



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

5ª RONDA

Antígeno probado: CD79 alfa

Tejido probado: Amígdala

Instrucciones: Los participantes fueron invitados a demostrar CD79 alfa en las preparaciones proporcionadas.

El antígeno CD79 es un heterodímero compuesto por 2 fosfoproteínas denominadas CD79a (mb-1 de 47 kDa) y CD79b (B29 de 37 kDa).

CD79 alfa se localiza en la membrana de células B, y esta presente en estadio pre B y células B maduras, apareciendo en células plasmáticas en el citoplasma.

Se expresa en:

- la mayoría de las neoplasias de células B, sin embargo solo aparece en el 50% de las neoplasias de células plasmáticas.
- Puede estar co-expresado con CD3 en el 10% de los casos de leucemias y linfomas linfoblásticos T, pero muy raramente en Linfomas T maduros.
- En Linfomas de Hodgkin, predominio linfocítico, CD79alfa se expresa en las células de Hodgkin en la mayoría de los casos, mientras que las células Reed-Sternberg sólo se expresan en el 20% del los casos

Número de laboratorios participantes:

- Remitidos: 86
- Contestados: control GCP : 77% de participación.

Guía utilizada para la evaluación: Cada uno de los cuatro asesores concedieron una puntuación entre 0 y 5, lo que daba una puntuación total entre 0 y 20 puntos. Los criterios de evaluación empleados son:

PUNTUACION	PATRON DE TINCION
0	No remisión de preparaciones
1-2	Solo se observa señal citoplasmática en células plasmáticas
3	Expresión de membrana en linfocitos B, aunque débil, observándose principalmente las células plasmáticas.
4-5	Tinción generalizada esperada: con adecuada inmunoreactividad de membrana en las células B y de superior intensidad en las plasmáticas

Otras variables que se han tenido en consideración han sido:

- Ausencia/Presencia de fondo
- Señal inespecífica
- Calidad global de la técnica (ausencia de burbujas, tinción irregular, efecto borde)
- Preservación de la muestra tras la recuperación antigénica.

Inmunotinción óptima: En la Figura 1 se puede observar inmunotinción óptima en la amígdala reactiva (control GCP)

