



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 2

**Antígeno probado:** CD10

**Tejido probado:** Amígdala

**Instrucciones:** Los participantes fueron invitados a teñir con CD10 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.

CD10 o Common acute lymphocytic leukemia antigen (CALLA) es un marcador de superficie celular importante para el diagnóstico de la Leucemia Linfocítica Aguda. Esta presente en las células leucémicas de fenotipo pre-B, que representan al 85% de los casos de LLA.

Sin embargo, esta glicoproteína se expresa también en una gran variedad de tejidos normales, con especial abundancia en riñón, donde esta presente en el borde en cepillo de los túbulos proximales y en el epitelio glomerular.

En los tejidos linfoides no neoplásicos, CD10 se expresa intensamente en las células de los centros foliculares (folículos secundarios) y en los endotelios vasculares, con un patrón de tinción de membrana con variable difusión a citoplasma.

### Número de laboratorios participantes:

- Remitidos: 75
- Contestados: 49, (65,3 %) para el GCP y 48 (64%) para el Control Local.

### Anticuerpos y Métodos evaluados:

#### Anticuerpos Primarios, proveedores y diluciones:

Proveedor	Código	Clon	Dilución
Biocare Medical	CM129C	56C6	1/20-1/50
Biocare Medical	PM129AA	56C6	Prediluido
Novocastra	NCL-CD10-270	56C6	1/10-1/15-1/20- 1/25-1/30-1/50- 1/80-1/100- 1/200
Novocastra	RTU-CD10-270	56C6	Prediluido
Master Diagnóstica	002022QD	56C6	Prediluido
Menarini	PM 12911	56C6	Prediluido
Zymed	08-1287	56C6	
DAKO	M0727	552/36	1/50

#### Recuperación antigénica:

- Microondas
- Olla a presión
- Baño María
- Autoclave
- PT Module Lab Vision
- Raypa Thermostatic Bath
- Dectocking Chamber de Biacare Medical
- Digestión enzimática con Proteinasa K

#### Detección:

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

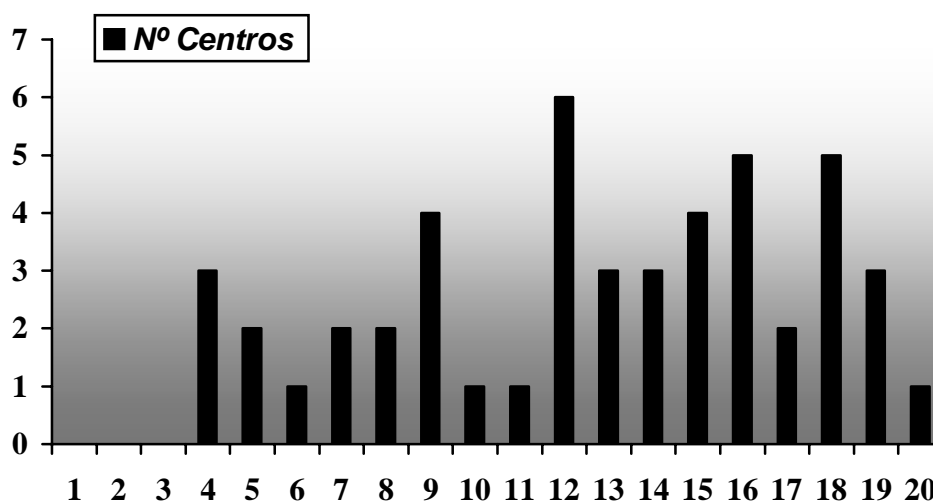
#### Automatización:

- Dako Techmate 500
- Lab Vision Autostainer
- Biogenex 6000
- Ventana/Atom Benchmark XT

### Estudio de los controles de cada centro:

Los controles locales correspondían a tejidos linfoides (amígdalas, ganglios linfáticos no neoplásicos, linfomas) y riñón normal.

