

MPCyV – Anticorpo Monoclonal anti-humano – Clone (CM2B4)*Mouse anti-human MPCyV Large T-Antigen Monoclonal Antibody (Clone CM2B4)*

Código	EP-12-52043	1ml
• Diluição recomendada	:	1:50
• Validade e lote do produto	:	Ver frasco
• Temperatura de armazenamento	:	2 à 8°C (não congelar)
• Clone	:	CM2B4
• Isotipo Ig	:	IgG2b
• Imunógeno	:	-
• Reatividade	:	RUO – (Humanos – não testados em outras espécies)
• Controle positivo	:	Seção de tecido do carcinoma de células Merkel clássico positivo de MPCyV.
• Marcação	:	Nuclear

Aplicações conhecidas

Em Imuno-histoquímica (IHQ) para uso em tecidos embebidos em parafina. Não testado em tecidos congelados e técnicas de western-blotting.

Especificações:

As células de Merkel são células neuroendócrinas redondas encontradas na pele, onde formam complexos sinápticos com fibras aferentes somatossensoriais. Estes complexos são responsáveis pelo toque fino e produzem várias substâncias neuroativas que atuam como neurotransmissores de pele de ação rápida ou neuromoduladores. Em condições patológicas, as células de Merkel podem proliferar e gerar uma forma rara, mas muito agressiva, de câncer de pele conhecido como carcinoma de células de Merkel (CCM). Cerca de 80% das CMMs são causadas pelo recém-descrito poliomavírus de células de Merkel (MCPyV ou MCV), que se integra ao genoma das células de Merkel e prolifera de forma clonal. O vírus MCPyV é um vírus de ADN não encapsulado que consiste em duas unidades iniciais (dois antígenos T, um grande e um pequeno) e três unidades tardias (VP1, 2 e 3). O antígeno T grande é a proteína nuclear funcional do MCPyV, que tem uma massa molecular de 125 kDa e é expressa em células tumorais, onde se liga a moléculas supressoras do ciclo celular, degrada e sequestra, promovendo sua fase S. O grande antígeno T possui mutações naturais truncadas que também produzem proteínas funcionalmente ativas de menor tamanho. O anticorpo CM2B4, que não mostra nenhuma coloração cruzada com outros tipos de poliomavírus e reconhece o antígeno T MCPyV grande, foi sintetizado contra um peptídeo derivado do exon 2 do locus do antígeno mencionado, para o qual é altamente específico, bem como para suas isoformas de 57kT; no entanto, pode não detectar algumas das suas formas truncadas menores. O CM2B4, avaliado juntamente com um painel de marcadores incluindo citoqueratinas 20 e 7, p63, TTF1, enolase neuronal específica, proteína S100, HMB45 e CD45, facilita o diagnóstico de aproximadamente 80% dos casos clássicos de carcinoma de células de Merkel. No entanto, a maioria dos casos de CCM com écrinas, escamosas, rabdomioblásticas, A diferenciação divergente leiomiossarcomatosa ou neuroblástica é negativa para MCPyV e está associada a um pior prognóstico da doença. Em comparação com a detecção do nível de MCPyV usando PCR, o anticorpo tem uma sensibilidade de 95% e uma especificidade de 83% uma vez que, como mencionado acima, foram observados casos MCC negativos MCCyV, bem como a positividade ocasional de significado incerto em linfócitos maduros, suor glândulas e endotélio vascular.

Armazenagem e estabilidade:

Armazenar entre 2°C e 8°C, porém o uso é feito em temperatura ambiente.

