



**Monoclonal Mouse  
Anti-Human Podoplanin**  
Clone D2-40

---

**English**  
**Code M3619**

**Intended use**

For in vitro diagnostic use

Monoclonal Mouse Anti-Human Podoplanin, Clone D2-40 is intended for use in immunohistochemistry (IHC). This antibody labels the lymphatic endothelium marker podoplanin in normal and neoplastic tissues. The antibody is a useful aid for classification of a variety of cancers with lymphatic invasion (1, 2). Differential classification of tumors 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**

Podoplanin is a ~38 kDa O-linked transmembrane sialoglycoprotein which is expressed in the endothelium of lymphatic capillaries, but not in the blood vasculature (3). Besides the expression in lymphatic endothelium, podoplanin is also found in a variety of other tissues, including mesothelial cells, reticular cells, follicular dendritic cells, ovarian and testicular germ cells (4). Anti-Podoplanin has also been demonstrated to react with lymphatic endothelium and is unreactive with vascular endothelium (1, 2) and aid in the classification of primary tumors with lymphatic invasion (1, 2). The use of other markers in conjunction with podoplanin has been shown to aid in classification of mesothelioma and metastatic adenocarcinoma (5) as well as seminomas and follicular dendritic cell tumors (6).

Refer to *Dako 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 tissue culture supernatant in 0.05 mol/L Tris-HCl, pH 7.2 and 0.015 mol/L sodium azide. This product contains stabilizing protein.

Clone: D2-40 (7)    Isotype: IgG1, kappa

Mouse IgG concentration: 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**

Dysgerminoma tissue (7).

**Specificity**

Clone D2-40 was tested by Western blotting of cell lysates from a variety of tumor cell lines. D2-40 identified a 40 kDa band in immunoblots of HEY ovarian epithelial carcinoma cells and a slightly higher molecular weight form in blots of MGH-U3 cells. D2-40 immunoreactivity has also been observed in Western blots of SK-OV-3 and Caov-3 ovarian epithelial carcinoma cells, PA-1PA-1 ovarian teratocarcinoma cells, Tera-1 and Tera-2 testicular teratocarcinoma cells, 833 embryonal carcinoma cells, RT-4 bladder transitional carcinoma cells and U-2 OS osteosarcoma cells. No reactivity was observed in Western blots of other tumor cell lines derived from a variety of cancers (7).

The effect of enzyme digestion on the immunoreactivity of D2-40 was tested using affinity-purified antigen from HEY cells and intact HEY cells. The immunoreactivity of D2-40 with Western blots of purified antigen and with cells by flow cytometry was unaffected by the removal of sialic acid residues through neuraminidase treatment of the cells or protein. Treatment of protein or cells with O-sialoglycoprotease destroyed the immunoreactivity of D2-40 in both Western blotting and flow cytometry, demonstrating that the antigen recognized by D2-40 is an O-linked glycoprotein (7).

**Materials required, but not supplied**

Refer to *Dako General Instructions for Immunohistochemical Staining* and/or the detection system instructions.

Suggested diluent(s) for IHC procedures: Antibody Diluent (Code S0809)

The following negative control is recommended for IHC procedures: Mouse IgG1 (Code X0931)

**Precautions**

1. For in vitro diagnostic use.
2. For professional users.
3. This product contains sodium azide (NaN<sub>3</sub>), a chemical highly toxic in pure form. At product concentrations, though not classified as hazardous, NaN<sub>3</sub> 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 reagents 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 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.

## Specimen preparation

**Paraffin sections:** Anti-Podoplanin can be used on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. Pretreatment of tissue with proteolytic enzymes is not recommended.

The deparaffinized tissue sections must be treated with heat prior to the IHC staining procedure. Heat-induced epitope retrieval (HIER) involves immersion of tissue sections in a pre-heated buffer solution and maintaining heat in a water bath or steamer (95–99 °C). Use a 20-minute heating protocol for HIER performed at 95–99 °C; after thermal treatment, allow the jar with buffer and slides to cool for 20 minutes at room temperature. Rinse well with buffer or deionized water following HIER. For greater adherence of tissue sections to glass slides, the use of Silanized Slides (Code S3003) is recommended. Target Retrieval Solution (Code S1700) or 10x Concentrate (Code S1699) is recommended.

## 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.

**Dilution:** M3619 may be used at a dilution 1:100–1:200 when performing IHC using the EnVision+ detection system. Follow the recommended procedure for the detection system selected.

**Quality control:** Positive and negative control tissues as well as negative control reagent should be run simultaneously using the same protocol as the patient specimens.

