

**Monoclonal Mouse
Anti-Human CD68**
Clone PG-M1
Code M0876

ENGLISH

Intended use	For in vitro diagnostic use. Monoclonal Mouse Anti-Human CD68, Clone PG-M1, is intended for use in immunohistochemistry (IHC). The antibody labels macrophages and is a useful aid for the classification of acute myeloid leukemia (AML), and histiocytic sarcoma (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.
Summary and explanation	CD68 is a highly glycosylated lysosomal membrane protein with an Mr of 110 000. The CD68 protein belongs to a family of lysosomal glycoprotein (LGP)/plasma membrane shuttling proteins that play a role in endocytosis and/or lysosomal trafficking. CD68 is expressed strongly in cytoplasmic granules, and weakly on the surface of macrophages, monocytes, neutrophils, basophils and NK-cells. Additionally, CD68 is expressed by some peripheral blood B cells and may be weakly expressed in B-cell type acute lymphoblastic leukemia (B-ALL) cells. CD68 can also be found in the cytoplasm of non-hematopoietic tissues, especially the liver, and renal glomeruli and tubules (2). Unlike many other CD leucocyte antigens, the CD68 molecule is antigenically very heterogenous, and different antibodies to CD68 show different cellular reactivities (3). Refer to <i>Dako</i> General Instructions for Immunohistochemical Staining 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	Monoclonal mouse antibody 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 ₃ . <u>Clone:</u> PG-M1 (3). <u>Isotype:</u> IgG3, kappa. <u>Mouse IgG concentration:</u> see label on vial. The protein concentration between lots may vary without influencing the optimal dilution. The titer of each individual lot is compared and adjusted to a reference lot to ensure a consistent immunohistochemical staining performance from lot-to-lot.
Immunogen	Human mononuclear spleen cell preparation containing more than 80% Gaucher's cells (3).
Specificity	The antibody was clustered as anti-CD68 at the Fifth International Workshop and Conference on Human Leucocyte Differentiation Antigens held in Boston in 1993 (4). The antibody labels COS-1 and WOP cells transfected with CD68 cDNA. Unlike other CD68 antibodies, which label both macrophages and myeloid cells, the PG-M1 antibody detects a fixative-resistant epitope on the macrophage-restricted form of the CD68 antigen (3).
Precautions	1. For in vitro diagnostic use. 2. For professional users. 3. This product contains sodium azide (NaN ₃), a chemical highly toxic in pure form. At product concentrations, though not classified as hazardous, sodium azide may react with lead and copper plumbing to form highly explosive build-ups of metal azides. Upon disposal, flush with large volumes of water to prevent metal azide build-up in plumbing. 4. As with any product derived from biological sources, proper handling procedures should be used. 5. Wear appropriate Personal Protective Equipment to avoid contact with eyes and skin. 6. Unused solution should be disposed of according to local, State and Federal regulations.
Storage	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 Dako Technical Support.
Specimen preparation	<u>Paraffin sections:</u> The antibody can be used for labeling paraffin-embedded tissue sections fixed in formalin, Bouin's fixative or B5 fixative (3). Pre-treatment of deparaffinized tissues with chymotrypsin, trypsin, pepsin, pronase (3), proteinase K, or heat-induced epitope retrieval is required. For heat-induced epitope retrieval of tissues fixed in formalin, optimal results are obtained with Dako Target Retrieval Solution, Code S1700, or 10 mmol/L Tris buffer, 1 mmol/L EDTA, pH 9.0. Less optimal results are obtained with 10 mmol/L citrate buffer, pH 6.0. The tissue sections should not dry out during the treatment or during the following immunohistochemical staining procedure. <u>Frozen sections and cell preparations:</u> The antibody can be used for labeling acetone fixed, frozen sections, although the labeling is slightly weaker than that observed in paraffin sections (3, 4), and cell preparations (3). The user must validate the staining procedure.
Staining procedure	These are guidelines only. Optimal conditions may vary depending on specimen type and preparation method, and should be validated individually by each laboratory. The performance of this antibody should be established by the user when utilized with other manual staining systems or automated platforms. <u>Dilution:</u> Monoclonal Mouse Anti-Human CD68, Code M0876, may be used at a dilution range of 1:50-1:100 when applied on formalin-fixed, paraffin-embedded sections of human tonsil and using 20 minutes heat-induced epitope retrieval in Dako Target Retrieval solution, Code S1700, and 30 minutes incubation at room temperature with the primary antibody. 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 Dako Antibody Diluent, Code S0809. <u>Quality control:</u> Positive and negative control tissues as well as negative control reagent should be run simultaneously using the same protocol as the patient specimens. <u>Visualization:</u> Dako EnVision+HRP kits, e.g. Code K4005, are recommended. Follow the procedure enclosed with the selected visualization kit.

