

FLEX
Monoclonal Mouse
Anti-Human
B-Cell-Specific Activator Protein
 Clone DAK-Pax5
Ready-to-Use
 (Dako Omnis)
Code GA650

ENGLISH

Intended use	For in vitro diagnostic use. FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human B-Cell-Specific Activator Protein, Clone DAK-Pax5, Ready-to-Use (Dako Omnis), is intended for use in immunohistochemistry (IHC) together with the Dako Omnis instrument. The antibody labels B-cell-specific activator protein (BSAP)-expressing cells including pro-, pre-, and mature B cells. Results aid in the classification of 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 of tumor has been made by conventional histopathology using nonimmunologic histochemical stains.
Synonyms for antigen	BSAP, Pax5, NF-HB, S α -BP, NFS μ -B1, LR1 and EBB-1 (2, 4).
Summary and explanation	BSAP, also known as paired box protein 5 (Pax5), is a transcription factor expressed in B cells. BSAP is a member of the <i>PAX</i> gene family that encodes transcription factors involved in B-cell development. BSAP is expressed in pro-, pre-, and mature B cells, but not in plasma cells (3, 4). Targeted disruption of the BSAP gene in mice blocks B-cell development at the pro-B-cell stage, suggesting a role for BSAP in the control of B-cell development (2). During embryogenesis BSAP expression is transiently expressed in the developing central nervous system. Later, BSAP expression is detected in the fetal liver where it correlates with the onset of B lymphopoiesis. Thus, BSAP may not only play an important role in B-cell development but also in neural development (3, 5). In classic Hodgkin lymphoma (CHL), Hodgkin and Reed-Sternberg cells (HRS cells) usually express BSAP, whereas HRS cells mostly do not display B-cell antigens such as CD19 or CD20 (6). BSAP expression has also been reported in subsets of epithelial malignancies (7). 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.
Reagent provided	Ready-to-use monoclonal mouse antibody provided in liquid form in a buffer containing stabilizing protein and 0.015 mol/L sodium azide. <u>Clone:</u> DAK-Pax5. <u>Isotype:</u> IgG1, kappa.
Immunogen	Synthetic 17-mer peptide from the C-terminal inhibitory domain of the protein.
Specificity	In Western blotting of mouse spleen cell lysate, the antibody labels a 55 kDa protein corresponding to BSAP.
Precautions	<ol style="list-style-type: none"> For in vitro diagnostic use. For professional users. 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. As with any product derived from biological sources, proper handling procedures should be used. Wear appropriate Personal Protective Equipment to avoid contact with eyes and skin. Unused solution should be disposed of according to local, State and Federal regulations.
Storage	Store at 2-8 °C. During storage the cap should be closed. Do not use after expiration date stamped on vial. Onboard stability is 280 hours. Onboard time is tracked by the Dako Omnis software. 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.

Step	Reagent	Comments
Fixation/embedding	Formalin-fixed, paraffin-embedded	Onboard deparaffinization
Pre-treatment	EnVision FLEX, High pH (Code GV804)	30 min HIER
Antibody	Ready-to-use	20 min incubation
Negative Control	FLEX Negative Control, Mouse (Code GA750)	20 min incubation
Visualization	EnVision FLEX (Code GV800) + EnVision FLEX+ Mouse LINKER (Code GV821)	Block: 3 min; Link: 10 min; Polymer: 20 min; Chromogen: 5 min
Counterstain	Hematoxylin (Code GC808)	3 min incubation
Control Tissue	Tonsil	Nuclear staining
Slides	FLEX IHC Microscope Slides (Code K8020)	Recommended for greater adherence of tissue sections to glass slides
Mounting	Non-aqueous, permanent mounting required	After staining, the sections must be dehydrated, cleared and mounted using a permanent mounting method
Instrumentation	Dako Omnis	Reagents are provided in instrument-specific vials

*The user must always read the package insert for detailed instructions of the staining procedure and handling of the product.

