



SEAP

Calle Ancora, 3, 2º B  
28045 MADRID  
Tfno. y Fax 91 539 86 28  
Mail: seap@seap.es



GARANTÍA DE CALIDAD

Programa de  
Garantía de Calidad  
en Patología

## Módulo de PATOLOGÍA QUIRÚRGICA GENERAL

### Ronda nº 6

**Antígeno probado:** HMB45

**Tejido probado:** SEAP-GCP - Ganglio Linfático con Metástasis de Melanoma

LOCAL - Mayoritariamente Melanoma primario o metastático

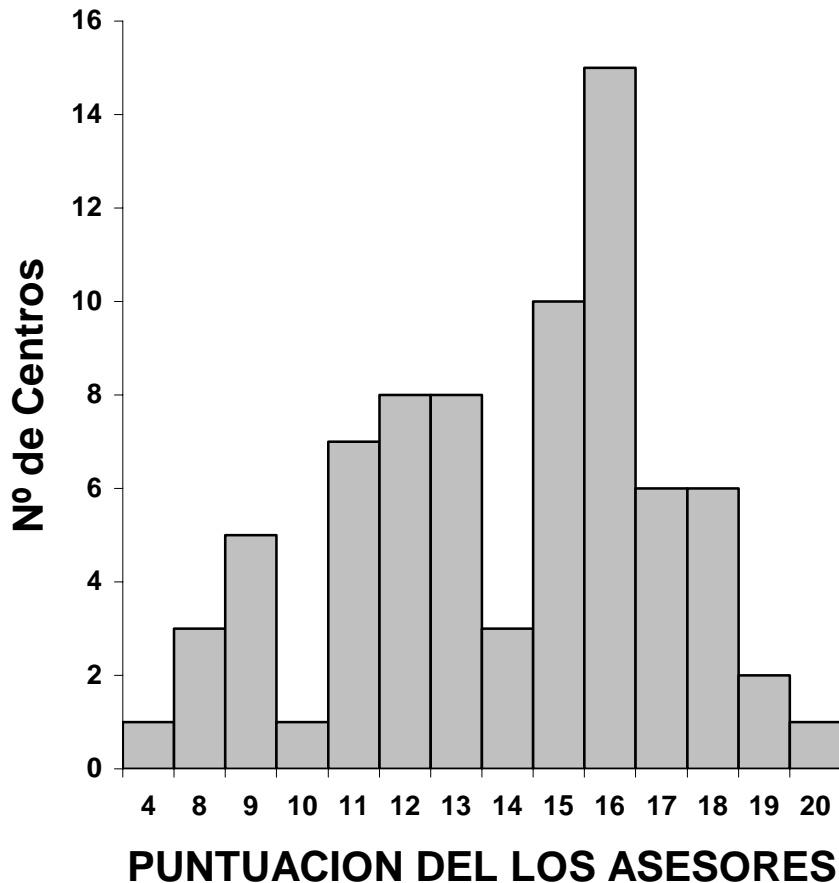
**Instrucciones:** Los participantes fueron invitados a teñir con HMB45 la preparación remitida por el programa (ganglio linfático con metástasis de melanoma fijada en formol al 10%, pH 7 durante 24 horas) y su propia preparación control, devolviendo ambas preparaciones para su evaluación.

**Número de laboratorios participantes:**

- Remitidos: 87 GCP y 87 Local
- Contestados: 75 , 86,2 % (GCP) y 76, 87,35 % (Control Local)

