



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 3

**Antígeno probado:** CD43

**Tejido probado:** Amígdala

**Instrucciones:** Los participantes fueron invitados a teñir con CD43 la preparación remitida por el programa (amígdala fijada en formol al 10%, pH 7 durante 24 horas) y su propia preparación control, devolviendo ambas preparaciones para su evaluación.

**CD43** (leukosialina o sialoforina) es una molécula de peso molecular heterogéneo, entre 90 y 140 kD que se expresa en la membrana de los linfocitos T y las células mieloides. Tiene un dominio extracelular ampliamente glicosilado y su función no ha sido aún determinada, ya que parece ser una molécula antiadhesiva que mediaría la repulsión entre leucocitos y otras células, aunque en ciertas circunstancias puede funcionar como una molécula de adhesión.

Su expresión es defectuosa en el síndrome de Wiskott-Aldrich, de forma secundaria a un defecto genético ligado al cromosoma X, provocando alteraciones en la función de linfocitos T citotóxicos y helper.

Los dos clones más utilizados en los hospitales españoles, el **DF-T1** y el **MT1**, muestran algunas diferencias en las poblaciones celulares identificadas.

El **clon DF-T1** reacciona con la porción citoplasmática de la proteína y marca, además de linfocitos T a timocitos corticales y medulares, macrófagos, células de Kupffer, células NK, células B activadas, células

plasmáticas, células de Langerhans epidérmicas, plaquetas y células mieloides y precursores eritrocíticos de médula ósea, con tinción intensa de los polimorfonucleares neutrófilos.

El **clon MT1** reconoce un antígeno unido a la membrana presente en la práctica totalidad de los linfocitos T y en las poblaciones celulares identificadas por DF-1, con la excepción de las células B maduras activadas.

**Tinción Positiva Normal:** El patrón de tinción es de membrana con variable intensidad de tinción citoplasmática asociada.

Amígdalas y Ganglios Linfáticos: Células T normales y neoplásicas en zonas interfoliculares y células positivas dispersas de los folículos de células B. La reactividad con neutrófilos y macrófagos se aprecia con mayor facilidad en los ganglios linfáticos que en las amígdalas.

Timo: La mayoría de las células de la corteza y la médula del timo resultan fuertemente marcadas.

Médula ósea: Intensa positividad de células mieloides, megacariocitos y precursores eritroides, mientras que las plaquetas y los hematíes son negativos.

**Tinción Positiva en tejidos patológicos:** 80% de Linfomas de células T, coexpresado con CD20 en Linfomas Linfocíticos, pero no en lesiones benignas, sarcomas granulocíticos, LMA, la mayoría de las LLA, plasmacitomas (58%), proliferaciones de mastocitos (también positivos para Triptasa, CD68 y CD117).

#### **Número de laboratorios participantes:**

- **Remitidos:** 77
- **Contestados:** 51, 66,23% (GCP) y 48, 62,33% (Control Local)  
Siete de los Servicios que no responden lo hacen por carecer del anticuerpo (13,72%).

## Anticuerpos y Métodos evaluados:

### Anticuerpos Primarios:

Proveedor	Código	Clon	Dilución
Biotest	812255	MT1	1/60
Pharmingen	555474	1G10	1/200
Biogenex	A155M-5M	MT1	Prediluido, 1/25
Biogenex	MU155-UC	MT1	1/40, 1/400
Master Diagnóstica	002061QD	C7-B1-B6	Prediluido
Master Diagnóstica	002061Q	C7-B1-B6	1/50
Dako	N1559	DF-T1	Prediluido
Dako	M0786	DF-T1	1/25, 1/50, 1/100, 1/140, 1/200, 1/400
Novocastra	NCL-DFT1	DF-T1	1/10, 1/50
Novocastra	RTU-MT1	MT1	Prediluido
Novocastra	NCL-MT1	MT1	1/90
Unidad de Anticuerpos Monoclonales CNIO		93F	1/500

### Recuperación antigénica:

- Microondas
- Olla a presión
- Baño María
- Autoclave
- PT Module Lab Vision
- Raypa Thermostatic Bath
- Digestión con Proteasa 1 Ventana
- Digestión con Pepsina Novocastra

