



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 de PATOLOGÍA LINFOIDE

### Ronda nº 10

**Antígeno probado: CD68**

**Tejido probado control AGCP:** Multitejido compuesto por tres muestras de amígdala fijadas 24, 36 y 72 horas respectivamente, dos muestras de Linfoma de Hodgkin y un corte de LLC.

**Tejido probado control local:** Mayoritariamente Amígdala, aunque también se han empleado ganglios linfáticos normales, ganglios linfáticos tumorales, tumores cutáneos, apéndice, etc.

**Instrucciones:** Los participantes fueron invitados a teñir con anticuerpo anti-CD68 la preparación remitida por el programa y su propia preparación control, devolviendo ambas preparaciones para su evaluación.

### **Consideraciones Generales CD68**

El anticuerpo anti-CD68 reconoce una glicoproteína citoplasmática de unos 110 kD relacionada con los lisosomas, que parece tener un papel en la actividad fagocítica de los macrófagos. No es, pues, un marcador específico de línea, sino de lisosomas.

**Expresión en tejidos normales:** En los tejidos adultos normales se expresa en células de líneas macrofágica y monocítica, incluyendo histiocitos, células de Kupffer y microglía, células dendríticas, células de Langerhans, y mastocitos. Los monoclonales anti-CD68 también suelen detectar expresión en precursores mieloides de médula ósea.

**Expresión en Neoplasias:** En neoplasias, son positivos los tumores fibro-histiocíticos como el xantogranuloma juvenil, la histiocitosis de células de Langerhans, algunos subtipos de leucemias mieloides (según el anticuerpo utilizado), algunos tumores epiteliales y células epitelioides de algunos melanomas.

**Utilidad:** Los anticuerpos anti CD68 son útiles en el diagnóstico de tumores fibro-histiocíticos, histiocitosis y en patologías con gran cantidad de histiocitos, en algunas proliferaciones o cambios gliales y en melanomas. También pueden ser útiles en la caracterización de algunas leucemias mieloides.

**Control:** Se recomienda tejidos no neoplásicos en los que exista una población habitual de estirpe macrofágica, como amígdala o apéndice cecal. En ambos casos, deberán teñirse claramente los macrófagos de los centros germinales. Si se emplea el clon KP1 podrá también verse una débil tinción de células epiteliales.

**Número de laboratorios participantes:**

- Remitidos: 104
- Contestados: 79 (75,9%) para el GCP y 84 (80,76%) para el Control Local.

**Comentario:** Hemos identificado ocho formularios remitidos por los laboratorios con descripción de la técnica y evaluación de las muestras que no han podido ser asociados a sus preparaciones del control GCP, ya que estas no se recibieron o lo hicieron sin el etiquetado adecuado (incluyendo el código de participación y el de la técnica). Desafortunadamente, estos casos han debido de considerarse como "no recibidos".

**Anticuerpos y Métodos evaluados:**

Los anticuerpos más utilizados en inmunohistoquímica diagnóstica son los monoclonales KP1 y PGM1. Los empleados por los laboratorios participantes en esta ronda se detallan en la siguiente tabla:

## Anticuerpos Primarios, proveedores y diluciones:

Proveedor	Nº laboratorios	Código	Clon	Dilución
Dako	30	M0814	KP1	1:50-1:8000
Dako	8	N1577	KP1	Prediluido
Dako	6	M0876	PGM1	1:50, 1:80,1:100
Dako	10	N1576	PGM1	prediluido
Master Diagnóstica	9	002097 QD	KP1	prediluido
Master Diagnóstica	1	5045QD	LM5	prediluido
Novocastra/Vision Biosystems	4	NCL-CD68	514H12	1:40, 1:60, 1:200
Novocastra/Vision Biosystems	7	RTU CD68	514H12	Prediluido
Zymed-Invitrogen	1	08-0125	KP1	¿?
Diagnostic Biosystems	1	PDM065	PGM1	Prediluido
Lab Vision- Neomarkers	1	MS-1808-R7	¿?	¿?
Biocare	1	28766	KP1	prediluido
Cell Marke	2	CMC321	KP1	1:50, 1:100
CNIO	1			1:2000
No especificado	2			

