



SEAP

Calle Ancora, 3, 2º B
28045 MADRID
Tfno. y Fax 91 539 86 28
MAIL: SEAP@SEAP.ES



Programa de Garantía de
Calidad en Patología

MÓDULO LINFOIDE. Ronda nº 9

Antígeno probado: TdT

Introducción

La desoxinucleotidil-transferasa terminal (TdT) es una enzima de 58 kDa presente normalmente sólo en linfoblastos B y T. Cataliza la adición de desoxinucleótidos en el extremo 3'terminal de la cadena de oligonucleótidos, estando implicada en la generación de diversidad en los receptores antigénicos de los linfocitos T o B, al incorporar nuevos nucleótidos en las uniones de los segmentos reordenados de los genes del receptor de células T y de la cadena pesada de la inmunoglobulina.

A nivel inmunohistoquímico se observa expresión en linfoblastos en timo y otros órganos linfoides. En patología tumoral se aprecia una intensa expresión en linfomas o leucemias linfoblásticas; también puede observarse inmunotinción en células de leucemia mieloide aguda, y muy débilmente en algunos casos de linfoma de Burkitt. El resto de neoplasias hematolinfoides no expresan TdT.

Control GCP: timo

Instrucciones

Los participantes fueron invitados a teñir con TdT la preparación control (GCP) remitida por el programa (timo fijado en formol al 10% a pH 7 durante 24 horas) y su propia preparación control, devolviendo ambas para su evaluación.

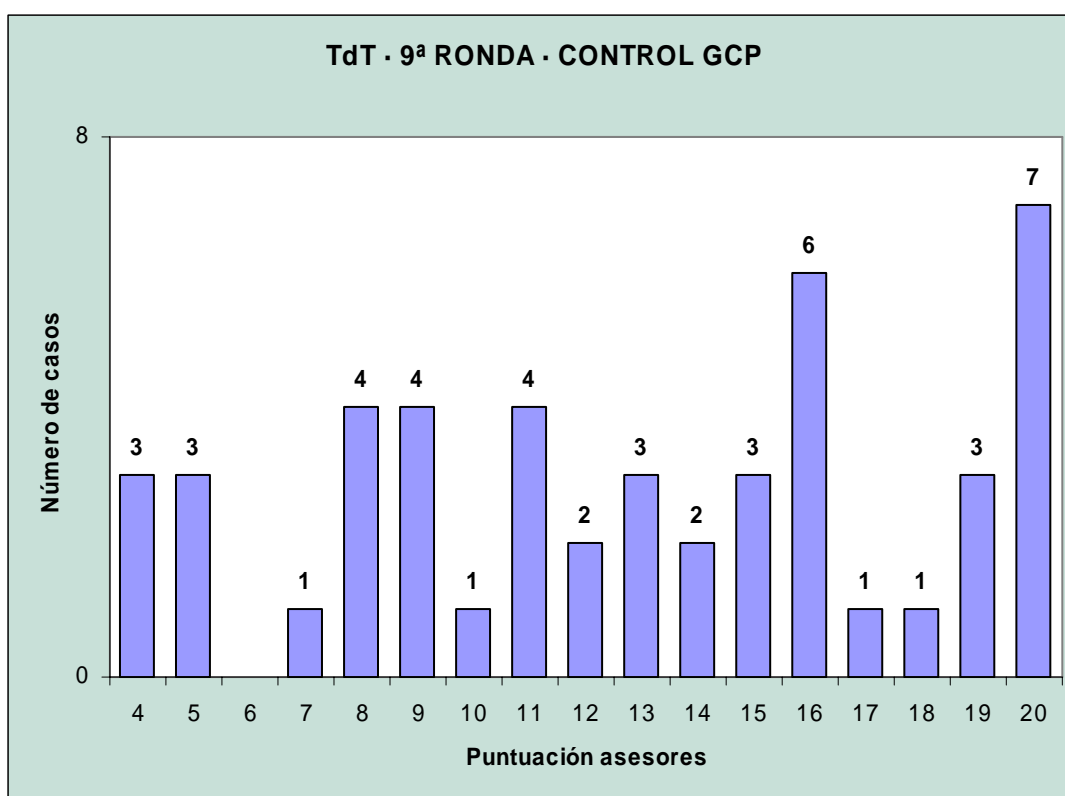
Número de laboratorios participantes

- Remitidos: 89
- Contestados:
 - Control del programa: 48 (54%)
 - Control local: 41 (46%)

Resultado de la evaluación

Control del programa (GCP)

Se consideró necesaria una inmunotinción nuclear intensa en celularidad tímica cortical.

