temps que les IgD, après stimulation des lymphocytes B au repos in vitro. En outre, la CD21 s'avère présente sur plusieurs types de cellules épithéliales, et s'accompagne d'une faible expression sur les cellules de leucémies lymphoblastiques aiguës à lymphocytes T, de sous-ensembles de thymocytes normaux, et de lymphocytes T matures (3).</p> <p>Consulter le document <i>General Instructions for Immunohistochemical Staining</i> (Instructions générales de coloration immunohistochimique) de Dako ou les instructions du système de détection pour les procédures IHC : Principe de la procédure, Matériel requis mais non fourni, Conservation, Préparation des échantillons, Procédure de coloration, Contrôle de qualité, Dépannage, Interprétation de la coloration, Limites générales.</p>
Réactif fourni	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. <u>Clone</u> : 1F8 (4). <u>Isotype</u> : IgG1, kappa.
Immunogène	Préparation de CD21 purifiée issue d'amygdale humaine à une pureté de 60% (4).
Spécificité	Dans les analyses par Western blot de l'immunogène, l'anticorps marque des bandes de 145 kDa correspondant à la CD21. L'épitope reconnu par l'anticorps est situé au sein d'un fragment de liaison de la C3d de 72 kDa (4). L'anticorps marque les cellules ou lignées cellulaires connues pour exprimer la CD21 (Raji, NC 37, cellules d'amygdale), alors qu'aucun marquage n'est observé dans les cellules de Jurkat négatives à la CD21 (lignée de lymphocytes T) et dans les érythrocytes humains (4).
Précautions d'emploi	<ol style="list-style-type: none">1. Pour utilisation diagnostique in vitro.2. Pour utilisateurs professionnels.3. Ce produit contient de l'azide de sodium (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. Ne pas utiliser après la date de péremption imprimée sur le flacon. Si les réactifs sont conservés dans des conditions autres que celles indiquées, celles-ci doivent être validées par l'utilisateur. Il n'existe pas de signe particulier pour indiquer l'instabilité de ce produit. Par conséquent, des contrôles positifs et négatifs doivent être testés en même temps que les échantillons de patient. Si une coloration inattendue est observée, qui ne peut être expliquée par des différences dans les procédures du laboratoire et qu'un problème lié à l'anticorps est suspecté, contacter l'assistance technique de Dako.
Préparation des échantillons	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 d'environ 4 µm. Le prétraitement avec une restauration d'épitope induite par la chaleur (HIER) est nécessaire. Pour obtenir des résultats optimaux, prétraiter les tissus à l'aide du produit EnVision FLEX, Target Retrieval Solution, Low pH (50x) (Link) (réf. K8005). <u>Coupes déparaffinées</u> : Le prétraitement des coupes tissulaires déparaffinées, fixées au formol et incluses en paraffine, est recommandé à l'aide du Dako PT Link. Pour plus de détails, se référer au Guide d'utilisation du PT Link. Les paramètres suivants doivent être utilisés pour le PT Link : Température de préchauffage : 65 °C ; température et durée de restauration de l'épitope : 97 °C pendant 20 minutes (±1 minute) ; laisser refroidir jusqu'à 65 °C. Retirer le portoir à lames et les lames Autostainer de la cuve du PT Link et plonger immédiatement les lames dans un récipient/une cuve (par ex., PT Link Rinse Station, réf. PT109) contenant du tampon de lavage EnVision FLEX Wash Buffer (20x) (Link) (réf. K8007), dilué à température ambiante. Laisser les lames dans le tampon de lavage pendant 1 à 5 minutes. <u>Coupes incluses en paraffine</u> : Comme préparation alternative des échantillons, le déparaffinage et la restauration d'épitope peuvent être réalisés dans le PT Link à l'aide d'une procédure modifiée. Se référer aux instructions du Guide d'utilisation du PT Link. Une fois la procédure de coloration terminée, les coupes doivent être déshydratées, éclaircies et montées selon une méthode de montage permanent. Les coupes de tissus ne doivent pas sécher lors du traitement ni lors de la procédure de coloration immunohistochimique suivante. Pour une meilleure adhérence des coupes de tissus sur les lames de verre, il est recommandé d'utiliser des lames Dako Silanized Slides (réf. S3003).
Procédure de coloration	Le système de visualisation recommandé est le système EnVision FLEX+, Mouse, High pH (Link) (réf. K8002), en remplaçant la High pH Target Retrieval Solution de ce kit par le produit EnVision FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x) (Link) (réf. K8005). Les étapes de coloration et les temps d'incubation sont préprogrammés dans le logiciel Autostainer Link. Se reporter au Guide d'utilisation de l'Autostainer Link correspondant pour plus de détails sur le chargement des lames et des réactifs. Si les protocoles ne sont pas disponibles sur l'instrument Autostainer utilisé, contacter l'assistance technique Dako. Toutes les étapes d'incubation doivent être effectuées à température ambiante. Les conditions optimales peuvent varier en fonction de l'échantillon et des méthodes de préparation, et doivent être déterminées par chaque laboratoire individuellement. Il est recommandé d'effectuer une contre-coloration à l'aide de EnVision FLEX Hematoxylin (Link) (réf. K8008).

