



**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 GENERAL

### **Ronda nº 11**

**Antígeno probado: CK7**

**Tejido probado:** Hígado, metástasis de adenocarcinoma de colon.

**Instrucciones:** Los participantes fueron invitados a teñir con CK7 la preparación remitida por el programa (hígado con metástasis, fijado en formol tamponado al 10%, pH 7 durante 24 horas) y su propia preparación control, devolviendo ambas preparaciones para su evaluación.

**Número de laboratorios participantes::**

- **Remitidos:** 108
- **Contestados:** 90 83.3% (GCP) y 89, 82.4 % (Control Local)

Los criterios consensuados usados en la evaluación para considerar la tinción CK7 como óptima fueron los siguientes:

Tinción intensa y bien definida predominantemente citoplasmática fundamentalmente en el epitelio de la metástasis de adenocarcinoma de colon, así como también en algunas células endoteliales, en el epitelio biliar, canalículos biliares y en hepatocitos aislados. Siguiendo este criterio se evaluó la tinción de 1 a 5 como sigue:

0. Preparación no remitida.
- 1: No tinción, tinción débil y heterogénea en las células de la metástasis de adenocarcinoma colónico.
2. Tinción inespecífica en la metástasis con patrón citoplasmático, fondo intenso o tinción inespecífica.
- 3 Tinción específica pero débil, con tinción en endotelios o hepatocitos aislados sólo apreciable con aumentos superiores a 10X.
4. Tinción específica pero débil, con tinción en endotelios o hepatocitos aislados apreciable a 10X.
5. Tinción específica, con tinción en endotelios o hepatocitos aislados apreciable a 4X.

## Características, utilidad y variabilidad de la expresión

La citoqueratina 7 (KRT7) es una familia de proteínas de filamentos intermedios citoplasmáticos expresado en las células epiteliales. La proteína codificada por un grupo de genes KER7 (12q12-13) es miembro de la familia de las citoqueratinas de bajo peso molecular (40-54 kDa) de tipo II de bajo. Éstas están constituidas por proteínas básicas o neutras formando heterodímeros de cadenas de queratinas que se coexpresan durante la diferenciación de los tejidos epiteliales simples o estratificados. Esta citoqueratina se expresa específicamente en el epitelio simple de las cavidades de los órganos internos, en los conductos de las glándulas salivares y en los vasos sanguíneos. Mediante splicing alternativos se generan varios transcritos diferentes que dan diferentes proteínas de las que no se conoce completamente el patrón de distribución en humanos: pulmón, vejiga urinaria, mesotelio, folículo piloso, estructuras ductales...

### Anticuerpos y Métodos evaluados:

#### Anticuerpos Primarios:

Todos los laboratorios que informaron de su protocolo utilizaron el mismo clon de anticuerpo primario OVTL comercializado por diferentes casas comerciales.

1. DAKO M7018:	27	31%
2. DAKO prediluido M1626	23	24.5%
3. Master Diagnostica/Vitro	17	19.5%
4. Menarini/Novocastra	16	18.4%
5. Bigenex	2	3.3 %
6. Zymed	2	3.3 %

En 40 laboratorios (44%) se usaron viales pre-diluidos del anticuerpo, el 40% optó por ajustar las diluciones entre 1:10 y 1:100 (50-5 microgramos/ml). Nueve laboratorios (15%) no declaró la dilución usada.

### Recuperación antigénica:

Sólo 65 (74%) laboratorios informaron del sistema de recuperación antigénica utilizado. El porcentaje es aún menor entre los laboratorios con sistemas totalmente automatizados de inmunohistoquímica puesto que solamente el 55% de éstos informaron del sistema utilizado. En 29 laboratorios se usó algún tipo de desenmascaramiento antigénico automatizado. La mayoría de los laboratorios, 48 centros, optaron por la combinación de olla a presión con buffer de alto y bajo pH para el desenmascaramiento.