### Detección:

- Dako Envision
- Dako LSAB+/2
- Kit Ventana
- Biogenex

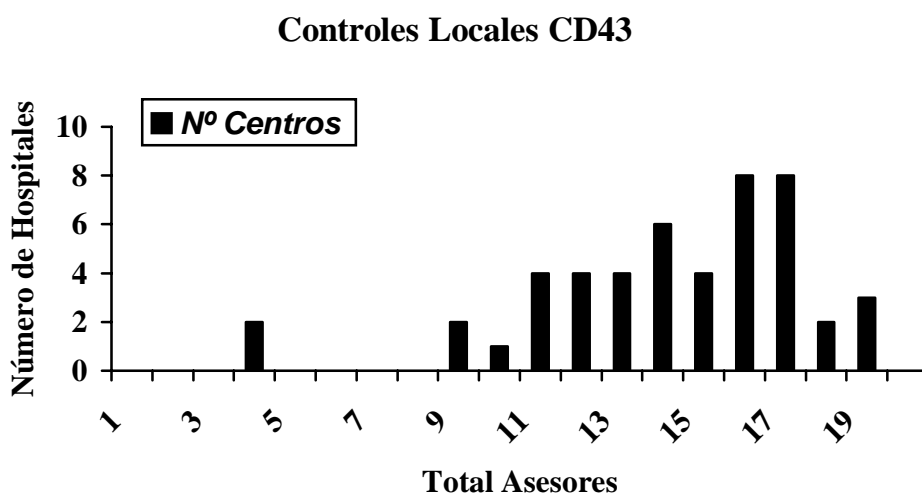
**Automatización** Dako Techmate 500  
 Lab Vision/ Dako Autostainer  
 Biogenex 6000  
 Ventana Benchmark XT  
 Biomeda Microprobe

En la evaluación de las inmunotinciones se siguieron los criterios establecidos para la generalidad de los anticuerpos:

- 0 Preparaciones no remitidas
- 1 Nula o poca tinción de las células diana
- 2 Mínima tinción de las células diana con una mayoría negativa
- 3 Ligera tinción de las células diana
- 4 Buena tinción de las células diana en número e intensidad
- 5 Excelente tinción de las células diana con mínima tinción de fondo

### Estudio de los controles de cada centro:

Los resultados de la evaluación fueron los siguientes:



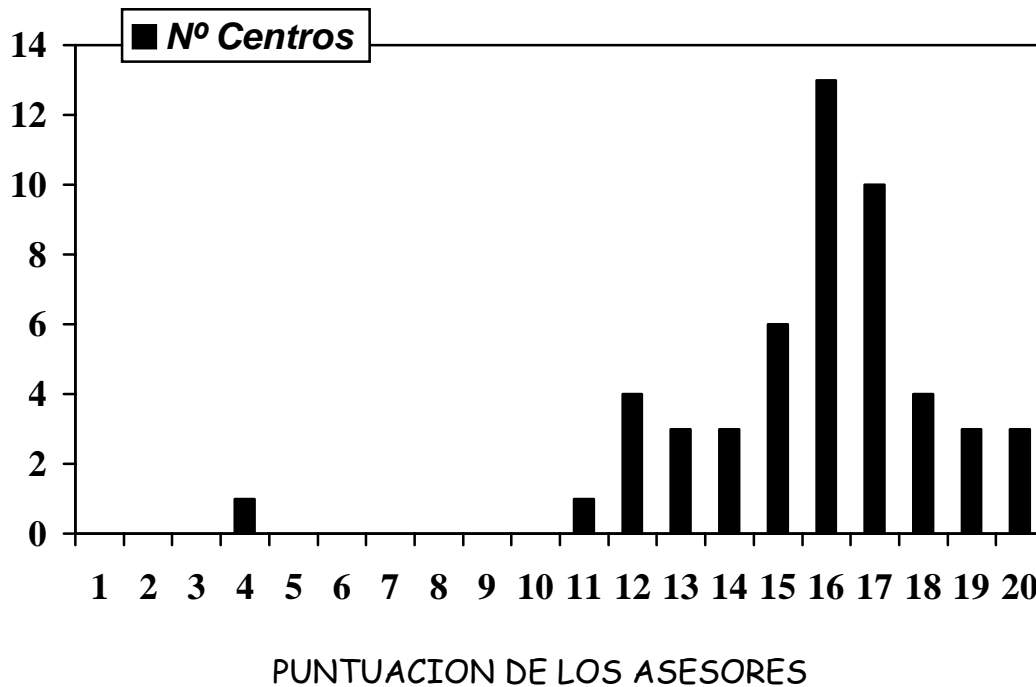
### PUNTUACION DE LOS ASESORES

Una puntuación igual o superior a 12 se considera aceptable para su utilización en diagnóstico rutinario. El 81,21 % (39) de las preparaciones remitidas se consideraron como aceptables, con un 43,75 % (21) con una puntuación igual o superior a 16/20, consideradas como óptimas o cercanas.