**Estudio de los controles de cada centro:** Los resultados de la evaluación fueron los siguientes:

## HMB45 6ª Ronda Control Local



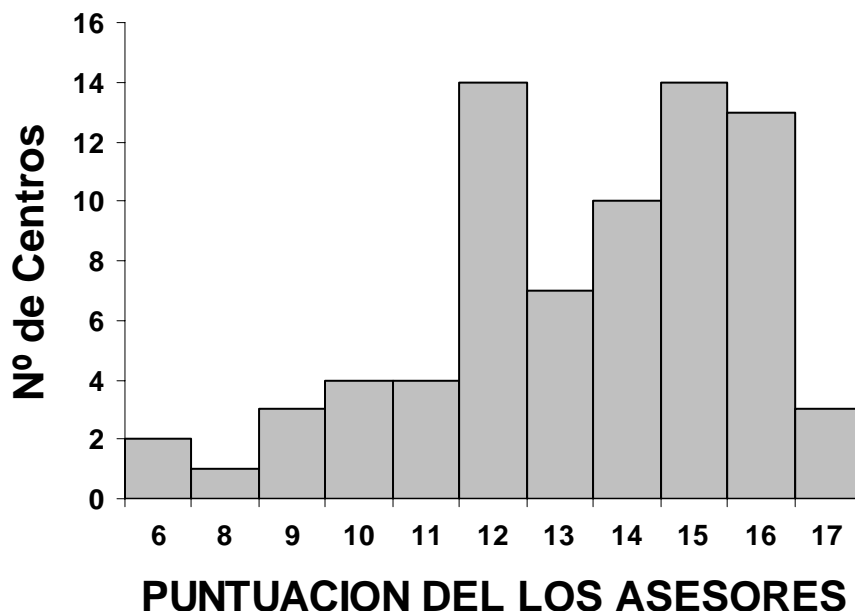
Considerando que una puntuación superior a 12 se considera aceptable, el 67,11 % de las preparaciones remitidas se consideraron como aceptables, con un 46,05 % con una puntuación igual o superior a 16/20, consideradas como óptimas o cercanas. Estos resultados son muy buenos y positivos. La mayoría de los centros participantes ha obtenido un nivel superior al mínimo aceptado para considerar que la técnica puede aplicarse con fines diagnósticos de manera rutinaria, especialmente teniendo en cuenta que su expresión sirve para el diagnóstico y estadiaje de los melanomas.

Los principales problemas detectados han sido una alta frecuencia de tinción inadecuada o inespecífica de algunas células, lo que puede llevar a errores en el diagnóstico debido a mala interpretación de la positividad en algunas células, con consiguiente incremento del Índice de Breslow o falsos positivos en ganglios linfáticos, centinela o no. Al tratarse de un antígeno altamente sensible, la técnica inmunohistoquímica debe estar ajustada al

máximo para evitar tinciones excesivas, tinción de fondo o tinciones irregulares, lo que podría inducir a interpretaciones erróneas de los resultados debido a sobretinción. En los casos con puntuaciones inferiores a 12/20, además, destacaban los artefactos técnicos generales (hidratación, contraste inadecuado por exceso o defecto, defectos en la manipulación con rotura del corte, etc), inadecuada selección del tejidos control, o tinciones débiles e irregulares que pueden inducir a falsos negativos.

Estudio de los controles remitidos por el programa GCP:

## HMB45 6ª Ronda Control GCP



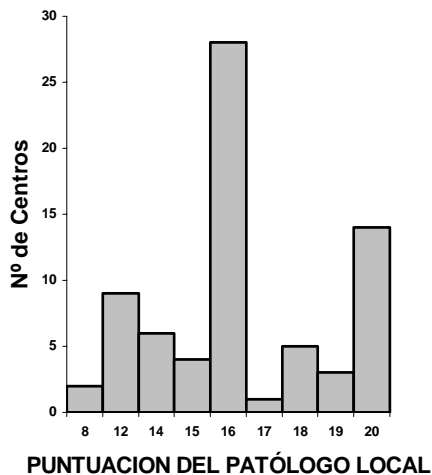
Considerando que una puntuación superior a 12 se considera aceptable, el 62,67 % de las preparaciones remitidas se consideraron aceptables. Un 21,33 % obtuvieron una puntuación igual o superior a 16/20, consideradas como óptimas o cercanas. Los principales problemas detectados han sido por una parte una alta frecuencia de una discreta tinción de fondo o la presencia de degradación del tejido por exceso de pretratamiento, ambos problemas fácilmente solventables con ajustes en la concentración y/o tiempos de incubación del anticuerpo primario, así como menor tiempo de pretratamiento con calor. En los casos de puntuación inferior a 16/20, los principales problemas eran una tinción prácticamente inexistente o muy débil en intensidad o en número de células, inferior al esperado, lo que puede inducir a diagnosticar falsos negativos, así como tinciones irregulares

o inespecíficas, que pueden inducir a errores diagnósticos. En los controles ofrecidos (GCP), prácticamente no se observaron problemas de artefactos técnicos generales (hidratación, contraste inadecuado por exceso o defecto, defectos en la manipulación con rotura del corte, etc). El contraste con los resultados de los controles locales, pone, una vez más, de manifiesto la influencia del procesamiento previo del tejido control utilizado, que es el factor diferente en ambos casos y probablemente responsable de las discrepancias.