Conteúdo:

1. Ver frasco.

Notas técnicas importantes:

1. Evitar contato dos reagentes com os olhos e membranas mucosas. Caso os reagentes entrem em contato com áreas sensíveis lavar abundantemente com água.
2. Esse produto é prejudicial se ingerido.
3. Consulte as autoridades locais ou estaduais com relação ao método recomendado de descarte
4. Evitar a contaminação microbiana dos reagentes
5. Recomendado para uso em pesquisa (RUO)



Notas do protocolo:

A diluição ideal do anticorpo e protocolos para uma aplicação específica podem variar. Devido à sensibilidade superior destes reagentes exclusivos, os tempos de incubação recomendados não são aplicáveis a outros sistemas de detecção, pois os resultados podem variar. Os protocolos ideais para uma aplicação específica podem variar. Esses incluem, mas não estão limitados à fixação, método de recuperação de calor, tempos de incubação, diluição de anticorpos, espessura da secção de tecido. As recomendações e protocolos da literatura são baseados em uso exclusivo de produtos EasyPath. Em última análise, é responsabilidade do pesquisador para determinar as condições ideais. Este produto é apenas para uso profissional. A imuno-histoquímica é um processo de diagnóstico de múltiplas etapas que consiste em treinamento especializado na seleção dos reagentes apropriados, seleção de tecidos, fixação e em processamento, preparação da lâmina IHQ e interpretação do resultado de coloração. A utilização em tecido congelado não foi validado.

Protocolo:

- 1 - Desparafinização - Estufa 60-65 °C por 3 horas, depois bateria de Xilol e diluições decrescentes de álcool e lavar em água destilada
- 2 - Recuperação antigênica - Colocar 600ml de água destilada na câmara pressurizada (MuscaePlus/EasyPath) e a(s) lâmina(s) no recipiente com tampão EDTA 10X pH8,5 (Recomendado EP-12-20553/6 EasyPath), tampar a câmara e deixar 15 minutos em 110 °C, conforme pré-programado, esfriar em temperatura ambiente por 20 minutos no próprio tampão.
- 3 - Bloqueador de Peroxidase EasyPath por 5 minutos, lavar com TBS e em seguida secar a lâmina com papel macio.
- 4 - Anticorpo primário (Biocare ou EasyPath) por 30-60 minutos (Conforme padronização do laboratório), lavar com TBS e em seguida secar a lâmina com papel macio.
- 5 - Amplificador do anticorpo EasyPath por 15 minutos, lavar com TBS e em seguida secar a lâmina com papel macio.
- 6 - Polímero PolyFusion-HRP EasyPath por 30 minutos, lavar com TBS e em seguida secar a lâmina com papel macio. Nota: O polímero é sensível à luz. Evitar a exposição desnecessária.
- 7 - Preparar o DAB EasyPath com 15 minutos de antecedência (Proporção: 1ml de DAB Substrato para 1 gota de DAB Cromógeno).
- 8 - DAB EasyPath por 5 minutos, lavar com TBS, depois com lavar com água deionizada e secar a lâmina com papel macio.
- 9 - Potencializador do DAB EasyPath (etapa não obrigatória) por 2 minutos, lavar com TBS, depois com lavar com água deionizada e secar a lâmina com papel macio.
- 10 - Hematoxilina EasyPath por 1 minuto e lavar em água corrente por 1 minuto.
- 11 - Bateria de álcool e xilol.
- 12 - Montar a(s) lâmina(s).

INSTRUÇÕES GERAIS

Para a obtenção de um melhor resultado da metodologia e uma completa compreensão da terminologia utilizada, nós recomendamos as seguintes indicações:

Número de testes realizados *

O número mínimo de testes é calculado com 100µl gotas de reagente, aconselhamos seguir esta quantidade de reagentes. Em casos de seções pequenas, no entanto, pode-se utilizar menos.

Tempo de execução

O tempo de execução foi calculado somando-se a duração de todas as etapas do método. Ele não inclui o tempo de desparafinizar, hidratar e desidratar o corte.

Coloração final

A metodologia foi padronizada a uma temperatura média de 20°C e em condições normais de trabalho, utilizando-se os produtos indicados nesta literatura. Pode ocorrer uma pequena variação na coloração final, devido principalmente a variação da temperatura, ocorrendo esta variação, deve-se alterar o tempo utilizado em cada reagente, com o objetivo de intensificar ou diminuir a coloração.

