



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 1**

**Antígeno probado:** CD15

**Tejido probado:** Ganglio linfático: Linfoma de Hodgkin clásico, Esclerosis Nodular tipo I.

**Instrucciones:** Los participantes fueron invitados a teñir con CD15 la preparación remitida por el programa (ganglio linfático fijado 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:** 78
- **Contestados:** 59 75.6% (GCP) y 59, 75.6 % (Control Local)

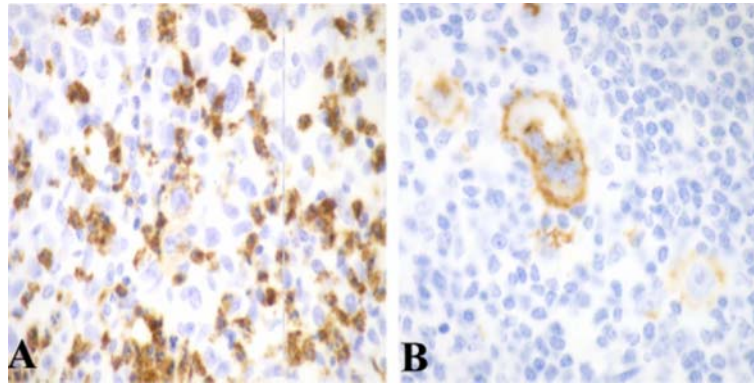
Los criterios consensuados usados en la evaluación para considerar la tinción CD15 como óptima fueron los siguientes:

Tinción intensa y bien definida predominantemente en la membrana así como también en forma de punto paranuclear en la zona del Golgi en las células de Hodgkin y Reed-Sternberg cells en el control remitido de linfoma de Hodgkin (Figura 1B). Siguiendo este criterio se evaluó la tinción de 1 a 5 como sigue:

- 1: No tinción demostrable ni en células de Hodgkin o Reed-Sternberg ni en leucocitos polimorfonucleares.
2. Tinción en leucocitos polimorfonucleares con ausencia de tinción en las células de Hodgkin o Reed-Sternberg.
3. a. Tinción en leucocitos polimorfonucleares así como en la mayoría pero no la totalidad de las células de Hodgkin o Reed-Sternberg a cualquier aumento.  
b. Tinción en leucocitos polimorfonucleares así como en las células de Hodgkin o Reed-Sternberg con patrón de membrana y Golgi solo observable a 40X.

4. Tinción en leucocitos polimorfonucleares así como en la totalidad de las células de Hodgkin o Reed-Sternberg con patrón de membrana y Golgi claramente observable a 20X.

5. Tinción en leucocitos polimorfonucleares así como en la totalidad de las células de Hodgkin o Reed-Sternberg con patrón de membrana y Golgi claramente observable a 5X.



**Figura 1:** **A** Linfoma de Hodgkin Clásico control CGP. Nótese la intensa positividad de los polimorfonucleares acompañantes y la positividad débil y focal para CD15 en las células atípicas que en su mayoría son negativas para este antígeno en este laboratorio. **B:** Caso representativo del patrón de tinción mejor evaluado en esta ronda. La positividad de membrana es intensa pero la de Golgi es débil. Nótese además la variabilidad en los niveles de expresión de las células atípicas.

### **Características, utilidad y variabilidad de la expresión**

CD15 representa un grupo de glicoproteínas y glicolípidos de membrana que tienen en común un grupo pentasacárido terminal denominado antígeno de Lewisx (Lex). La composición de proteínas y lípidos es diferente en cada tipo celular por lo que existe una marcada variabilidad en la **unión a los anticuerpos en los diferentes tipos celulares**.

CD15 es un antígeno de diferenciación mielomonocítica que se expresa en células mieloides maduras (polimorfonucleares, eosinófilos, células cebadas), macrófagos y células de Langerhans. CD15 se expresa también en epitelios secretorios como el mamario, los túbulos colectores renales, pulmón y tracto gastrointestinal.

Además la positividad para CD15 es un hallazgo característico y casi constante en las formas de linfoma de Hodgkin con fenotipo clásico. También puede expresarse en 10-15% de linfomas T-periféricos, leucemias mieloides agudas y crónicas.