Los resultados de la evaluación fueron los siguientes:



PUNTUACION DE LOS ASESORES

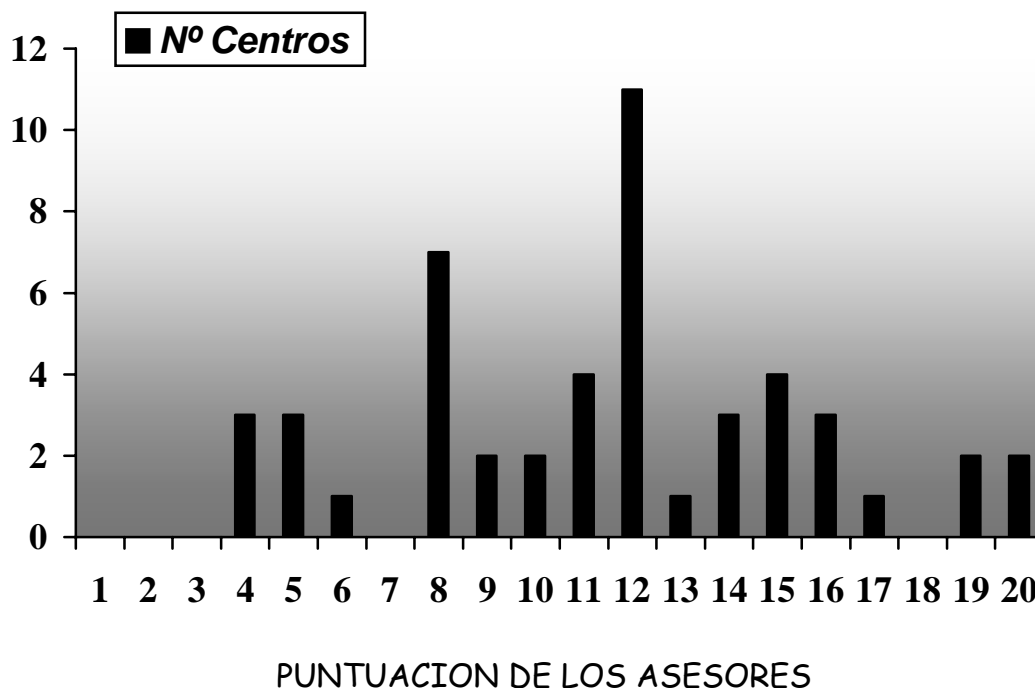
Considerando que una puntuación igual o superior a 12 se considera aceptable, el 66.6 % (32) de las preparaciones remitidas se consideraron como aceptables, con un 33,3% (16) con una puntuación igual o superior a 16/20, consideradas como óptimas o cercanas.

Un 33,3% de los 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. Un problema menos frecuente, han sido los artefactos técnicos generales y los debidos a un exceso de pretratamiento.

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

Se remitió un corte de amígdala para su inmunotinción para CD10. El resultado de la evaluación fue:

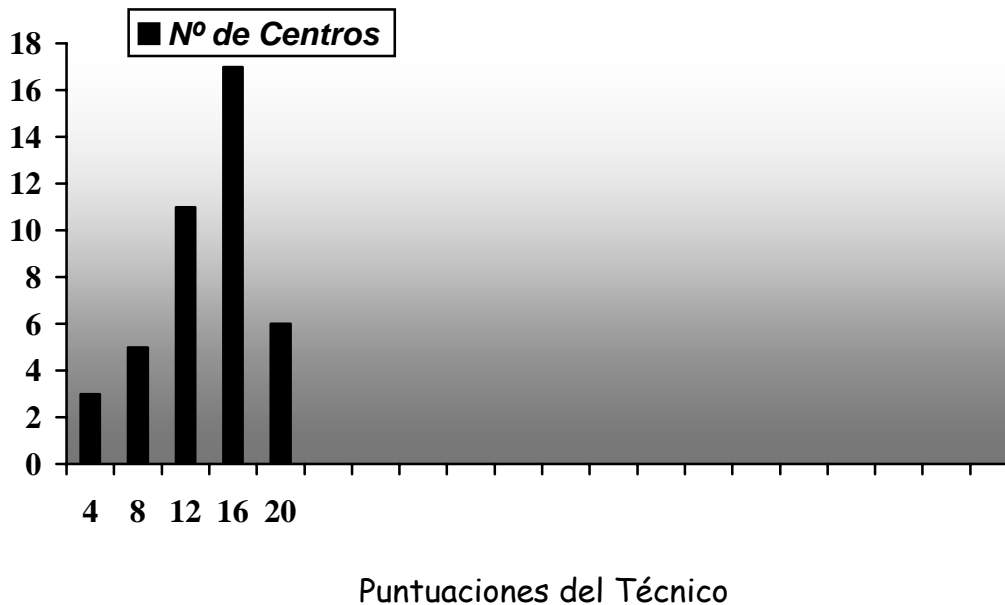
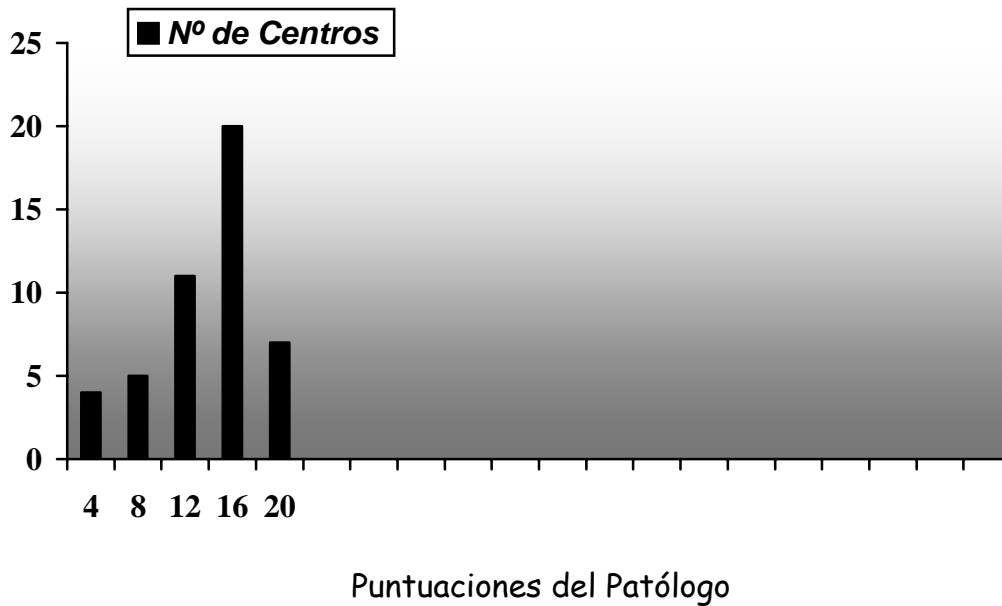


Si consideramos aceptable una puntuación igual o superior a 12, el 55,1 % (27) de las preparaciones remitidas alcanzaron este nivel. Un 16,32 % (8) obtuvieron una puntuación igual o superior a 16/20, considerada como óptima o cercana. Un 44,89 % de los centros no alcanzaron la calidad suficiente para considerar que la técnica puede aplicarse de manera rutinaria.