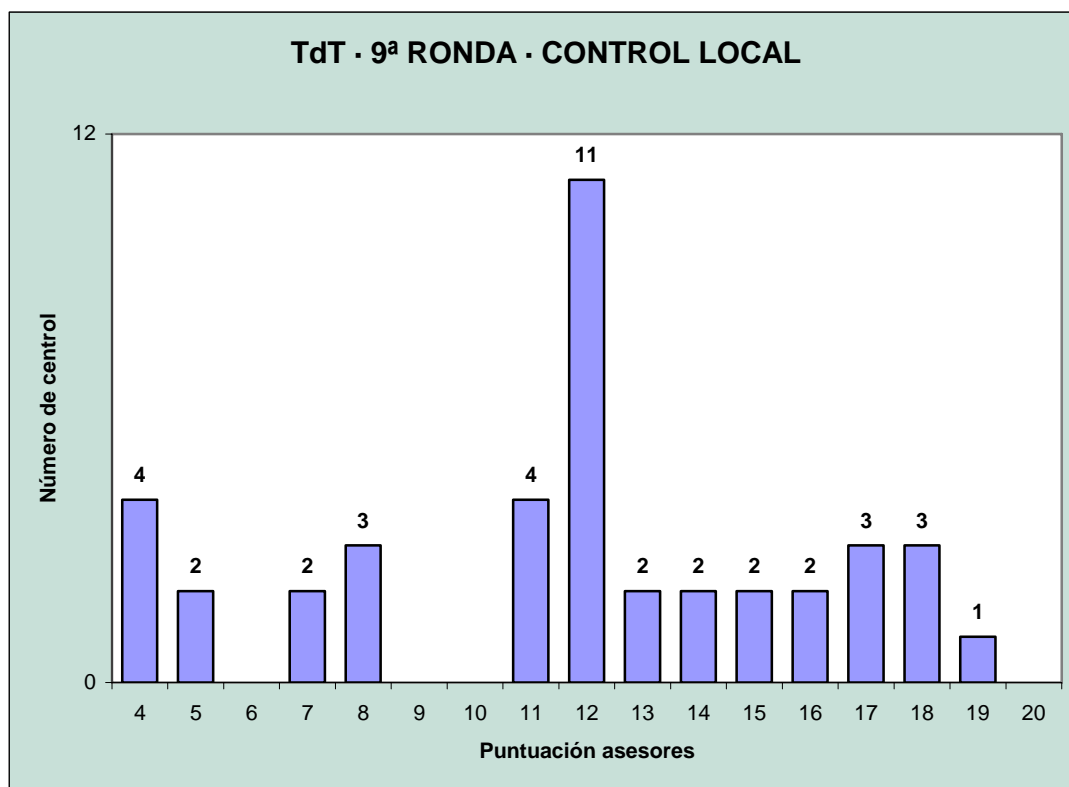


Devolvieron el control GCP 48 laboratorios, alcanzando la mayoría (28 laboratorios, 58%) una inmunotinción de calidad aceptable o superior; en 18 centros la valoración del control (37,5%) fue óptima o sub-óptima (superior a 15.)

Los problemas mas frecuentemente observados fueron una inmunotinción ligera, en ocasiones irregular, una contratinción excesiva y en menor medida una tinción de fondo.

Control local

Del total de 41 laboratorios que remitieron control local, 26 obtuvieron una puntuación de 12 (considerada como aceptable) o superior en la evaluación realizada por los asesores; ello supone un 63% de los laboratorios.



Únicamente 9 laboratorios consiguieron una puntuación igual o superior a 16, considerables como óptimas o sub-óptimas (22% de los centros). Se observa una diferencia entre los resultados obtenidos con del control GCP, siendo relativamente mejor el resultado con el control local, aunque a expensas de una puntuación aceptable (1215).