## Staining interpretation

The cellular staining pattern is cytoplasmic and sometimes membranous.

## Performance characteristics

**Normal tissues:** The antibody strongly immunostains lymphatic endothelium, ganglion cells and nerve in many normal tissue types. Vascular endothelial cells are not labeled in all normal tissues tested (8).

<b>Tissue Type (# tested)</b>	<b>Labeled Tissue Elements</b>
Adrenal (3)	2/3 cytoplasm of capsular fibroblasts; 1/3 cytoplasm of interstitial fibroblasts; 1/3 cytoplasm of pericapsular lymphocytes
Bone marrow (3)	3/3 not labeled
Brain, cerebellum (3)	3/3 cytoplasm of neuropil
Brain, cerebrum (3)	3/3 nuclei of rare astrocytes
Breast (3)	3/3 cytoplasm of myoepithelial cells
Cervix (3)	3/3 membrane and/or cytoplasm of basilar epithelial cells, 3/3 cytoplasm of stromal fibroblasts
Colon (3)	2/3 lymphocytes
Esophagus (3)	1/3 cytoplasm of ganglion cells in muscle; 1/3 cytoplasm of basilar epithelium
Heart (3)	2/3 cytoplasm of myocytes
Kidney (3)	1/3 cytoplasm of pericapsular fibroblasts
Liver (3)	3/3 not labeled
Lung (3)	2/3 cytoplasm of bronchial epithelial cells, 3/3 cytoplasmic edge of alveolar cells
Mesothelial cells (3)	1/3 cytoplasm of mesothelial cells
Ovary (3)	3/3 cytoplasm of ovarian stromal cells; 1/3 cytoplasm of surface epithelium of inclusion cysts
Pancreas (3)	2/3 cytoplasm of periductal fibroblasts; 1/3 cytoplasm of ductal myoepithelial cells
Parathyroid (3)	3/3 not labeled
Peripheral nerve (3)	2/3 cytoplasm of perineurium
Pituitary (3)	1/3 cytoplasm of pericapsular fibroblasts in neurohypophysis; 1/3 cytoplasm of neuropil in neurohypophysis
Prostate(3)	3/3 cytoplasm of basal cells of ducts; 3/3 cytoplasm of stromal fibroblasts
Salivary gland (3)	3/3 cytoplasm of ductal and acinar myoepithelial cells
Skeletal muscle (3)	3/3 cytoplasm of perimysium
Skin (3)	3/3 cytoplasm of myoepithelial cells of adnexal structures
Small intestine (3)	3/3 cytoplasm of myenteric plexus
Spleen (3)	3/3 not labeled
Stomach (3)	3/3 cytoplasm of periglandular fibroblasts; 1/3 cytoplasm of myenteric plexus; 1/3 cytoplasm and membrane of germinal center lymphocytes
Testes (3/3)	3/3 cytoplasm of peritubular fibroblasts
Thymus (3)	3/3 cytoplasm and membrane of medullary lymphocytes
Thyroid (3)	3/3 not labeled
Tonsil (3)	3/3 cytoplasm and membrane of basilar epithelial cells and germinal center lymphocytes
Uterus (3)	3/3 cytoplasm of myometrium; 1/3 cytoplasm of endometrial glands

Abnormal tissues (2,7):

Tissue Type (# tested)	Labeled Tissue and Tissue Elements
Kaposi's Sarcoma (24): Patch, plaque and nodular stages	24/24
Lymphangioma (10)	10/10 endothelium lining the sinusoidal spaces
Angiosarcoma (7)	3/7
Leiomyosarcoma (10)	3/10
Dermatofibroma (6)	2/6
Malignant fibrous histiocytoma (2)	1/2
Hemangioma (10)	0/10
Glomus tumor (3)	0/3
Angiolipoma (2)	0/2
Pyogenic granuloma (2)	0/2
Vascular malformation (2)	0/2
Hemangiopericytoma (1)	0/1
Hemangioendothelioma (1)	0/1
Dermatofibrosarcoma protuberans (4)	0/4
Neurofibromas (6)	0/6
<i>Pure germ cell tumors</i>	
Seminomas (35)	34/35
Embryonal carcinomas (5)	1/5
Immature and mature teratoma (1)	0/1
<i>Mixed germ cell tumors</i>	
Seminomas (12)	12/12
Embryonal carcinomas (21)	17/21
Immature and mature teratoma (16)	5/16
Yolk sac tumor (4)	1/4
Choriocarcinoma (2)	0/2

## Français

### Réf. M3619

#### Utilisation prévue

Pour utilisation diagnostique in vitro.

