



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 9

Antígeno probado: bcl-2

Tejido probado: Amígdala

1.-Instrucciones:

Los participantes fueron invitados a teñir con anticuerpo anti-Bcl 2, 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.

2.- Información relacionada con Bcl-2.

La proteína Bcl-2 ("B-cell lymphoma/leukaemia-2") forma parte de una familia de proteínas anti-apoptosis que se localizan en las membranas mitocondriales, de retículo endoplásmico y nucleares. Bcl-2 es una proteína de 25 KDa, cuya función principal es inhibir la apoptosis, aunque también se ha demostrado su papel en el mantenimiento de la memoria de las células B, regulación de la señalización por calcio y proliferación celular.

2.1.- Expresión en tejidos normales:

- ✓ En los tejidos adultos normales se expresa en células en rápida división y diferenciación.
- ✓ En los tejidos linfoides, Bcl-2 se expresa en células T, células pro-B y en células B maduras.
- ✓ En los centros germinales B, no se expresa (donde la apoptosis forma parte de la vía de desarrollo para seleccionar solo células productoras de anticuerpos), sin embargo se puede expresar en células T del centro germinal.

2.2. - Expresión en Neoplasias:

En tumores, la sobreexpresión de Bcl-2 participa en la carcinogénesis mediante la supresión de la muerte celular programada y la extensión de la vida media de las células neoplásicas.

Su sobreexpresión es muy frecuente en muchos tipos de neoplasias, que incluyen linfomas no Hodgkin, leucemias, adenocarcinomas, (próstata, colorrectal, estómago, pulmón, etc.), carcinoma escamocelular, carcinoma de células pequeñas, neuroblastoma y diferentes tipos de sarcomas, sobre todo GIST, tumor fibroso solitario y sarcoma sinovial.

En los linfomas, la sobreexpresión de Bcl-2 se suele deber a la translocación del gen que lo codifica junto al de las cadenas pesadas de Igs t(14;18) bcl2/JH con reordenamiento del gen. Esta alteración es especialmente importante en el linfoma folicular, lo que induce sobreexpresión de Bcl-2 en el 100% de los de grado I, en más del 80% de los de grado II y en el 75% de los de grado III. Sin embargo, el linfoma folicular de la piel suele ser Bcl-2 negativo.

2.3. - Utilidad:

Es un marcador muy útil en la distinción entre hiperplasia folicular reactiva y linfoma folicular, pero carece de utilidad para diferenciar entre linfoma folicular y otros tipos de linfomas de bajo grado, ya que la mayoría expresan Bcl-2.

Puede ser útil también en el diagnóstico diferencial de tumores de partes blandas, ya que las fibromatosis y el "histocitoma fibroso maligno" (si aún se contempla) son negativos.

2.4. - Control para Bcl2:

En una amígdala reactiva, las células de la periferia del folículo, es decir, los linfocitos B del manto y los linfocitos T interfoliculares son positivas, con una intensa y definida tinción citoplasmática. Todos los centrocitos y centroblastos deben ser negativos y sólo se expresará en el centro folicular algunos linfocitos T.

3. - Número de laboratorios participantes:

- Remitidos: 89

- Contestados:

- Para el Control GCP: 76 centros, es decir, el (85%).
- Para el Control Local 77 (86%).

4.-Anticuerpos y Métodos evaluados:

Los anticuerpos más utilizados en inmunohistoquímica diagnóstica son los monoclonales 124 y 100/D5.