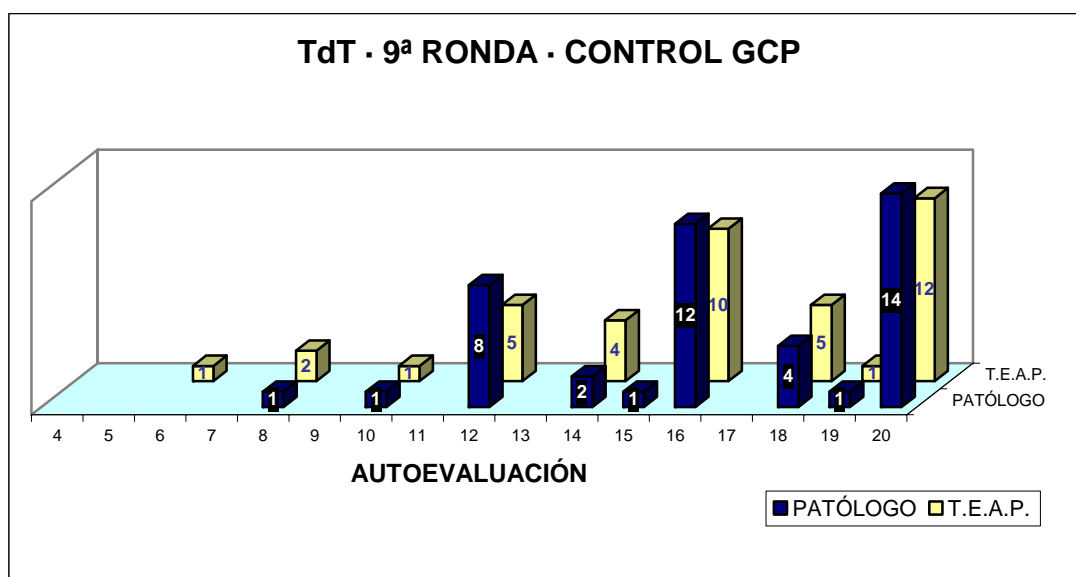
La principal causa de evaluación desfavorable fue una tinción ligera, irregular o inadecuada, seguida de una tinción de fondo ligera o moderada. Otras causas menos frecuentes fueron un contraste excesivo, que dificulta la valoración del tejido control, así como un pretratamiento inadecuado.

En un porcentaje de laboratorios se consideró inadecuado el control local. La mayoría de centros empleó timo como tejido control, que consideramos el óptimo para la evaluación de este anticuerpo. Segundo en frecuencia se empleó linfoma linfoblástico (en biopsias de médula ósea, pleura entre otras

localizaciones): los resultados con este tejido fue inferior al obtenido con timo. Finalmente, se empleó amígdala como tejido control, no se nos especificó o se emplearon otros tejidos (como ganglio linfático).

Autoevaluación

Del total de laboratorios que remitieron el **control GCP**, todos completaron la autoevaluación a excepción de cinco patólogos y siete técnicos de laboratorio. Así pues, los porcentajes de participación fueron, respectivamente, del 90% (43 patólogos) y el 85% (41 T. E. A. P.)