Les tissus de contrôle positifs et négatifs et 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 produit FLEX Negative Control, Mouse (Link) (réf. IR750).

Interprétation de la coloration Performances

Les cellules marquées par l'anticorps présentent une coloration membranaire.

Tissus sains : Dans l'hyperplasie lymphoïde réactive, l'anticorps marque fortement les cellules dendritiques folliculaires du centre germinatif dans 11 cas sur 11, avec une coloration des cellules dendritiques folliculaires fortement intriquée dans la zone claire et une coloration des cellules dendritiques folliculaires imprécise et beaucoup moins compacte dans la zone sombre. L'anticorps marque les cellules plasmatisques et entraîne un marquage faible et moins homogène des lymphocytes de la zone du manteau. Les cellules de la paroi sinusale et les lymphocytes B monocytoides sont faiblement marqués (1). Les cellules dendritiques folliculaires des centres germinatifs des amygdales présentent une coloration modérée à forte, tandis que la coloration d'un sous-ensemble de lymphocytes B activés est faible à modérée.

Tissus anormaux : Dans 6 cas de leucémie lymphoïde chronique à lymphocytes B, l'anticorps a présenté un marquage de surface faible des cellules néoplasiques dans quatre cas, ainsi qu'un marquage des cellules dendritiques folliculaires dans les centres germinatifs résiduels épars dans quatre cas. Dans 8 cas sur 8 de lymphome à cellules du manteau, l'anticorps a marqué des tissus de cellules dendritiques folliculaires étendus, mal définis et peu denses soit nodulaires soit diffus, ressemblant à des follicules primaires brisés. Dans 11 cas sur 11 de lymphomes folliculaires, les follicules anormaux ont présenté des tissus de cellules dendritiques folliculaires denses, nettement définis, étendus et parfois fusionnants. Cependant, seul un marquage de cellules dendritiques folliculaires imprécis et irrégulier a été observé dans cinq cas avec une transformation de haut grade dans les zones de lymphome diffus à grandes cellules. Dans 7 cas sur 7 de lymphome à lymphocytes B de type MALT de faible grade, l'anticorps a marqué des tissus de cellules dendritiques folliculaires étendus, avec une apparence particulièrement dense et confluyente dans les cas de lymphomes primaires gastriques et des glandes salivaires. Dans 5 cas sur 5 de lymphome à lymphocytes T et de lymphomes à lymphocytes B riches en histiocytes, l'anticorps a marqué quelques follicules résiduels comprimés à la périphérie de l'engagement lymphomateux. Dans 9 cas sur 9 de lymphome à lymphocytes T angio-immunoblastiques, des foyers de cellules dendritiques ayant une morphologie de cellules dendritiques folliculaires sont apparus avec une incorporation fréquente de veinules post-capillaires proliférantes. Dans 4 cas sur 4 de lymphome hodgkinien nodulaire à prédominance lymphocytaire, l'anticorps a marqué des tissus de cellules dendritiques folliculaires étendus chevauchant les zones du manteau étendues. Dans 15 cas de lymphome d'Hodgkin de sous-type nodulaire sclérosant, l'anticorps a marqué des tissus de cellules dendritiques folliculaires nettement définis, parfois irréguliers entourant des cellules tumorales négatives dans 11 cas de grade I, et a présenté un marquage épars, voire aucun marquage dans 4 cas de grade II (1). Dans le sarcome dendritique folliculaire, l'anticorps a marqué les cellules néoplasiques dans 17 cas sur 17 (5). Dans une autre étude (6), l'anticorps a marqué des cellules de Reed-Sternberg et d'Hodgkin dans 7 cas sur 37 de sclérose nodulaire, 2 cas sur 41 de lymphome à cellularité mixte, et 5 cas sur 12 de lymphome hodgkinien à déplétion lymphocytaire, alors qu'aucun marquage de cellules tumorales n'a été observé dans 4 cas de type à prédominance lymphocytaire. Dans 9 des cas où des cellules de Reed-Sternberg et de Hodgkin étaient marquées par l'anticorps, les cellules n'ont exprimé aucun autre marqueur associé aux lymphocytes B ou T (6).