4.1.-Anticuerpos Primarios, proveedores y diluciones:

| Proveedor | Nº laboratorios | Código | Clon | Dilución |
|------------------------------|-----------------|-------------------------|-------------|---|
| Dako | 22 | N1587 | 124 | Prediluido |
| Dako | 20 | M0887 | 124 | 1:10, 1:20, 1:50, 1:80, 1:100, 1:120, 1:350 |
| Master Diagnóstica | 12 | 004002 | 100/D5 | Prediluido |
| Master Diagnóstica | 2 | 004003 | 8C8 | Prediluido |
| Novocastra/Vision Biosystems | 5 | NCL-bcl-2/ BCL-2-L-CE | Bcl2/100/D5 | 1:20, 1:50, 1:80, 1:120 |
| Novocastra/Vision Biosystems | 10 | RTU bcl-2/ BCL-2-R-7-CE | Bcl2/100/D5 | Prediluido |
| Zymed-Invitrogen | 2 | 08-1193 | Bcl2/100 | Prediluido |
| Diagnostic Biosystems | 1 | Mob 130 | 100/D5 | 1:25 |
| Lab Vision- Neomarkers | 1 | MS-597 | 8C8 | 1:200 |
| Biogenex | 1 | MU287-UC | Bcl2/100 | 1:800 |
| Ventana | 1 | 760-2693 | Bcl2/100/D5 | Prediluido |

4.2.-Recuperación antigénica:

Microondas
Olla a presión
Baño María
Autoclave
PT Module Lab Vision
Benchmark Ventana
BondMax Vision Biosystems

4.3.-Detección:

Kit Dako Envision
Kit Dako LSAB+/2
Kit Ventana Iview
Kit Novolink de Novocastra
Kit Bond Polymer Detection Vision Biosystems Biogenex
Masvision polivalente Master Diagnóstica

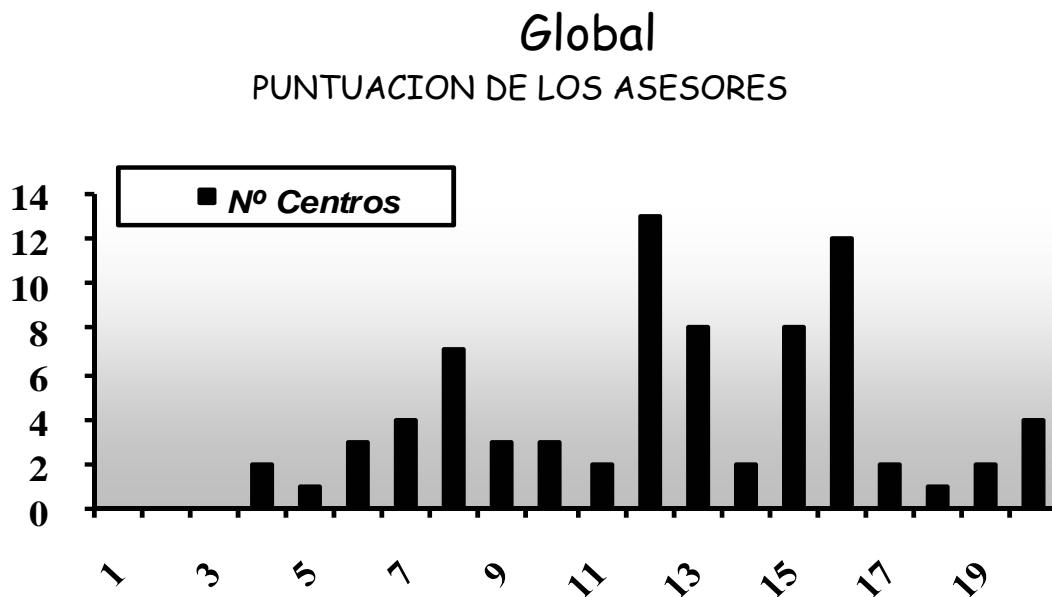
4.4.-Automatización:

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

5.- Estudio de los controles locales:

Los controles locales correspondían en su mayoría a amígdalas no neoplásicas (58), apéndice (1), aunque también se recibieron controles multitejidos (1 Tissue array) y linfomas de diversos subtipos (3 Linfomas B Difusos de Célula Grande y 2 L. foliculares)

Los resultados de la evaluación fueron los siguientes:



La puntuación igual o superior a 12 se considera aceptable, por lo que el 67.5% (52) de las 77 preparaciones remitidas se consideraron aptas, con un 27% (21) con una puntuación igual o superior a 16/20, consideradas como óptimas o cercanas y 4 casos puntuados como 20/20 (5%).