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

**Resultados de la autoevaluación:** El 89.8 % de los técnicos y el 100 % 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:

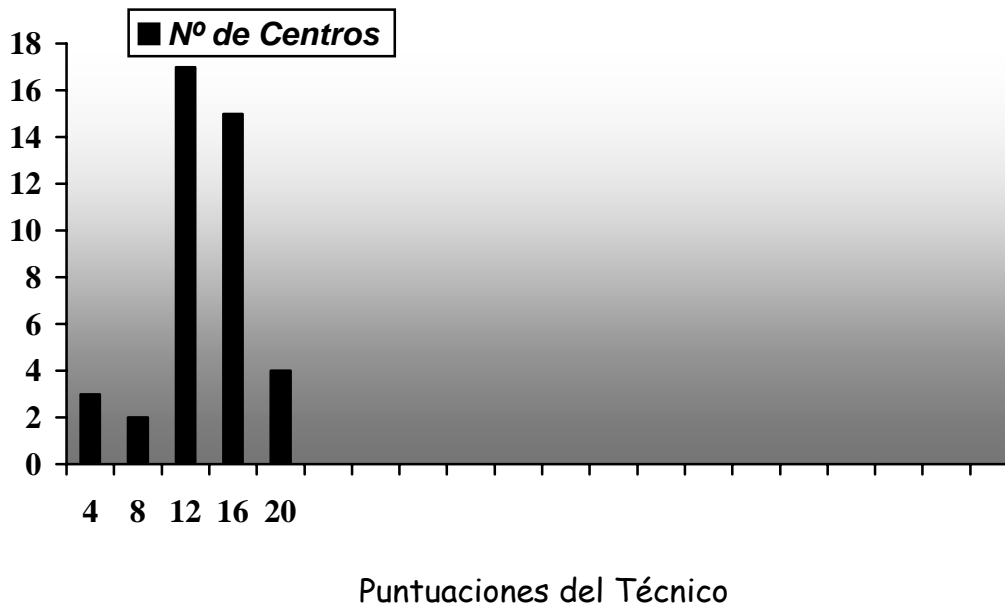
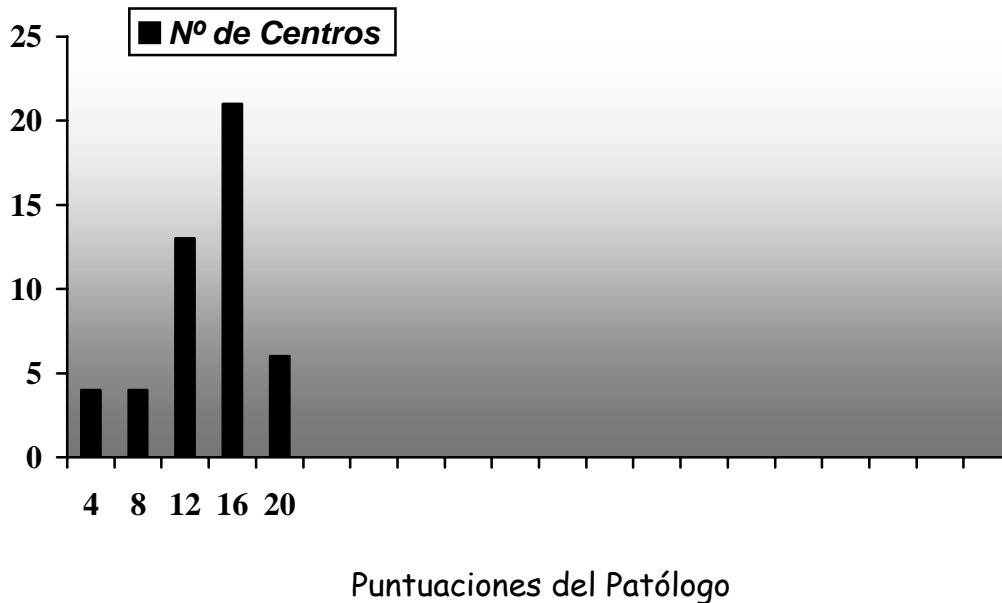
### Control Local



Como se puede observar en los gráficos y reconocemos en la mayoría de las técnicas analizadas, la percepción local sobre los resultados continúa siendo muy superior a la valoración de los observadores externos. Para los patólogos participantes, el 57.44 % de los casos obtenían una puntuación

igual o superior a 16/20. Este porcentaje era del 54.76 % en el caso de los técnicos. En ambos casos esas cifras eran superiores a las de los observadores externos (34%).