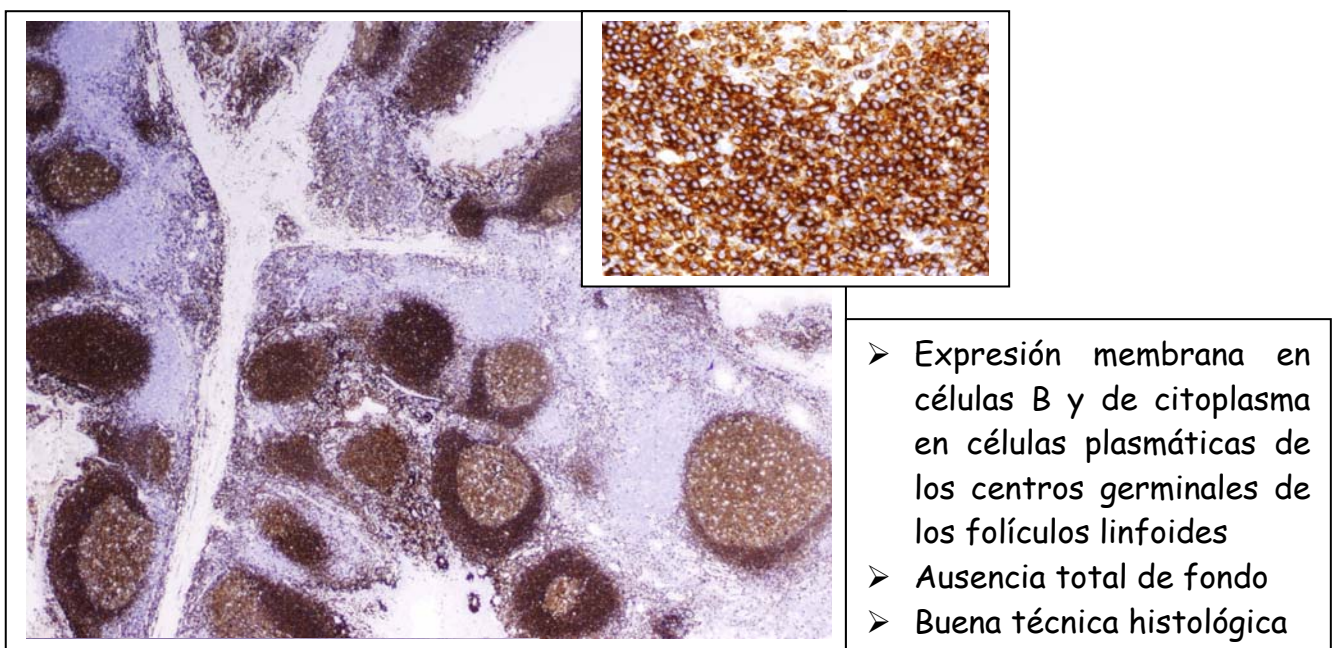


Figura 1: CD79 alfa en el control de amígdala (control GCP)

Resultados de la Evaluación

1.-Análisis y Valoración del control GCP.

Los participantes remitieron el control de amígdala reactiva aportado por el CGP e inmunoteñido para CD79 alfa.

La participación ha sido del 77%.

El reparto de puntuación en los controles se puede apreciar en las figura 2

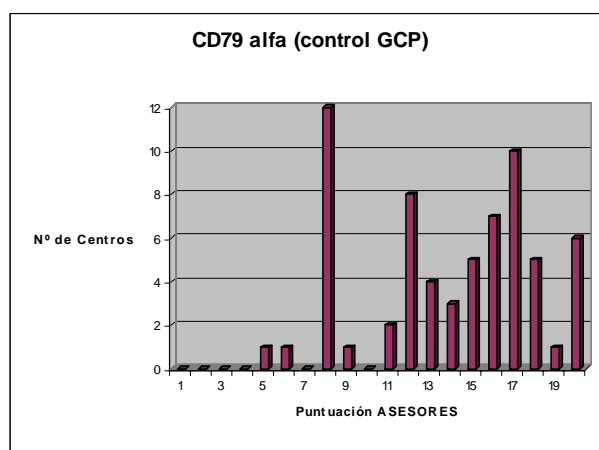


Figura nº2: Gráfica con los resultados globales para el control GCP

Con el mismo criterio que en rondas anteriores, valoraciones igual o superior a 12, se consideran dentro del rango de lo aceptable para diagnóstico, si bien se deben revisar los protocolos para estar en el rango de lo óptimo o incluso excelente.

- Valoración igual o superior a 12 se ha observado en el 74% de los controles remitidos.
- el 44% consiguieron una valoración igual o superior a 16 y la máxima valoración se concedió al 9% de los participantes con valoraciones de 20.

Uno de los problemas observados, ha sido la débil intensidad en células plasmáticas y ausencia de reactividad en células B del centro germinal de la amígdala, por lo que se aconseja revisar los protocolos que incluimos de los centros con mejores valoraciones.