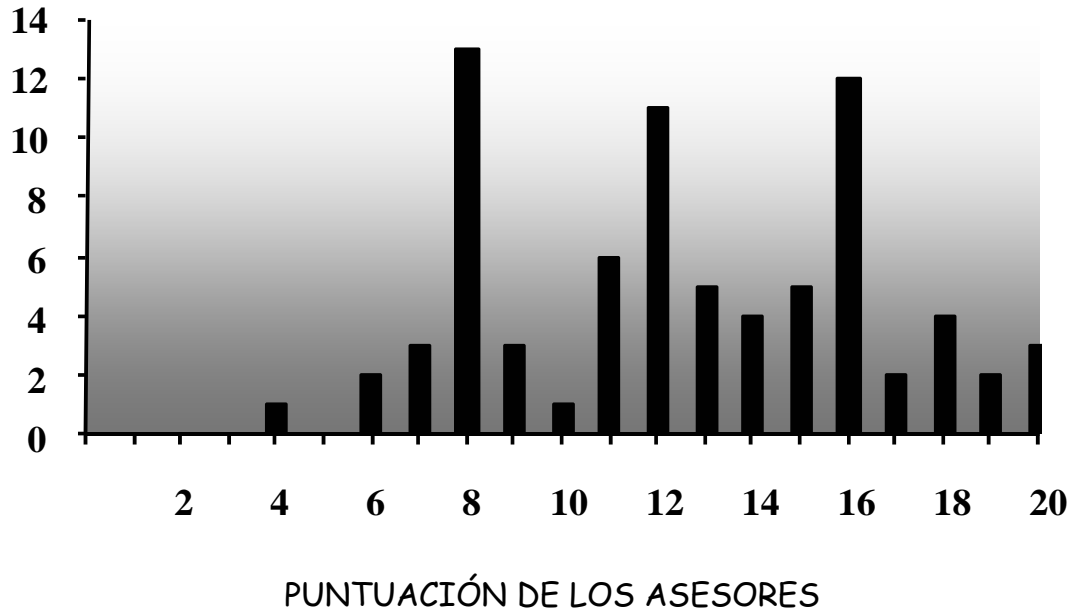
En cuanto a los NO OPTIMOS: Un 32.5% (30) del total de centros participantes no alcanza el nivel mínimo para considerar que la técnica puede aplicarse de manera rutinaria.

El principal problema detectado ha sido, la escasa sensibilidad de la técnica, con una intensidad de la tinción o número de células inmunorreactivas inferior al esperable. Problemas menos frecuentes, han sido los artefactos técnicos generales y los debidos a un exceso de pretratamiento.

6.- Estudio de los controles remitidos por el programa GCP:

Se remitió un corte de amígdala fijada en formol e incluida en parafina para su inmunotinción para bcl-2. El resultado de la evaluación fue:

Global



Si consideramos aceptable una puntuación igual o superior a 12, el 63% (48) de las 75 preparaciones remitidas alcanzaron este nivel. Un 30% (23) obtuvieron una puntuación igual o superior a 16/20, considerada como óptima o cercana. El 4% (3) obtuvo la puntuación máxima 20/20. Un 31,76% (27) de los centros no alcanzaron la calidad suficiente para considerar que la técnica pueda aplicarse de manera rutinaria.