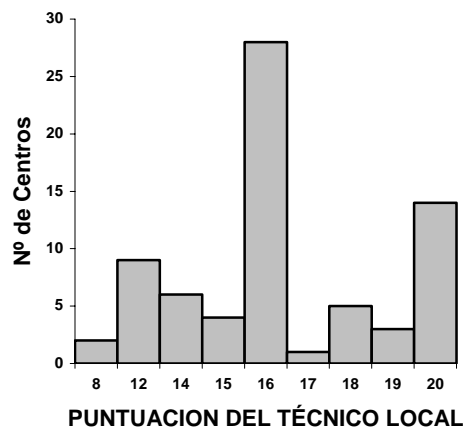
**Resultados de la autoevaluación:** Como se indica en las instrucciones remitidas, la autoevaluación es una parte importante del programa de Garantía de Calidad. El 88,16 % de los técnicos y el 94,74 % de los patólogos participantes remitieron su valoración de los controles locales y el 88 % y el 96 % respectivamente del control del GCP. Los resultados obtenidos son los siguientes:

### Control Local

HMB45 6ª Ronda Control Local



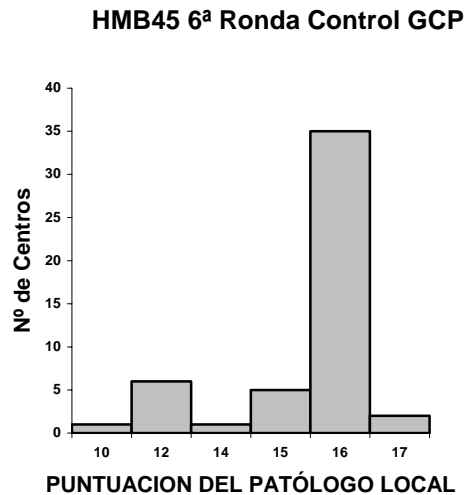
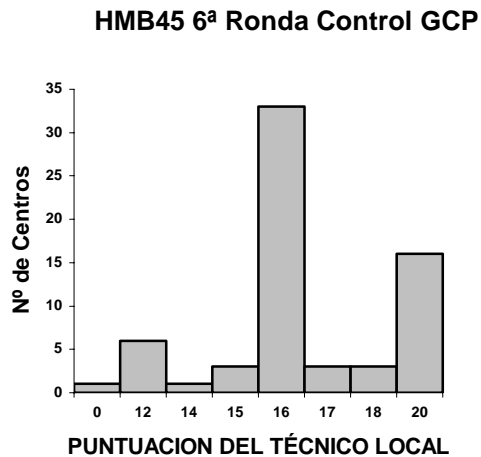
HMB45 6ª Ronda Control Local



Como se puede observar en los gráficos, la percepción local sobre los resultados de la técnica es superior a la valoración de los observadores externos. Para los técnicos participantes el 77,61 % de los casos tenían una puntuación igual o superior a 16/20. Este porcentaje era del 70,83 % en el caso de los patólogos. En ambos casos esas cifras son casi duplican las de los observadores externos. Parece evidente la tendencia a sobrevalorar los resultados de la técnica, pero esa tendencia generalizada se corrige al observar detalladamente y de manera objetiva la tinción y puntuar detalles

como la presencia de fondo, degradación del tejido por pretratamiento excesivo, uniformidad de tinción en el conjunto de la preparación o tinción inespecífica no deseada.