Validade

Indica o tempo em que produto permanece inalterado a partir de sua fabricação, se armazenado adequadamente. Cada produto possui uma etiqueta com identificação do lote e data de vencimento.

Equipamento básico

Bandeja de incubação comercializada pelo Grupo Erviegas, código EP-51-05022.

Câmara pressurizada MuscaePlus (EasyPath) para recuperação antigênica com controle de pressão, temperatura e tempo.

Duas séries de solventes, conforme metodologia de cada kit:

- DESCENDENTE: para desparafinizar e levar os cortes das seções para água destilada, composta de: xilol (x2), etanol absoluto (x2), etanol a 96%, etanol a 70% e água destilada.



- **ASCENDENTE:** para desidratar e limpar, composta de: etanol a 70%, etanol a 96%, etanol absoluto (x2) e xilol (x2).

Aconselhamos o uso do meio de montagem ERV-MOUNT, comercializado pela Grupo Erviegas código EP-51-05042 frasco com 500ml e EP-51-05041 frasco com 100ml.

Equipamento complementar

Podem-se ser utilizadas micropipetas para reduzir a quantidade de reagentes utilizados durante o processo, bem como outros sistemas de recuperação antigênica como micro-ondas, panela de pressão, banho maria ou sistema automatizados para imuno-histoquímica como IntelliPATH (Biocare).

Fixação e meios de inclusão

Os tempos dos métodos foram determinados a partir de cortes histológicos de fragmentos fixados em formol tamponado com pH 7 com tampão fosfato e inclusos em parafina, pelo tempo mínimo de fixação (Recomendado – Histofix, fixador EasyPath). A utilização de outros fixados nas práticas histológicas comuns (piocromoformol de Bouin, B5), temperatura do processamento, inclusão e desparafinização podem interferir na metodologia e tempos de incubações.

Garantia Grupo Erviegas

O Grupo Erviegas garante o funcionamento do produto conforme especificado nesta literatura. Para mais informações sobre o produto ou detalhes sobre outras técnicas e produtos acesse nosso site www.grupoerviegas.com.br.

Referências Bibliográficas

1. Maksimovic S, Baba Y, Lumpkin EA. Neurotransmitters and synaptic components in the Merkel cell-neurite complex, a gentle-touch receptor. *Ann N Y Acad Sci.* 2013 Mar;1279:13-21.
2. Paik JY, Hall G, Clarkson A, Lee L, Toon C, Colebatch A, Chou A, Gill AJ. Immunohistochemistry for Merkel cell polyomavirus is highly specific but not sensitive for the diagnosis of Merkel cell carcinoma in the Australian population. *Hum Pathol.* 2011 Oct;42(10):1385-90
3. Wang TS, Byrne PJ, Jacobs LK, Taube JM. Merkel cell carcinoma: update and review. *Semin Cutan Med Surg.* 2011 Mar;30(1):48-56
4. Kuwamoto S. Recent advances in the biology of Merkel cell carcinoma. *Hum Pathol.* 2011 Aug;42(8):1063-77
5. Martin B, Poblet E, Rios JJ, Kazakov D, Kutzner H, Brenn T, Calonje E. Merkel cell carcinoma with divergent differentiation: histopathological and immunohistochemical study of 15 cases with PCR analysis for Merkel cell polyomavirus. *Histopathology.* 2013 Apr;62(5):711-22
6. Iwasaki T, Matsushita M, Kuwamoto S, Kato M, Murakami I, Higaki-Mori H, Nakajima H, Sano S, Hayashi K. Usefulness of significant morphologic characteristics in distinguishing between Merkel cell polyomavirus-positive and Merkel cell polyomavirus-negative Merkel cell carcinomas. *Hum Pathol.* 2013 May 10. doi:pii: S0046-8177(13)00110-X. 10.1016/j.humpath.2013.01.026. [Epub ahead of print]

