

## Monoclonal Mouse Anti-Epstein-Barr Virus, LMP

Clones CS.1-4

**Code No./ Code/ Code-Nr. M 0897**

Edition/ Edition/ Ausgabe 24.03.03

ENGLISH
<p><b>Intended use</b> For in vitro diagnostic use.</p>

Monoclonal Mouse Anti-Epstein-Barr Virus, LMP, Clones CS.1-4, is intended for use in immunocytochemistry. The antibody labels Epstein-Barr virus-infected cells expressing the latent membrane protein (LMP), and is a useful tool for the identification of tumour cells in Epstein-Barr virus-associated Hodgkin's disease (1-3) and nasopharyngeal carcinoma (4). Differential identification is aided by the results from a panel of antibodies. Interpretation must be made within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a qualified pathologist.

### Introduction

Epstein-Barr virus (EBV) is a human herpes virus, normally found as a widespread asymptomatic infection with >95% of the world's adult population being lifelong carriers. The virus genome is a doublestranded DNA molecule of approximately 172 kb encoding at least 80 proteins. Two strains of EBV exist, although the bulk of the genome appears to be identical (5, 6). EBV-infected cells and neoplasms generally show one of three different expressional patterns of latency-associated viral genes. In latency type I, only EBV-encoded-nuclear-antigen 1 (EBNA-1) is expressed together with two small polyadenylated nuclear RNAs (EBER 1 and 2) observed in Burkitt's lymphoma. In latency type II, additional expression of three latent membrane proteins, LMP-1, LMP-2A and LMP-2B are observed, seen in Hodgkin's disease and nasopharyngeal carcinoma. Latency type III is seen in lymphoproliferative diseases arising in immunocompromised individuals and EBV-transformed lymphoblastoid cell lines. In this group all six EBNAs (EBNA-1/2/3A/3B/3C/LP), all three LMPs and the two EBERs are expressed (6).

The integral membrane protein, LMP-1, is encoded by the *BNRF1 gene* and contains 386 amino acids with a molecular mass of 63 kDa. It is regarded as an oncogenic protein as it is implicated in at least four transcription factor signalling pathways, and induces expression of multiple cell surface markers and cell adhesion molecules (4, 5). EBV is associated with certain tumours of lymloid and epithelial origin including Burkitt's lymphoma (BL), immunoblastic lymphoma (IBL), T-cell lymphoma, Hodgkin's Disease (HD), nasopharyngeal carcinoma (NPC) and gastric carcinoma. The only situation where full virus replication can be reliably observed is in hairy leukoplakia, a benign lesion of the tongue frequently encountered in AIDS patients (5, 6).

### Reagent provided

A mixture of four monoclonal mouse antibodies provided in liquid form as cell culture supernatant dialysed against 0.05 mol/L Tris/HCl, pH 7.2, and containing 15 mmol/L NaN<sub>3</sub>.

**Clones:** CS.1, CS.2, CS.3 and CS. 4 (7). **Isotype:** IgG1, kappa.

**Mouse IgG concentration:** See label on vial.

### Immunogen

Recombinant fusion protein containing the sequence of bacterial beta-galactosidase and the carboxyl half of EBV-encoded LMP (7).

### Specificity

In Western blotting with lysates of EBV-transformed lymphoblastoid cell lines, the antibody labels a major band of 57-66 kDa depending on the virus isolate, sometimes accompanied by a minor band of 50-55 kDa corresponding to full length and truncated form of LMP. The antibody recognizes 20 geografically distinct EBV isolates (7). The antibody cross-reacts with a 43-44 kDa doublet of uncharacterized normal cell proteins in cellular extracts including that from EBV-negative control cell lines (7).

The antibody labels a normal EBV-positive lymphoblastoid cell line established by infection of normal resting B-cells with the B95.8 virus, whereas the BL2 cell line, established from a rare EBV-negative sporadic BL-patient, as well as other unrelated cell isolates, including tonsillar B and T lymphocytes, fetal liver and thymus, cultured fetal fibroblasts, human leukaemic cell lines HSB2 and K562 and 7 EBV-negative B-cell lines show no labelling, except the cellular doublet proteins (7).

### Precautions

- For professional users.
- This product contains sodium azide (NaN<sub>3</sub>), 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.

### Storage

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 user must verify the conditions. 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 our Technical Services.