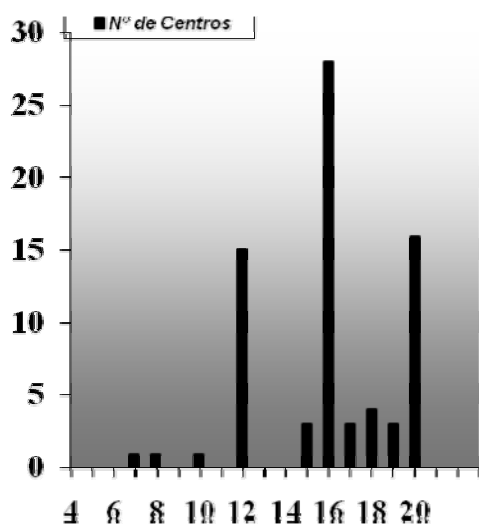
Al igual que en el control local, la técnica ha mostrado en un elevado porcentaje de centros escasa sensibilidad, con intensidades y detección de células inferiores a lo esperable.

7.- Resultados de la autoevaluación:

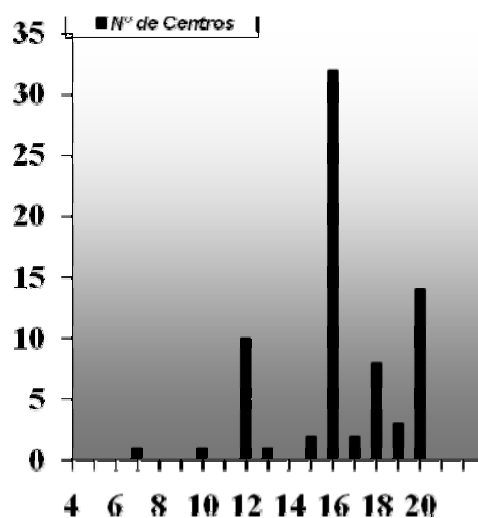
El 99% de los técnicos y de los patólogos remitieron su valoración de los controles GCP y locales.

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

Control Local



Puntuaciones del Patólogo



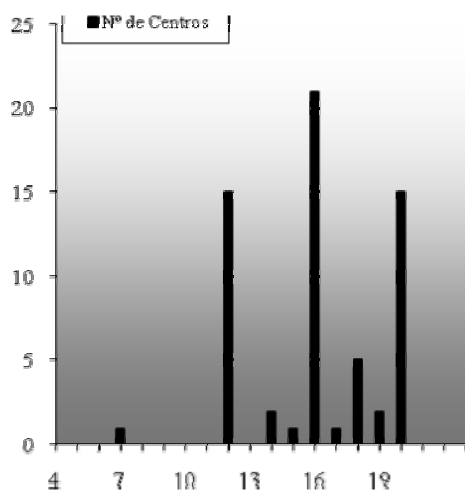
Puntuaciones del Técnico

Como se puede observar en los gráficos, se mantiene en la mayoría de las técnicas analizadas, una percepción local sobre los resultados muy superior a la valoración de los observadores externos, reflejando que el nivel de sensibilidad exigido a la detección es muy inferior del que debiera.

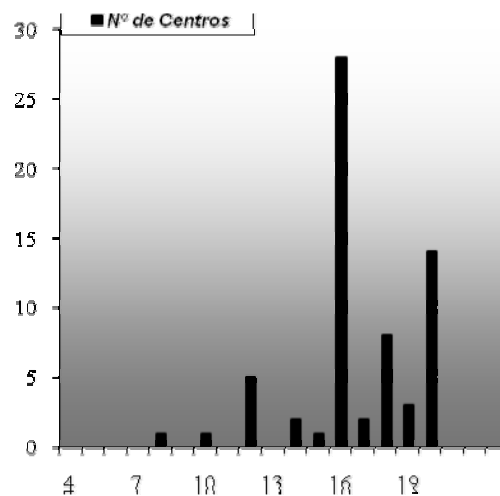
Globalmente, la discrepancia de valoración en esta ronda ha sido de:

- El 67% valorada Optima la técnica por los evaluadores externos, frente al 95% de autoevaluación local
-
- El 27% se considero muy buena inmunoreactividad, frente al 76% remitidos en la autoevaluación.
-
- El 5 % se consideró excelente por parte del total de asesores que han participado, frente a las Autoevaluaciones que respectivamente en su control local se han otorgado valoraciones excelentes el 21% del total.

