

**FLEX**  
**Monoclonal Rabbit**  
**Anti-Human**  
**Cyclin D1**  
Klon EP12  
**Ready-to-Use**  
(Dako Omnis)

**Kód GA083**

**Použití**

Pro diagnostiku in vitro.

FLEX Monoklonální Rabbit Anti-Human Cyclin D1, klon EP12, Ready-to-Use (Dako Omnis), je určena pro použití v imunohistochemii (IHC) společně s přístrojem Dako Omnis. Tato protilátka značí buňky exprimující cyclin D1 ve tkáních fixovaných ve formalínu a zalitých v parafínu (1). Diferenční klasifikaci nádorů 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 tumoru provedené konvenční histopatologií za použití neimunologických histochemických zbarvení.

**Synonyma antigenu**

PRAD-1, CCND1, Bcl-1 (1).

**Souhrn a výklad**

Cyclin D1 je protein o molekulové hmotnosti 36 kDa kódovaný genem CCND1 (bcl-1) umístěný na chromozomu 11q13. Cyclin D1 se spojuje s cyclin-dependentními kinázami (CDK) CDK4 a CDK6 a aktivuje je (1–3). Protein působí jako CDK-dependentní regulátor buněčného cyklu fosforylací a inaktivací proteinu retinoblastom, čímž umožňuje progresi přes G1-S fázi buněčného cyklu (1–3). Cyclin D1 se také podílí na buněčném cyklu funkcí nezávislých na CDK, včetně asociace a regulace řady transkripčních faktorů a transkripčních koregulátorů. Je prokázáno, že se cyclin D1 zapojuje do regulace buněčného metabolismu, diferenciace tukových buněk a migrace buněk (1–3). Nadměrná exprese cyclinu D1 se pojí s tumorigenezí, přičemž genová amplifikace CCND1 anebo nadměrná exprese byla prokázána v řadě lidských neoplazmat (1, 4–6).

Protilátky k cyclinu D1 se ukázaly jako nápomocné při klasifikaci lymfomů z pláštových buněk (1,7,8).

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 zbarvení, Obecná omezení.

**Dodávaná reagencie**

Monoklonální králičí protilátka připravená k použití, dodaná v kapalné podobě v pufru obsahujícím stabilizující protein a 0,015 mol/l azidu sodného.

Klon: EP12.

**Imunogen**

Syntetický peptid odpovídající reziduum poblíž C-konce lidského cyclinu D1.

**Specificita**

V testech Western blot s buněčnými lyzáty MCF7 označuje protilátka velký pruh o molekulové hmotnosti zhruba 36 kDa, odpovídající předpokládané molekulové hmotnosti cyclinu D1.

**Bezpečnostní opatření**

1. Pro diagnostiku in vitro.
2. Určeno pro profesionální uživatele.
3. Tento výrobek obsahuje azid sodný (NaN<sub>3</sub>), 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 expirace uvedeném na lahvičce. Aplikační stabilita je 80 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.

**Šablona protokolu  
barvení\***

Krok	Reagencie	Protokol
Odparafínování	Clearify™ (kód GC810)	Výchozí
Předběžné zpracování	EnVision FLEX, FLEX, High pH (kód GV804)	30minutové tepelně indukované vyhledávání epitopu
Primární protilátka	Ready-to-Use (kód GA083)	17,5minutová inkubace
Činidlo pro negativní kontrolu	FLEX Negative Control, Rabbit (kód GA600)	17,5minutová inkubace
Vizualizace	EnVision FLEX (kód GV800) + EnVision FLEX+ Rabbit LINKER (kód GV809)	Blok: 3 min; Link: 10 min; Polymer: 20 min; Chromogen: 5 min
Kontrastní barvivo	Hematoxylin (kód GC808)	3minutová inkubace
Montáž	Je vyžadována bezvodá permanentní montáž	Po vyjmutí nutno dehydratovat, vyčistit a namontovat
<b>Kontrola kvality</b>	<b>Tkáň</b>	<b>Barvicí vzor</b>
Kontrolní tkáň	Mandle	Nukleární zbarvení

\*Uživatel se musí vždy seznámit s používanými činidly, která jsou uvedena v příbalové informaci, a vyhledat si podrobnosti v uživatelských příručkách Dako Omnis.

**Příprava vzorku**

**Parafínové 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. Z důvodu vyšší přilnavosti řezů tkání k podložním sklům se doporučuje používat podložní skla FLEX IHC Microscope Slides, kód K8020.