### Specimen preparation

**Paraffin sections:** The antibody can be used for labelling paraffin-embedded tissue sections fixed in formalin. Pre-treatment of tissues with proteinase K or heat-induced epitope retrieval is recommended. For heat-induced epitope retrieval, optimal results are obtained with DakoCytomation Target Retrieval Solution, code No. S 1700, DakoCytomation Target Retrieval Solution, High pH, code No. S 3308, 10 mmol/L citrate buffer, pH 6.0, or 10 mmol/L Tris buffer, 1 mmol/L EDTA, pH 9.0. The tissue sections should not dry out during the treatment or during the following immunocytochemical staining procedure. Unless the stability of the diluted antibody and negative control has been established in the actual staining procedure, it is recommended to dilute these reagents immediately before use, or dilute in DakoCytomation Antibody Diluent, code No. S 0809. Positive and negative controls should be run simultaneously with patient specimen.

**Frozen sections and cell preparations:** The antibody can be used for labelling acetone-fixed, frozen sections and cell preparations (1, 7).

### Staining procedure

**Dilution:** Monoclonal Mouse Anti-Epstein-Barr Virus, LMP, code No. M 0897, may be used at a dilution range of 1:100-1:200 when applied on formalin-fixed, paraffin-embedded sections of human EBV-positive colon and using 20 minutes heat-induced epitope retrieval in DakoCytomation Target Retrieval Solution, code No. S 1700, and 30 minutes incubation at room temperature with the primary antibody. Optimal conditions may vary depending on specimen and preparation method, and should be determined by each individual laboratory. The recommended negative control is DakoCytomation Mouse IgG1, code No. X 0931, diluted to the same mouse IgG concentration as the primary antibody.

**Visualization:** DAKO LSAB™+/HRP kit, code No. K 0679, and DAKO EnVision™+/HRP kits, code Nos. K 4004 and K 4006, are recommended. For frozen sections and cell preparations, the DakoCytomation APAAP kit, code No. K 0670, is a good alternative if endogenous peroxidase staining is a concern. Follow the procedure enclosed with the selected visualization kit.

### Product-specific limitations

In frozen sections, weak cross-reactivity has been noted in smooth muscle cells and a small fraction of plasma cells (1). Reactivity has also been reported for peripheral nerve tissue (8). In formalin-fixed, paraffin-embedded sections, weak cross-reactivity has been detected in layers three and four of the brain cortex, in peripheral nerves and in the basal cell layer of normal skin. Myoepithelial cells and smooth muscle cells also showed faint cross-reactivity (8). For B and T non-Hodgkin's lymphomas, frozen sections yielded better staining results than formalin-fixed, paraffin-embedded sections (8).

### Performance characteristics

Cells labelled by the antibody display a cytoplasmic and membrane staining pattern.

**Normal tissues:** The antibody does not label normal nasopharyngeal mucosa, neither is small infiltrating lymphocytes, desmoplastic stroma and overlying normal epithelium in primary nasopharyngeal samples labelled (4). The antibody displays no labelling in large intestine, appendix or pancreas (8). Strong labelling of normal early myeloid and erythroid precursors may be seen despite a total absence of evidence of EBV by PCR (9).

**Abnormal tissues:** In frozen sections of 84 cases of Hodgkin's disease 40/84 was strongly labelled by the antibody in Hodgkin and Reed-Sternberg cells. The portions varied according to histological subtype, where staining was demonstrated in 1/10 with nodular lymphocyte predominance, 16/52 with nodular sclerosis and 23/24 with mixed cellularity type (1). The antibody labelled 22/46 cases of paraffin-embedded tissue of Hodgkin's disease, with 1/12 of lymphocyte predominance, 12/24 of nodular sclerosis, 6/7 of mixed cellularity type and 3/3 of lymphocyte depletion subtypes (2). In another study including 47 Hodgkin's lymphomas, a total of 32/47 were labelled by the antibody, including 28/42 of the nodular sclerosis type and 4/5 of mixed cellularity type (3). Among 51 nasopharyngeal carcinomas, the antibody labelled 40/51, including 8/10 keratinising squamous cell carcinomas, 7/12 non-keratinising squamous cell carcinomas and 25/29 undifferentiated carcinomas (4).

FRANÇAIS
<p><b>Utilisation prévue</b> Usage diagnostique <i>in vitro</i>.</p>

Monoclonal Mouse Anti-Epstein-Barr Virus, LMP, Clones CS.1-4, est destiné à l'usage en immunocytochimie. L'anticorps marque les cellules infectées au virus de Epstein-Barr exprimant la protéine latente de membrane (LPM), et est un moyen utile pour l'identification des cellules tumorales dans les maladies de Hodgkin associées au virus de Epstein-Barr (1-3) et carcinome nasopharyngien (4). L'identification différentielle est aidée par les résultats d'un panel d'anticorps. L'interprétation doit être effectuée par un pathologiste qualifié selon le contexte de l'histoire clinique du patient et autres épreuves diagnostiques.