Control del GCP



Puntuaciones del Patólogo



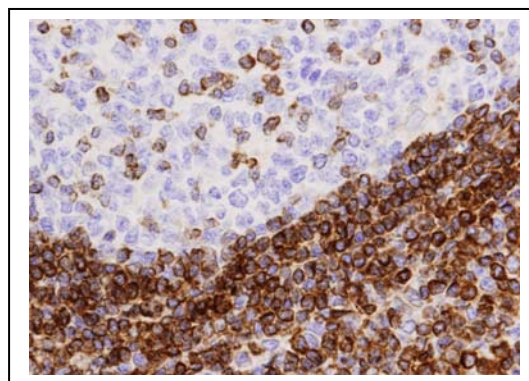
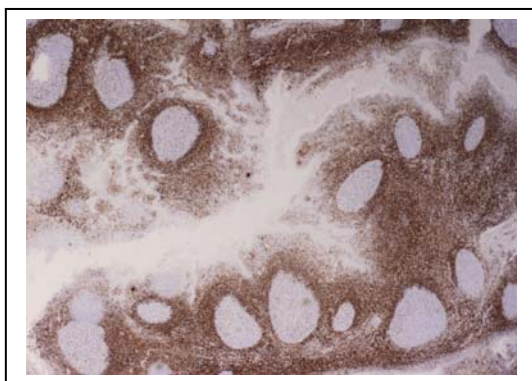
Puntuaciones del Técnico

Los resultados son similares al control local, con un 98% de preparaciones con una puntuación igual o superior a 12/20 para los patólogos, y un 97% para los técnicos, consideradas suficientes para uso diagnóstico, lo que contrasta con la evaluación externa (63%).

8.- Inmunotinción óptima:

Se consideró una inmunotinción óptima para Bcl2 en tejido linfoide la que mostraba una tinción citoplásmica intensa en las células de los mantos foliculares y las células linfoides interfoliculares, con negatividad de los centros foliculares, exceptuando salpicados linfocitos T pequeños.

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



9.- Guía utilizada para la evaluación:

Los criterios para considerar óptima una tinción para bcl-2 en una amígdala fueron:

- Tinción fuerte y definida del 100% de las células B normales del manto.
- Fuerte tinción citoplasmática en las células linfoides interfoliculares
- Tinción de aislados linfocitos pequeños en el centro folicular
- 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 o artefactos |
| 4 | Tinción de células diana adecuada |
| 5 | Tinción óptima con clara detección de linfocitos T centrofoliculares y ausencia de fondo |

10.- Los protocolos de los mejores resultados para Bcl-2 en esta ronda han sido:

20/20 GCP:

Metodo 1:

Automatización: TechMate 500 DAKO

Recuperación antigénica con calor: PT module con tampón Tris /EDTA pH 8 durante 10 minutos.

Anticuerpo primario: Neomarkers Clon 8C8, dilución 1:200, durante 25 minutos a temperatura ambiente

Método de detección: Novolink de Novocastra

Metodo 2:

Automatización: TechMate 500 DAKO

Recuperación antigénica con calor: Olla a presión con tampón Citrato pH 9 durante 2 minutos.

Anticuerpo primario: Dako: Clon 124, dilución 1:80, durante 25 minutos a temperatura ambiente

Método de detección: EnVision (DAKO)

Metodo 3:

Automatización: Autostainer (DAKO)

Recuperación antigénica con calor: Olla a presión, con tampón Citrato pH 9 durante 3 minutos.