Specimen preparation	<p><u>Paraffin sections:</u> The antibody can be used for labeling formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. Tissue specimens should be cut into sections of 4 μm.</p> <p><u>Pre-treatment:</u> Pre-treatment of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections with heat-induced epitope retrieval (HIER) is required. Pretreating tissues with HIER using diluted EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Dako Omnis), Code GV804, is recommended. Deparaffinization, rehydration and target retrieval are performed onboard Dako Omnis. Please refer to Dako Omnis Basic User Guide. Dako Omnis ensures that the tissue sections do not dry out during the pre-treatment process or during the following immunohistochemical staining procedure. For greater adherence of tissue sections to glass slides, the use of FLEX IHC Microscope Slides, Code K8020 is recommended.</p>
Staining procedure	<p><u>Program:</u> The staining steps and incubation times are pre-programmed into the Dako Omnis software. Please refer to the Dako Omnis Basic User Guide for detailed instructions on loading slides and reagents. If the protocols are not available in the Dako Omnis system, please contact Dako Technical Support. All incubation steps are performed at 32 °C onboard Dako Omnis.</p> <p><u>Visualization:</u> The recommended visualization system is EnVision FLEX, High pH (Dako Omnis), Code GV800 in combination with EnVision FLEX+ Mouse LINKER (Dako Omnis), Code GV821. The visualization is performed onboard Dako Omnis.</p> <p><u>Counterstaining:</u> The recommended counterstain is Hematoxylin (Dako Omnis), Code GC808. The counterstaining is performed onboard Dako Omnis.</p> <p><u>Mounting:</u> After staining onboard Dako Omnis the sections must be dehydrated, cleared and mounted using a permanent mounting method.</p> <p><u>Quality control:</u> Positive and negative control tissue 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</p>

in the "Performance characteristics" section. The recommended negative control reagent is FLEX Universal Negative Control, Mouse (Dako Omnis), Code GA750.

Staining interpretation

Cells labeled by the antibody display nuclear staining.

Performance characteristics

Normal tissues: In tonsil, B cells in the mantle zone and in the germinal center show a moderate to strong staining reaction. Germinal center B cells can also show a weak to moderate cytoplasmic staining reaction (8). Normal lymphoid tissues (lymph node and spleen) show strong nuclear staining in B-lymphocytes but all remaining organs of the human body are not labeled (1).

Abnormal tissues: The antibody labeled 155/159 classic Hodgkin lymphomas (hereof only 12 with intense positive staining), 155/155 diffuse large B-cell lymphomas, 41/41 follicular lymphomas, 66/66 mantle cell lymphomas, 11/11 splenic B-cell marginal zone lymphomas, 35/35 Burkitt lymphomas, 76/76 chronic lymphocytic leukemias/small lymphocytic lymphomas, 11/11 B-lymphoblastic leukemias/lymphomas, 30/30 hairy cell leukemias, 12/12 nodal marginal zone lymphomas, 6/6 nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphomas, 23/30 posttransplant lymphoproliferative disorders (monomorphic PTL-D), and weak labeling was observed in 5/84 cases of carcinomas of colon and rectum, 1/26 kidney cancers, 1/11 bladder cancers, 4/21 prostate cancers, 1/14 stomach cancers, 2/4 Merkel cell carcinomas, 4/11 neuroendocrine carcinomas, 2/16 cervix cancers, and 3/13 ovary cancers (1). No labeling was found in 17 acute myeloid leukemias, 47 angioimmunoblastic T-cell lymphomas, 27 anaplastic large cell lymphomas ALK+, 17 anaplastic large cell lymphomas ALK-, 6 chronic myelogenous leukemias, 1 extranodal NK/T-cell lymphoma nasal-type, 1 hepatosplenic T-cell lymphoma, 5 mycosis fungoides, 158 peripheral T-cell lymphomas unspecified (PTCL/U), 6 plasma cell myelomas, 7 precursor T-lymphoblastic leukemias/lymphomas, 1 panniculitis-like T-cell lymphoma, 18 ductal pancreas cancers, 28 liver cancers, 14 gastric cancers, 38 breast cancers, 17 uterus cancers, 46 sarcomas, 13 melanomas, 10 thymomas, 10 medulloblastomas, 20 gliomas, 100 lung cancers, and 21 testis cancers (1).

