FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human CD20cy Klon L26 Ready-to-Use
(Dako Omnis)

Kód GA604

Použití

Pro diagnostiku in vitro.

FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human CD20cy, klon L26, Ready-to-Use (Dako Omnis), je určena pro použití v imunohistochemii (IHC) společně s přístrojem Dako Omnis. Tato protilátka značí buňky linie B a je užitečná při klasifikaci novotvarů odvozených z B-buněk (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 provedené konvenční histopatologií za použití neimunologických histochemických zbarvení.

Synonyma antigenu

L26 (2).

Souhrn a výklad

CD20 je transmembránový neglykosylovaný protein nacházející se v prekurzorech buněk B a ve zralých buňkách B, po diferenciaci do plazmových buněk se však ztratí (3). V klidových buňkách B se CD20 objevuje v nefosforylované formě s molekulární hmotností 33 kDa. Po stimulaci mitogenu bude CD20 výrazně fosforylovaný (izoformy s molekulární hmotností 35-37 kDa) a představuje dominantní fosfoprotein v aktivních buňkách B, řadách buněk B a v leukémiích vlasatých buněk (2). Dlouhé N- a C-koncové zakončení proteinu se nacházejí na cytoplazmatické straně membrány a jen malá část proteinu je exponována na buněčném povrchu (3). Protilátky reagující s cytoplazmatickými epitopy CD20 jsou označené jako CD20cy (2). Předpokládá se, že CD20 hraje přímou úlohu v oblasti regulace transmembránově vodivého Ca^{2+} toku buněk B, což naznačuje možnou funkci CD20 jako regulátoru proliferace a diferenciace (3).

V příručce *General Instructions for Immunohistochemical Staining* (Obecné pokyny pro imunohistochemické barvení) společnosti *Dako* 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 vzorku, Postup barvení, Kontrola kvality, Řešení problémů, Interpretace zabarvení, 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.

Klon: L26 (1, 4). Izotyp: IgG2a, kappa.

Imunogen

B buňky z lidských mandlí (4).

Specificita

Látka Anti-Human CD20cy, klon L26 byla vytvořena seskupením jako anti-CD20 na Fifth International Workshop and Conference on Human Leucocyte Differentiation Antigens (Pátý mezinárodní seminář a konference o antigenech pro diferenciaci lidských leukocytů) (2).

SDS-PAGE analýza imunousazenin vytvořených mezi lyzátem buňky z mandlí, označeným ^{125}I a protilátkou vykazuje primární reakci s polypeptidy s molekulární hmotností 30 kDa a 33 kDa (4).

Studie, které používaly buňky COS-1 transfekované s cDNA kódující molekulu CD20 naznačují, že protilátka značí intracytoplazmatický epitop nacházející se na molekule CD20 (5).

Bezpečnostní opatření

1. Pro diagnostiku 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 řádná bezpečnostní opatření.
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 exspirace 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 zabarvení, které nelze vysvětlit změnami laboratorních postupů, a máte podezření, že se jedná o problém s protilátkou, obraťte se na technickou podporu společnosti Dako.

Šablona protokolu barvení*

Krok		Komentáře
Fixace/zalití	Fixováno ve formalínu, zalito v parafínu	Odstranění parafínu v přístroji
Předběžné zpracování	EnVision FLEX, FLEX, High pH (kód GV804)	30 min HIER
Protilátka	Ready-to-use	12,5minutová inkubace
Negativní kontrola	FLEX Negative Control, Mouse (kód GA750)	12,5minutová inkubace
Vizualizace	EnVision FLEX (kód GV800) + EnVision FLEX+ Mouse LINKER (kód GV821)	Blok: 3 min; Link: 10 min; Polymer: 20 min; Chromogen: 5 min
Kontrastní barvivo	Hematoxylin (kód GC808)	3minutová inkubace
Kontrolní tkáň	Mandle	Cytoplazmatická strana povrchové buněčné membrány
Sklíčka	FLEX IHC Microscope Slides (kód K8020)	Doporučeno kvůli lepší přilnavosti řezů tkání k podložním sklům.
Montáž	Je vyžadována bezvodá permanentní montáž	Po barvení je třeba řezy dehydratovat, vyčistit a montovat za použití permanentní montážní metody
Vybavení	Dako Omnis	Činidla 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 k 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 skel 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 permanentní montážní metody.

Kontrola kvality: Tkáně 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“. Doporučená reagencie pro negativní kontrolu je FLEX Universal Negative Control, Mouse (Dako Omnis), kód GA750.

Omezení specifická pro tento produkt

Byly prokázány ojedinělé případy lymfomů periferní buňky T exprimující CD20 (7, 8).

Interpretace zbarvení

Buňky B označené protilátkou vykazují zabarvení cytoplazmatické strany membrány buněčného povrchu.