Anticuerpo primario: Dako: Clon 124, prediluido, durante 10 minutos a temperatura ambiente

Método de detección: EnVision (DAKO)

Metodo 4:

Automatización: BOND MAX (VISION BIOSISTEM)

Recuperación antigénica con calor: BOND MAX, con tampón Citrato pH 6 A 100°C durante 15 minutos.

Anticuerpo primario: Menarini, Clon 124/100/05, prediluido, durante 15 minutos a temperatura ambiente

Método de detección: NOVOLINK de VISION BIOSISTEM

11.- Comentarios:

El análisis de los resultados de inmunotinción con diversos anticuerpos monoclonales y condiciones de tinción muestra resultados de mayor calidad que en la ronda anterior.

Los anticuerpos monoclonales empleados: -clones 124, bcl2/100/D5 y 100- son útiles para su uso en rutina, así como diferentes tampones para el desmascaramiento antigénico.

En general, con los diversos anticuerpos analizados, se aprecia una mejor calidad de tinción y mayor sensibilidad con el uso de tampones a pH9.

El principal problema de los laboratorios considerados no aptos ha sido la escasa sensibilidad de la técnica con una intensidad de tinción o una proporción de células marcadas muy 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.

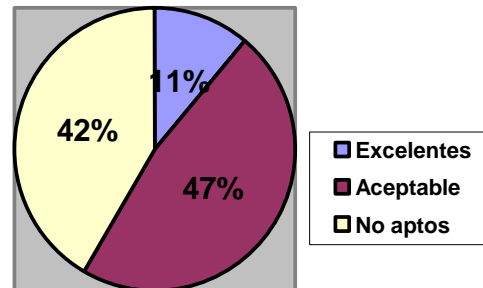
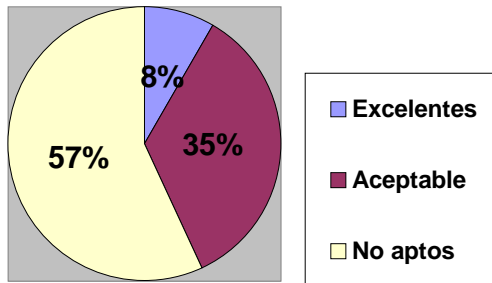
12.- Evolución de los resultados respecto a los controles de bcl-2 previos (en 2ª(2006) y 7ª, 8ª y 9ª de 2007 rondas linfoides):

Tabla 1: % de Bcl-2 Aptos y Excelentes

| | 2ª Ronda | 7ª Ronda | 8ª Ronda | 9ª Ronda |
|---|----------|----------|----------|----------|
| % de Aptos Control Local (≥ 12) | 43'06% | 69,33% | 63,85% | 67% |
| % de Excelentes Control Local (≥ 16) | 8'33% | 24% | 25,3% | 27% |
| % de Aptos Control GCP (≥ 12) | 58'33% | 63'63% | 68,23% | 63% |
| % de Excelentes Control GCP (≥ 16) | 11'11% | 27'27% | 35,29% | 30% |

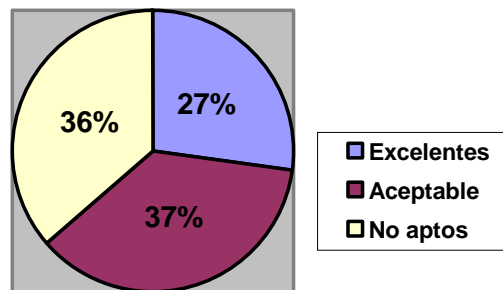
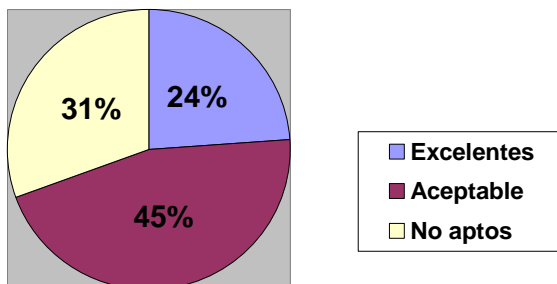
Control Local 2ª Ronda