#### 1. Olla a presión

48 laboratorios (60%): 29 con buffer de citrato (pH entre 6,1 y 7), 19 con EDTA (pH entre 8-9). Los tiempos de recuperación variaron entre 2 y 8 minutos.

#### 2. Autoclave

1 laboratorio (1.2%) utilizaron autoclave para el desenmascaramiento antigénico, 2 usaron buffer de citrato tamponado a pH6,1.

### 3. *Bond*

Sólo 8 de 20 usuarios de este sistemas informaron del tipo de desenmascaramiento antigénico usado. Siete de ellos optaron por utilizar un buffer de bajo pH (ER1, 6,1) con tiempos entre 6 y 25 minutos. Un laboratorio opto por digestión enzimática Enzima 1 a 37°C por 10 minutos.

### 4. *Benchmark XT*

Sólo 5 de los siete usuarios de este sistema informaron del tipo de desenmascaramiento antigénico usado. En dos casos utilizaron protocolos enzimáticos basados en Proteasa 1 (Ventana Medical Systems) a 37°C por 10 minutos con resultados excelentes. Los protocolos basados en CC1 dieron sistemáticamente una tinción inadecuada.

### 5. *Digestión enzimática*

1 laboratorios utilizo digestión enzimática a 37° C con Proteasa K 40X de Dako, `por 10 minutos.

## **Detección:**

### *Anticuerpos Secundarios*

La mayoría de los laboratorios utiliza un sistema de detección con amplificación basada en polímeros, aunque 9 (10%) laboratorios todavía utilizan un sistema de detección basado en estreptavidina-biotina. En 27 (31%) laboratorios la detección se integra en una plataforma totalmente automatizada.

1. <b>Dako Envision Plus</b>	42 (48%)
2. <b>Refine (Vision Biosystems/Menarini Diagnostics)</b>	20 (23%)
3. <b>Dako LSAB /LSAB+</b>	9 (10%)
4. <b>Masvision (Vitro/Master Diagnostics)</b>	7 (8%)
5. <b>iView (BenchMark/Venatana Medical Systems/ATOM)</b>	7 (8%)
6. <b>Novolink (Novocastra/Menarini Diagnostics)</b>	2 (16.9%)

### *Automatización*

Solo 6 laboratorios (7%) usaron protocolos totalmente manuales. El resto usó alguno de las siguientes plataformas automáticas o semi-automáticas:

1. <b>Autostainer</b> (Dakoautostainer, Dakoautostainer Plus, LabVision Autostainer)	38 (44%)
2. <b>Bond</b> (Bond, Bond Max, Visions Byosistemas/Menarini Diagnostics)	20 (23%)
3. <b>TechMate</b> (Dako, TM500 o TM Horizon)	16 (18%)
4. <b>BenchMark</b> (BenchMark, BenchMark XT)	7 (8%)

## Estudio de los controles en el programa GCP:

Cada caso se evaluó de forma independiente por cada asesor 1 de a 5 según los criterios siguientes:

0. Preparación no remitida.

1: No tinción, tinción débil y heterogénea únicamente en las células de la metástasis de adenocarcinoma colónico.