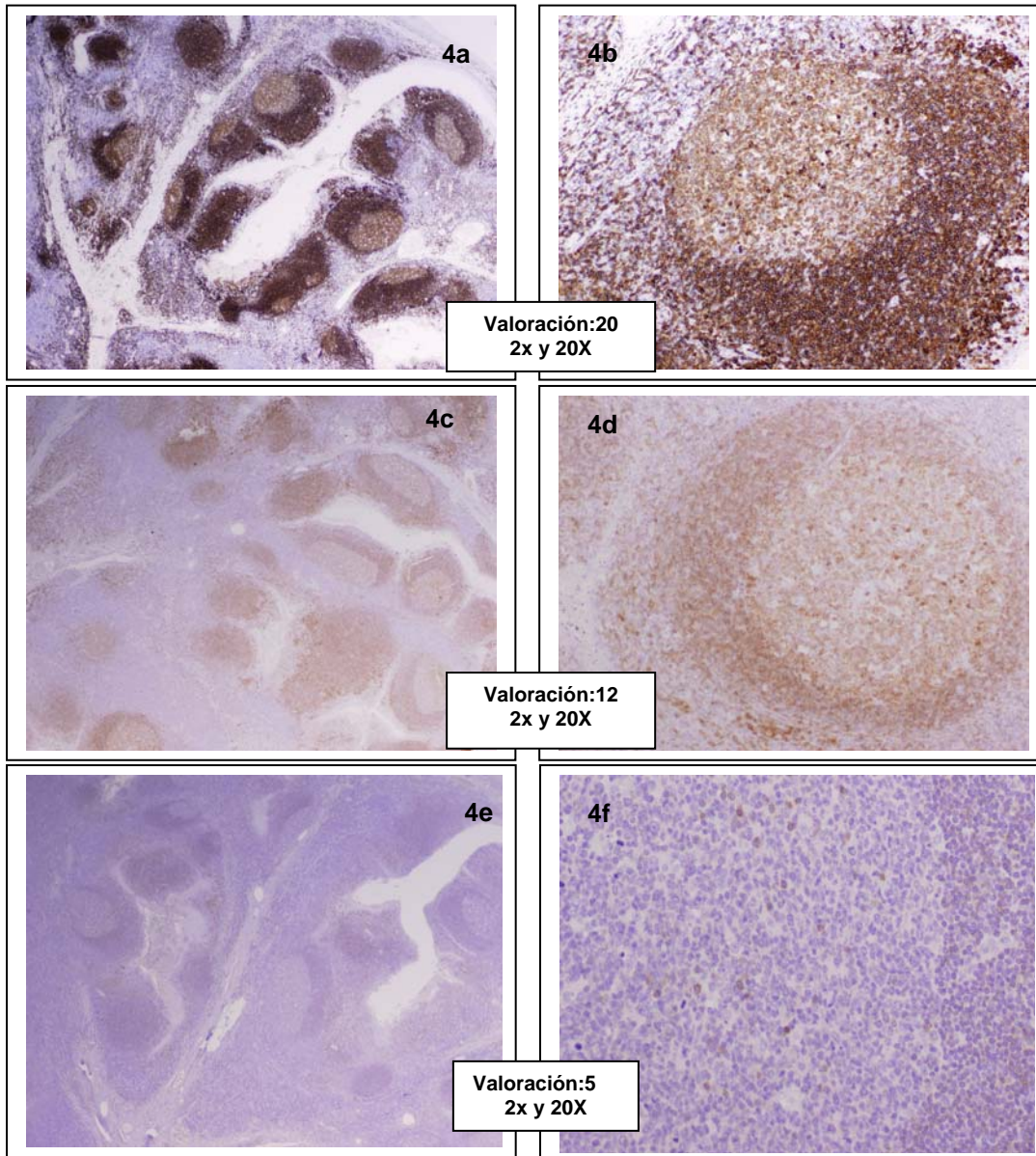


Figura 3: Imágenes correspondientes al control GCP con diferentes valoraciones:

- 4a y 4b: valoración de 20 otorgada por los evaluadores.
- 4c y 4d: valoración 12, aceptable
- 4e y 4f: valoración 5 subóptima.

2.-Análisis y Valoración del control LOCAL.

Tejidos utilizados como control: la mayoría de los centros han utilizado amígdala reactiva (el 90%), aunque también han remitido algún ganglio y adenopatías.

Los resultados de la valoración otorgada por los 4 asesores que han participado en esta ronda son los reflejados en la figura nº 4.