### Control del GCP



Los resultados son similares al control local, con un 47% de preparaciones con una puntuación igual o superior a 16/20 para los técnicos, y un 56.25 % para los patólogos, Sigue observándose una discrepancia con las valoraciones de los asesores externos (que eran del 16.66%), mayor que en el caso de los controles locales.

### **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).

En el caso de los tejidos linfoides, se consideró óptimo el marcaje de las células centrofoliculares y de los endotelios vasculares. En el riñón se valoró la tinción de los túbulos proximales y del epitelio glomerular. En todos los tejidos se puntuó la ausencia de fondo o tinción inespecífica y de artefactos técnicos.

### **Mejores métodos:**

Obtuvieron una puntuación de 20/20 en las preparaciones del GCP:

#### **Método 1:**

Bloqueo: Agua oxigenada

Automatización: Dako Techmate 500

Digestión enzimática: No

Recuperación antigénica con calor: Autoclave a 120 °C 1 atm durante 3 minutos.

Tampón y pH: Citrato pH 7.3

Anticuerpo primario: Novocastra NCL-CD10-270. Dilución 1/10 durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Método de detección: Dako Envision K5007

Cromógeno: Dako DAB K5001, 5 minutos a temperatura ambiente

#### **Método 2:**

Bloqueo: Agua oxigenada

Automatización: Dako Autostainer Plus

Digestión enzimática: No.

Recuperación antigénica con calor: Baño maría a 98 °C durante 40 minutos y 20 minutos de reposo a T<sup>a</sup> ambiente.

Tampón y pH: Citrato pH 9

Anticuerpo primario: Novocastra NCL-CD10-270 RTU durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Método de detección: Dako Envision.

Cromógeno: Dako DAB, 10 minutos a temperatura ambiente

Obtuvo una puntuación de 20/20 en las preparaciones de controles locales:

**Método 3:**

Bloqueo: Agua oxigenada

Automatización: Dako Techmate 500

Digestión enzimática: Proteinasa K Dako S2019 Dil 1/40 10 min. T<sup>a</sup> amb.

Recuperación antigénica con calor: Olla a presión 2 minutos.

Tampón y pH: Citrato pH 6.5

Anticuerpo primario: Novocastra NCL-CD10-270. Dilución 1/10 durante 40 minutos a temperatura ambiente.

Método de detección: Dako Chemmate Detection kit K5001

Cromógeno: Dako DAB K5001, 7'5 minutos a temperatura ambiente

**Comentarios:**

Observamos resultados muy diversos con el anticuerpo más utilizado, el monoclonal Clon 56C6. Este anticuerpo muestra buena sensibilidad con métodos de pretratamiento diversos y tampones a diferentes pHs. Es de señalar que las mejores detecciones se han logrado con tratamientos intensivos de los tejidos, sea con autoclave, con digestión con proteinasa K asociada a tratamiento térmico con olla a presión, o con calentamiento en baño maría. Los protocolos que emplean métodos de desenmascaramiento menos agresivos suelen proporcionar menor tinción y una importante disminución de la proporción de células inmunorreactivas.

En general, se observan sólo leves discrepancias en los resultados según se analicen los controles locales o el control del GCP, por lo que no se observan importantes deficiencias en fijación y procesamiento.

Si atendemos únicamente a los resultados del GCP, casi de un 43% de los centros no alcanza la calidad suficiente para considerar que la técnica es aceptable para la rutina. Sin embargo, la mayoría han utilizado el mismo anticuerpo monoclonal, Clon 56C6, proporcionado por varios proveedores, que ha demostrado muy buenos resultados en algunos laboratorios.

La gran variabilidad en sensibilidad de detección y en intensidad de la señal de unos centros a otros demuestra la necesidad de mejorar las condiciones de recuperación antigénica, las diluciones del anticuerpo y los métodos de detección empleados.