Charakteristiky účinnosti

Normální tkáně: V normální lymfatické tkáni tato protilátka značí buňky zárodečného centra, lymfocyty plášťové zóny a rozptýlené interfolikulární lymfocyty, ne však buňky T, histiocyty a plazmatické buňky (6, 7). Nebylo zjištěno žádné označení v epidermu, mazových žlázách, vlasových folikulech a vylučovacích žlázách pokožky, folikulárním epitelu v brzlíku, pneumocytech a průduškovém epitelu plic, a ve velkém počtu jiných normálních nelymfatických testovaných tkáních (6). Plášťová zóna a buňky B zárodečného centra v mandlích vykazují středně silnou až silnou reakci zabarvení, zatímco izolované buňky B v játrech vykazují slabou až středně silnou reakci zabarvení.

Abnormální tkáně: Reakce s protilátkou byla zjištěna ve většině ze 131 případů testovaných novotvarů buňky B (1). Označování pomocí protilátky naznačuje, že v rámci diferenciace buněk B se antigen CD20 nenachází ve velmi nevyzrálých lymfatických buňkách (0/6 případů akutních nediferencovaných leukémií), avšak jeho výskyt začíná v raných fázích zrání (14/34 případů akutních lymfoblastických a 7/9 případů pre-B akutních lymfoblastických leukémií). Následně se antigen CD20 plně nachází ve zralých buňkách B (15/15 případů chronických lymfocytických, 3/3 případů prolymfocytických, 3/3 případů vlasatých buněk, 6/7 lymfosarkomových buněčných leukémií, a v 45/46 případů maligních lymfomů buňky B včetně Burkittových, Waldenströmových lymfomů a imunoblastických lymfomů buňky B. Antigen CD20 se ztrácí v plazmových buňkách a protilátka značila jen 1/2 případů leukémie plazmových buněk a 0/12 případů meylomů (1). Jiné studie poskytly srovnatelné výsledky vykazující pozitivní označení 44/44 případů velkobuněčných a imunoblastických lymfomů buňky B (6), a všech 40 lymfomů buňky B, s výjimkou běžných akutních lymfoblastických leukémií a maligního plazmacytického lymfomu. V rámci Hodgkinova onemocnění bylo výrazné zabarvení povrchové membrány Reed-Sternbergových buněk pozorováno v 9 z 27 případů (7). V případě lymfoproliferativních onemocnění rodu buněk T bylo 0/73 případů označených protilátkou (1), zatímco jiné studie uvádějí 1/18 (7) a 1/111 (8) značených případů.

Literatura

1. Takami T, Qi C-F, Yamada T, Yamashina M, Kon S-I, Ishii Y, et al. B20.3. Reactivity and specificity of L26 (pan-B-cell mAb) on 322 cases of fresh and paraffin-embedded lymphoproliferative diseases. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, Rieber EP, Schmidt RE, Stein H, et al., editors. Leukocyte typing IV. White cell differentiation antigens. Proceedings of the 4th International Workshop and Conference; 1989 Feb 21-25; Vienna, Austria. Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press; 1989. p. 134-6.
2. Zhou L-J, Tedder TF. CD20 workshop panel report. In: Schlossman SF, Boumsell L, Gilks W, Harlan JM, Kishimoto T, Morimoto C, et al., editors. Leukocyte typing V. White cell differentiation antigens. Proceedings of the 5th International Workshop and Conference; 1993 Nov 3-7; Boston, USA. Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press; 1995. p. 511-4.
3. Tedder TF, Engel P. CD20: a regulator of cell-cycle progression of B lymphocytes. Immunology Today 1994;15:450-4.
4. Ishii Y, Takami T, Yuasa H, Takei T, Kikuchi K. Two distinct antigen systems in human B lymphocytes: identification of cell surface and intracellular antigens using monoclonal antibodies. Clin Exp Immunol 1984;58:183-92.
5. Mason DY, Comans-Bitter WM, Cordell JL, Verhoeven MAJ, van Dongen JJM. Antibody L26 recognizes an intracellular epitope on the B-cell-associated CD20 antigen. Am J Pathol 1990;136:1215-22.
6. Cartun RW, Coles FB, Pastuszak WT. Utilization of monoclonal antibody L26 in the identification and confirmation of B-cell lymphomas. A sensitive and specific marker applicable to formalin- and B5-fixed, paraffin-embedded tissues. Am J Pathol 1987;129:415-21.
7. Norton AJ, Isaacson PG. Monoclonal antibody L26: an antibody that is reactive with normal and neoplastic B lymphocytes in routinely fixed and paraffin wax embedded tissue. J Clin Pathol 1987;40:1405-12.
8. Blakolmer K, Vesely M, Kummer JA, Jurecka W, Mannhalter C, Chott A. Immunoreactivity of B-cell markers (CD79a, L26) in rare cases of extranodal cytotoxic peripheral T- (NK/T-) cell lymphomas. Mod Pathol 2000;13:766-72.

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