FRANÇAIS

Utilisation prévue

Pour utilisation diagnostique in vitro.

L'anticorps FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human B-Cell-Specific Activator Protein, Clone DAK-Pax5, Ready-to-Use (Dako Omnis) est destiné à une utilisation en immunohistochimie (IHC) avec l'instrument Dako Omnis. L'anticorps marque les cellules exprimant la protéine activatrice spécifique des lymphocytes B (BSAP), notamment les lymphocytes B pro-lymphome et pré-lymphome, ainsi que les lymphocytes B matures. Les résultats obtenus facilitent la classification des lymphomes (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 de tumeur par histopathologie traditionnelle utilisant des colorations histochemiques non immunologiques.

Synonymes de l'antigène

BSAP, Pax5, NF-HB, S α -BP, NFS μ -B1, LR1 et EBB-1 (2, 4).

Résumé et explication

La protéine BSAP, également appelée PAX5, est un facteur de transcription exprimé dans les lymphocytes B. La protéine BSAP appartient à la famille des gènes *PAX*, qui code les facteurs de transcription impliqués dans le développement des lymphocytes B. La protéine BSAP est exprimée dans les lymphocytes B pro-lymphome, pré-lymphome et les lymphocytes B matures, mais pas dans les cellules plasmiques (3, 4). La perturbation ciblée du gène BSAP chez les souris bloque le développement des lymphocytes B au stade des cellules pro-B, suggérant ainsi qu'il intervient dans le contrôle du développement des lymphocytes B (2). Durant l'embryogenèse, l'expression du gène BSAP s'effectue de façon transitoire dans le système nerveux central en développement. Par la suite, une expression du gène BSAP est détectée dans le foie du fœtus, où il correspond à un début de lymphopoïèse B. Ainsi, le gène BSAP joue non seulement un rôle important dans le développement des lymphocytes B, mais également dans le développement nerveux (3, 5).

Dans le cadre d'un lymphome de Hodgkin classique (CHL), les cellules de Hodgkin et de Reed-Sternberg (cellules HRS) expriment généralement le gène BSAP, tandis que les cellules HRS ne présentent majoritairement pas d'antigènes des lymphocytes B tels que le CD19 ou CD20 (6). L'expression du gène BSAP a également été observée dans des sous-ensembles de tumeurs épithéliales (7).

Consulter le document *General Instructions for Immunohistochemical Staining* (Instructions générales de coloration immunohistochemique) de Dako ou les instructions du kit 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.

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.

Clone : DAK-Pax5. **Isotype :** IgG1, kappa.

Immunogène

Peptide 17-mérique synthétique issu du domaine inhibiteur C-terminal de la protéine.

Spécificité

Dans le Western blot d'un lysat de cellules de rate de souris, l'anticorps marque une protéine de 55 kDa correspondant au BSAP.

Précautions d'emploi

1. Pour utilisation diagnostique in vitro.
2. Pour utilisateurs professionnels.
3. Ce produit contient de l'azide de sodium (NaN₃), un produit chimique hautement toxique à l'état pur. 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, des procédures de manipulation appropriées doivent être respectées.
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. Pendant la conservation, le bouchon doit être fermé. Ne pas utiliser après la date de péremption imprimée sur le flacon. La stabilité sur l'appareil est de 280 heures. La stabilité sur l'appareil est suivie par le logiciel Dako Omnis. 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.