Una buena técnica para la detección de CD15 es fundamental y no sólo en el programa de patología linfóide ya que entre otras la expresión de CD15 en adenocarcinomas de pulmón nos ayuda a distinguir estos tumores de los mesoteliomas que son característicamente negativos. Así pues, el protocolo óptimo para CD15 es aquel que permita **reconocer la expresión del antígeno de forma robusta, reproducible e independiente del tipo celular examinado**.

Esta especial complejidad para este antígeno obligó al panel de asesores del módulo de patología linfóide a considerar únicamente como buen control local de la técnica casos de linfoma de Hodgkin Clásico o en su defecto tumores epiteliales con niveles más

bajos de expresión de CD15 con el fin de asegurar el máximo de sensibilidad en la detección. La mayor parte de los centros escogieron casos de linfoma de Hodgkin como control. El propio panel de asesores envió a los centros secciones de linfoma de Hodgkin clásico como control externo. Pocos centros escogieron la positividad de los polimorfonucleares de una amígdala reactiva como control de la expresión. Como queda recogida en la evaluación del control externo, algunos laboratorios no alcanzaron a obtener ninguna expresión de CD15 en las células de Hodgkin si bien detectaban la positividad de los polimorfonucleares (Figura 1A).

### **Anticuerpos y Métodos evaluados:**

#### **Anticuerpos Primarios:**

1. DAKO clon C3D1 25 laboratorios (1 laboratorio lo usó en combinación con el clon MCS1 de Vitro)	42.4%
2. DAKO clon C3SW en 1 laboratorio	1.7 %
3. Master Diagnostica, clon MCS-1 en 11 laboratorios	18.6%
4. Master Diagnostica, otros clones 2 laboratorios	3.4%
5. Novocastra, clon BY87 en 6 laboratorios	10 %
6. Biocare, clon DT07+BC97 en 3 laboratorios	5 %
7. Vitro clon MCS1 (sin combinar) en 2 laboratorio	3.4 %
8. Ventana Medical Systems, clon BY87 en 1 laboratorio	1.7 %
9. Ventana Medical Systems, clon MMA en 1 laboratorio	1.7 %
10. Becton Dickinson 6, clon LeuM1 en 3 laboratorios y clon MMA en tres laboratorios.	10 %
11. Anticuerpo monoclonal propio en CNIO	1.7%

En 11 laboratorios (18.6%) se usaron viales pre-diluidos de anticuerpo, el 42% 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:**

##### *1. Olla a presión*

41 laboratorios (70%): 22 con buffer de citrato (pH entre 6,1 y 7), 5 con EDTA (pH entre 8-9) 4 con soluciones Target retrieval de DAKO (pH 9,9 y 7,6), 1 con TBS-Tween 20% 1 con tris. Los tiempos de recuperación variaron entre 150 segundos y 8 minutos.

##### *2. Autoclave*

3 laboratorios (5%) utilizaron autoclave para el desmascaramiento antigénico, 2 usaron buffer de citrato tamponado a pH6,1 con tiempos entre 2 y 5 minutos y 1 EDTA.

##### *3. CC4 Benchmark XT*

2 laboratorios (3.4%) utilizaron la recuperación con el sistema automatizado y cerrado de Ventana Medical Systems en la plataforma BenchMark XT.

##### *4. Digestión enzimática*

2 laboratorios (3.4%) utilizaron digestión enzimática a 37° C: uno con Pepsina y otra con Proteasa 1 de Ventana Medical System.

### 5. *Microondas*

1 laboratorio (1.7 %) utilizó recuperación con microondas, en buffer de citrato por 20 minutos.