DEUTSCH

Verwendungszweck

Zur In-vitro-Diagnostik.

FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human CD21, Clone 1F8, Ready-to-Use (Dako Autostainer/Autostainer Plus) ist zur Verwendung in der Immunhistochemie (IHC) in Verbindung mit Dako Autostainer/Autostainer Plus-Geräten bestimmt. Dieser Antikörper markiert folliculäre dendritische Zellen und reife B-Zellen, die CD21 exprimieren, und ist hilfreich bei der Klassifikation von malignen Lymphomen (1). Die Differenzialklassifikation wird durch die Ergebnisse eines Antikörper-Panels unterstützt. Die klinische Auswertung einer eintretenden oder ausbleibenden Färbung sollte durch morphologische Studien mit geeigneten Kontrollen ergänzt werden und von einem qualifizierten Pathologen unter Berücksichtigung der Krankengeschichte und anderer diagnostischer Tests des Patienten vorgenommen werden. Dieser Antikörper kommt nach der Primärdiagnose durch konventionelle Histopathologie unter Verwendung von nicht immunologischen histochemischen Färbungen zum Einsatz.

Synonyme Bezeichnungen des Antigens

C3d-Rezeptor, CR2, EBV-Rezeptor (2).

Zusammenfassung und Erklärung

CD21 ist ein transmembranes Glykoprotein aus der Familie komplementregulierender Proteine, wie u. a. CD35, C4-bindendes Protein, Faktor H und CD55. CD21 hat eine Mr von 145 000 und in seiner löslichen Form, sCD21, eine Mr von 130 000. Die extrazelluläre Region besteht aus mehreren Kurzkonsenswiederholungen, die mehrere klare ligandenbindende Stellen enthalten. Die Bindung der spezifischen Liganden ergibt eine differenzielle transmembranöse Signaltransduktion über den zytoplasmatischen Schwanz, der potenzielle Phosphorylierungsstellen von Proteinkinase C und Tyrosinkinase aufweist (2, 3).

CD21 wird von folliculären dendritischen Zellen (FDCs) und reifen B-Zellen exprimiert (3). FDCs bilden ein dreidimensionales Netzwerk in B-Zellfollikeln, das anscheinend die Struktur des folliculären Kompartiments definiert (1). Auf B-Zellen von lymphoidem Gewebe ist die CD21-Expression in Randzonen stark und in Mantelzonen-B-Zellen moderat ausgeprägt. Keimzentrum-B-Zellen wurden mit den meisten CD21 mAbs als negativ befunden und Knochenmark-B-Zellen weisen wenig oder keine CD21-Expression auf. Die Expression von CD21 geht zusammen mit IgD nach der Stimulierung von ruhenden B-Zellen in vitro schrittweise verloren. Außerdem wurde CD21 auf einigen Arten von Epithelzellen gefunden sowie mit geringer Expression auf akuten lymphoblastischen Leukämiezellen des T-Zellentyps, Untergruppen von normalen Thymozyten und reifen T-Zellen (3).

Folgende Angaben bitte den *General Instructions for Immunohistochemical Staining* (Allgemeine Richtlinien zur immunhistochemischen Färbung) von Dako bzw. den Anweisungen des Detektionssystems für IHC-Verfahren entnehmen: Verfahrensprinzipien; Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien; Lagerung; Gewebevorbereitung; Färbeverfahren; Qualitätskontrolle; Fehlerbehandlung; Auswertung der Färbung; Allgemeine Beschränkungen.