### Recuperación antigénica:

- Microondas
- Olla a presión
- Baño María
- Autoclave
- PT Module Lab Vision
- Benchmark Ventana
- BondMax Vision Biosystems
- Digestión con proteinasa K

### Detección:

- Kit Dako Envision
- Kit Dako LSAB+/2
- Kit Ventana Iview
- Kit Bond Polymer Define Detection Vision Biosystems
- Biogenex
- Masvision polivalente Master Diagnóstica

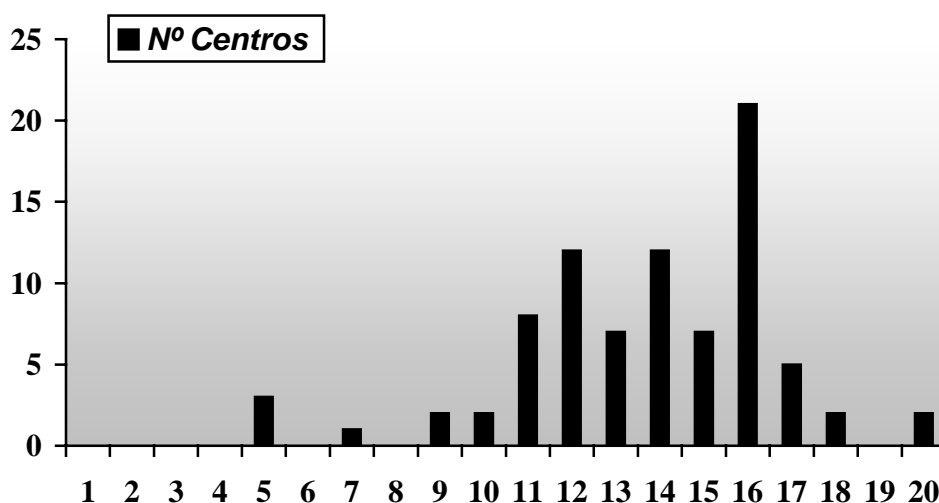
### Automatización:

- Dako Techmate 500
- Lab Vision Autostainer
- Biogenex 6000
- Ventana Benchmark XT
- Bond Max Vision Biosystems

### Estudio de los controles locales:

Los controles locales correspondían en su mayoría a amígdalas no neoplásicas (67%), aunque también se recibieron ganglios linfáticos, apéndices y lesiones cutáneas. Es de señalar que 4 laboratorios emplearon como control diversos tipos de linfomas, lo que no puede considerarse adecuado.

Los resultados de la evaluación fueron los siguientes:



### PUNTUACION DE LOS ASESORES

La puntuación igual o superior a 12 se considera aceptable, por lo que el 80,95% (68) de las 84 preparaciones remitidas se consideraron como aptas, con un 35,71% (30) con una puntuación igual o superior a 16/20, consideradas como óptimas o cercanas y dos casos puntuados como 20/20 (2,38%).

Un 19% (16) de los centros participantes no alcanza el nivel mínimo para considerar que la técnica puede aplicarse de manera rutinaria.