Product-specific limitations	The PG-M1 antibody labels some non-hematopoietic malignancies, especially about 10% of melanomas (3), therefore the classification of histiocytic sarcoma should always be supported by labeling of neoplastic cells for at least another macrophage-restricted marker and/or the leucocyte common antigen, and non-labeling of epithelial and melanoma-associated antigens (1).
Staining interpretation	Cells of the monocyte/macrophage lineage labeled by the antibody show a cytoplasmic (diffuse or granular) staining pattern.
Performance characteristics	<u>Normal tissues:</u> In normal peripheral blood only monocytes are labeled by the antibody. In a wide range of tissues tested, all macrophages were labeled. In bone marrow also osteoclasts were labeled, whereas granulocytes and myeloid precursors were consistently not labeled. A weak reactivity of some megakaryocytes was observed in about 20% of the cases. Kupffer's cells in the liver, mast cells, and synovial cells were the only additional normal cells labeled by the antibody (3). <u>Abnormal tissues:</u> Among 431 malignancies of the lymphohematopoietic system, reactivity with the antibody was restricted to acute myeloid leukemias of the M4 and M5 type, true histiocytic sarcomas, and mastocytosis. Consistently unreactive were acute myeloblastic leukemias of M1, M2, and M3 type, malignant non-Hodgkin's lymphomas of B- and T-cell type, Hodgkins lymphoma, acute lymphoblastic leukemias, and chronic myeloid leukemia. The majority of 370 non-hematopoietic tumors were not labeled with the antibody, exceptions being 15/15 granular cell myoblastomas, 6/13 kidney clear cell carcinomas, 4/10 glioblastomas, 10/18 meningiomas and 5/50 melanomas, and, as expected, 2/2 giant cell tumors of the bone, and 7/7 xanthogranulomas (3).