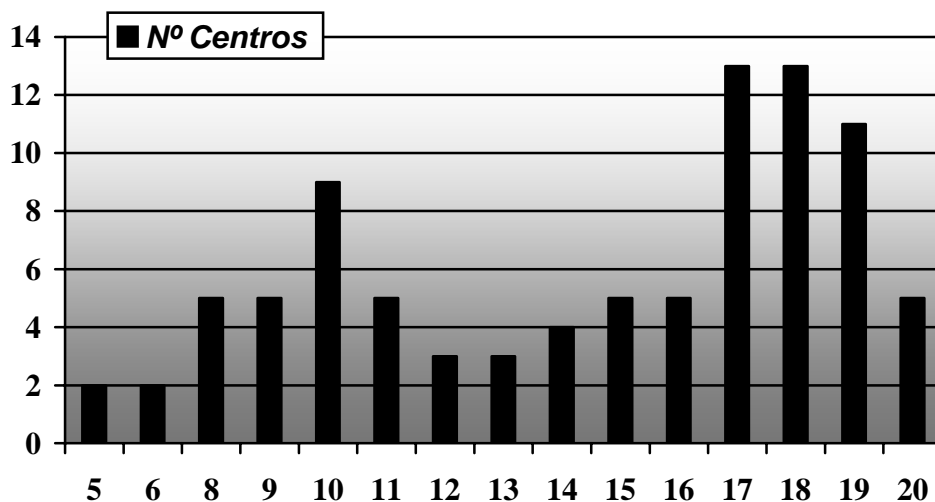
2. Tinción inespecífica en la metástasis, patrón citoplásmático con fondo intenso u otras tinciones inespecíficas.

3 Tinción específica pero débil, con tinción en endotelios o hepatocitos aislados sólo apreciable con aumentos superiores a 10X.

4. Tinción específica, con tinción en endotelios o hepatocitos aislados sólo apreciable a 10X.

5. Tinción específica, con tinción en endotelios o hepatocitos aislados sólo apreciable a 4X. Los resultados de la evaluación fueron los siguientes:

### *Evaluación de los asesores*

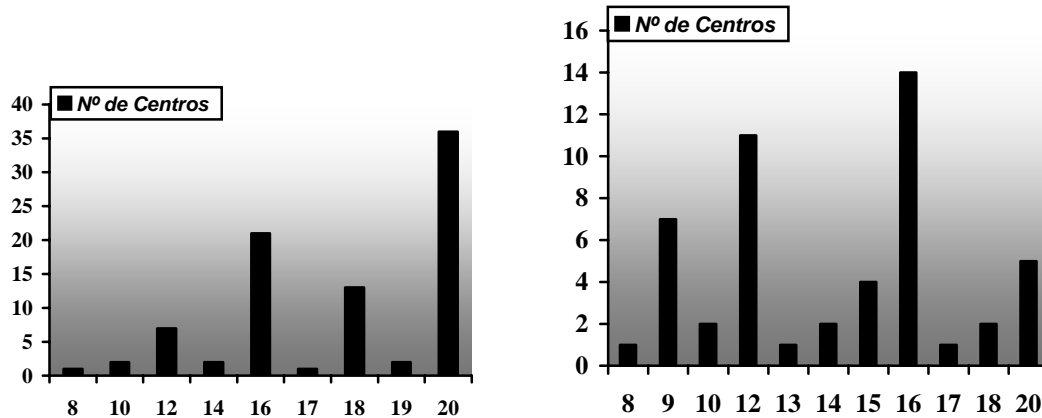


### *Puntuación de los Asesores*

Considerando que una puntuación igual o superior a 12 se considera aceptable, el 71 % (62) de los estudios evaluados se consideraron como aceptables, con un 53 % (46) con una puntuación igual o superior a 16/20, consideradas como óptimas o cercanas. Cinco protocolos se evaluaron con 20 puntos, la máxima puntuación. El principal problema detectado ha sido una tinción inadecuada de algunas células, tinción de fondo ligera y/o pretratamiento excesivo provocando degradación del tejido. En los casos con menor puntuación, además, destacaba un contraste inadecuado, tinción irregular, tinción de fondo, etc.

Un 29% de los centros participantes no alcanza el nivel de sensibilidad suficiente para diagnóstico.

## Resultados de la Autoevaluación



Puntuaciones del Patólogo

Puntuaciones del Técnico

Los resultados demuestran que en opinión de los patólogos locales 94% de preparaciones aceptables con una puntuación igual o superior a 16/20 de 40% para los técnicos y un 84 % para los patólogos.

Sigue observándose una notable discrepancia con las valoraciones de los asesores externos aunque menor que en el caso de los controles locales.