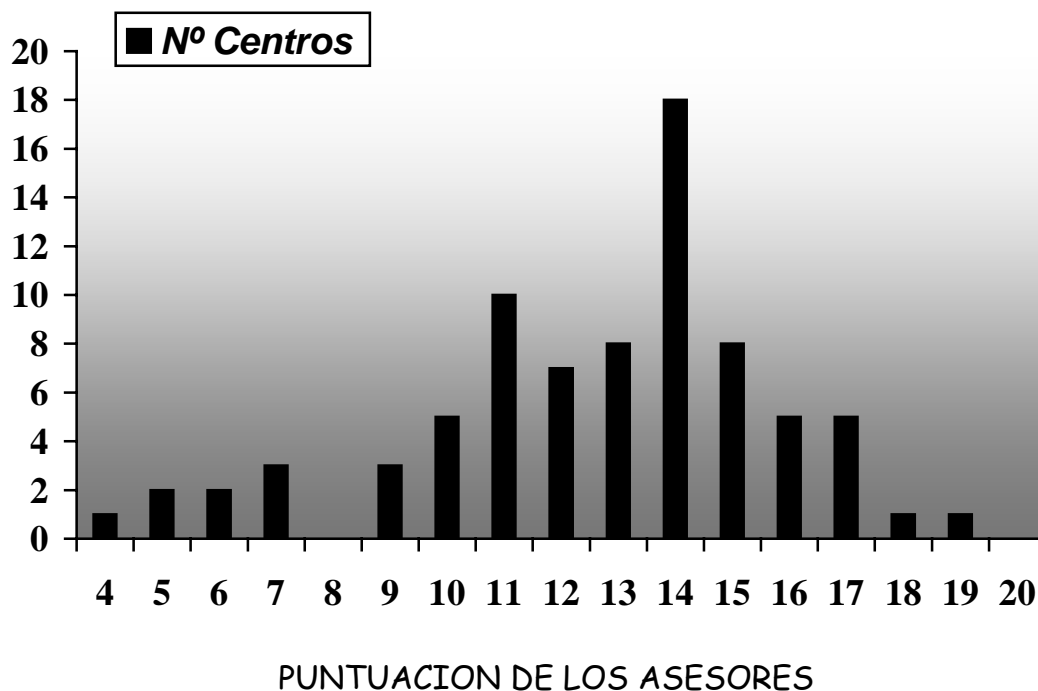
El principal problema detectado ha sido la existencia de tinción de fondo ligera o moderada. Problemas menos frecuentes, han sido los artefactos técnicos generales.

### Estudio de los controles remitidos por el programa GCP:

Se remitió un corte de multibloque compuesto por amígdala fijada en formol 24, 48 y 72 horas, dos casos de Enfermedad de Hodgkin clásica y un caso de leucemia linfocítica crónica.

Es de señalar que no todos los laboratorios recibieron cortes que incluyeran todas las muestras del multibloque y, en ocasiones, se debieron analizar muestras artefactadas por agotamiento del bloque.

El resultado de la evaluación fue:



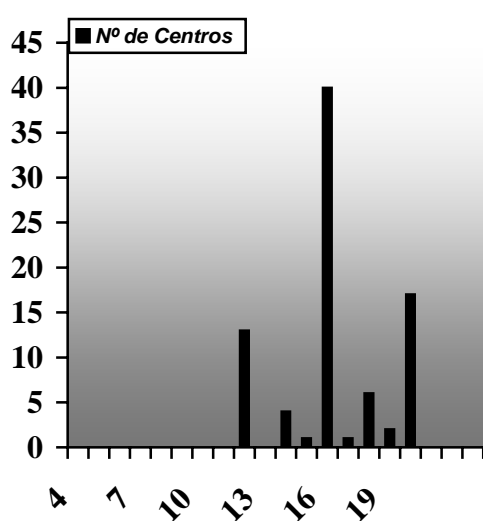
Si consideramos aceptable una puntuación igual o superior a 12, el 67% (53) de las 79 preparaciones remitidas alcanzaron este nivel. Un 15,1% (12) obtuvieron una puntuación igual o superior a 16/20, considerada como óptima o cercana. Ningún laboratorio alcanzó la puntuación máxima 20/20. Un 32,91% (26) de los centros no alcanzaron la calidad suficiente para considerar que la técnica puede aplicarse de manera rutinaria.

Al igual que en el control local, la técnica ha mostrado algunos problemas de sensibilidad, con intensidades y detección de células inferiores a lo esperable, aunque las observaciones más frecuentes se refieren a la existencia de tinción de fondo, en general de intensidad ligera.