### Introduction

Le virus de Epstein-Barr (VEB) est un herpèsvirus humain, normalement trouvé comme infection asymptomatique répandue avec >95% de la population adulte mondiale étant porteurs durant toute leur vie. Le génome du virus est une molécule ADN bicaténaire d'environ 172 kb encodant au moins 80 protéines. Deux souches de VEB existent, malgré que la partie majeure du génome paraît être identique (5, 6). Les cellules et néoplasmes infectées au VEB en général montrent l'un des trois différents modèles expressifs de gènes associés à la latence virale. En latence du type I, seulement l'antigène nucléaire 1 du virus d'Epstein Barr (EBNA-1) est exprimé ensemble avec deux petits ARN nucléaires polyadénylés (EBER 1 et 2) observé dans le lymphome de Burkitt. En latence du type II, l'expression supplémentaire de trois protéines membranaires latentes, LMP-1, LMP-2A et LMP-2B sont observées, dans la maladie de Hodgkin et le carcinome nasopharyngien. La latence du type III est observée dans les maladies lymphoprolifératives se produisant chez les individus immunodéprimés et lignes cellulaires lymphoblastoïdes transformées au VEB. Dans ce groupe, tous les six EBNAs (EBNA-1/2/3A/3B/3C/LP), tous les trois LMP et les deux EBERS sont exprimés (6).

La protéine membranaire intégrale, LMP-1, est encodée par le gène *BNRF1 gene* et contient 386 acides aminés avec une masse moléculaire de 63 kDa. Elle est considérée comme protéine oncogène vu qu'elle est impliquée dans un minimum de quatre voies de transmission des facteurs de transcription, et déclenche l'expression de marqueurs de face cellulaire multiples et de molécules d'adhésion cellulaire (4, 5). VEB est associé avec certaines tumeurs d'origine lymphoïde et épithéliale y compris le lymphome de Burkitt (LB), le lymphome immunoblastique (LIB), le lymphome à cellules T, la maladie de Hodgkin (MH), le carcinome nasopharyngien (CNP) et carcinome gastrique. La seule situation où la réplication entière du virus peut sûrement être observée est dans la leucoplasie chevelue, une lésion bénigne de la langue fréquemment rencontrée chez les patients atteints du SIDA (5, 6).

### Réactif fourni

Un mélange de quatre anticorps monoclonaux de souris fourni à l'état liquide comme culture cellulaire surageante dialysée pour 0,05 mol/L Tris/HCl, pH 7,2, et contenant 15 mmol/L NaN<sub>3</sub>.

**Clones:** CS.1, CS.2, CS.3 et CS. 4 (7). **Isotype:** IgG1, kappa.

**Concentration de l'IgG de souris:** Voir l'étiquette sur le flacon à échantillon.

### Immunogène

Protéine de fusion recombinante contenant la séquence de beta-galactosidase bactérienne et la moitié du carboxyl de LMP encodée au VEB (7).

### Spécificité

En buvardage de Western avec les lysats des lignes cellulaires lymphoblastoïdes transformés au VEB, l'anticorps marque une bande majeure de 57-66 kDa selon l'isolat du virus, parfois accompagné par une bande mineure de 50-55 kDa correspondant à la taille complète et forme tronquée de LMP. L'anticorps reconnaît 20 isolats VEB géographiquement distincts (7). L'anticorps réagit croisément avec un doublet de 43-44 kDa de protéines cellulaires normales non caractérisées dans des extraits cellulaires y compris ceux des lignes cellulaires à témoin négatif VEB (7).

L'anticorps marque une ligne cellulaire lymphoblastique positive au VEB établie par infection des cellules B normales au repos avec le virus B95.8, alors que la ligne cellulaire BL2, établie à partir d'un patient atteint de LB rare, sporadique, négatif au VEB, aussi bien que d'autres isolats cellulaires sans rapport y compris les lymphocytes B et T de l'amygdale le foie et thymus foetal, des fibroblastes du fœtus en culture, des lignes cellulaires leucémiques humaines HSB2 et K562 et 7 lignes cellulaires B négatives au VEB ne montrent pas de marquage, excepté des protéines à doublet cellulaire (7).

### Précautions

- Pour utilisateurs professionnels.
- Ce produit contient de l'azoture de sodium (NaN<sub>3</sub>), produit chimique hautement toxique à l'état pur. A certaines concentrations, bien qu'il ne soit pas classifié comme dangereux, l'azoture de sodium peut entraîner des réactions avec une tuyauterie en plomb et en cuivre en formant des dépôts d'azotures métallisés fortement explosifs. Durant son évacuation, laisser couler l'eau à flot pour éviter toute accumulation d'azotures métallisés dans la tuyauterie.
- Comme pour tout dérivé biologique dangereux à manipuler, une précision s'impose.

