

Queratina CAM5.2 – Anticorpo Monoclonal anti-humano – Clone (CAM5.2)*Mouse anti-human Keratin CAM5.2 Antibody (Clone CAM5.2)***Código** **EP-12-51103** **1ml**

- Diluição recomendada : 1:50
- Validade e lote do produto : Ver frasco
- Temperatura de armazenamento : 2 à 8°C (não congelar)
- Clone : CAM5.2
- Isotipo Ig : Camundongo IgG2b/k
- Imunógeno : Linha de células de carcinoma colorretal humano HT24.
- Reatividade : RUO – (Humanos – não testados em outras espécies)
- Controle positivo : Secção tecidual procedente de adenocarcinoma de mama.
- Marcação : Citoplasma 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:

A nomenclatura criada em 1982 por Moll e Franke atribuída varia de 1 a 8 para a queratina tipo II (neutra ou básica) e entre 9 e 21 para a tipo I (ácida). No entanto, e devido à alta homologia entre as diferentes moléculas, é comum que um único anticorpo monoclonal reaja com diferentes tipos de queratinas. O anticorpo queratina CAM 5.2 reage com ceratinas de peso molecular de 38-50 kD presentes na maioria dos epitélios simples e ductais. Este anticorpo é útil para identificar células epiteliais normais e neoplásicas em cortes histológicos. A coloração positiva é obtida em adenocarcinomas de carcinomas de mama, intestino, fígado, rins, neuroendócrinos (por exemplo, tumor de células de Merkel), mesoteliomas, tumores de células germinativas (exceto seminoma), sarcoma sinovial e epitelióide. Alguns tecidos de origem não epitelial podem ser imunocorados como músculo liso, alguns sarcomas mamários, meningiomas e neuroblastomas malignos. CAM 5.2 não marca o epitélio estratificado e não reage com carcinomas que surgem no esôfago, vagina e colo do útero. Resultados negativos também foram obtidos em linfomas, melanomas, meningiomas, sarcomas e seminomas.

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 horizontal, 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. Wood G, Warnke R. Suppression of endogenous avidinbinding activity in tissues and its relevance to biotinavidin detection systems. J Histochem Cytochem. 29:1196-1204 (1981).
2. Moll R, Franke W, Schiller D, Geiger B, Krepler R. The catalog of human cytokeratins: Patterns of expression in normal epithelia, tumors, and cultured cells. Cell. 31:11-24 (1982).
3. Makin C, Bobrow L, Bodmer W. Monoclonal antibody to cytokeratin for use in routine histopathology. J Clin Pathol. 37:975 (1984).
4. Robbins SL, Cotran RS, Kumar V. Pathologic Basis of Disease. New York: WB Saunders. (1984).
5. Cooper D, Schermer A, Sun T-. Biology of Disease: Classification of human epithelia and their neoplasms using monoclonal antibodies to keratins: Strategies, applications and limitations. Lab Invest. 52:243-256 (1985).
6. Gatter K, Ralfkiaer E, Skinner J, et al. An immunochemical study of malignant melanoma and its differential diagnosis from other malignant tumors. J Clin Pathol. 38:1353-1357 (1985).
7. Rose N, Friedman H, JL F, eds. Manual of Clinical Laboratory Immunology. New York: American Society for Microbiology. (1986).
8. Theaker J, Gatter K, Esiri M, et al. Epithelial membrane antigen and cytokeratin expression by meningiomas: An immunohistochemical study. J Clin Pathol. 39:435-439 (1986).
9. Smedts F, Raemakers F, Robbin H, et al. Changing patterns of keratin expression during progression of cervical intraepithelial neoplasia. Am J Pathol. 136(3):657-667 (1990).
10. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Protection of Laboratory Workers from Infectious Disease Transmitted by Blood, Body Fluids, and Tissue: Tentative Guideline (M29-T2). (2 ed.) Villanova, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards. (1991).
11. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture (H3-A3). Villanova, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards. 14 (1991).