Solo un 18,79 % de los centros participantes no alcanza el nivel mínimo para considerar que la técnica puede aplicarse de manera rutinaria.

Los principales problemas detectados han sido artefactos técnicos de corte, pretratamiento o tinción, más que los propios de la detección de CD43.

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



Se consideraron aceptables 50 de los 51 casos, un 98% de los hospitales, con una puntuación igual o superior a 12. Un 64,7% (33) obtuvieron una puntuación igual o superior a 16/20, consideradas como óptimas o cercanas. El único caso no válido reconoció en su formulario la sospecha de problemas debidos a alteración del anticuerpo.

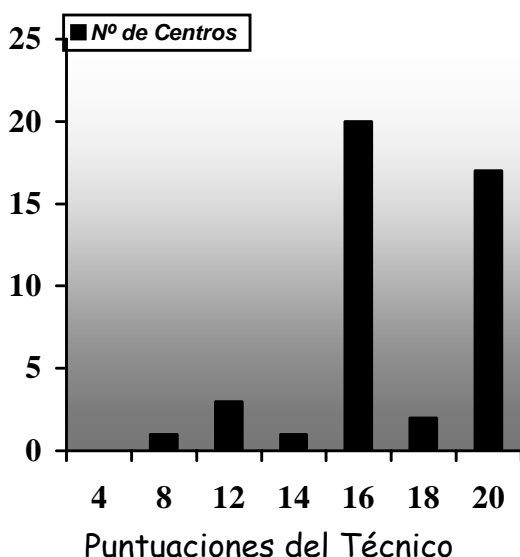
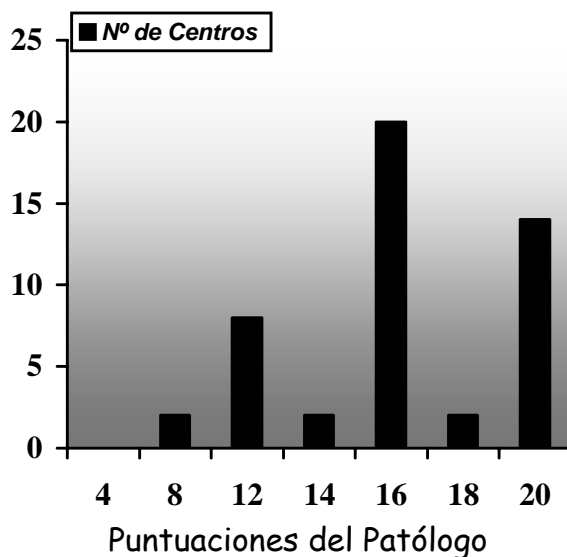
Existieron algunas discrepancias en los resultados respecto al control local, ya que las puntuaciones fueron en general más altas, reflejando quizás defectos en la elección del tejido control local o en su fijación. Respecto a los defectos detectados, al igual que en el control local, los más frecuentes fueron las tinciones irregulares y de fondo o los artefactos técnicos.

## Resultados de la autoevaluación:

El 91,66 % de los técnicos y el 95,83 % de los patólogos participantes remitieron su valoración de los controles locales y del control del GCP.

Los resultados obtenidos del análisis de tales datos son los siguientes:

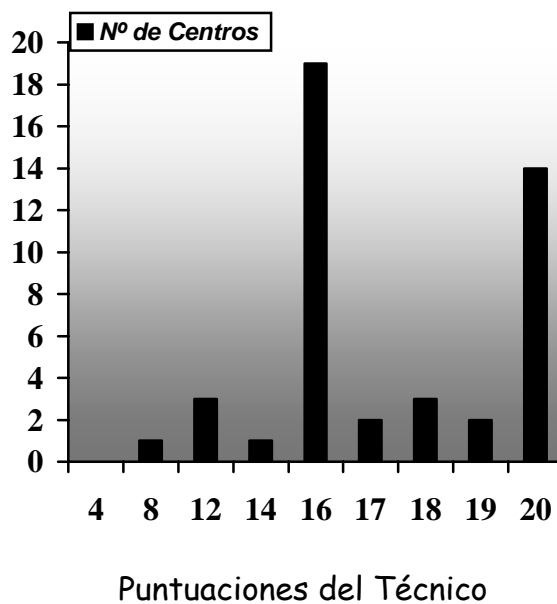
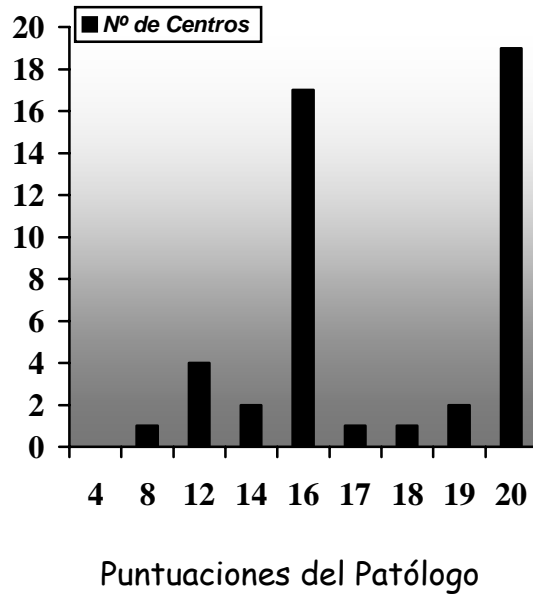
### Control Local