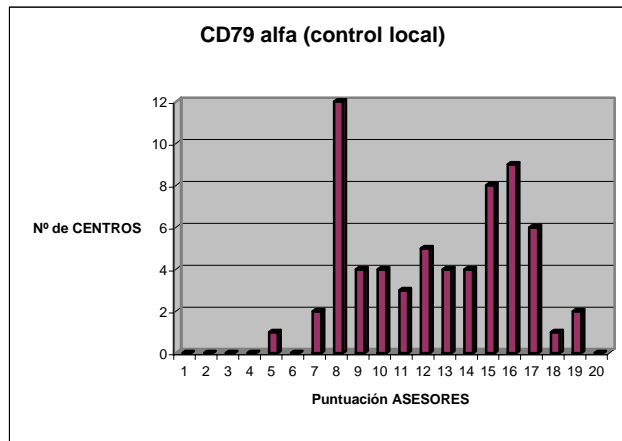


Figura 4: Gráfica con los resultados globales para el control local

La valoración en el control local ha sido en general inferior al obtenido con el control aportado por el GCP, y en síntesis se resume en:

- El 61% de los centros obtuvieron valores de 12 o superiores.
- El 28% total consiguieron valoraciones óptimas.
- Hay que destacar que no se observan valoraciones de 20, lo que indica que este marcador necesita ser revisado para mejorar la técnica en la mayoría de los centros.

3.- Material y Métodos de la 5ª Ronda de patología Linfoide

3a.-Tejidos utilizados como control:

- Amígdala:50
- Ganglio: 6
- Adenopatía:1
- Multitejido: 1

3b. -Anticuerpos Primarios utilizados:

Anti-CD79 alfa	Casa Comercial
JCB117	DAKO
SP18	Master Diagnostica
HM47/9A	Master Diagnóstica
HM47/9A	Diagnostic Biosystem
HM47/9A	Novocastra
HM47/9A	Biocare Medical
HM57	DAKO
11D10	novocastra

3c. -Recuperación antigénica:

Aparatos utilizados:

- Microondas
- Olla a presión
- Baño María
- Autoclave

Soluciones de recuperación antigénica (Tampones)

- Citrato a diferente pH (6; 6.3)
- EDTA pH9
- Tris/EDTA pH)

○

Tratamiento enzimático:

- Pepsina

3d. -Sistemas de Visualización:

- LAB de Ventana
- LSAB de DAKO
- EnVision de DAKO
- Novolink de Novocastra
- Masvision de Master Diagnostica

4.- Autoevaluación en el control GCP por parte de los Patólogos de cada centro.

La participación ha sido del 86% de patólogos y 88% de técnicos, los resultados se pueden observar en las siguientes Figuras (5 y 6)

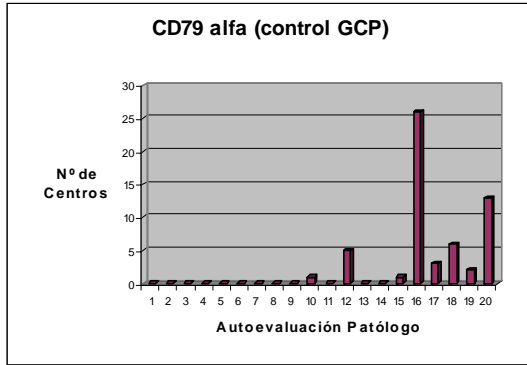


Figura 5

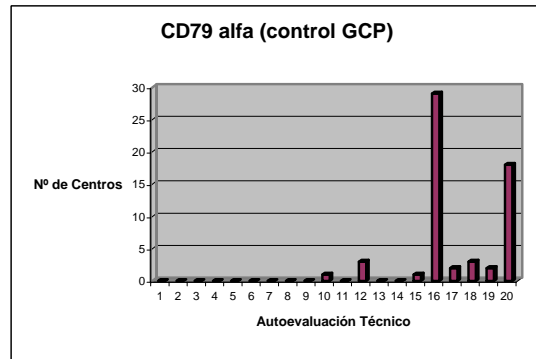


Figura 6

De las gráficas podemos deducir que la autoevaluación remitida fue la siguiente:

- Valoración igual o superior a 12, el 98% del total de participantes
- Valoración superior o igual a 16: 88% (patólogos) y 91% (técnicos) |
- Valoración de 20: el 23% (patólogos) y 30% (técnicos)

5.-Autoevaluación en el control LOCAL: en figuras 7 y 8

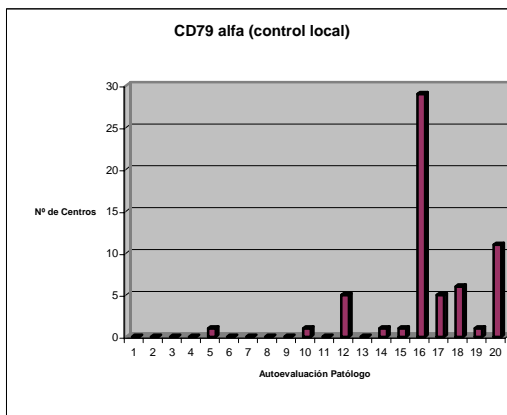


Figura 7

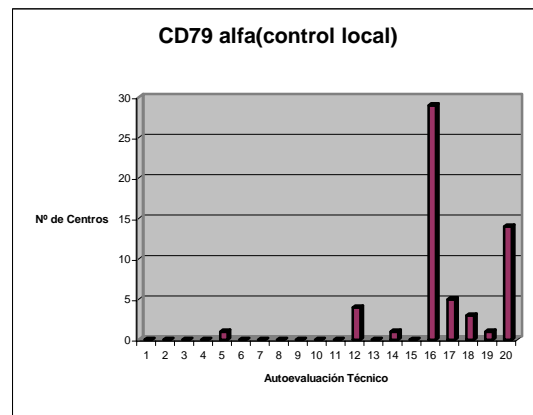


Figura 8

- Valoración igual o superior a 12, el 98% del total de participantes
- Valoración superior o igual a 16: 88%
- Valoración de 20: el 19,3% (patólogos) y 24% (técnicos)

Estos resultados son considerablemente superiores a los otorgados por los observadores externos, por lo que consideramos será de ayuda incluir imágenes de las diferentes categorías, incluyendo los criterios establecidos además de los mejores protocolos para CD79 alfa.

6.- Protocolos aportados por los centros cuya valoración ha sido considerada de excelente (puntuación de 20/20):

A)

- ❑ Método de Visualización: Dako Envision kit k5007
- ❑ Inmunoteñidor automático: TechMate 500. Dako
- ❑ Buffer y pH:
- ❑ Bloqueo: H_2O_2
- ❑ Recuperación antigénica: Target Retrieval Tris/EDTA pH:9 de Dako Microondas 20 minutos.
- ❑ Anticuerpo primario: Clon JCB 117 de DAKO, a dilución 1/10 durante 30 minutos a t^a ambiente
- ❑ Cromógeno: Dako DAB

B)

- ❑ Método de Visualización: Novolink -Novocastra
- ❑ Inmunoteñidor automático: TM-500
- ❑ Buffer y pH: Buffer: información no aportada
- ❑ Bloqueo: H_2O_2
- ❑ Recuperación antigénica: EDTA 1mM pH 8
- ❑ Anticuerpo primario: Clon JCB 117 de DAKO, a dilución 1/400 durante 25 minutos a t^a ambiente
- ❑ Cromógeno: DAB

C)

- ❑ Método de Visualización: DakoCytomation LSAB-HRP K5001
- ❑ Inmunoteñidor automático: Información no aportada
- ❑ Bloqueo: H_2O_2
- ❑ Recuperación antigénica: Olla a presión, 2 minutos en tampón Citrato pH 6
- ❑ Anticuerpo primario: Clon JCB 117 de DAKO

D)

- ❑ Sistema de Visualización: EnVision DAKO
- ❑ Sistema automatizado; Techmate 500 Dako
- ❑ Bloqueo: H_2O_2
- ❑ Recuperación antigénica: por calor en tampón Citrato pH 6,3 durante 3 minutos.
- ❑ Anticuerpo primario: JCB 117 de DAKO
- ❑ Cromógeno: DAB.