L'anticorps Monoclonal Mouse Anti-Human Podoplanin, Clone D2-40, est destiné à être utilisé en immunohistochimie (IHC). Cet anticorps marque la podoplanine, marqueur de l'endothélium lymphatique, dans les tissus sains et néoplasiques. L'anticorps est un outil utile pour la classification de plusieurs cancers avec invasion lymphatique (1, 2). La classification différentielle des tumeurs 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 podoplanine est une O-sialoglycoprotéine transmembranaire d'environ 38 kDa exprimée dans l'endothélium des capillaires lymphatiques, mais pas dans le système vasculaire sanguin (3). Outre l'expression dans l'endothélium lymphatique, la podoplanine est également présente dans plusieurs autres tissus, notamment les cellules mésothéliales, les cellules réticulaires, les cellules dendritiques folliculaires, les cellules germinales ovariennes et les cellules germinales testiculaires (4). Il a également été démontré que l'anticorps Anti-Podoplanin réagit avec l'endothélium lymphatique et n'est pas réactif avec l'endothélium vasculaire (1, 2). Il facilite par ailleurs la classification des tumeurs primaires avec invasion lymphatique (1, 2). Il a été démontré que l'utilisation d'autres marqueurs en association avec la podoplanine facilite la classification des mésothéliomes et des adénocarcinomes métastatiques (5) ainsi que des séminomes et des tumeurs à cellules dendritiques folliculaires (6).

Consulter le document *General Instructions for Immunohistochemical Staining* (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.

#### Réactif fourni

Anticorps monoclonal de souris fourni sous forme liquide comme surnageant de culture tissulaire dans un tampon Tris-HCl à 0,05 mol/L, de pH 7,2, contenant de l'azide de sodium à 0,015 mol/L. Ce produit contient une protéine stabilisante.

Clone : D2-40 (7) Isotype : IgG1, kappa.

Concentration en IgG de souris : 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

Tissu de dysgerminome (7).

## Spécificité

Le clone D2-40 a été testé par analyse Western Blot sur des lysats cellulaires provenant de diverses lignées cellulaires tumorales. Le D2-40 a identifié une bande de 40 kDa dans les immunoblots de cellules HEY de carcinome épithélial ovarien et une forme de poids moléculaire légèrement supérieur dans les blots de cellules MGH-U3. L'immunoréactivité de la D2-40 a également été observée lors d'analyses Western blot de cellules SK-OV-3 et Caov-3 de carcinome épithélial ovarien, de cellules PA-1PA-1 de tératocarcinome ovarien, de cellules Tera-1 et Tera-2 de tératocarcinome testiculaire, de cellules 833 de carcinome embryonnaire, de cellules RT-4 de carcinome transitionnel de la vessie et de cellules U-2 OS d'ostéosarcome. Aucune réactivité n'a été observée dans les analyses par Western Blot sur d'autres lignées cellulaires tumorales provenant de divers cancers (7).

L'effet de la digestion enzymatique sur l'immunoréactivité du D2-40 a été testé en utilisant un antigène purifié par affinité provenant de cellules HEY et de cellules HEY intactes. L'immunoréactivité de la D2-40 avec les tests Western blot d'antigène purifié et avec les cellules analysées par cytométrie de flux n'a pas été affectée par l'élimination des résidus d'acide sialique via un traitement par neuraminidase des cellules ou des protéines. Le traitement des protéines ou des cellules par la O-sialoglycoprotéase a détruit l'immunoréactivité du D2-40 objectivée par Western Blot et cytométrie de flux, prouvant que l'antigène reconnu par la D2-40 est une O-glycoprotéine (7).

## Matériels requis mais non fournis

Consulter le document *General Instructions for Immunohistochemical Staining* (Instructions générales de coloration immunohistochimique) de Dako et/ou les instructions du système de détection.

Diluant recommandé pour les procédures IHC : Antibody Diluent (réf. S0809)

Le contrôle négatif suivant est recommandé pour les procédures IHC : Mouse IgG1 (réf. X0931)

## Précautions d'emploi

1. Pour utilisation diagnostique in vitro.
2. Pour utilisateurs professionnels.
3. Ce produit contient de l'azide de sodium ( $\text{NaN}_3$ ), produit chimique hautement toxique dans sa forme pure. Aux concentrations du produit, bien que non classé comme dangereux, le  $\text{NaN}_3$  peut réagir avec le cuivre et le plomb des canalisations pour former des azides métalliques hautement explosifs. 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 réactifs non utilisés doivent être éliminés conformément aux réglementations locales, nationales et européennes.