Como se puede observar en los gráficos y reconocemos en la mayoría de las técnicas analizadas, la percepción local sobre los resultados es superior a la valoración de los observadores externos. Para los técnicos participantes el 97,72% de los casos tenían una puntuación igual o superior a 12/20 y el 88,63% igual o mayor de 16/20. Estos porcentajes eran del 100 % y el

78.26% en el caso de los patólogos. En ambos casos esas cifras eran muy superiores a las de los observadores externos.

### Control del GCP



Los resultados son similares al control local, con un 90.9 % de preparaciones con una puntuación igual o superior a 16/20 para los técnicos, y un 85.1 % para los patólogos.

Sigue observándose una notable discrepancia con las valoraciones de los asesores externos.

**Inmunotinción óptima:** Se consideró una inmunotinción óptima a la que mostraba teñidos el número de células esperado con una adecuada relación en la intensidad de la tinción con respecto al contraste empleado y con mínimo o ausente artefacto tanto de técnica inmunohistoquímica (degradación del tejido por sobrecalentamiento, tinción de fondo, p. ej.) como de técnica histológica (contraste adecuado, ausencia de hidratación, etc).

**Mejores métodos** (puntuación de 20/20 en las preparaciones del GCP):

1:

Bloqueo: Agua oxigenada

Automatización: Dako Techmate 500

Digestión enzimática: No

Recuperación antigénica con calor: Olla.

Tampón y pH: Citrato ph 6

Anticuerpo primario: Novocastra NCL-DFT-1 . Dilución 1/10 durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Método de detección: Dako Envision K5007

Cromógeno: Dako DAB K5001, 5-10 minutos a temperatura ambiente

2:

Bloqueo: Agua oxigenada

Automatización: Dako Autostainer Plus

Digestión enzimática: No

Recuperación antigénica con calor: Olla.

Tampón y pH: Citrato ph 6

Anticuerpo primario: Dako N1559, Clon DFT-1, prediluido, durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Método de detección: Dako Envision K5007

Cromógeno: Dako DAB K5001, 5-10 minutos a temperatura ambiente

3:

Bloqueo: Agua oxigenada

Automatización: Dako Autostainer

Digestión enzimática: No

Recuperación antigénica con calor: Olla.

Tampón y pH: EDTA ph 8

Anticuerpo primario: Dako M0786, Clon DFT-1 . Dilución 1/400 durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Método de detección: Dako Envision K5007

Cromógeno: Dako DAB K5001, 5-10 minutos a temperatura ambiente



**Comentarios:** Observamos buenos resultados con diversos anticuerpos monoclonales, aunque con ciertas diferencias en la sensibilidad en la demostración de linfocitos T. La mayor sensibilidad con ausencia de fondo se ha observado con el anticuerpo monoclonal clon DFT-1, aunque las detecciones utilizando el clon MT1, el segundo en frecuencia, han obtenido una buena puntuación (con una media de 14.91 puntos en el control de GCP). En general, se observan discrepancias en los resultados según se analicen los controles locales o el control del GCP, con una menor puntuación generalizada de los casos locales. Este hecho puede reflejar deficiencias en fijación y procesamiento, que estén disminuyendo la sensibilidad de la detección.

Atendiendo solo a los resultados del GCP, la práctica totalidad de ellos son adecuados para su utilización rutinaria, dando mejores puntuaciones globales los realizados con el monoclonal DFT-1, sin excluir la validez de los restantes clones.