## Control del GCP



Los resultados son similares al control local, con un 83,33% de preparaciones con una puntuación igual o superior a 16/20 para los técnicos, y un 81,94 % para los patólogos, Sigue observándose una discrepancia con las valoraciones de los asesores externos (21'33 % frente a 84,48%), que cuadruplica el valor. Estas diferencias pueden deberse a la uniformidad de fijación y de condiciones técnicas de los controles GCP

**Inmunotinción óptima:** Se consideró una inmunotinción óptima la que mostraba teñidos el número de células esperado (ausencia o tinción debil de histiocitos o de fondo) 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). En relación al contraste, y especialmente en aquellos melanomas con gran cantidad de pigmento melánico, se recomienda utilizar contratinción con giemsa en lugar de con hematoxilina. De ésta manera se distinguen las células tumorales, que adquieren un pigmento marrón del cromógeno DAB de la inmunohistoquímica, que contrasta intensamente con el color verdoso de los histiocitos que han fagocitado melanina. Una buena técnica, utilizada por varios laboratorios es el uso de Fosfatasa Alcalina o Fast Red que dan un pigmento rosado o rojizo

en lugar de marrón. El problema del uso de Fosfatasa Alcalina como cromógeno en lugar de DAB, es que puede difundir y dar tinción de fondo o inespecífica de algunas células. En casos en que la morfología de las células neoplásicas del melanoma sea clara no presenta problemas, pero en aquellos casos en que el melanoma simula otro tipo de celular, puede plantear problemas.

Los criterios generales de puntuación empleados son los reflejados en las hojas de resultados individuales remitidas.

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

Método: Dako Tech Mate / Envision, Streptavidina marcada

Bloqueo: Agua oxigenada 3%

Automatización: Biotech Tech Mate 500 / Dako Autostainer

Digestión enzimática: Algunos centros utilizan digestión enzimática con Pepsina A o Proteinasa K además de recuperación antigénica con calor. El resto no realizan recuperación enzimática.

Recuperación antigénica con calor: La mayoría de centros usan olla a presión con tampón citrato pH 6 durante 2-3 minutos a máxima presión.

Tampón y pH: TBS pH 7,6; DAKO pH 7,6; citrato pH6

Anticuerpo primario: Dako M0634 Clon HMB45, a diluciones entre 1/60 y 1/100, con incubación de entre 25 y 30 minutos a temperatura ambiente.

Cromógeno: Dako DAB K5007 a dilución 1:50; K5001 o K4065, durante 5-10 minutos a temperatura ambiente. Fosfatasa Alcalina Dako K5005 al 1% durante 7 minutos a temperatura ambiente. Fast Red BioGenex durante 5 minutos.

**Comentarios**: Con este antígeno no se observa una gran discrepancia en los resultados según se analicen en los controles locales o en el control del GCP. Eliminando el factor "tejido", y atendiendo solo a los resultados del GCP la mayoría de los resultados son adecuados para su utilización rutinaria. Sin embargo hay un porcentaje apreciable con deficiencias técnicas, que podrían inducir a errores de interpretación en casos de tinciones excesivas con fondo o tinciones irregulares o en casos con tinciones insuficientes. En general las tinciones de la mayoría de los centros son óptimas y aplicables al diagnóstico de lesiones neoplásicas u otras patologías de forma rutinaria.

En alguna ocasión, el control local seleccionado no fue el adecuado para el antígeno a probar, por no presentar positividad intrínseca (nevus melanocítico o lesiones lentiginosas), o se seleccionaron controles correspondientes a arrays tisulares, que en ocasiones resultaron con

patrones de tinción muy irregulares, probablemente influenciados por las diferencias en las condiciones de fijación y tratamiento previo de los distintos tejidos representados.

Se recomienda emplear como control tejido fijado en condiciones conocidas y controladas. Asimismo, en casos con gran cantidad de pigmento melánico que pueda interferir en la interpretación de la positividad de la tinción inmunohistoquímica, se recomienda utilizar como cromógeno la Fosfatasa Alcalina o el Fast Red, en caso de disponer del mismo. En caso contrario, es muy recomendable utilizar Giemsa, en lugar de hematoxilina como contraste (contratinción), ya que permite discernir con claridad las células positivas teñidas de marrón con DAB de los melanófagos, que adquieren un color verdoso con el Giemsa.