## Conservation

Conservé 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

**Coupes en paraffine :** L'anticorps Anti-Podoplanin peut être utilisé pour des coupes de tissus incluses en paraffine et fixées au formol. Le prétraitement des tissus par des enzymes protéolytiques n'est pas recommandé.

Les coupes de tissus déparaffinées doivent être traitées à la chaleur avant d'appliquer la procédure de coloration IHC. La restauration d'épitope induite par la chaleur (HIER) implique l'immersion des coupes de tissus dans une solution tampon préchauffée et le maintien de la chaleur dans un bain-marie ou une étuve (95-99 °C). Suivre un protocole de chauffage de 20 minutes pour la procédure HIER effectuée entre 95 et 99 °C ; après traitement thermique, laisser la cuve contenant le tampon et les lames refroidir pendant 20 minutes à température ambiante. Rincer abondamment à l'aide de tampon ou d'eau déionisée après la procédure HIER. Pour une meilleure adhérence des coupes de tissus sur les lames de verre, il est recommandé d'utiliser des Silanized Slides (réf. S3003). La Target Retrieval Solution (réf. S1700) ou le 10x Concentrate (réf. S1699) sont recommandés.

## Procédure de coloration

Il ne s'agit là que de conseils. Les conditions optimales peuvent varier en fonction du type de prélèvement et de la méthode de préparation, et doivent être validées individuellement par chaque laboratoire. Les performances de cet anticorps doivent être établies par l'utilisateur lorsqu'il est utilisé avec d'autres systèmes de coloration manuelle ou plates-formes automatisées.

**Dilution :** Le M3619 peut être utilisé à une dilution de 1:100 à 1:200 lors de la procédure IHC faisant appel au système de détection EnVision+. Suivre la procédure recommandée pour le système de détection sélectionné.

**Contrôle de qualité :** Les tissus de contrôle positifs et négatifs, ainsi que le réactif de contrôle négatif, doivent être testés en parallèle selon le même protocole que pour les échantillons de patients.

## Interprétation de la coloration

Le motif de coloration cellulaire est cytoplasmique et parfois membranaire.

## Performances

**Tissus sains :** L'anticorps colore fortement l'endothélium lymphatique, les cellules ganglionnaires et les nerfs dans de nombreux types de tissus sains. Les cellules endothéliales vasculaires ne sont pas marquées dans tous les tissus sains testés (8).

Type de tissu (nombre testé)	Éléments tissulaires marqués
Amygdale (3)	3/3 : cytoplasme et membrane des cellules épithéliales basales et des lymphocytes des centres germinatifs
Cellules mésothéliales (3)	1/3 : cytoplasme des cellules mésothéliales
Cerveau, cerebrum (3)	3/3 : noyaux de quelques astrocytes
Cerveau, cervelet (3)	3/3 : cytoplasme du neuropile
Cœur (3)	2/3 : cytoplasme des myocytes

Col de l'utérus (3)	3/3 : membrane et/ou cytoplasme des cellules épithéliales basilaire, 3/3 : cytoplasme de fibroblastes du stroma
Côlon (3)	2/3 : lymphocytes
Estomac (3)	3/3 : cytoplasme de fibroblastes périglandulaires ; 1/3 : cytoplasme de plexus myentérique ; 1/3 : cytoplasme et membrane de lymphocytes du centre germinatif
Foie (3)	3/3 non marqués
Glande salivaire (3)	3/3 : cytoplasme des cellules myoépithéliales acinaires et canalaire
Hypophyse (3)	1/3 : cytoplasme des fibroblastes péricapsulaires dans la neurohypophyse ; 1/3 : cytoplasme du neuropile dans la neurohypophyse
Intestin grêle (3)	3/3 : cytoplasme du plexus myentérique
Moelle osseuse (3)	3/3 non marqués
Muscle squelettique (3)	3/3 : cytoplasme du périnysium
Nerf périphérique (3)	2/3 : cytoplasme du périnèvre
Œsophage (3)	1/3 : cytoplasme des cellules ganglionnaires du muscle ; 1/3 : cytoplasme d'épithélium basilaire
Ovaire (3)	3/3 : cytoplasme des cellules du stroma ovarien ; 1/3 : cytoplasme d'épithélium de surface de kystes d'inclusion
Pancréas (3)	2/3 : cytoplasme de fibroblastes péricanalaire ; 1/3 : cytoplasme des cellules myoépithéliales canalaire
Parathyroïde (3)	3/3 non marqués
Peau (3)	3/3 : cytoplasme des cellules myoépithéliales des structures annexielles
Poumon (3)	2/3 : cytoplasme des cellules épithéliales bronchiques, 3/3 : bord du cytoplasme des cellules alvéolaires
Prostate (3)	3/3 : cytoplasme des cellules basales canalaire ; 3/3 : cytoplasme de fibroblastes du stroma
Rate (3)	3/3 non marqués
Rein (3)	1/3 : cytoplasme des fibroblastes péricapsulaire
Sein (3)	3/3 : cytoplasme des cellules myoépithéliales
Surrénale (3)	2/3 : cytoplasme des fibroblastes capsulaire ; 1/3 : cytoplasme des fibroblastes interstitiels ; 1/3 : cytoplasme des lymphocytes péricapsulaire
Testicules (3/3)	3/3 : cytoplasme des fibroblastes périrubulaires
Thymus (3)	3/3 : cytoplasme et membrane des lymphocytes médullaire
Thyroïde (3)	3/3 non marqués
Utérus (3)	3/3 : cytoplasme de myomètre ; 1/3 : cytoplasme de glandes endométriale