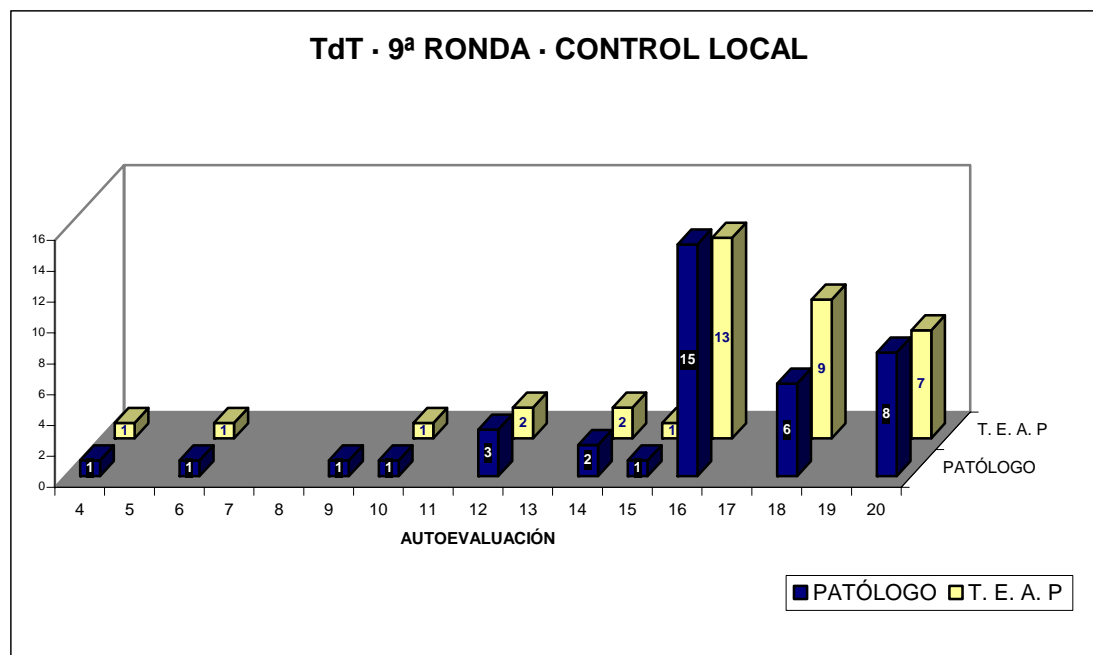


Curiosamente excepto dos patólogos y cuatro técnicos, el resto consideraron aceptable (puntuación igual o superior a 12) el resultado obtenido sobre el **control GCP**, lo que supone un 95% de patólogos y un 90% de técnicos. La valoración estimada por el equipo asesor fue sensiblemente menor: 58%.

También se aprecia una diferencia significativa con respecto a la autoevaluación óptima o sub-óptima, que alcanza el 81% en el caso de los patólogos o el 68% en el caso de los técnicos versus solamente un 37,5% que consideró el equipo asesor.

Con respecto a la autoevaluación del **control local**, los porcentajes de participación fueron similares a los del control GCP: 35 patólogos y técnicos (85%). La evaluación realizada por patólogos fue prácticamente superponible a la de los técnicos (89% al menos aceptable y 83% de óptima o sub-óptima) aunque divergente con respecto a la considerada por el equipo asesor (63% de

centros con inmunotinción aceptable, y 22% de inmunotinción óptima o sub-óptima.)



La consulta de las imágenes de inmunotinción procedentes de esta novena ronda de panel linfóide, disponibles en su día en la página web de la S.E.A.P., podrían ser útiles como herramienta de mejora en muchos de los laboratorios participantes. Puede dar una idea del objetivo a alcanzar en la inmunotinción para TdT con respecto a intensidad de tinción, contratinción, etc.

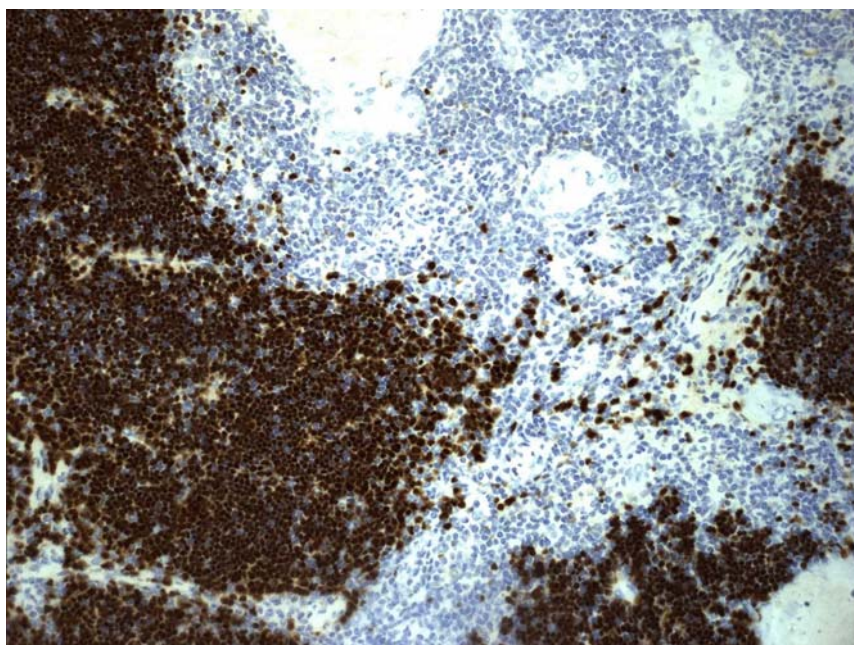
Inmunotinción óptima y anticuerpos empleados

Los anticuerpos empleados han sido los siguientes:

ANTICUERPO	ORIGEN	CENTROS	Puntuación	
			>15	>11
POLICLONAL	<i>DAKO, SUPERTECH</i>	16	5	12
DT01	<i>MASTER DIAGNÓSTICA</i>	10	6	7
SEN28	<i>NOVOCASTRA, DAKO, MONOSAN</i>	7	4	4
OTROS	<i>VARIOS</i>	5	0	1
DESCONOCIDO	<i>VARIOS</i>	10		

En 22 centros se emplearon anticuerpos de Dako, en 8 de Menarini-Novocastra, en 11 de Vitro-Master Diagnóstica y en los 7 restantes de varias casas comerciales (Biogenex, Diagnostic Biosystems, Supertech, Monosan o no especificados.)