Geliefertes Reagenz

Gebrauchsfertiger, monoklonaler Maus-Antikörper in flüssiger Form in einem Puffer, der stabilisierendes Protein und 0.015 mol/L Natriumazid enthält.

Klon: 1F8 (4). **Isotyp:** IgG1, Kappa.

Immunogen

CD21-Präparat aus menschlichem Mandelgewebe, zu 60% rein (4).

Spezifität

Beim Western Blotting des Immunogens markiert der Antikörper Banden von 145 kDa, was CD21 entspricht. Das vom Antikörper erkannte Epitop ist innerhalb eines 72 kDa schweren, C3d-bindenden Fragments lokalisiert (4).

Der Antikörper markiert Zellen oder Zelllinien, von denen bekannt ist, dass sie CD21 exprimieren (Raji, NC 37, Mandelgewebezellen), wohingegen keine Markierung in den CD21-negativen Jurkat-Zellen (T-Zelllinie) und menschlichen Erythrozyten beobachtet wird (4).

Vorsichtsmaßnahmen

1. Zur In-vitro-Diagnostik.

2. Für Fachpersonal.

3. Dieses Produkt enthält Natriumazid (Na₃), eine in reiner Form äußerst giftige Chemikalie. Bei den in diesem Produkt verwendeten Konzentrationen kann Natriumazid, obwohl nicht als gefährlich klassifiziert, mit in Wasserleitungen vorhandenem Blei oder Kupfer reagieren und zur Bildung von hochexplosiven Metallazid-Anreicherungen führen. Nach der Entsorgung muss mit reichlich Wasser nachgespült werden, um Metall-Azid-Anreicherung zu vermeiden.

4. Wie alle Produkte biologischen Ursprungs müssen auch diese entsprechend gehandhabt werden.

5. Geeignete persönliche Schutzausrüstung (PSA) tragen, um Augen- und Hautkontakt zu vermeiden.

6. Nicht verwendete Lösung ist entsprechend örtlichen, staatlichen und EU-rechtlichen Richtlinien zu entsorgen.

Lagerung

Bei 2-8 °C aufbewahren. Nach Ablauf des auf dem Behälter aufgedruckten Verfallsdatums nicht mehr verwenden. Werden die Reagenzien unter anderen als den angegebenen Bedingungen aufbewahrt, müssen diese Bedingungen vom Benutzer überprüft werden. Es gibt keine offensichtlichen Anhaltspunkte für die mögliche Instabilität dieses Produkts. Es sollten daher die Positiv- und Negativkontrollen gleichzeitig mit den Patientengewebeproben mitgeführt werden. Wenn eine unerwartete Anfärbung beobachtet wird, welche durch Änderungen in den Labormethoden nicht erklärt werden kann, und falls Verdacht auf ein Problem mit dem Antikörper besteht, ist Kontakt mit dem technischen Kundendienst von Dako aufzunehmen.

Gewebevorbereitung

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

Es ist eine Vorbehandlung durch hitzeinduzierte Epitopdemaskierung (HIER-Verfahren) erforderlich. Optimale Ergebnisse können durch Vorbehandlung der Gewebe mit EnVision FLEX, Target Retrieval Solution, Low pH (50x) (Link) (Code-Nr. K8005) erzielt werden.

Entparaffinierte Schnitte: Die Vorbehandlung der entparaffinierten, formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebeschnitte sollte mit Dako PT Link erfolgen. Weitere Informationen hierzu siehe PT Link-Benutzerhandbuch. Für PT Link sind die folgenden Parameter zu verwenden: Temperatur auf 65 °C vorwärmen; Epitopdemaskierungstemperatur und -zeit: 97 °C für 20 (±1) Minuten; auf 65 °C abkühlen. Autostainer-Objektträgerhalter mit Objektträgern aus dem PT Link-Tank nehmen und die Objektträger sofort in einen Behälter/Tank (z. B. PT Link Rinse Station, Code-Nr. PT109) mit verdünntem, auf Raumtemperatur gebrachttem EnVision FLEX Wash Buffer (20x) (Code-Nr. K8007) tauchen. Die Objektträger 1-5 Minuten im Waschpuffer belassen.