Control GCP 2ª Ronda

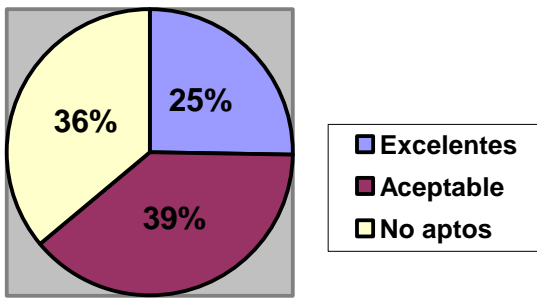


Control Local 7ª Ronda

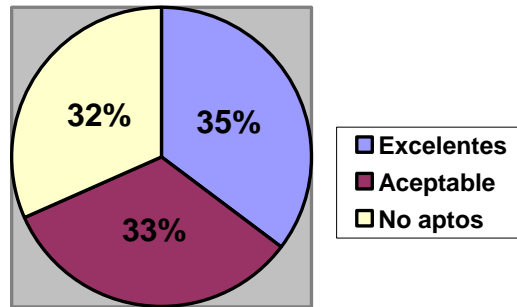
Control GCP 7ª Ronda



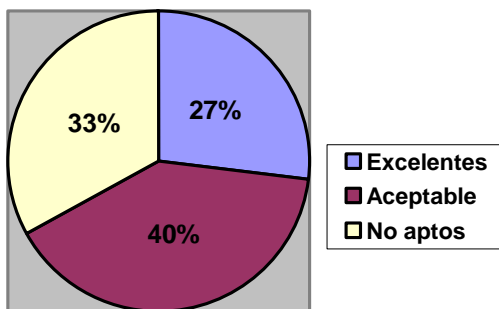
Control Local 8ª Ronda



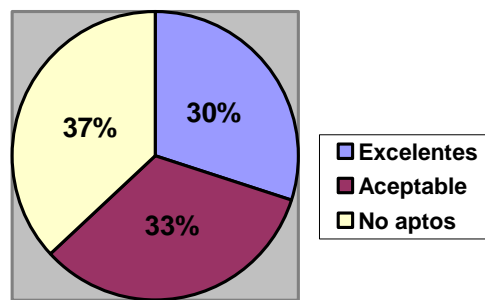
Control GCP 8ª Ronda



Control Local 9ª Ronda

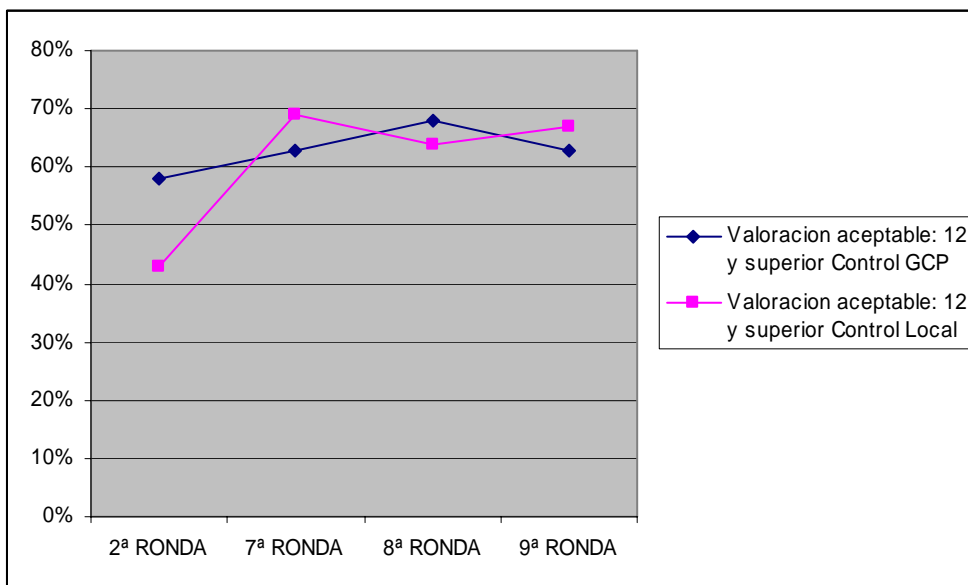


Control GCP 9ª Ronda



Grafica 1: correspondiente a resultados de tabla 1

12.1 Evolución de los resultados ACEPTABLES en las 4 Rondas analizadas

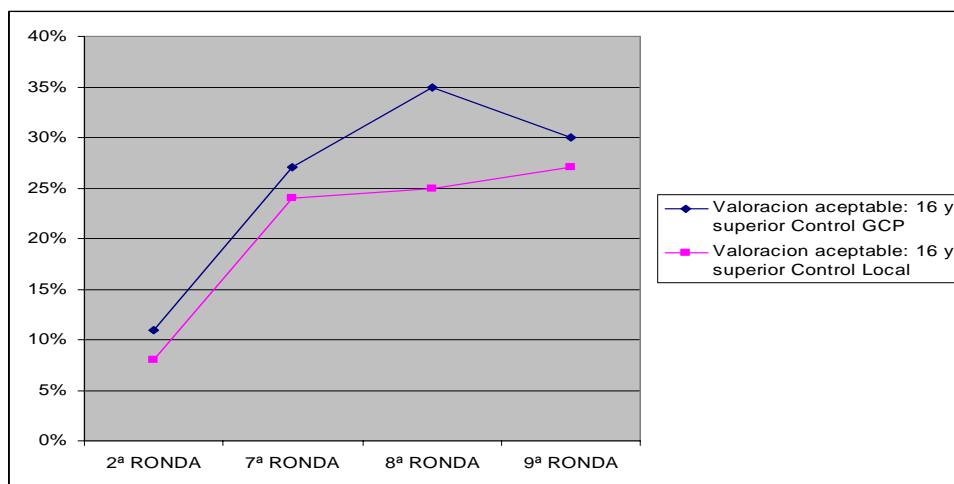


Como se puede apreciar en los gráficos, continúa en general una mejoría en los resultados, que ha sido más evidente en los controles GCP hasta la ronda 8, invirtiéndose los resultados en la última ronda.

En referencia a los controles locales, se observó un incremento considerable en la 7ª RONDA, que se ido manteniendo en el rango del (60-70) % en rondas posteriores, como consecuencia de una mejor selección de los tejidos control.

12.2.-Evolución de los resultados Excelentes en las 4 Rondas analizadas

Si consideramos la evolución de resultados OPTIMOS, es decir con valoraciones de 16 o superior, podemos observar que también mejores resultados en rondas sucesivas, siendo mas evidente hasta la Roda nº8 en los controles GCP, y referente a los controles locales la evolución evidencia una mejora paulatina en todas las rondas



Queda, sin embargo, un porcentaje aún importante de laboratorios (33% control Local y 37% en el control GCP) en los que la técnica no puede considerarse de calidad suficiente para ser empleada en diagnóstico y se aconseja que se revisen tanto los controles empleados así como los mejores protocolos incluidos en los informes remitidos hasta el momento.

13.- Referencias:

1. Cory S, Huang DC, Adams JM. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene*. 2003 Nov 24;22(53):8590-607. Review.
2. Lai R, Arber DA, Chang KL, Wilson CS, Weiss LM: Frequency of bcl-2 expression in non-Hodgkin's lymphoma: a study of 778 cases with comparison of marginal zone lymphoma and monocytoid B-cell hyperplasia. *Modern Pathology* 1998; 11:864-869.
3. Karl et.al *Cancer Research* 2005, 65: 5063-5069
4. www.nordiqc.org