### Estudio de los controles locales remitidos por los centros:

#### Control Local

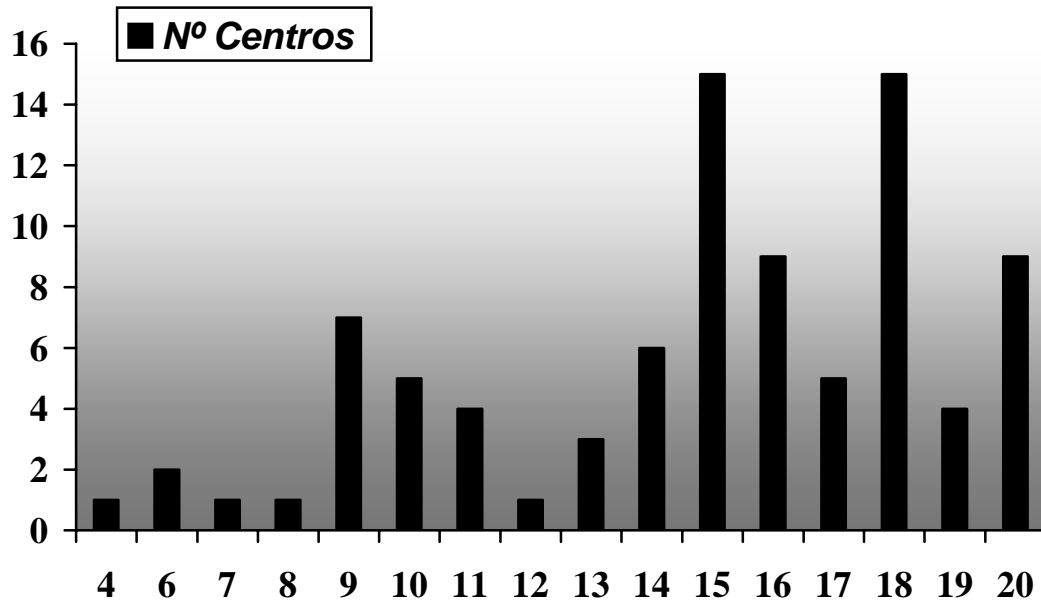
Participaron 89 centros, 82.4 %, proporcionando una sección del control local para evaluación.

Como controles locales se utilizaron:

1. Hígado 21 centros
2. Carcinoma mama 11 centros
3. Pulmón normal 11 centros
4. Riñón normal 11 centros
5. Carcinoma ovario 5 centros
6. Páncreas normal 3 centros
7. Próstata normal 3 centros
8. Piel normal 3 centros
9. Ganglio linfático M1 3 centros
10. Multitumor 2 centros
11. Otros 6 centros

En 10 casos, los asesores consideraron el control local como inadecuado, debido a problemas en la fijación o procesado el tejido local así como en la elección del tipo histológico inadecuado para la técnica. Las recomendaciones de los asesores en cuanto a control local son las de utilizar en la medida de lo posible un tejido con células positivas y negativas (riñón normal, metástasis hepática...). En otros casos el

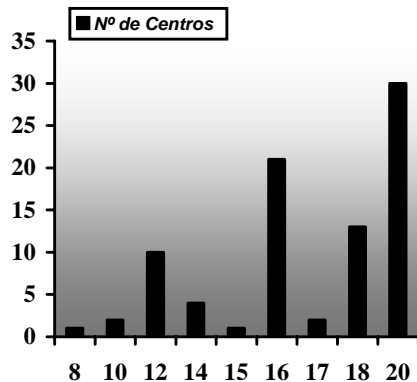
control local se dio por inadecuado por corresponder a tumores poco diferenciados, sin conocer el origen o la localización y difíciles de predecir su perfil de expresión deCK7.