Vue d'ensemble du protocole de coloration*

Étape	Réactif	Commentaires
Fixation/inclusion	Fixation au formol, inclusion en paraffine	Déparaffinage intégré
Prétraitement	EnVision FLEX, High pH (réf. GV804)	HIER de 30 minutes
Anticorps	Prêt à l'emploi	Incubation de 20 minutes
Contrôle négatif	FLEX Negative Control, Mouse (réf. GA750)	Incubation de 20 minutes
Visualisation	EnVision FLEX (réf. GV800) + EnVision FLEX+ Mouse LINKER (réf. GV821)	Bloc : 3 min ; Link : 10 min ; Polymère : 20 min ; Chromogène : 5 min
Contre-coloration	Hematoxylin (réf. GC808)	Incubation de 3 minutes
Tissu de contrôle	Amygdale	Coloration nucléaire
Lames	FLEX IHC Microscope Slides (réf. K8020)	Recommandées pour une meilleure adhérence des coupes de tissus aux lames de verre
Montage	Milieu de montage permanent non aqueux requis	Une fois la procédure de coloration terminée, les coupes doivent être déshydratées, éclaircies et montées selon une méthode de montage permanent
Appareillage	Dako Omnis	Les réactifs sont fournis dans des flacons propres à l'appareil

*L'utilisateur doit toujours lire la notice pour obtenir des instructions détaillées sur la procédure de coloration et sur la manipulation du produit.

Préparation des échantillons

Coupes en paraffine : 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 de 4 μ m.

Prétraitement : Le prétraitement des coupes de tissus fixées au formol et incluses en paraffine par restauration d'épitope induite par la chaleur (HIER) est nécessaire. Il est recommandé de prétraiter les tissus par la méthode HIER à l'aide de la solution diluée EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Dako Omnis), réf. GV804. Le déparaffinage, la réhydratation et la restauration des cibles sont effectués sur l'appareil Dako Omnis. Se reporter au Guide d'utilisation de base du Dako Omnis.

Le Dako Omnis s'assure que les coupes de tissus ne sèchent pas lors du prétraitement ni lors de la procédure de coloration immunohistochemique suivante. Pour une meilleure adhérence des coupes de tissu sur les lames de verre, il est recommandé d'utiliser les lames FLEX IHC Microscope Slides (réf. K8020).

Procédure de coloration
Programme : Les étapes de coloration et les temps d'incubation sont préprogrammés dans le logiciel Dako Omnis. Se reporter au Guide d'utilisation de base du Dako Omnis pour plus de détails sur le chargement des lames et des réactifs. Si les protocoles ne sont pas disponibles sur le système Dako Omnis, contacter l'assistance technique Dako. Toutes les étapes d'incubation sont effectuées à 32 °C sur l'appareil Dako Omnis.
Visualisation : Le système de visualisation recommandé est le système EnVision FLEX, High pH (Dako Omnis), réf. GV800, associé au système EnVision FLEX+ Mouse LINKER (Dako Omnis), réf. GV821. La visualisation est effectuée sur l'appareil Dako Omnis.
Contre-coloration : Le contre-colorant recommandé est le produit Hematoxylin (Dako Omnis), réf. GC808. La contre-coloration est effectuée sur l'appareil Dako Omnis.
Montage : Après la coloration sur l'appareil Dako Omnis, les coupes doivent être déshydratées, éclaircies et montées à l'aide d'une méthode de montage permanent.
Contrôle de qualité : Les tissus de contrôle positif et négatif, ainsi que 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 FLEX Universal Negatives Control, Mouse (Dako Omnis), réf. GA750.

Interprétation de la coloration
 Les cellules marquées par l'anticorps présentent une coloration nucléaire.