Paraffineingebettete Schnitte: Alternativ können Entparaffinierung und Epitopdemaskierung im PT Link unter Verwendung eines modifizierten Verfahrens durchgeführt werden. Weitere Informationen finden Sie im PT Link-Benutzerhandbuch. Nach Abschluss des Färbeverfahrens müssen die Schnitte dehydriert, geklärt und mit einer permanenten Eindeckmethode eingedeckt werden.

Während der Gewebepreparierung oder während des anschließenden immunhistochemischen Färbeverfahrens dürfen die Gewebeschnitte nicht austrocknen. Für eine bessere Haftung der Gewebeschnitte an den Glas-Objektträgern werden Dako Silanized Slides (Code-Nr. S3003) empfohlen.

Färbeverfahren

Das empfohlene Detektionssystem ist EnVision FLEX+, Mouse, High pH (Link) (Code-Nr. K8002), das die High pH Target Retrieval Solution dieses Kits durch EnVision FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x) (Link) (Code-Nr. K8005) ersetzt. Die Färbeschritte und Inkubationszeiten sind in der Autostainer Link-Software vorprogrammiert. Detaillierte Anweisungen zum Laden der Objektträger und Reagenzien bitte dem Benutzerhandbuch zum Autostainer Link entnehmen. Wenn die Protokolle auf dem verwendeten Autostainer-Gerät nicht verfügbar sind, wenden Sie sich an den technischen Kundendienst von Dako. Alle Inkubationsschritte sollten bei Raumtemperatur durchgeführt werden.

Optimale Bedingungen können je nach Gewebe und Präparationsverfahren unterschiedlich sein und sollten vom jeweiligen Labor selbst ermittelt werden. Die Gegenfärbung in Hämatoxylin sollte mit EnVision FLEX Hämatoxylin (Link) (Code-Nr. K8008) ausgeführt werden.

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 unter „Leistungseigenschaften“ beschriebenen Reaktionsmuster aufweisen. Das empfohlene Negativkontrollreagenz ist FLEX Negative Control, Mouse (Link) (Code-Nr. IR750).

Auswertung der Färbung

Mit diesem Antikörper markierte Zellen weisen eine Membranfärbung auf.

Leistungseigenschaften










Normalgewebe: Bei reaktiver lymphoider Hyperplasie markiert der Antikörper Keimzentrum-FDCs in 11/11 Fällen stark mit einer dicht vernetzten FDC-Färbung der hellen Zone und einer locker angeordneten, viel weniger kompakten FDC-Färbung der dunklen Zone. Der Antikörper markiert Plasmazellen und erzeugt eine schwache und weniger konsistente Markierung von Lymphozyten in der Mantelzone. Sinusdeckzellen und monozytoide B-Zellen werden schwach markiert (1). Die folliculären dendritischen Zellen im Keimzentrum der Mandeln zeigen eine mäßige bis starke Färbereaktion, während eine Untergruppe aktivierter B-Zellen in der Mantelzone eine schwache bis mäßige Färbereaktion zeigen.