### Conservation

Conserver à 2-8°C. Ne pas utiliser après la date d'expiration mentionnée sur le flacon. Dans le cas où les réactifs sont conservés dans des conditions autres que celles spécifiées, les conditions doivent être vérifiées 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 opérés simultanément avec les échantillons du patient. Si une coloration imprévue est constatée qui ne peut pas être expliquée par des changements de procédures de laboratoire et qu'un problème avec le produit est suspecté, contactez nos Services Techniques.

### Préparation de l'échantillon

**Coupes de paraffine:** L'anticorps peut être utilisé pour le marquage des coupes inclues dans la paraffine fixées aux formol. L'avant-traitement des tissus avec la protéinase K ou par restauration de l'épitope par la chaleur est requis. Pour la restauration de l'épitope par la chaleur, des résultats optimaux sont obtenus avec DakoCytomation Target Retrieval Solution, code No. S 1700, DakoCytomation Target Retrieval Solution, pH Elevé, code No. S 3308, 10 mmol/l tampon citrate, pH 6.0, ou 10 mmol/l tampon Tris, 1 mmol/l EDTA, pH 9.0. Les coupes de tissus ne doivent pas s'assécher durant le traitement ou durant la procédure de coloration immunocytochimique suivante. A moins que la stabilité de l'anticorps dilué et le témoin négatif ait été établie dans la procédure de coloration, il est requis de diluer ces réactifs juste avant l'usage, ou de diluer dans DakoCytomation Antibody Diluent, code No. S 0809. Les témoins positifs et négatifs doivent être écoulés simultanément avec l'échantillon du patient.

**Sections congelées et préparations cellulaires:** L'anticorps peut être utilisé pour le marquage des coupes congelées fixées à l'acétone et préparations cellulaires (1, 7).

**Procédure de coloration**

**Dilution:** Monoclonal Mouse Anti-Epstein-Barr Virus, LMP, code No. M 0897, peut être utilisé à intervalle de dilution de 1:100 à 1:200 et appliqué sur des coupes incluses dans la paraffine fixées au formol du cõlon humain positif au BEV pendant 20 minutes par restauration de l'épitope par la chaleur dans DakoCytomation Target Retrieval Solution, code No. S 1700, et pendant 30 minutes d'incubation à temperature ambiante avec l'anticorps primaire. Les conditions optimales peuvent varier selon le spécimen et la méthode de préparation et doivent être déterminées par chaque laboratoire individuel. Le témoin négatif requis est DakoCytomation Mouse IgG1, code No. X 0931, dilué à la même concentration de l'IgG de souris comme anticorps primaire.

**Révélation:** DAKO LSAB™+/HRP kit, code No. K 0679, et DAKO EnVision™+/HRP kits, code Nos. K 4004 et K 4006, sont requis. Pour les coupes congelées et les préparations cellulaires, DakoCytomation APAAP kit, code No. K 0670, est une alternative appropriée si la coloration péroxidase endogène est à craindre. Suivre la procédure inclue dans le kit de révélation choisi.

**Limitations spécifiques du produit**

Dans les coupes congelées, une faible réactivité a été observée dans les cellules de muscle lisse et une partie infime des plasmocytes (1). Une réactivité a aussi été observée dans le tissu nerveux périphérique (8). Dans les coupes incluses dans la paraffine, une faible réactivité croisée a été révélée dans la troisième et la quatrième couches corticales, dans les nerfs périphériques et dans la couche de la cellule basale de la peau normale. Les cellules myoépithéliales and les cellules de muscle lisse ont aussi révélé une réactivité croisée infime (8). Pour les lymphomes B et T non-Hodgkiniens, les coupes congelées ont donné de meilleurs résultats de coloration que les coupes incluses dans la paraffine (8).

**Caractères de performance**

Les cellules marquées par l'anticorps montrent un modèle de coloration cytoplasmique et membranaire.

**Tissus normaux:** L'anticorps ne marque pas la muqueuse naso-pharyngienne normale, ni ne sont les petits lymphocytes infiltrants, le stroma desmoplastique et l'épithélium sus-jacent normal dans les échantillons nasopharyngiens normaux primaires (4). L'anticorps ne révèle pas de marquage dans le gros intestin, l'appendice et le pancréas (8). Un marquage fort des précurseurs précitlinaires normaux de myéloïdes et d'érythrocytaires peut être révélé malgré l'absence totale de VEB par PCR (9).