Tissus anormaux (2,7) :

Type de tissu (nombre testé)	Tissu marqué et éléments tissulaires
Sarcome de Kaposi (24) : taches, plaques et nodules	24/24
Lymphangiome (10)	10/10 : endothélium tapissant les espaces sinusoïdaux
Angiosarcome (7)	3/7
Léiomyosarcome (10)	3/10
Dermatofibrome (6)	2/6
Histiocytome fibreux malin (2)	1/2
Hémangiome (10)	0/10
Tumeur glomique (3)	0/3
Angiolipome (2)	0/2
Granulome pyogénique (2)	0/2
Malformation vasculaire (2)	0/2
Hémangiopéricytome (1)	0/1
Hémangioendothéliome (1)	0/1
Dermatofibrosarcome protuberans (4)	0/4
Neurofibromes (6)	0/6
<i>Tumeurs pures des cellules germinales</i>	
Séminomes (35)	34/35
Carcinomes embryonnaires (5)	1/5
Tératome immature et mature (1)	0/1
<i>Tumeurs mixtes des cellules germinales</i>	
Séminomes (12)	12/12
Carcinomes embryonnaires (21)	17/21
Tératome immature et mature (16)	5/16
Tumeur du sac vitellin (4)	1/4
Choriocarcinome (2)	0/2

---

## Deutsch

### Code-Nr. M3619

#### Verwendungszweck

Zur In-vitro-Diagnostik

Monoclonal Mouse Anti-Human Podoplanin, Clone D2-40 ist zur Verwendung in der Immunhistochemie (IHC) bestimmt. Dieser Antikörper markiert Podoplanin, einen Marker von lymphatischem Endothel, in normalem und neoplastischem Gewebe. Der Antikörper ist hilfreich bei der Klassifizierung einer Vielzahl von Krebsarten mit Lymphknotenbefall (1, 2). Die Differenzialklassifikation von Tumoren 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.

#### Zusammenfassung und Erklärung

Podoplanin ist ein transmembranes, O-gebundenes Sialoglykoprotein von ~38 kDa, das im Endothel der Lymphkapillaren exprimiert wird, aber nicht in den Blutgefäßen (3). Außer der Expression im lymphatischen Endothel findet sich Podoplanin auch in einer Vielzahl anderer Gewebe, wie z. B. Mesothelzellen, Retikulumzellen, follikulären dendritischen Zellen, Eierstock- und Hodenkeimzellen (4). Anti-Podoplanin reagiert nachweislich mit lymphatischem Endothel, zeigt jedoch keine Reaktion mit vaskulärem Endothel (1, 2), und hilft bei der Klassifizierung von Lymphknotenbefall durch primäre Tumore (1, 2). Die Verwendung anderer Marker zusammen mit Podoplanin hilft nachweislich bei der Klassifizierung von Mesotheliomen und metastatischen Adenokarzinomen (5) sowie bei Seminomen und Follikel-Zelltumoren (6).

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

Monoklonaler Maus-Antikörper in flüssiger Form als Gewebekulturüberstand in 0.05 mol/L Tris-HCl-Puffer, pH 7.2, und 0.015 mol/L Natriumazid. Dieses Produkt enthält stabilisierendes Protein.

Klon: D2-40 (7)    Isotyp: IgG1, Kappa

Konzentration von Maus-IgG: Siehe Behälteretikett.

Die Proteinkonzentration kann zwischen Chargen abweichen, ohne die optimale Verdünnung zu beeinflussen. Der Titer jeder Charge wird mit dem einer Referenzcharge verglichen und dieser angeglichen, um konstante immunhistochemische Färbegergebnisse zwischen den Chargen zu gewährleisten.