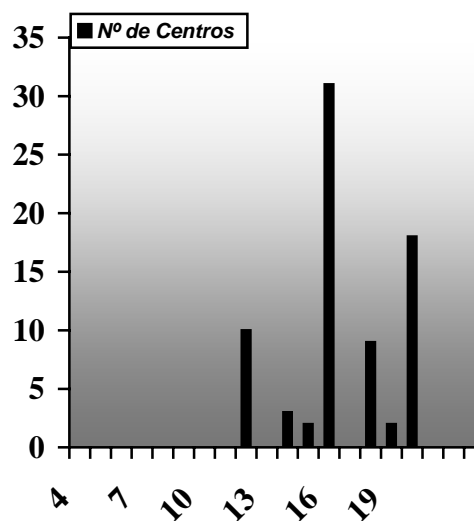
## Resultados de la autoevaluación:

El 89% de los técnicos y el 98% de los patólogos remitieron su valoración de los controles locales. Respecto a la evaluación de los controles GCP, el 96% de los participantes realizaron la evaluación. Los resultados obtenidos del análisis de tales datos son los siguientes:

### Control Local



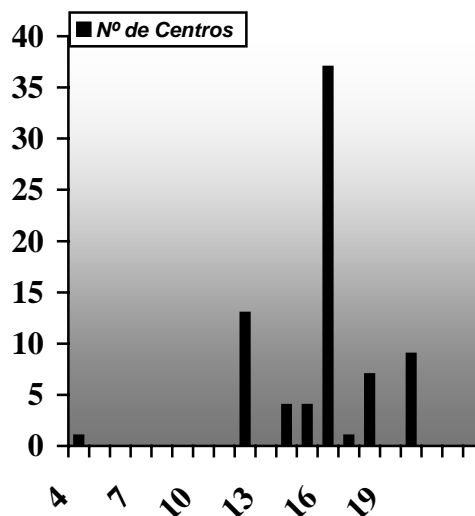
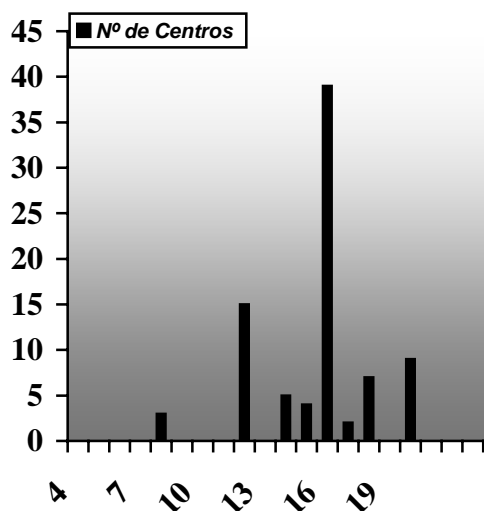
Puntuaciones del Patólogo



Puntuaciones del Técnico

Como se puede observar en los gráficos y seguimos reconociendo en la mayoría de las técnicas analizadas, la percepción local sobre los resultados es muy superior a la valoración de los observadores externos. De hecho, todos los que han remitido su evaluación (100%) han considerado su técnica válida para diagnóstico, reflejando que el nivel de sensibilidad exigido a la detección es muy inferior del que debiera.

## Control del GCP



Puntuaciones del Patólogo

Puntuaciones del Técnico

Los resultados son similares al control local, con un 96,38% de preparaciones con una puntuación igual o superior a 12/20 para los patólogos, y un 98,68% para los técnicos, consideradas suficientes para uso diagnóstico, lo que contrasta con la evaluación externa (67%).

### Inmunotinción óptima:

Se consideró una inmunotinción óptima para CD68 en tejido linfóide la que mostraba una tinción citoplásmica granular intensa en los macrófagos de los centros germinales de amígdalas o apéndices o de los macrófagos presentes en los restantes tejidos analizados.

En todos los tejidos se puntuó la ausencia de fondo o de tinción inespecífica y de artefactos técnicos, en especial la ausencia de degradación del tejido por sobrecalentamiento.

### Guía utilizada para la evaluación:

Los criterios para considerar óptima una tinción para CD68 en una amígdala fueron:

- Tinción fuerte y definida del 100% de los macrófagos de los centros germinales.
- Ausencia de fondo, degradación del tejido y artefacto.