**Postup barvení**

Odstranění parafínu, vyhledání cíle, imunohistochemické barvení a kontrastní barvení se provádějí v přístroji Dako Omnis. V softwaru přístroje Dako Omnis jsou předem naprogramovány kroky barvení a inkubační doby. Pokud není v systému Dako Omnis připraven protokol, lze jej stáhnout ze stránky *Dako Omnis Protocol Update* (Aktualizace protokolu Dako Omnis) na webu [www.agilent.com](http://www.agilent.com). Podrobné pokyny ke vkládání podložních skl a plnění činidel naleznete v Základní uživatelské příručce Dako Omnis.

Přístroj Dako Omnis zajistí, aby tkáňové řezy během předběžného zpracování a následného imunohistochemického barvení nevyschly.

**Předpůsobení:** Odstranění parafínu z tkáňových řezů FFPE se provádí pomocí roztoku Clearify, kód GC810. Doporučuje se vyhledávání cíle s tepelně indukovaným vyhledáváním epitopu (HIER) pomocí naředěného roztoku EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Dako Omnis), kód GV804.

**Vizualizace:** Doporučený vizualizační systém je EnVision FLEX, High pH (Dako Omnis), kód GV800 ve spojení se systémem EnVision FLEX+ Rabbit LINKER (Dako Omnis), kód GV809.

**Kontrastní barvení:** Doporučené kontrastní barvivo je Hematoxylin (Dako Omnis), kód GC808.

**Montáž:** Po provedení barvení v přístroji Dako Omnis se řezy musí dehydratovat, vyčistit a namontovat pomocí permanentní montážní metody.

**Kontrola kvality**

Pozitivní a negativní kontrolní tkáně a také reagencie pro negativní kontrolu je nutno provádět 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 Negative Control, Rabbit (Dako Omnis), kód GA600.

**Interpretace zbarvení**

Buněčný barvicí vzor je převážně nukleární.

**Charakteristiky účinnosti**

**Normální tkáně:** Suprabazální vrstva epitelu mandlí vykazuje středně silnou až silnou reakci zbarvení, zatímco rozptýlené endoteliální buňky vykazují slabou až střední reakci zbarvení (9).

Typ tkáně (počet testovaných)	Označené prvky tkáně	Typ tkáně (počet testovaných)	Označené prvky tkáně
Brzlík (3)	3/3 lymfoidní buňky (< 1 %), jaderné	Pankreas (3)	3/3 epiteliální buňky (25–30%), jaderné
Děloha (3)	3/3 endometriální epiteliální buňky a stromální buňky (< 5 %), jaderné	Plice (3)	1/3 alveolární epiteliální buňky (30 %) 2/3 alveolární epiteliální buňky (10–20 %)
Děložní hrdlo (2)	1/2 bazální epiteliální buňky (10%), jaderné 1/2 bazální epiteliální buňky (40%), jaderné	Prostata (3)	1/3 Glandulární epiteliální buňky a stromální buňky (10 %), jaderné 1/3 Glandulární epiteliální buňky a stromální buňky (< 5 %), jaderné 1/3 Glandulární epiteliální buňky (< 10 %), stromální buňky (< 5 %), jaderné

Hypofýza (3)	1/3 epiteliální buňky (< 10 %), jaderné 2/3 epiteliální buňky (40 %), jaderné	Prs (2)	1/2 duktální epiteliální buňky (< 10%), jaderné 1/2 duktální epiteliální buňky (< 1%), jaderné
Játra (3)	1/3 parenchymální epiteliální buňky (20 %), jaderné 2/3 parenchymální epiteliální buňky (< 1 %), jaderné	Příštítná tělíska (3)	1/3 epiteliální buňky (< 1 %), jaderné 1/3 epiteliální buňky (< 5 %), jaderné 1/3 epiteliální buňky (< 30 %), jaderné
Jícen (3)	3/3 epiteliální buňky (20–30 %), jaderné, stromální buňky (vzácně), jaderné	Slezina (3)	1/3 lymfocyty a litorální buňky (10 %), jaderné 2/3 lymfocyty a litorální buňky (5 %), jaderné
Kostní dřev (3)	1/3 myeloidní buňky (< 1 %), jaderné	Slinná žláza (3)	2/3 Glandulární epiteliální buňky (< 5 %), jaderné 1/3 Glandulární epiteliální buňky (10 %), jaderné a cytoplazmatické
Kůže (3)	1/3 skvamózní epiteliální buňky (30–40 %), jaderné 1/3 skvamózní epiteliální buňky (< 5 %), jaderné	Sval srdeční (3)	1/3 buňky srdečního svalstva (< 10 %), jaderné, buňky pojivové tkáně a stromální buňky (< 5 %), jaderné 1/3 pojivová tkáň (< 5 %)
Ledvina (3)	1/3 epiteliální buňky (< 5 %), jaderné 2/3 epiteliální buňky (10–20 %), jaderné	Sval, kosterní (3)	0/3
Malý mozek (3)	2/3 astrocyty (>1 %), jaderné	Štítná žláza (3)	2/3 Folikulární epiteliální buňky a stromální buňky (< 1 %), jaderné
Mandle (3)	3/3 epiteliální buňky (30 %), jaderné, lymfocyty (vzácně), jaderné	Tenké střevo (3)	3/3 epiteliální buňky krypt (40–50 %), jaderné
Mezoteliální buňky (3)	0/3	Tlusté střevo (3)	3/3 epiteliální buňky (20–30 %), jaderné, stromální buňky (vzácně), jaderné
Mozek (3)	2/3 vzácně pozitivní buňky (< 1 %), jaderné	Vaječník (3)	2/3 stromální buňky vaječníku (vzácně), jaderné
Nadledvina (3)	1/3 epiteliální buňky (< 1 %), jaderné	Varlata (3)	3/3 stromální buňky (< 1 %), jaderné
Nerv periferní (3)	1/3 mezenchymální epiteliální buňky (< 1 %), jaderné 1/3 Schwannovy buňky (< 5 %), jaderné	Žaludek (3)	2/3 epiteliální buňky (< 5 %), jaderné








