

CD15 – Anticorpo Monoclonal anti-humano – Clone (MMA)*Mouse anti-human CD15 Monoclonal Antibody (Clone MMA)*

Código	EP-12-50493	1ml	Concentrado
	EP-12-50491	0.1ml	Concentrado
	EP-12-50494	1ml	Pronto para uso
	EP-12-50496	6ml	Pronto para uso

- Diluição recomendada : 1:50 – 1:100
- Validade e lote do produto : Ver frasco
- Temperatura de armazenamento : 2 à 8°C (não congelar)
- Clone : MMA
- Isotipo Ig : Camundongo IgM
- Imunógeno : Fração glicoproteica de linfócitos humanos.
- Reatividade : RUO – (Humanos – não testados em outras espécies)
- Controle positivo : Linfoma de Hodgkin
- Marcação : Membrana celular

Aplicações conhecidas

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

Especificações:

Este anticorpo reage contra o antígeno humano CD15 (fucosiltransferase 4) também conhecido como Lewis X (Lex); 3- fucosil N-acetilactosamina [3-FL]; X hapteno; antígeno embrionário específico-1 ao passo [SSEA-1]; lacto-N-fucopentaose III [LNFP III]. Este anticorpo é expresso em células mielomonocíticas normais (90% dos granulócitos neutrofílicos humanos no sangue periférico e linfóide e em 30% - 60% dos monócitos circulantes), não estando presente nos linfócitos normais. O CD15 é consistentemente expresso pelas células epiteliais dos túbulos renais, epitélio glandular gástrico, epitélio escamoso da amígdala e esôfago, epitélio ductal das glândulas salivares, ductos pancreático e mamário, corpúsculos do timo Hassall, matéria cinzenta e branca e nas células endócrinas do córtex adrenal e pituitária anterior. Em neoplasias, o antígeno CD15 é expresso pelas células de *Reed-Sternberg* do linfoma de Hodgkin clássico (padrão de membrana e / ou área de Golgi), em algumas leucemias (leucemia mielóide aguda e crônica (> 50%), leucemia mielogênica aguda (> 95% da fase crônica e > 50% da fase blástica) e em carcinomas derivados de órgãos cujas células são positivas para CD15, incluindo adenocarcinomas de rins, trato digestivo, carcinomas de células escamosas. O CD15 pode ser útil na confirmação do diagnóstico da doença de Hodgkin e no diagnóstico diferencial de mesotelioma (geralmente negativo) e adenocarcinoma pulmonar (geralmente positivo).

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 entrarem 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 (Muscae Plus / 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-51-050212.

Câmara pressurizada Muscae Plus (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. Arber DA, Weiss LM. CD15: a review. *Appl Immunochim.* 1993, 1(1): 17-30.
2. Leong ASY, Cooper K, Leong FJWM: CD15 Manual of diagnostic antibody for Immunohistochemistry. 2th ed., London: Greenwich Medical Media, 2003. CD15, p. 83-84
3. Knowles DM. Immunophenotypic markers useful in the diagnosis and classification of hematopoietic neoplasms. In Knowles DM. *Neoplastic hematopathology*. 2th ed. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, 2001. p. 93-226.
4. Cui L, Johkura K, Yue F, Ogiwara N, Okouchi Y, Asanuma K, Sasaki K. Spatial Distribution and Initial Changes of SSEA-1 and Other Cell Adhesion-related Molecules on Mouse Embryonic Stem Cells Before and During Differentiation. *J Histochem Cytochem.* 2004, 52 (11): 1447-1457.
5. Theilgaard-Mönch K, Raaschou-Jensen K, Schjødt K, Heilmann C, Vindeløv L, Jacobsen N, Dickmeiss E. Pluripotent and myeloid-committed CD34+ subsets in hematopoietic stem cell allografts. *Bone Marrow Transplant*, 2003, 32(12):1125-1133.
6. Sewell HF, Jaffray B, Thompson WD. Reaction of monoclonal anti Leu M1--a myelomonocytic marker (CD15)--with normal and neoplastic epithelia. *J Pathol.* 1987, 151(4):279-84.
7. McCarthy N, Simpson J, Coghill G, Kerr MA. Expression in normal adult, fetal, and neoplastic tissues of a carbohydrate differentiation antigen recognised by antigranulocyte mouse monoclonal antibodies. *J Clin Pathol.* 1985, 38(5):521-9.
8. Wasielewski R, Mengel M, Fischer R, Hansmann ML, Hübner K, Franklin J, Tesch H, Paulus U, Werner M, Diehl V, Georgii A. Classical Hodgkin's disease. Clinical impact of the immunophenotype. *Am J Pathol.* 1997, 151(4): 1123-1130.
9. Rüdiger T, Ott G, Ott MM, Müller-Deubert SM, Müller-Hermelink HK. Differential diagnosis between classic Hodgkin's lymphoma, T-cell-rich B-cell lymphoma, and paragranuloma by paraffin immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol.* 1998, 22(10):1184-91.
10. Pileri SA, Ascani S, Leoncini L, Sabattini E, Zinzani PL, Piccaluga PP, Pileri A Jr, Giunti M, Falini B, Bolis GB, Stein H. Hodgkin's lymphoma: the pathologist's viewpoint. *J Clin Pathol.* 2002, 55(3):162-76.
11. Hall PA, D'Ardenne AJ. Value of CD15 immunostaining in diagnosing Hodgkin's disease: a review of published literature. *J Clin Pathol.* 1987, 40 (11):1298 -1304.
12. Dinand V, Malik A, Unni R, Arya LS, Pandey RM, Dawar R. Proliferative index and CD15 expression in pediatric classical Hodgkin lymphoma. *Pediatr Blood. Cancer.* 2008, 50(2):280-283.
13. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissue. 4th ed. Lyon: IARC. 2008.
14. Klebe S, Nurminen M, Leigh J, Henderson DW. Diagnosis of epithelial mesothelioma using tree-based regression analysis and a minimal panel of antibodies. *Pathology.* 2009, 41(2):140-148.
15. Yaziji H, Battifora H, Barry TS, Hwang HC, Bacchi CE, McIntosh MW, Kussick SJ, Gown AM. Evaluation of 12 antibodies for distinguishing epithelioid mesothelioma from adenocarcinoma: identification of a three-antibody immunohistochemical panel with maximal sensitivity and specificity. *Mod Pathol.* 2006, 19(4):514-523.
16. Zhou M, Roma A, Magi-Galluzzi. The usefulness of immunohistochemical markers in the differential diagnosis of renal neoplasms. *Clin Lab Med.* 2005, 25(2):247-257.
17. Pellegrini W, Bresciani G, De Zorzi A, Marocolo D, Ungari M, Facchetti. MMA monoclonal antibody is a superior anti-CD15 reagent for the diagnosis of classical Hodgkin's lymphoma? *Haematologica.* 2007, 92(5):708-709.
18. Benharroch D, Dima E, Levy A, Ohana-Malka O, Ariad S, Prinsloo I, Mejirovsky E, Sacks M, Gopas J. Differential Expression of Sialyl and Non-Sialyl CD15 Antigens on Hodgkin-Reed-Sternberg Cells: Significance in Hodgkin's Disease. *Leuk Lymphoma.* 2000, 39 (1-2):185-194.
19. Nordic QC [en línea]: CD15. <<http://www.nordiqc.org/Epitopes/CD15/CD15.htm>> [Consulta: 8 mayo 2010].
20. Sociedad Española de Anatomía Patológica [en línea]: Módulo de Patología Linfóide. Primera Ronda. CD15.