Consideramos una inmunotinción óptima (ver figura) la que mostraba una inmunoreactividad nuclear intensa en células diana (células tímicas corticales) con una contratinción adecuada y sin tinción de fondo ni de otros elementos celulares. También se tuvo en cuenta la integridad del tejido en base a una recuperación antigénica adecuada, sin artefactos histotecnológicos.



En la imagen, realizada con objetivo de 20 aumentos, se observa una patente inmunotinción nuclear, marcando celularidad tímica cortical, con ausencia de tinción de fondo, estando el tejido conservado y con una contratinción adecuada.

Metodología con mejores resultados

Con las tres clonas más ampliamente empleadas por los diversos centros (policlonal, DT01 y SEN28) se obtuvieron puntuaciones de 16 o mayor en el control GCP. Tanto con el anticuerpo policlonal como con las clonas DT01 y SEN28, en más del 50% de los centros se obtuvo una puntuación al menos aceptable. Sólo con ambos monoclonales en más de la mitad de los centros (60 y 57% respectivamente) se consiguió una evaluación de 16 ó más (con el anticuerpo policlonal tan solo en el 31%). Por el contrario, con las cinco clonas menos comúnmente empleadas (referenciadas L-339, GAG09, TDT88 y HT-6), los resultados no han sido buenos.

En la tabla de la siguiente página pormenorizamos la metodología empleada por algunos de los centros que obtuvieron mejor puntuación en la valoración efectuada por el equipo asesor, esto es, centros con puntuación máxima (20) en el control GCP y dos centros con puntuación de 18 en el control local (el único centro con 19 puntos en el control local, no especifica el anticuerpo primario empleado).

	MÉTODO	TAMPÓN	ANTICUERPO	CASA	INCUBAC	MÉTODO	AUTOMATIZACIÓN
GCP	AUTOCLAVE	CITRATO pH 7.3	POLICLONAL	DAKO	30'	DAKO (ilegible)	DAKO TECHMATE 500
	PT MODULE 98°C 30'	TAMPÓN EDTA pH 8	DT01	MASTER	60'	MASTER	LABVISION AUTOSTAINER 480
	MICROONDAS 750W 20'	TAMPÓN SP pH 9	SEN28	MONOSAN	30'	DAKO ENVISION	DAKO AUTOSTAINER
	OLLA 2'	CITRATO pH 6	SEN28	NOVOCASTRA	30'	NO ESPECIFIC.	DAKO HORIZON
LOCAL	OLLA 1'	TAMPÓN pH 6	DT01	MASTER	NO ESPECIF.	DAKO ENVISION	DAKO AUTOSTAINER PLUS
	OLLA 3'	CITRATO pH 6	POLICLONAL	DAKO	20'	DAKO ENVISION	DAKO AUTOSTAINER

Comentarios

La participación ha sido relativamente escasa, en muchos centros porque no disponen de este anticuerpo para diagnóstico. Los resultados obtenidos son medianamente aceptables para diagnóstico, ya que en el 42% de los casos en el control GCP no se obtuvo una inmunotinción aceptable, como tampoco en el 37% de los controles locales. La principal deficiencia encontrada ha sido la débil intensidad de la tinción conseguida. Ello podría conducir a falsos negativos y contribuir a errores diagnósticos. Parece desaconsejable el empleo de otros anticuerpos que los más habituales, dado que con ellos no se ha conseguido una inmunotinción adecuada en ningún caso. Por otra parte, obviando ese punto, la metodología empleada por los centros con puntuación deficiente no difiere de la generalizada (recuperación antigénica con calor, en olla a presión, etc.)

Es generalizada la recuperación antigénica con calor, tanto en olla a presión, con diversos tampones (citrato, EDTA) y tiempos, como en inmunoteñidor u horno microondas; algunos centros emplean el autoclave o el baño. No se utiliza la digestión enzimática en ningún laboratorio.

Por último, recomendamos el timo como tejido control, insistiendo en obtener una adecuada intensidad de inmunotinción, una ausencia de tinción de fondo y una contratinción adecuada.