Poznámka: Označení endoteliálních buněk bylo zjištěno u většiny normálních testovaných tkání.

## Literatura

1. Monoclonal Rabbit Anti-Cyclin D1, Clone EP12: Report of Normal Tissue Immunohistochemical Testing Using Dako Monoclonal Rabbit Anti-Human Cyclin D1, Clone EP12. 2011. Report on file, Dako, D03559.
2. Donnellan R, Chetty R. Cyclin D1 and human neoplasia. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 1998;51:1-7.
3. Lukas J, Pagano M, Staskova Z, Draetta G, Bartek J. Cyclin D1 protein oscillates and is essential for cell cycle progression in human tumour cell lines. *Oncogene* 1994;9:707-18.
4. Fu M, Wang C, Li Z, Sakamaki T, Pestell RG. Minireview: Cyclin D1: normal and abnormal functions. *Endocrin* 2004;145:5439-47.
5. Reis-Filho JS, Savage K, Lambros MBK, James M, Steele D, Jones RL, et al. Cyclin D1 protein overexpression and CCND1 amplification in breast carcinomas: an immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization analysis. *Modern Pathology*. 2006;19:999-1009.
6. Cheuk W, Wong K, Wong C, Chan J. Consistent immunostaining for Cyclin D1 can be achieved on a routine basis using a newly available rabbit monoclonal antibody. *Am J Surg Pathol* 2004;28:801-7.
7. Rossi S, Laurino L, Furlanetto A, Chinellato S, Orvieto E, Canal F, et al. Rabbit monoclonal antibodies: A comparative study between a novel category of immunoreagents and the corresponding mouse monoclonal antibodies. *Am J Clin Pathol* 2005;124:1-8.
8. De Boer CJ, Schuurin E, Dreef E, Peters G, Bartek J, Kluin PM, van Krieken HJM. Cyclin D1 protein analysis in the diagnosis of mantle cell lymphoma. *Blood* 1995;86:2715-23.
9. Falini B, Martelli MP, Tiacci E, Ascani S, Thiede C, Pileri SA. Immunohistochemical surrogates for genetic alterations of CCND1, PML, ALK, and NPM1 genes in lymphomas and acute myeloid leukemia. *Best Practice & Research Clin Haematol* 2010;23:417-31.

Protílátka Monoclonal Rabbit Anti-Human Cyclin D1, klon EP12 has byla vytvořena ve společnosti Epitomics Inc., pomocí vlastní technologie na přípravu králičí monoklonální protílátky chráněné patenty č. 5,675,063 a 7,402,409.

Vysvětlivky k symbolům

 REF	Katalogové číslo	 2°C - 8°C	Teplotní rozmezí od do		Výrobce
 IVD	In vitro diagnostický zdravotnický prostředek	 LOT	Číslo šarže		
	Viz návod k použití		Použitelné do		



Dako Denmark ApS  
 Produktionsvej 42  
 DK-2600 Glostrup  
 Denmark

Tel. +45 44 85 95 00  
 Fax +45 44 85 95 95

Vyrobilo Dako North America, Inc. pro  
 Dako Denmark ApS

Revize 2019.11