#### Immunogen

Dysgerminom-Gewebe (7).

#### Spezifität

Klon D2-40 wurde durch Western-Blot von Zellysaten verschiedener Tumorzelllinien getestet. In Immunoblots von HEY-Karzinomzellen des Eierstockepithels identifizierte D2-40 eine 40 kD Bande und in Blots von MGH-U3 Zellen eine Form mit einem etwas höheren Molekulargewicht. D2-40 Immunreaktivität wurde ebenfalls in Western-Blots von SK-OV-3 und Caov-3 Eierstockepithel-Karzinomzellen, PA-1PA-1 Eierstock-Teratokarzinomzellen, Tera-1- und Tera-2-Hoden-Teratokarzinomzellen, 883 Embryo-Karzinomzellen, RT-4 Blasen-Übergangszellkarzinom und U-2 OS Knochensarkomzellen beobachtet. In Western-Blots anderer Tumorzelllinien, die aus verschiedenen Krebsarten gewonnen wurden, zeigte sich keine Reaktivität (7).

Die Auswirkung der Enzymverdauung auf die Immunreaktivität von D2-40 wurde mit affinitätsgereinigtem HEY-Zellen-Antigen und intakten HEY-Zellen getestet. Die Immunreaktivität von D2-40 mit Western-Blots aus gereinigtem Antigen und von Zellen mit Durchflusszytometrie wurde durch die Entfernung der Sialinsäurerückstände mittels Neuraminidasebehandlung der Zellen oder Proteine nicht beeinflusst. Die Behandlung der Zellen oder Proteine mit O-Sialoglykoprotease zerstörte die Immunreaktivität von D2-40 sowohl in Western-Blots als auch in der Durchflusszytometrie und zeigte, dass es sich bei dem von D2-40 erkannten Antigen um ein O-gebundenes Glykoprotein handelt (7).

#### Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien

Siehe *General Instructions for Immunohistochemical Staining* (Allgemeine Richtlinien zur immunhistochemischen Färbung) von Dako bzw. Anweisungen des Detektionssystems.

Empfohlene(s) Verdünnungsmittel für IHC-Verfahren: Antibody Diluent (Code-Nr. S0809)

Folgende Negativkontrolle wird für IHC-Verfahren empfohlen: Mouse IgG1 (Code-Nr. X0931)

#### Vorsichtsmaßnahmen

1. Zur In-vitro-Diagnostik.
2. Für Fachpersonal.
3. Dieses Produkt enthält Natriumazid (NaN<sub>3</sub>), eine in reiner Form äußerst giftige Chemikalie. Bei den in diesem Produkt verwendeten Konzentrationen kann NaN<sub>3</sub>, obwohl nicht als gefährlich klassifiziert, mit in Wasserleitungen vorhandenem Blei oder Kupfer reagieren und zur Bildung von hochexplosiven Metall-Azid-Anreicherungen führen. Nach der Entsorgung muss mit reichlich Wasser nachgespült werden, um Metall-Azid-Anreicherung zu vermeiden.
4. Wie alle Produkte biologischen Ursprungs müssen auch diese entsprechend gehandhabt werden.
5. Geeignete persönliche Schutzausrüstung (PSA) tragen, um Augen- und Hautkontakt zu vermeiden.
6. Nicht verwendete Reagenzien sind entsprechend örtlichen, staatlichen und EU-rechtlichen Bestimmungen zu entsorgen.

## Lagerung

Bei 2-8 °C aufbewahren. Nach Ablauf des auf dem Behälter aufgedruckten Verfallsdatums nicht mehr verwenden. 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.

## Gewebevorbereitung

**Paraffinschnitte:** Anti-Podoplanin kann auf formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebeschnitten verwendet werden. Eine Vorbehandlung des Gewebes mit proteolytischen Enzymen wird nicht empfohlen.

Vor dem IHC-Färbeverfahren müssen die entparaffinierten Gewebeschnitte mit Wärme behandelt werden. Zur hitzeinduzierten Epitodemaskierung (heat-induced epitope retrieval, HIER) gehört ein Eintauchen der Gewebeschnitte in eine vorgewärmte Pufferlösung und Wärmeerhaltung in einem Wasser- oder Dampfbad (95-99 °C). Für die bei 95-99 °C durchgeführte HIER ein 40-minütiges Hitzeprotokoll verwenden; das Gefäß mit Puffer und Objektträgern nach der Hitzebehandlung 20 Minuten bei Raumtemperatur abkühlen lassen. Nach dem HIER-Verfahren gründlich mit Puffer oder entionisiertem Wasser spülen. Zur besseren Haftung der Gewebeschnitte an den Glasobjektträgern wird die Verwendung von Silanized Slides (Code-Nr. S3003) empfohlen. Es wird die Verwendung von Target Retrieval Solution (Code-Nr. S1700) oder 10x Concentrate (Code-Nr. S1699) empfohlen.