**Tissus anormaux:** Dans les coupes congelées de 84 cas de la maladie de Hodgkin, 40/84 étaient fortement révélés par l'anticorps dans les cellules Hodgkiniennes et les cellules de Reed-Sternberg. Les prises d'essai variaient selon le sous-type histologique, où une coloration a été révélée dans 1/10 à prédominance lymphocytaire nodulaire, 16/52 à sclérose nodulaire et 23/24 à type de cellularité mixte (1). L'anticorps marquait 22/46 cas de tissu inclu dans la paraffine de la maladie de Hodgkin avec 1/12 à prédominance lymphocytaire, 12/24 à sclérose nodulaire, 6/7 du type à cellularité mixte et 3/3 de sous-types de déplétion lymphocytaire (2). Dans un autre essai comprenant 47 de lymphomes Hodgkinien, un total de 32/47 étaient marqués par l'anticorps, y compris 28/42 à type de sclérose nodulaire et 4/5 du type à cellularité mixte (3). Parmi 51 des carcinomes nasopharyngiens, l'anticorps marquait 40/51 des cas, y compris 8/10 cas de carcinomes kératiniseux de la cellule squameuse, 7/12 de cas de carcinomes non-kératiniseux de la cellule squameuse et 25/29 de cas de carcinomes indifférenciés (4).

<p><b>DEUTSCH</b></p>

**Zweckbestimmung**

Für in-vitro-Diagnostik.

„Monoclonal Mouse Anti-Epstein-Barr Virus, LMP, Clones CS.1-4“, ist für den immunzytochemischen Gebrauch bestimmt. Der Antikörper markiert durch Epstein-Barr-Virus infizierte Zellen, welche das latente Membranprotein (LMP) exprimieren. Er ist ein nützliches Mittel zur Identifizierung von Tumorzellen in EBV-assoziiierter Hodgkin-Krankheit (1 - 3) und in Karzinom des Nasopharynx (4). Für die differenzierte Identifizierung sind Ergebnisse einer Anzahl von Antikörpern behilflich. Die Interpretation muss unter Berücksichtigung der klinischen Anamnese des Patienten und im Kontext anderer diagnostischer Untersuchungen durch einen erfahrenen Pathologen erfolgen.

**Einleitung**

Epstein-Barr-Virus (EBV) ist ein humanes Herpesvirus, das normalerweise mit einer weit verbreiteten asymptomatischen Infektion einhergeht. Mehr als 95 % der erwachsenen Bevölkerung weltweit sind lebenslängliche Träger. Das Genom des Virus besteht aus einem doppelsträngigen DNA-Molekül von ungefähr 172 kB und kodiert mindestens 80 Proteine. Es sind zwei Stämme des EBV bekannt, obwohl das Genom größtenteils identisch zu sein scheint (5, 6). EBV-infizierte Zellen und Neoplasien zeigen meistens eines der drei verschiedenen Expressionsmuster der latenzassoziierten viralen Gene. In der Latenz des Typs I wird nur das EBV-kodierte Kern-Antigen (EBV-encoded-nuclear-antigen 1 = EBNA-1) zusammen mit zwei kleinen polyadenylierten Kern-Ribonukleinsäuren (EBER 1 und 2) exprimiert, die in Burkitt-Lymphom auftreten. In der Latenz des Typs II werden noch drei weitere latente Membranproteine (LMP-1, LMP-2A und LMP-2B) exprimiert; diese werden in der Hodgkin-Krankheit und im Karzinom des Nasopharynx angetroffen. Die Latenz des Typs III tritt in lymphoproliferativen Erkrankungen in immungeschwächten Personen und auf EBV-transformierten lymphoblastoiden Zelllinien, auf. In letzterer Gruppe sind alle sechs Arten der EBNA (EBNA- 1/2/3A/3B/3C/LP), alle drei LPM und zwei EBER auf den Zellen exprimiert (6).

Das membranintegrierte Protein LMP-1 wird vom *BNRF1-Gen* kodiert und enthält 386 Aminosäuren mit der Molekularmasse 63 kD. Es gilt als ein onkogenes Protein und ist an mindestens vier Signalbahnen für Transkriptionsfaktoren beteiligt, wodurch er die Expression multipler Zelloberflächenmarker und Zelladhäsionsmoleküle induziert (4, 5). EBV ist mit bestimmten Tumoren lymphoiden und epithelialen Ursprungs assoziiert, darunter Burkitt-Lymphom (BL), Immunoblastenlymphom (IBL), T-Zell-Lymphom, Hodgkin-Krankheit (HD) Karzinom des Nasopharynx (NPC) und Magenkarzinom. Die einzige Situation wo das volle Virus nach verlässlichen Beobachtungen repliziert wird ist die Haarleukoplakie, eine gutartige Läsion der Zunge, welche oft bei AIDS-Patienten auftritt (5, 6).