Performances
Tissus sains : Dans l'amygdale, les lymphocytes B de la zone du manteau et du centre germinatif présentent une coloration modérée à forte. Les lymphocytes B du centre germinatif peuvent également présenter une coloration cytoplasmique faible à modérée (8). Les tissus lymphoïdes sains (ganglion lymphatique et rate) présentent une coloration nucléaire forte dans les lymphocytes B, mais aucun autre organe du corps humain n'est marqué (1).
Tissus anormaux : L'anticorps a marqué 155 cas sur 159 de lymphomes de Hodgkin classiques (dont 12 seulement avec une coloration positive intense), 155 cas sur 155 de lymphomes diffus à grands lymphocytes B, 41 cas sur 41 de lymphomes folliculaires, 66 cas sur 66 de lymphomes à cellules du manteau, 11 cas sur 11 de lymphomes de la zone marginale de la rate à cellules B, 35 cas sur 35 de lymphomes de Burkitt, 76 cas sur 76 de lymphomes à petits lymphocytes/leucémies lymphocytaires chroniques, 11 cas sur 11 de lymphomes/leucémies lymphoblastiques à cellules B, 30 cas sur 30 de leucémies à cellules chevelues, 12 cas sur 12 de lymphomes de la zone marginale ganglionnaire, 6 cas sur 6 de lymphomes de Hodgkin nodulaire à prédominance lymphocytaire, 23 cas sur 30 de maladies lymphoprolifératives post-greffe (monomorphe SLPT-B), et un faible marquage a été observé dans 5 cas sur 84 de carcinomes du côlon et du rectum, 1 cas sur 26 de cancer des reins, 1 cas sur 11 de cancer de la vessie, 4 cas sur 21 de cancer de la prostate, 1 cas sur 14 de cancer de l'estomac, 2 cas sur 4 de carcinomes à cellules de Merkel, 4 cas sur 11 de carcinomes neuroendocrines, 2 cas sur 16 de cancer de l'utérus et 3 cas sur 13 de cancer des ovaires (1). Aucun marquage n'a été observé dans 17 cas de leucémies aiguës myéloïdes, 47 cas de lymphomes angio-immunoblastiques à lymphocytes T, 27 cas de lymphomes anaplasiques à grandes cellules ALK+, 17 cas de lymphomes anaplasiques à grandes cellules ALK-, 6 cas de leucémies myélogènes chroniques, 1 cas de lymphome extra-ganglionnaire à lymphocytes T/cellules NK de type nasal, 1 cas de lymphome à cellules T hépatosplénique, 5 cas de mycose fongioïde, 158 cas de lymphomes à cellules T périphériques non spécifiés (PTCL/U), 6 cas de myélomes à cellules plasmiques, 7 cas de lymphomes/leucémies lymphoblastiques à lymphocytes T (précurseurs), 1 cas de lymphome à cellules T de type panniculite, 18 cas de cancer des canaux du pancréas, 28 cas de cancer du foie, 14 cas de cancer de l'estomac, 38 cas de cancer du sein, 17 cas de cancer de l'utérus, 46 cas de sarcome, 13 cas de mélanomes, 10 cas de thymomes, 10 cas de médulloblastomes, 20 cas de gliomes, 100 cas de cancer du poulmon et 21 cas de cancer des testicules (1).

DEUTSCH

Verwendungszweck
 Zur In-vitro-Diagnostik.
 FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human B-Cell-Specific Activator Protein, Clone DAK-Pax5, Ready-to-Use (Dako Omnis) ist zur Verwendung in der Immunhistochemie (IHC) in Verbindung mit dem Dako Omnis-Gerät bestimmt. Der Antikörper markiert Zellen, die das B-Zellen-spezifische Aktivatorprotein BSAP (B-Cell-Specific Activator Protein) exprimieren (Pro-, Prä- und reife B-Zellen). Die Ergebnisse unterstützen die Klassifikation von 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 des Tumors durch konventionelle Histopathologie unter Verwendung von nicht immunologischen histochemischen Färbungen zum Einsatz.

Synonyme Bezeichnungen des Antigens
 BSAP, Pax5, NF-HB, α -BP, NFS μ -B1, LR1 und EBB-1 (2, 4).