## Färbeverfahren

Diese Angaben sind nur Richtlinien. Optimale Bedingungen können je nach Gewebetyp und Vorbereitungsverfahren unterschiedlich sein und sollten vom jeweiligen Labor selbst ermittelt werden. Die Leistung dieses Antikörpers sollte vom Benutzer bei einem Einsatz mit anderen manuellen Färbesystemen oder automatisierten Systemen ermittelt werden.

**Verdünnung:** M3619 kann in der IHC mit dem EnVision+ Detektionssystem bei einer Verdünnung von 1:100 bis 1:200 verwendet werden. Das empfohlene Verfahren des ausgewählten Detektionssystems befolgen.

**Qualitätskontrolle:** Positiv- und Negativkontrollgewebe sowie Negativkontrollreagenz sollten zur gleichen Zeit und mit demselben Protokoll wie die Patientengewebe getestet werden.

## Auswertung der Färbung

Das zelluläre Färbemuster ist zytoplasmatisch und gelegentlich membranös.

## Leistungseigenschaften

**Normalgewebe:** Der Antikörper ruft in lymphatischem Endothel, Ganglienzellen und Nerven vieler normaler Gewebetypen eine starke Immunfärbung hervor. Die vaskulären Endothelzellen wiesen in sämtlichen getesteten normalen Gewebeproben keine Färbung auf (8).

Gewebetyp (Anz. getestet)	Markierte Gewebe-Elemente
Brust (3)	3/3 Zytoplasma von Myoepithelzellen
Dickdarm (3)	2/3 Lymphozyten
Dünndarm (3)	3/3 Zytoplasma des Auerbach-Plexus
Gehirn, Großhirn (3)	3/3 Zellkerne seltener Astrozyten
Gehirn, Kleinhirn (3)	3/3 Zytoplasma des Nervenfilzes
Haut (3)	3/3 Zytoplasma der Myoepithelzellen von Adnexstrukturen
Herz (3)	2/3 Zytoplasma von Myozyten
Hoden (3/3)	3/3 Zytoplasma peritubulärer Fibroblasten
Hypophyse (3)	1/3 Zytoplasma perikapsulärer Fibroblasten der Neurohypophyse; 1/3 Zytoplasma des Nervenfilzes der Neurohypophyse
Knochenmark (3)	3/3 nicht markiert
Leber (3)	3/3 nicht markiert
Lunge (3)	2/3 Zytoplasma bronchialer Epithelzellen; 3/3 zytoplasmatisches Ende der Alveolarzellen
Magen (3)	3/3 Zytoplasma periglandulärer Fibroblasten; 1/3 Zytoplasma des Auerbach-Plexus; 1/3 Zytoplasma und Membran des Keimzentrums von Lymphozyten
Mandeln (3)	3/3 Zytoplasma und Membran basaler Epithelzellen und der Keimzentrum-Lymphozyten
Mesothelzellen (3)	1/3 Zytoplasma der Mesothelzellen
Milz (3)	3/3 nicht markiert
Nebenniere (3)	2/3 Zytoplasma kapsulärer Fibroblasten; 1/3 Zytoplasma interstitieller Fibroblasten; 1/3 Zytoplasma perikapsulärer Lymphozyten
Niere (3)	1/3 Zytoplasma perikapsulärer Fibroblasten
Ösophagus (3)	1/3 Zytoplasma von Ganglienzellen im Muskel; 1/3 Zytoplasma des basalen Epithels
Ovar (3)	3/3 Zytoplasma ovarialer Stromazellen; 1/3 Zytoplasma des Oberflächenepithels von Einschlusszysten
Pankreas (3)	2/3 Zytoplasma periduktaler Fibroblasten; 1/3 Zytoplasma duktaler Myoepithelzellen
Parathyroidea (3)	3/3 nicht markiert
Peripherer Nerv (3)	2/3 Zytoplasma des Perineuriums
Prostata (3)	3/3 Zytoplasma der Basalzellen der Ductuli prostatici; 3/3 Zytoplasma stromaler Fibroblasten
Skelettmuskulatur (3)	3/3 Zytoplasma des Perimysiums
Speicheldrüse (3)	3/3 Zytoplasma duktaler und azinärer Myoepithelzellen
Thymus (3)	3/3 Zytoplasma und Membran medullärer Lymphozyten