**Das vorliegende Reagenz**

Ein Gemisch vierer monoklonaler Maus-Antikörper, geliefert in flüssiger Form als Zellkulturüberstand, dialysiert gegen 0,05 mol/L Tris/HCl bei pH 7,2, welches 15 mmol/L NaN₃ enthält.

**Klone:** CS.1, CS.2, CS.3 und CS.4 (7). **Isotyp:** IgG1, Kappa.

**Maus-IqG Konzentration:** Siehe Etikett am Fläschchen.

**Immunogen**

Ein rekombinantes Fusionsprotein, welches eine Sequenz bakterieller Beta-Galaktosidase und die Karboxylhälfte des EBV-kodierten LMP enthält (7).

**Spezifität**

In Westernblotanalyse mit Lysaten EBV-transformierter lymphoblastoider Zelllinien markiert der Antikörper ein, je nach Virusisolat, 57 - 66 kD schweres Hauptband, welches manchmal von einem kleineren Band von 50 – 55 kD begleitet wird, entsprechend der gesamten Länge und verstümmelten Form des LMP. Der Antikörper erkennt 20 geographisch unterschiedliche EBV-Isolate (7). Der Antikörper kreuzreagiert mit einem 43 – 44 kD schweren Dublett nicht näher charakterisierter Normalzell-Proteine in Zellextrakten, einschließlich solcher aus EBV-negativen Kontrollzelllinien (7).

Der Antikörper markiert normale EBV-positive lymphoblastoide Zellen aus einer Zelllinie, die durch Infizierung normaler ruhender B-Zellen mit dem B95.8-Virus gebildet wurde. Die BL2-Zelllinie hingegen, die von einem seltenen EBV-negativen sporadischen BL-Patienten stammt, wie auch andere nicht zugehörige Zellisolate, etwa B- und T-Lymphozyten aus den Tonsillen, fetale Leber und Thymus, kultivierte fetale Fibroblasten, humane leukämische Zelllinien HSB2 und K562 und 7 EBV-negative B-Zelllinien, zeigen keine Markierung, mit Ausnahme des zellulären Proteindubletts (7).

**Sicherheitshinweise**

1. Ausschließlich von geschultem Fachpersonal zu verwenden

2. Dieses Produkt enthält Natriumazid (NaN₃), eine in reiner Form hoch toxische chemische Verbindung. Bei den in diesem Produkt vorliegenden Konzentrationen, obwohl nicht als gefährlich klassifiziert, kann Natriumazid mit in Abflussinstallationen vorhandenem Blei oder Kupfer reagieren und zur Anreicherung von hochexplosiven Metallaziden führen. Nach der Entsorgung mit reichlich Wasser nachspülen, um den Aufbau von Metallazid-Verbindungen in Abflussrohren zu vermeiden.

3. Wie bei jedem Produkt, welches aus biologischen Quellen stammt, sollten die entsprechenden Verfahren zur Handhabung angewandt werden.

**Aufbewahrung**

Bei 2 – 8 °C aufbewahren. Nicht nach dem am Fläschchen angegebenen Verfallsdatum verwenden. Sollten die Reagenzien unter anderen Bedingungen als den beschriebenen aufbewahrt werden, müssen diese vom Anwender verifiziert werden. Es gibt keine offensichtlichen Anhaltspunkte für die mögliche Instabilität dieses Produktes. Es sind daher die

(104986-001)	M 0897/EFG/SUA/24.03.03 p. 3/4
DakoCytomation Denmark A/S · Produktionsvej 42 · DK-2600 Glostrup · Denmark · Tel. +45 44 85 95 00 · Fax +45 44 85 95 95 · CVR No. 33 21 13 17	

Positiv- und Negativkontrollen gleichzeitig mit Patientenproben mitzuführen. Wenn unerwartete Verfärbung beobachtet wird, welche durch Änderungen in Labormethoden nicht erklärt werden kann und ein Verdacht auf ein Problem mit dem Antikörper besteht, bitte Kontakt mit unserem Technischen Beratungs- und Kundendienst aufnehmen.