Zusammenfassung und Erklärung
 BSAP, das auch als Paired Box-Protein 5 (Pax5) bezeichnet wird, ist ein in B-Zellen exprimierter Transkriptionsfaktor. BSAP gehört zur PAX-Genfamilie, die an der Entwicklung der B-Zellen beteiligte Transkriptionsfaktoren kodiert. BSAP wird in Pro-, Prä- und reifen B-Zellen, aber nicht in Plasmazellen exprimiert (3, 4). Gezielte Störung des BSAP-Gens bei Mäusen blockiert die Entwicklung von B-Zellen im Stadium der Pro-B-Zellen und weist darauf hin, dass BSAP bei der Steuerung der B-Zellen-Entwicklung eine Rolle spielt (2). Während der Embryogenese wird die BSAP-Expression im sich entwickelnden zentralen Nervensystem vorübergehend exprimiert. Später wird die BSAP-Expression in der fötalen Leber nachgewiesen, wo sie mit dem Einsetzen der B-Lymphopoese korreliert. BSAP spielt also nicht nur möglicherweise eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von B-Zellen, sondern auch bei der neuronalen Entwicklung (3, 5).
 Beim klassischen Hodgkin-Lymphom (CHL) exprimieren Hodgkin- und Reed-Sternberg-Zellen (HRS-Zellen) in der Regel BSAP, während HRS-Zellen überwiegend keine B-Zellen-Antigene wie CD19 oder CD20 aufweisen (6). Eine BSAP-Expression wurde auch in Untergruppen epithelialer Tumore nachgewiesen (7).

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: DAK-Pax5. **Isotyp**: IgG1, Kappa.

Immunogen
 Synthetisches 17-meres Peptid aus der C-terminalen, hemmenden Domäne des Proteins.

Spezifität
 Beim Western-Blotting von Maus-Milzlysat markiert der Antikörper ein Protein mit einem Molekulargewicht von 55 kDa, das BSAP entspricht.

Vorsichtsmaßnahmen

- Zur In-vitro-Diagnostik.
- Für Fachpersonal.
- Dieses Produkt enthält Natriumazid (NaN₃), 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 Metallazid-Anreicherung zu vermeiden.
- Wie alle Produkte biologischen Ursprungs müssen auch diese entsprechend gehandhabt werden.
- Geeignete persönliche Schutzausrüstung (PSA) tragen, um Augen- und Hautkontakt zu vermeiden.
- Nicht verwendete Lösung ist entsprechend örtlichen, staatlichen und EU-rechtlichen Richtlinien zu entsorgen.

Lagerung
 Bei 2-8 °C lagern. Während der Lagerung ist der Deckel geschlossen zu halten. Nach Ablauf des auf dem Behälter aufgedruckten Verfallsdatums nicht mehr verwenden. Die Stabilität im Gerät beträgt 280 Stunden. Die Zeitdauer im Gerät wird durch die Dako Omnis Software erfasst. 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.

Übersicht über die Färbeprotokolle*

Schritt	Reagenz	Anmerkungen
Fixierung/Einbettung	Fixiert in Formalin, eingebettet in Paraffin	Entparaffinierung im Gerät
Vorbehandlung	EnVision FLEX, High pH (Code-Nr. GV804)	30 Min. HIER
Antikörper	Gebrauchsfertig	20 Min. Inkubation
Negativkontrolle	FLEX Negative Control, Mouse (Code-Nr. GA750)	20 Min. Inkubation

Detektionssystem	EnVision FLEX (Code-Nr. GV800) + EnVision FLEX+ Mouse LINKER (Code-Nr. GV821)	Block: 3 Min.; Link: 10 Min.; Polymer: 20 Min.; Chromogen: 5 Min.
Gegenfärbung	Hematoxylin (Code-Nr. GC808)	3 Min. Inkubation
Kontrollgewebe	Mandeln	Nukleare Färbung
Objekträger	FLEX IHC Microscope Slides (Code-Nr. K8020)	Empfohlen zur besseren Haftung der Gewebeschnitte an den Glasobjekträgern
Eindeckung	Nichtwässriges, permanentes Eindeckmedium erforderlich	Nach dem Färben müssen die Schnitte dehydriert, geklärt und unter Verwendung eines permanenten Eindeckmediums auf den Objekträger aufgebracht werden
Geräte	Dako Omnis	Reagenzien werden in gerätespezifischen Behältern geliefert

* Der Anwender muss stets die Packungsbeilage lesen, um sich über die detaillierten Anweisungen für das Färbeverfahren und die Handhabung des Produkts zu informieren.