7.-Comentarios:

Los resultados a nivel global indican una demostración de CD79 alfa aceptable para el diagnóstico. Siendo aconsejable revisar los mejores protocolos para aquellos laboratorios donde no fue del todo óptima la valoración.

Los problemas mas frecuentes que se ha podido detectar han sido:

- ❑ Expresión adecuada pero de intensidad mejorable
- ❑ Débil reactividad
- ❑ Un exceso y defecto de pretratamiento antigénico
- ❑ Heterogeneidad de tinción
- ❑ Artefactos derivados de la capilaridad
- ❑ Tinción focal

Sugerencias para disminuir los problemas o artefactos detectados:

- ❑ Utilizar controles de expresión conocida. Una amígdala bien fijada puede ser un excelente control.
- ❑ Revisar los protocolos de desenmascaramiento.
- ❑ Revisar el anticuerpo utilizado y ajustar las diluciones y tiempos de incubación de los reactivos.
- ❑ Revisar las caducidades de los reactivos.
- ❑ Evitar que las preparaciones se deshidraten durante la técnica de inmunotinción.
- ❑ Revisar las preparaciones tras el proceso de inmunotinción, estableciendo un control de calidad interno

8.- Bibliografía

- Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW (Eds.) WHO Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, IARC Press 2001.
- Korkolopoulou P, Cordell J, Jones M, Kaklamanis L, Tsenga A, Gatter KC, Mason DY. The expression of the B-cell marker mb-1 (CD79a) in Hodgkin's disease. *Histopathology*. 1994 Jun;24(6):511-5.
- Kurtin PJ, Hobday KS, Ziesmer S, Caron BL. Demonstration of distinct antigenic profiles of small B-cell lymphomas by paraffin section immunohistochemistry. *Am J Clin Pathol*. 1999 Sep;112(3):319-29.
- Mason DY, Cordell JL, Brown MH, Borst J, Jones M, Pulford K, Jaffe E, Ralfkiaer E, Dallenbach F, Stein H, et al. CD79a: a novel marker for

- B-cell neoplasms in routinely processed tissue samples. *Blood*. 1995 Aug 15;86(4):1453-9.
- Pillozzi E, Pulford K, Jones M, Muller-Hermelink HK, Falini B, Ralfkiaer E, Pileri S, Pezzella F, De Wolf-Peeters C, Arber D, Stein H, Mason D, Gatter K. Co-expression of CD79a (JCB117) and CD3 by lymphoblastic lymphoma. *J Pathol*. 1998 Oct;186(2):140-3.
 - Toth B, Wehrmann M, Kaiserling E, Horny HP. Immunophenotyping of acute lymphoblastic leukaemia in routinely processed bone marrow biopsy specimens. *J Clin Pathol*. 1999 Sep;52(9):688-92.
 - Vasef MA, Alsabeh R, Medeiros LJ, Weiss LM. Immunophenotype of Reed-Sternberg and Hodgkin's cells in sequential biopsy specimens of Hodgkin's disease: a paraffin-section immunohistochemical study using the heat-induced epitope retrieval method. *Am J Clin Pathol*. 1997 Jul;108(1):54-9.
 - Yao X, Teruya-Feldstein J, Raffeld M, Sorbara L, Jaffe ES. Peripheral T-cell lymphoma with aberrant expression of CD79a and CD20: a diagnostic pitfall. *Mod Pathol*. 2001 Feb;14(2):105-10.