**Vorbereitung der Proben**

**Paraffinschnitte:** Der Antikörper kann für die Markierung von in Paraffin eingebetteten formalinfixierten Gewebeschnitten verwendet werden. Es wird die Vorbehandlung der Gewebe durch Proteinase-K bzw. durch hitze-induzierte Epitopdemaskierung empfohlen. Optimale Ergebnisse werden durch hitze-induziertes Epitop-Retrieval bei Verwendung der „DakoCytomation Target Retrieval Solution“, Bestell-Nr. S 1700, „DakoCytomation Target Retrieval Solution, High pH“, Bestell-Nr. S 3308, 10 mmol/L Zitratpuffer, pH 6,0, bzw. 10 mmol/L Tris-Puffer, 1 mmol/L EDTA, pH 9,0, erzielt. Die Gewebeschnitte dürfen während der Behandlung bzw. während des nachfolgenden immunzytochemischen Färbungsvorgangs nicht austrocknen. Wurde die Stabilität des verdünnten Antikörpers und der Negativkontrolle im vorliegenden Färbungsverfahren nicht festgestellt, wird empfohlen diese Reagenzien unmittelbar vor Gebrauch zu verdünnen oder die Verdünnung mittels „DakoCytomation Antibody Diluent“, Bestell-Nr. S 0809 vorzunehmen. Positiv- und Negativkontrollen sind gleichzeitig mit Patientenproben mitzuführen.

**Gefrierschnitt- und Zellpräparate:** Der Antikörper kann für die Markierung von azetonfixierten Gefrierschnitten und Zellpräparaten verwendet werden (1, 7).

**Färbungsverfahren**

**Verdünnung:** „Monoclonal Mouse Anti-Epstein-Barr Virus, LMP“, Bestell-Nr. M 0897, kann für formalinfixierte in Paraffin eingebettete Schnitte des humanen EBV-positiven Dickdarms im Verdünnungsbereich zwischen 1:100 und 1:200 verwendet werden, wenn hitze-induziertes Epitop-Retrieval unter Einwirkung von „DakoCytomation Target Retrieval Solution“, Bestell-Nr. S 1700, 20 Minuten lang angewandt wird und eine Inkubation bei Raumtemperatur mit dem primären Antikörper während 30 Minuten stattfindet. Die optimalen Bedingungen schwanken je nach Probe und Präpariermethode und sollten von jedem Labor für sich bestimmt werden. Die empfohlene Negativkontrolle ist „DakoCytomation Mouse IgG1“, Bestell-Nr. X 0931, verdünnt zur gleichen Maus-IgG-Konzentration wie der primäre Antikörper.

**Sichtbarmachen:** „DAKO LSAB™+/HRP-Kit“, Bestell-Nr. K 0679 und „DAKO EnVision™+/HRP-Kits“, Bestell-Nr. K 4004 und K 4006, werden empfohlen. Für Gefrierschnitte und Zellpräparate bildet „DakoCytomation APAAP kit“, Bestell-Nr. K 0670, eine gute Alternative falls endogene Peroxidase-Färbung ein Problem darstellt. Das Vorgehen, welches jeweils dem gewählten Visualisierungskit beiliegt, befolgen.

**Spezifische Produktbeschränkungen**

In Gefrierschnitten konnte eine schwache Kreuzreaktivität mit glatten Muskelzellen und einer kleinen Fraktion der Plasmazellen festgestellt werden (1). Es wurde auch Reaktivität mit peripherem Nervengewebe berichtet (8). In formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten Schnitten wurde schwache Kreuzeraktivität mit den Schichten 3 und 4 der Hirnrinde, mit peripheren Nerven und mit Stratum basale der normalen Haut nachgewiesen. Auch Myoepithelien und glatte Muskelzellen zeigten eine schwache Kreuzreaktivität (8). In B- und T-Zell- Non-Hodgkin Lymphomen waren die Färbungsergebnisse in Gefrierschnitten besser als in formalinfixierten in Paraffin eingebetteten Schnitten (8).

**Leistungsmerkmale**

Die durch den Antikörper markierten Zellen zeigen ein zytoplasmatisches und membranales Färbungsmuster.

**Normales Gewebe:** Normale Nasopharynx-Schleimhaut wird vom Antikörper nicht markiert. Nicht markiert werden auch kleine infiltrierende Lymphozyten, desmoplastisches Stroma und das bedeckende normale Epithel der primären Proben aus dem Nasopharynx (4). Kolon, Appendix und Pankreas werden vom Antikörper nicht markiert (8). Starke Markierung normaler früher myeloider und erythroider Vorläuferzellen kann gesehen werden, selbst wenn in der Polymerase-Kettenreaktion jeglicher Hinweis auf EBV fehlt (9).