Gewebevorbereitung

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

Vorbehandlung: Es ist eine Vorbehandlung der formalinfixierten und paraffineingebetteten Gewebeschnitte durch hitzeinduzierte Epitopdemaskierung (HIER) erforderlich. Die HIER-Vorbehandlung der Gewebe mit EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Dako Omnis), Code-Nr. GV804, wird empfohlen. Entparaffinierung, Rehydrierung und Demaskierung werden im Dako Omnis Gerät selbst durchgeführt. Weitere Informationen finden Sie im Dako Omnis Benutzerhandbuch.

Dako Omnis gewährleistet, dass die Gewebeschnitte während der Vorbehandlungsprozedur und während des anschließenden immunhistochemischen Färbeverfahrens nicht austrocknen. Für eine bessere Haftung der Gewebeschnitte an den Glasobjekträgern werden FLEX IHC Microscope Slides, Code-Nr. K8020, empfohlen.

Färbeverfahren

Programm: Die Färbeschritte und Inkubationszeiten sind in der Dako Omnis Software vorprogrammiert. Detaillierte Anweisungen zum Laden der Objekträger und Reagenzien sind dem Dako Omnis Benutzerhandbuch zu entnehmen. Wenn die Protokolle im Dako Omnis System nicht verfügbar sind, wenden Sie sich an den technischen Kundendienst von Dako. Alle Inkubationsschritte sind bei 32 °C im Dako Omnis Gerät durchzuführen.

Detektionssystem: Das empfohlene Detektionssystem ist EnVision FLEX, high pH (Dako Omnis), Code-Nr. GV800 in Verbindung mit EnVision FLEX+ Mouse LINKER (Dako Omnis), Code-Nr. GV821. Die Detektion wird im Dako Omnis Gerät durchgeführt.

Gegenfärbung: Die empfohlene Gegenfärbung ist Hematoxylin (Dako Omnis), Code-Nr. GC808. Die Gegenfärbung wird im Dako Omnis Gerät durchgeführt.

Eindecken: Nach dem Färben im Dako Omnis Gerät müssen die Schnitte dehydriert, geklärt und mit einer permanenten Eindeckmethode auf den Objekträger aufgebracht werden.

Qualitätskontrolle: 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 im Abschnitt „Leistungseigenschaften“ beschriebenen Reaktionsmuster aufweisen. Das empfohlene Negativkontrollreagenz ist FLEX Universal Negative Control, Mouse (Dako Omnis), Code-Nr. GA750.

Auswertung der Färbung

Mit diesem Antikörper markierte Zellen weisen ein nukleäres Färbemuster auf.

Leistungseigenschaften









Normalgewebe: In Mandeln zeigen B-Zellen in der Mantelzone und in Keimzentren eine moderate bis starke Färbereaktion. B-Zellen in den Keimzentren können auch eine schwache bis moderate zytoplasmatische Färbereaktion zeigen (8). Normales lymphoides Gewebe (Lymphknoten und Milz) zeigt starke Kernfärbung bei B-Lymphozyten. Alle anderen menschlichen Organe werden jedoch nicht markiert (1).