Cada uno de los cuatro asesores concedió una puntuación entre 0 y 5, lo que daba una puntuación total entre 0 y 20 puntos. La puntuación fue como sigue:

Puntuación	Patrón de tinción
0/No remitido	No remisión de preparación
1	Ausencia de tinción significativa
2	Tinción insuficiente de células diana
3	Tinción citoplasmática de células diana suficiente para diagnóstico, aunque mejorable en intensidad, ausencia de fondo o artefactos
4	Tinción de células diana adecuada
5	Tinción óptima con clara detección de macrófagos centrofoliculares y ausencia de fondo

### Mejores métodos:

Obtuvo una puntuación de 19/20 en la preparación del GCP:

Automatización: Autostainer

Recuperación antigénica con calor: Baño Maria con tampón Tris-EDTA pH 9 durante 20 minutos.

Anticuerpo primario: Dako N1576 Clon PGM1 (prediluido), durante 10 minutos.

Método de detección: Envision

Cromógeno: Dako (Envision)

Obtuvo una puntuación de 18/20 en la preparación del GCP:

Automatización: Benchmark Ventana

Recuperación antigénica con calor: No especificado

Anticuerpo primario: Dako M0876 Clon PGM1, dilución 1/100, durante 44 minutos a 37°C.

Método de detección: UltraView Universal.

Cromógeno: DAB Ventana.



Obtuvieron una puntuación de 20/20 en las preparaciones de controles locales:

Método 1:

Automatización: Autostainer

Recuperación antigénica con calor: Baño Maria 20 minutos con tampón pH 6.

Anticuerpo primario: Dako M0876 Clon PGM1 Dilución 1/100, durante 30 minutos a temperatura ambiente

Método de detección: Envision

Cromógeno: DAB Envision

Método 2:

Automatización: No especificada

Recuperación antigénica con calor: PTlink durante 20 minutos tampón Citrato pH6

Anticuerpo primario: Dako (prediluido) Clon PGM1

Método de detección: No especificado

Cromógeno: DAB Dako

**Comentarios:**

El análisis de los resultados de inmunotinción con diversos anticuerpos monoclonales y condiciones de tinción muestra una franca mejoría de resultados de los controles locales respecto a la ronda anterior (8ª ronda de Patología Quirúrgica). Esta mejoría no es tan evidente en los controles de GCP, posiblemente por los problemas de agotamiento de muestra antes mencionados.

**Evolución de los resultados respecto a las evaluaciones previas de CD68 (1ª ronda Linfoide y 8ª ronda de Patología Quirúrgica):**

	<b>1ª Ronda Linfoide</b>	<b>8ª Ronda Pat. Quirúrgica</b>	<b>10ª Ronda Linfoide</b>
% de Aptos Control Local ( $\geq 12$ )	67,2%	67,5%	80,9%
% de Optimos Control Local ( $\geq 16$ )	27,6%	24,32%	35,71%
% de Aptos Control GCP ( $\geq 12$ )	62,1%	64,4%	67%
% de Optimos Control GCP ( $\geq 16$ )	34,4%	30,5%	15,1%

Los monoclonales más empleados - clones KP1 y PGM1- son útiles para su empleo en rutina diagnóstica. Sin embargo, destaca como resultado de la evaluación que el clon PGM1, aunque empleado por un menor número de laboratorios (21%) que el KP1 (63,7%), a proporcionado las mejores evaluaciones tanto para GCP como para los controles locales. Como ya se apuntaba en rondas anteriores, KP1 suele proporcionar mayor tinción de fondo y menor especificidad que PGM1.

En los procedimientos de detección, el desenmascaramiento antigénico se ha demostrado eficaz con calor y diferentes tampones.

Los principales problemas de los laboratorios considerados no aptos han sido la tinción de fondo y la escasa sensibilidad de la técnica con una intensidad de tinción o una proporción de células marcadas inferior a lo esperado.

El uso como controles locales de muestras tumorales (linfomas, principalmente) no se consideró adecuado, ya que no es posible evaluar la sensibilidad y especificidad de la técnica.