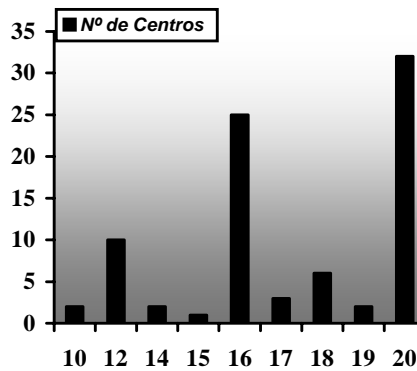
#### Puntuación de los Asesores

Teniendo en cuenta que una puntuación igual o superior a 12 se considera aceptable, el 76% (68) de las preparaciones remitidas se estimaron aceptables. Un 48% (43) obtuvieron una puntuación igual o superior a 16/20, consideradas como óptimas o cercanas. Nueve casos se evaluaron con 20 puntos, ninguno de ellos obtuvo la máxima puntuación en el control CGP.

Existieron grandes discrepancias en los resultados respecto al control local, con una alta frecuencia de tinción irregular, con áreas del tejido mostrando una intensidad de la tinción o número de células inmunorreactivas inferior al esperable. La evaluación demostró también la alta frecuencia de tinciones de intensidad débil o insuficiente y de presencia de leve fondo inespecífico.



Puntuaciones del Patólogo



Puntuaciones del Técnico

Como se puede observar en los gráficos la percepción local sobre los resultados es similar a la valoración de los observadores externos. Para los técnicos participantes el 76 % de los casos tenían una puntuación igual o superior a 16/20. Este porcentaje era del 74% en el caso de los patólogos. En 10 casos, además se incluían comentarios escritos que demostraban la insatisfacción local por la tinción de su propio control. Este hecho puede deberse a que probablemente no se utilizan de rutina controles externos en el uso diagnóstico de esta técnica, dado que el laboratorio local no parecía sentirse satisfecho con su propio control escogido.

**Mejor método** (puntuación de 20/20 en las preparaciones del GCP):

Cinco centros recibieron la máxima puntuación en el control CGP.

Método: ENVISION (3),REFINE POLYMER(1), MASVISION(1)

Bloqueo: Agua oxigenada

Automatización: AUTOSTAINER (3), BOND MAX (1) y TECHMATE (1)

Digestión enzimática: NO

Recuperación antigénica con calor: SI: Olla a presión 2 minutos en tampón citrato a pH 6(3) ó Tampón Tris-EDTA pH 9(1) o ER1 (1) pH 6,5 15 minutos.

Anticuerpo primario: Monoclonal Clon OVTL 12/30, 30 minutos a temperatura ambiente (Dako 4, 1 Master Diagnostics)

Cromógeno: DAB 10 min.

### **Comentarios:**

Con respecto a rondas previas, la calidad general de las tinciones para CK7 se mantienen con un grado de tinciones buenas en torno al 70% del control CGP y del 80% del control local y de tinciones excelentes en torno al 20% en ambos casos. La homogeneidad de los resultados es mayor que para otros anticuerpos, en parte debido a que todos los laboratorios utilizan el mismo clon. No obstante los mejores resultados se obtuvieron con diluciones locales del clon OV-TL12/30. Un número elevado de laboratorios (44%) usaron formas comerciales prediluidas, obteniendo tinciones con gran fondo por lo general, salvo si se rediluyen entre 1:10 y 1:100.

Sorprendentemente, sólo uno de los 27 laboratorios con protocolos totalmente automatizados obtuvo 20 puntos, y en general el grado de información remitida respecto a los protocolos utilizados por estos laboratorios es sensiblemente inferior (en torno a la mitad de los laboratorios participantes), lo que refleja un exceso de confianza en el desarrollo de la técnica por la máquina y un cierto desconocimiento del funcionamiento de las mismas. La puntuación es mejor en general en los controles locales, no obstante esta comisión quiere señalar que sólo la evaluación comparativa de los controles CGP

teñidos por los laboratorios participantes en el programa permite conocer el nivel de sensibilidad de la técnica realizada en cada laboratorio. Este informe incluye además algunas recomendaciones respecto a la selección del control local (ver párrafo control local)