Anormales Gewebe: Der Antikörper markierte 155/159 klassischen Hodgkin-Lymphomen (davon nur 12 mit intensiver positiver Färbung), 155/155 diffusen großzelligen B-Zell-Lymphomen, 41/41 folliculären Lymphomen, 66/66 Mantelzelllymphomen, 11/11 B-Zell-Marginalzonenlymphomen der Milz, 35/35 Burkitt-Lymphomen, 76/76 chronischen lymphatischen Leukämien/kleinzelligen lymphatischen Lymphomen, 11/11 B-lymphoblastischen Leukämien/Lymphomen, 30/30 Haarzellenleukämien, 12/12 nodalen Marginalzonenlymphomen, 6/6 nodulären Hodgkin-Lymphomen mit lymphozytärer Prädominanz, 23/30 posttransplantären lymphoproliferativen Erkrankungen (monomorphe PTL-D-B). Eine schwache Färbung wurde in 5/84 Fällen von Dickdarm- und Rektumkarzinomen, 1/26 Fällen von Nierenkrebs, 1/11 Fällen von Blasenkrebs, 4/21 Fällen von Prostatakrebs, 1/14 Fällen von Magenkrebs, 2/4 Karzinomen der Merkel-Zellen, 4/11 neuroendokrinen Karzinomen, 2/16 Fällen von Zervixkrebs und 3/13 Fällen von Eierstockkrebs beobachtet (1). Bei 17 akuten myeloischen Leukämien, 47 angioimmunoblastischen T-Zelllymphomen, 27 anaplastisch großzelligen Lymphomen ALK+, 17 anaplastisch großzelligen Lymphomen ALK-, 6 chronischen myelogenen Leukämien, 1 extranodalen NK/T-Zelllymphom des nasalen Typs, 1 Hepato-T-Zelllymphom der Milz, 5 Fällen von Mycosis fungoides, 158 unspezifischen peripheralen T-Zelllymphomen (PTCL/U), 6 Plasmazellenmyelomen, 7 Vorläufern von T-lymphoblastischen Leukämien/Lymphomen, 1 Panniculitis-ähnlichen T-Zelllymphom, 18 Fällen von Duktus-Pankreaskrebs, 28 Fällen von Leberkrebs, 14 Fällen von Magenkrebs, 38 Fällen von Brustkrebs, 17 Fällen von Uteruskrebs, 46 Sarkomen, 13 Melanomen, 10 Thymomen, 10 Medulloblastomen, 20 Gliomen, 100 Fällen von Lungenkrebs und 21 Fällen von Hodenkrebs wurde keine Markierung gefunden (1).

References / Bibliographie / Literaturnachweise

- Agostinelli C, Sabattini E, Gjørret JO, Righi S, Rossi M, Mancini M, Piccaluga PP, Bacci F, Marafioti T, Bettini G, Falini B, Pileri SA. Characterization of a new monoclonal antibody against PAX5/BASP in 1525 paraffin-embedded human and animal tissue samples. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2010;18:561-572
- Krenacs L, Himmelmann AW, Quintanilla-Martinez L, Fest T, Riva A, Wellmann A, et al. Transcription factor B-cell-specific activator protein (BSAP) is differentially expressed in B cells and in subsets of B-cell lymphomas. *Blood* 1998;92:1308-16.
- Torlakovic E, Torlakovic G, Nguyen PL, Brunning RD, Delabie J. The value of anti-pax-5 immunostaining in routinely fixed and paraffin-embedded sections: a novel pan pre-B and B-cell marker. *Am J Surg Pathol* 2002;26:1343-50.
- Zhang X, Lin Z, Kim I. Pax5 expression in non-Hodgkin's lymphomas and acute leukemias. *J Korean Med Sci* 2003;18:804-8.
- Nutt SL, Thévenin C, Busslinger M. Essential functions of Pax-5 (BSAP) in pro-B cell development [review]. *Immunobiology* 1997;198:227-35.
- Foss HD, Reusch R, Demel G, Lenz G, Anagnostopoulos I, Hummel M, Stein H. Frequent expression of the B-cell-specific activator protein in Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin's disease provides further evidence for its B-cell origin. *Blood* 1999;94:3108-13.
- Mhaweck-Fauceglia P, Saxena R, Zhng S, Terracciano L, Sauter G, Chadhuri A, Herrmann FR, Penetrante R. Pax-5 immunorexpression in various types of benign and malignant tumours: a high-throughput tissue microarray analysis. *J Clin Pathol* 2007;60:709-14.
- Dako in-house report D33519

Explanation of symbols / Explication des symboles / Erläuterung der Symbole

 Catalogue number Référence du catalogue Katalognummer	 2 °C - 8 °C Temperature limitation Limites de température Zulässiger Temperaturbereich	 Use by Utiliser avant Verwendbar bis
 In vitro diagnostic medical device Dispositif médical de diagnostic in vitro In-vitro-Diagnostikum	 Batch code Réf. du lot Chargenbezeichnung	 Manufacturer Fabricant Hersteller
 Consult instructions for use Consulter les instructions d'utilisation Gebrauchsanweisung beachten	 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