Thyreoidea (3)	3/3 nicht markiert
Uterus (3)	3/3 Zytoplasma der Uterusmuskulatur; 1/3 Zytoplasma endometraner Drüsen
Zervix (3)	3/3 Membran und/oder Zytoplasma basaler Epithelzellen; 3/3 Zytoplasma stromaler Fibroblasten









**Anormale Gewebe (2,7):**

Gewebetyp (Anz. getestet)	Markierte Gewebe und Gewebeteile
Kaposi-Sarkom (24): Flecken-, Plaque- und Knotenstadium	24/24
Lymphangiom (10)	10/10, Endothel der sinusoidalen Gefäßräume
Angiosarkom (7)	3/7
Leiomyosarkom (10)	3/10
Dermatofibrom (6)	2/6
Malignes fibröses Histiocytom (2)	1/2
Hämangiom (10)	0/10
Glomustumor (3)	0/3
Angiolipom (2)	0/2
Teleangiektatisches Granulom (2)	0/2
Vaskuläre Missbildung (2)	0/2
Hämangioperizytom (1)	0/1
Hämangioendotheliom (1)	0/1
Dermatofibrosarcoma protuberans (4)	0/4
Neurofibrom (6)	0/6
<i>Reine Keimzelltumore</i>	
Seminome (35)	34/35
Embryonale Karzinome (5)	1/5
Unreife und reife Teratome (1)	0/1
<i>Gemischte Keimzelltumore</i>	
Seminome (12)	12/12
Embryonale Karzinome (21)	17/21
Unreife und reife Teratome (16)	5/16
Dottersacktumor (4)	1/4
Choriokarzinom (2)	0/2

**References/ Bibliographie/ Literaturnachweise**

- Kahn HJ, Marks A. A new monoclonal antibody, D2-40, for detection of lymphatic invasion in primary tumors. Lab Invest 2002;82: 1255-7.
- Kahn HJ, Bailey D, Marks A. Monoclonal antibody D2-40, a new marker of lymphatic endothelium, reacts with Kaposi's sarcoma and a subset of angiosarcomas. Mod Pathol 2002; 15:434-40.
- Breiteneder-Geleff S, Soleiman A, Kowalski H, Horvat R, Amann G, Kriehuber E, et al. Angiosarcomas express mixed endothelial phenotypes of blood and lymphatic capillaries: podoplanin as a specific marker for lymphatic endothelium. Am J Pathol 1999; 154:385-94.
- Kalof AN and Cooper K. D2-40 Immunohistochemistry – So Far! Adv Anat Pathol 2009; 16:62-4.
- Chu AY, Litzky LA, Pasha TL, Acs G, Zhang PJ. Utility of D2-40, a novel mesothelial marker, in the diagnosis of malignant mesothelioma, Mod Pathol 2005, 18:105-110.
- Yu H, Gibson JA, Pinkus GS, Hornick JL. Podoplanin (D2-40) is a novel marker for follicular dendritic cell tumors. Am J Clin Pathol 2007; 128:776-82.
- Marks A, Sutherland DR, Bailey D, Iglesias J, Law J, Lei M, et al. Characterization and distribution of an oncofetal antigen (M2A antigen) expressed on testicular germ cell tumours. Br J Cancer 1999; 80:569-78.
- IHC003 Report On File

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

 REF	Catalogue number Référence catalogue Katalognummer		Temperature limitation Limites de température Zulässiger Temperaturbereich	 IVD	In vitro diagnostic medical device Dispositif médical de diagnostic in vitro In-vitro-Diagnostikum
	Manufacturer Fabricant Hersteller	 LOT	Batch code Réf. du lot Chargenbezeichnung		Consult instructions for use Consulter les instructions d'utilisation Gebrauchsanweisung beachten
	Use by Utiliser avant Verwendbar bis	 EC REP	Authorized representative in the European Community Représentant agréé dans la Communauté européenne Autorisierte Vertretung in der Europäischen Gemeinschaft		



Dako North America, Inc.  
6392 Via Real  
Carpinteria, California 93013 USA

Tel 805 566 6655  
Fax 805 566 6688  
Technical Support 800 424 0021  
Customer Service 800 235 5763



Dako Denmark A/S  
Produktionsvej 42  
DK-2600 Glostrup Denmark

Tel +45 4485 9500  
Fax +45 4485 9595  
www.agilent.com

PT0039/Rev D

Revision/ Révision/ Revision 2017.06