### Referencias seleccionadas

1. Allory Y, Bazille C, Vieillefond A, Molinie V, Cochand-Priollet B, Cussenot O, Callard P, Sibony M. Profiling and classification tree applied to renal epithelial tumours. *Histopathology* 2007.
2. Park SY, Kim BH, Kim JH, Lee S, Kang GH. Panels of immunohistochemical markers help determine primary sites of metastatic adenocarcinoma. *Arch Pathol Lab Med* 2007;131:1561-67.
3. Alsaad KO, Serra S, Schmitt A, Perren A, Chetty R. Cytokeratins 7 and 20 immunoexpression profile in goblet cell and classical carcinoids of appendix. *Endocr Pathol* 2007;18:16-22.
4. Liu L, Qian J, Singh H, Meiers I, Zhou X, Bostwick DG. Immunohistochemical analysis of chromophobe renal cell carcinoma, renal oncocytoma, and clear cell carcinoma: an optimal and practical panel for differential diagnosis. *Arch Pathol Lab Med* 2007;131:1290-1297.
5. Vang R, Gown AM, Barry TS, Wheeler DT, Yemelyanova A, Seidman JD, Ronnett BM. Cytokeratins 7 and 20 in primary and secondary mucinous tumors of the ovary: analysis of coordinate immunohistochemical expression profiles and staining distribution in 179 cases. *Am J Surg Pathol* 2006;30:1130-1139.
6. Schaafsma HE, Ramaekers FC, van Muijen GN, Lane EB, Leigh IM, Robben H, Huijsmans A, Ooms EC, Ruiter DJ. Distribution of cytokeratin polypeptides in human transitional cell carcinomas, with special emphasis on changing expression patterns during tumor progression. *Am J Pathol* 1990;136:329-43.
7. Rullier A, Le BB, Fawaz R, Blanc JF, Saric J, Bioulac-Sage P. Cytokeratin 7 and 20 expression in cholangiocarcinomas varies along the biliary tract but still differs from that in colorectal carcinoma metastasis. *Am J Surg Pathol* 2000;24:870-876.
8. Tot T. Patterns of distribution of cytokeratins 20 and 7 in special types of invasive breast carcinoma: a study of 123 cases. *Ann Diagn Pathol* 1999;3:350-356.
9. Rubin BP, Skarin AT, Pisick E, Rizk M, Salgia R. Use of cytokeratins 7 and 20 in determining the origin of metastatic carcinoma of unknown primary, with special emphasis on lung cancer. *Eur J Cancer Prev* 2001;10:77-82.
10. Goldstein NS, Bassi D. Cytokeratins 7, 17, and 20 reactivity in pancreatic and ampulla of Vater adenocarcinomas. Percentage of positivity and distribution is affected by the cut-point threshold. *Am J Clin Pathol* 2001;115:695-702.
11. Jiang J, Ulbright TM, Younger C, Sanchez K, Bostwick DG, Koch MO, Eble JN, Cheng L. Cytokeratin 7 and cytokeratin 20 in primary urinary bladder carcinoma and matched lymph node metastasis. *Arch Pathol Lab Med* 2001;125:921-23.
12. Tot T. The value of cytokeratins 20 and 7 in discriminating metastatic adenocarcinomas from pleural mesotheliomas. *Cancer* 2001;92:2727-32.
13. Cai YC, Banner B, Glickman J, Odze RD. Cytokeratin 7 and 20 and thyroid transcription factor 1 can help distinguish pulmonary from gastrointestinal carcinoid and pancreatic endocrine tumors. *Hum Pathol* 2001;32:1087-93.
14. Kende AI, Carr NJ, Sobin LH. Expression of cytokeratins 7 and 20 in carcinomas of the gastrointestinal tract. *Histopathology* 2003;42:137-40.