FRANÇAIS

Utilisation prévue	Pour une utilisation diagnostique in vitro. L'anticorps Monoclonal Mouse Anti-Human CD68, Clone PG-M1, est destiné à être utilisé en immunohistochimie (IHC). L'anticorps marque les macrophages et facilite la classification de la leucémie aiguë myéloïde (LAM), et du sarcome histiocytaire (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 histochimiques non immunologiques.
Résumé et explication	La CD68 est une protéine membranaire lysosomale très glycosylée d'un poids moléculaire de 110 000. La protéine CD68 appartient à une famille de glycoprotéines lysosomales (LGP)/protéines navettes de la membrane cytoplasmique qui jouent un rôle dans l'endocytose et/ou dans le trafic lysosomal. Le CD68 est fortement exprimé dans les granules cytoplasmiques, et faiblement exprimé à la surface des macrophages, des monocytes, des neutrophiles, des basophiles et des cellules NK. De plus, la CD68 est exprimée par certains lymphocytes B du sang périphérique et est faiblement exprimée dans les cellules de leucémie aiguë lymphoblastique à lymphocytes B (LAL-B). La CD68 peut également être présente dans le cytoplasme de tissus non hématopoïétiques, en particulier dans le foie et dans les tubules et glomérules rénaux (2). À la différence de nombreux autres antigènes leucocytaires CD, la molécule de CD68 est très hétérogène d'un point de vue antigénique, et différents anticorps anti-CD68 présentent différentes réactivités cellulaires (3). Consulter le document <i>General Instructions for Immunohistochemical Staining</i> (Instructions générales de coloration immunohistochimique) 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.
Réactifs fournis	Anticorps monoclonal de souris, fourni sous forme liquide en tant que surnageant de culture cellulaire, dialysé contre 0,05 mol/L de Tris/HCl à pH 7,2 et contenant 15 mmol/L d'azide de sodium (NaN ₃). <u>Clone :</u> PG-M1 (3). <u>Isotype :</u> IgG3, kappa. <u>Concentration en IgG de souris :</u> Voir l'étiquette sur le flacon. La concentration en protéines peut varier d'un lot à l'autre sans que cela influence la dilution optimale. Le titre de chaque lot est comparé et ajusté par rapport à un lot de référence pour assurer des performances de coloration immunohistochimiques cohérentes d'un lot à l'autre.
Immunogène	Préparation de cellules humaines mononucléées de la rate contenant plus de 80% de cellules de Gaucher (3).
Spécificité	L'anticorps a été classé comme un anti-CD68 à la Fifth International Workshop and Conference on Human Leucocyte Differentiation Antigens (Cinquième Conférence et Atelier Internationaux sur les Antigènes de Différenciation des Leucocytes Humains (HLDA)), événement qui s'est tenu à Boston en 1993 (4). L'anticorps marque les cellules COS-1 et WOP transfectées avec l'ADNc de la CD68. À la différence des autres anticorps anti-CD68 qui marquent les macrophages et les cellules myéloïdes, l'anticorps PG-M1 détecte un épitope résistant aux fixateurs sur la forme de l'antigène CD68 qui est spécifique aux macrophages (3).
Précautions d'emploi	1. Pour utilisation diagnostique in vitro. 2. Pour utilisateurs professionnels. 3. Ce produit contient de l'azide de sodium (NaN ₃), produit chimique hautement toxique dans sa forme pure. Aux concentrations du produit, bien que non classé comme dangereux, l'azide de sodium peut réagir avec le cuivre et le plomb des canalisations et former des accumulations d'azides métalliques hautement explosives. Lors de l'élimination, rincer abondamment à l'eau pour éviter toute accumulation d'azide métallique dans les canalisations. 4. Comme avec tout produit d'origine biologique, respecter les procédures de manipulation appropriées. 5. Porter un équipement de protection individuelle approprié pour éviter tout contact avec les yeux et la peau. 6. Les solutions non utilisées doivent être éliminées conformément aux réglementations locales, nationales et européennes.
Conservation	Conserver entre 2 et 8 °C. Ne pas utiliser après la date de péremption imprimée sur le flacon. Si les réactifs sont conservés dans des conditions autres que celles indiquées, celles-ci doivent être validées par l'utilisateur. Il n'existe pas de signe particulier pour indiquer l'instabilité de ce produit. Par conséquent, des contrôles positifs et négatifs doivent être testés en même temps que les échantillons de patient. Si une coloration inattendue est observée, qui ne peut être expliquée par des différences dans les procédures du laboratoire et qu'un problème lié à l'anticorps est suspecté, contacter l'assistance technique de Dako.
Préparation des échantillons	<u>Coupes en paraffine :</u> L'anticorps peut être utilisé pour le marquage des coupes de tissus incluses en paraffine et fixées au formol, au fixateur de Bouin ou au fixateur B5 (3). Le prétraitement des tissus déparaffinés par la chymotrypsine, la trypsine, la pepsine, la pronase (3), la protéinase K ou avec une restauration d'épitope induite par la chaleur (HIER) est nécessaire. Pour la restauration d'épitope induite par la chaleur des tissus fixés au formol, des résultats optimaux sont obtenus avec le produit Dako Target Retrieval Solution, réf. S1700 ou avec un tampon Tris à 10 mmol/L, EDTA à 1 mmol/L, à pH 9,0. Des résultats moins optimaux sont obtenus dans un tampon citrate à 10 mmol/L, à pH 6,0. Les coupes de tissus ne doivent pas sécher lors du traitement ni lors de la procédure de coloration immunohistochimique suivante. <u>Coupes congelées et préparations cellulaires :</u> L'anticorps peut être utilisé pour le marquage des coupes congelées fixées à l'acétone bien que le marquage soit légèrement plus faible que celui observé dans les coupes en paraffine (3, 4), et les préparations cellulaires (3). L'utilisateur doit valider la procédure de coloration.