**Abnormales Gewebe:** In Gefrierschnitten von 84 Fällen der Hodgkin-Krankheit waren 40/84 Hodgkin- und Reed-Sternberg-Zellen mit dem Antikörper stark markiert. Der Anteil variierte entsprechend den histologischen Untertypen: Färbung war vorhanden in 1 Fall von 10 mit nodulärer lymphyozytärer Prädominanz, in 16/52 Fällen mit nodulär-sklerosierender Form und in 23/24 Fällen mit gemischtzelliger Form (1). Der Antikörper markierte 22/46 in Paraffin eingebettete Gewebeschnitte aus Patienten mit Hodgkin-Krankheit: 1/12 mit Lymphozytenprädominanz, 12/24 mit nodulär-sklerosierender Form, 6/7 mit gemischtzelliger Form und 3/3 mit lymphozytenarmer Form (2). In einer anderen Studie, welche 47 Hodgkin-Lymphome einbezog, waren insgesamt 32/47 Fälle durch den Antikörper markiert. Darin waren enthalten 28/42 der nodulär-sklerosierenden Form und 4/5 der gemischtzelligen Form (3). Von 51 Karzinomen des Nasopharynx markierte der Antikörper 40/51, darunter 8/10 keratinisierende Plattenepithel-Karzinome, 7/12 nicht verhornende Plattenepithel-Karzinome und 25/29 nicht differenzierte Karzinome (4).

--

**References/ Références/ Literatur**

- Pallesen G, Hamilton-Dutoit SJ, Rowe M, Young LS. Expression of Epstein-Barr virus latent gene products in tumour cells of Hodgkin’s disease. Lancet 1991;337:320-2.
- Murray PG, Young LS, Rowe M, Crocker J. Immunohistochemical demonstration of the Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein in paraffin sections of Hodgkin’s disease. J Pathol 1992;166:1-5.
- Engel M, Essop MF, Close P, Hartley P, Pallesen G, Sinclair-Smith C. Improved prognosis of Epstein-Barr virus associated childhood Hodgkin’s lymphoma: study of 47 South African cases. J Clin Pathol 2000;53:182-6.
- Vera-Sempere FJ, Burgos JS, Botella MS, Cordoba J, Gobernado M. Immunohistochemical expression of Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein (LMP-1) in paraffin sections of EBV-associated nasopharyngeal carcinoma in Spanish patients. Oral Oncol, Eur J Cancer 1996;32B:163-8.
- Baumforth KRN, Young LS, Flavell KJ, Constandinou C, Murray PG. The Epstein-Barr virus and its association with human cancers [review]. J Clin Pathol: Mod Pathol 1999;52:307-22.
- Cruchley AT, Williams DM, Niedobitek G, Young LS. Epstein-Barr virus: biology and disease [review]. Oral Diseases 1997;3 Suppl 1: S156-63.
- Rowe M, Evans HS, Young LS, Hennessy K, Kieff E, Rickinson AB. Monoclonal antibodies to the latent membrane protein of Epstein-Barr virus reveal heterogeneity of the protein and inducible expression in virus-transformed cells. J Gen Virol 1987;68:1575-86.
- Jiwa NM, Oudejans JJ, Dukers DF, Vos W, Horstman A, van der Valk P, et al. Immunohistochemical demonstration of different latent membrane protein-1 epitopes of Epstein-Barr virus in lymphoproliferative diseases. J Clin Pathol 1995;48:438-42.
- Leong ASY, Cooper K, Leong FJWM. Manual of diagnostic antibodies for immunohistology. Oxford University Press; 199. p. 162.

**Explanation of symbols/ Légende des symboles/ Erläuterung der Symbole**

<b>REF</b>	Catalogue number <p>Référence du catalogue <p>Bestellnummer</p></p>	 <p>2 °C <span style="margin-left: 20px;">8 °C</span></p>	Temperature limitation <p>Limites de température <p>Zulässiger Temperaturbereich</p></p>	 <p>Manufacturer <p>Fabricant <p>Hersteller</p></p></p>
<b>IVD</b>	In vitro diagnostic medical device <p>Dispositif médical de diagnostic in vitro <p>In-Vitro-Diagnostikum</p></p>	<b>LOT</b>	Batch code <p>Code du Lot <p>Chargenbezeichnung</p></p>	
	Consult instructions for use <p>Consulter les instructions d'utilisation <p>Gebrauchsanweisung beachten</p></p>		Use by <p>Utiliser jusque <p>Verwendbar bis</p></p>	

(104986-001)	M 0897/EFG/SUA/24.03.03 p. 4/4
DakoCytomation Denmark A/S · Produktionsvej 42 · DK-2600 Glostrup · Denmark · Tel. +45 44 85 95 00 · Fax +45 44 85 95 95 · CVR No. 33 21 13 17	