Anormales Gewebe: In sechs Fällen von chronischer lymphozytärer B-Zellen-Leukämie zeigte der Antikörper in vier Fällen eine schwache Oberflächenmarkierung neoplastischer Zellen und markierte in vier Fällen FDCs in vereinzelten Keimzentrumsresten. In 8/8 Fällen von Mantelzelllymphomen markierte der Antikörper locker angeordnete, schlecht definierte und erweiterte FDC-Netzwerke von nodulärer oder diffuser Gestalt, die gebrochenen primären Follikeln ähneln. In 11/11 Fällen von folliculären Lymphomen zeigten die anormalen Follikel dichte, klar definierte, erweiterte und manchmal sich mischende FDC-Netzwerke. Allerdings wurde in fünf Fällen mit hoher Transformation in den Bereichen mit diffusem großzelligem Lymphom nur eine vereinzelte und lockere FDC-Markierung beobachtet. In 7/7 Fällen von niedriggradigen B-Zell-Lymphomen vom MALT-Typ markierte der Antikörper erweiterte FDC-Netzwerke mit besonders dichter und konfluenter Erscheinung in Fällen von primären Speicheldrüsen- und Magenlymphomen. In 5/5 Fällen von T-Zell- und histiozytenreichen B-Zell-Lymphomen markierte der Antikörper einige komprimierte Restfollikel im Peripheriebereich des lymphomatosen Bereichs. In 9/9 Fällen von angioimmunoblastischen T-Zell-Lymphomen erschienen Gruppen dendritischer Zellen mit FDC-Morphologie mit häufiger Aufnahme proliferierender postkapillärer Venolen. In 4/4 Fällen von nodulären, durch Prädominanz von Lymphozyten gekennzeichneten Hodgkin-Lymphomen markierte der Antikörper vergrößerte FDC-Netzwerke, die die erweiterten Mantelzonen überlappen. Bei 15 Fällen von Hodgkin-Lymphomen des nodulären, sklerosierenden Untertyps markierte der Antikörper klar definierte, manchmal unregelmäßige FDC-Netzwerke um die negativen Tumorzellen in 11 Fällen mit Grad I und zeigte zerstreute oder keine Markierung in 4 Fällen mit Grad-II-Erkrankung (1). Bei folliculärem dendritischem Sarkom markierte der Antikörper neoplastische Zellen in 17/17 Fällen (5). In einer anderen Studie (6) markierte der Antikörper Reed-Sternberg- und Hodgkin-Zellen in 7/37 Fällen von nodulär sklerosierendem, 2/41 Fällen von gemischtzelligem und 5/12 Fällen von lymphozytenarmem Hodgkin-Lymphom, wohingegen keine Markierung von Tumorzellen in 4 Fällen des durch Prädominanz von Lymphozyten gekennzeichneten Typs beobachtet wurde. In 9 Fällen, in denen Reed-Sternberg- und Hodgkin-Zellen durch den Antikörper markiert wurden, exprimierten die Zellen keine anderen auf B- oder T-Zellen bezogenen Marker (6).

References / Bibliographie / Literaturnachweise

1. Bagdi E, Krenacs L, Krenacs T, Miller K, Isaacson PG. Follicular dendritic cells in reactive and neoplastic lymphoid tissues: a reevaluation of staining patterns of CD21, CD23, and CD35 antibodies in paraffin sections after wet heat-induced epitope retrieval. *Appl Immunohistochem Molecul Morphol* 2001; 9:117-24.
2. Timens W. CD Guide. CD21. In: Kishimoto T, Kikutani H, von dem Borne AEG, Goyert SM, Mason DY, Miyasaka M, et al., editors. *Leucocyte typing VI. White cell differentiation antigens. Proceedings of the 6th International Workshop and Conference*; 1996 Nov 10-14; Kobe, Japan. New York, London: Garland Publishing Inc.; 1997. p. 1125.
3. Timens W. BC5. CD21 workshop panel report. In: Kishimoto T, Kikutani H, von dem Borne AEG, Goyert SM, Mason DY, Miyasaka M, et al., editors. *Leucocyte typing VI. White cell differentiation antigens. Proceedings of the 6th International Workshop and Conference*; 1996 Nov 10-14; Kobe, Japan. New York, London: Garland Publishing Inc.; 1997. p. 140-2.
4. Petzer AL, Schulz TF, Stauder R, Eigentler A, Myones BL, Dierich MP. Structural and functional analysis of CR2/EBV receptor by means of monoclonal antibodies and limited tryptic digestion. *Immunology* 1988; 63:47-53.
5. Chan JKC, Fletcher CDM, Nayler SJ, Cooper K. Follicular dendritic cell sarcoma. Clinicopathologic analysis of 17 cases suggesting a malignant potential higher than currently recognized. *Cancer* 1997;79:294-313.
6. Nakamura S, Nagahama M, Kagami Y, Yatabe Y, Takeuchi T, Kojima M, et al. Hodgkin's disease expressing follicular dendritic cell marker CD21 without any other B cell marker. A clinicopathologic study of nine cases. *Am J Surg Pathol* 1999; 23:363-76.

Explanation of symbols / Explication des symboles / Erläuterung der Symbole

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



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