### 6. *Baño*

5 laboratorios (8.4%) usaron baño caliente con EDTA pH 9

### **Detección:**

#### *Anticuerpos Secundarios*

- |                      |            |
|----------------------|------------|
| 1. Dako Envision:    | 25 (42.4%) |
| 2. Dako LSAB /LSAB+: | 16 (27.1%) |
| 3. Kit Ventana       | 3 (5%)     |
| 4. Novolink          | 5 (8.5%)   |
| 5. Masvision         | 10 (16.9%) |

#### *Automatización*

Solo 11 laboratorios (18.6%) usaron protocolos totalmente manuales. El resto usó alguno de las siguientes plataformas automáticas o semi-automáticas:

- |                              |            |
|------------------------------|------------|
| 1. Dako Techmate 500/Horizon | 11 (18.6%) |
| 2. Dako Autostainer          | 24 (40.7%) |
| 3. Lab Vision Autostainer    | 5 (8.5%)   |
| 4. Biogenex 6000             | 3 (5%)     |
| 5. Ventana Benchmark XT      | 3 (5%)     |
| 6. Biomega                   | 1 (1.7%)   |
| 7. Menarini                  | 1 (1.7%)   |

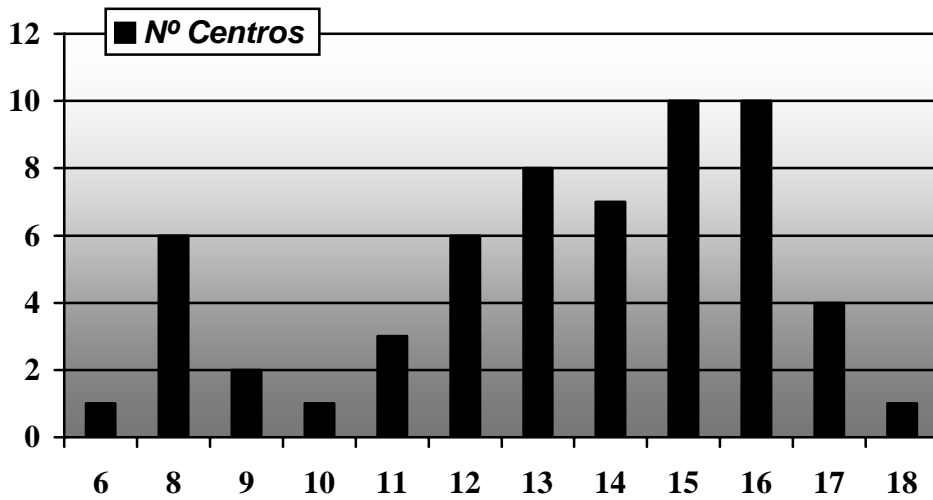
### **Estudio de los controles en el programa GCP:**

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

1. ausencia de control interno
2. control interno positivo pero células tumorales negativas
3. TINCION APTA. Positividad débil en cualquier forma detectable sólo a X40.
4. Positividad citoplasmática detecta sólo a X20
5. Positividad de membrana, citoplasma y refuerzo de la zona del aparato de Golgi, de forma intensa y evidente a X5.

Los resultados de la evaluación fueron los siguientes:

*Evaluación de los asesores*



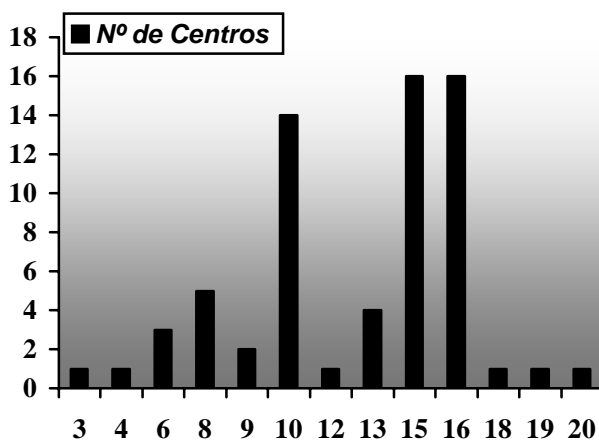
Puntuación de los Asesores

Considerando que una puntuación igual o superior a 12 se considera aceptable, el 78 % (46) de las estudios evaluados se consideraron como aceptables, con un 25.4 % (15) con una puntuación igual o superior a 16/20, consideradas como óptimas o cercanas. Ningún protocolo se evaluó con 20 puntos.

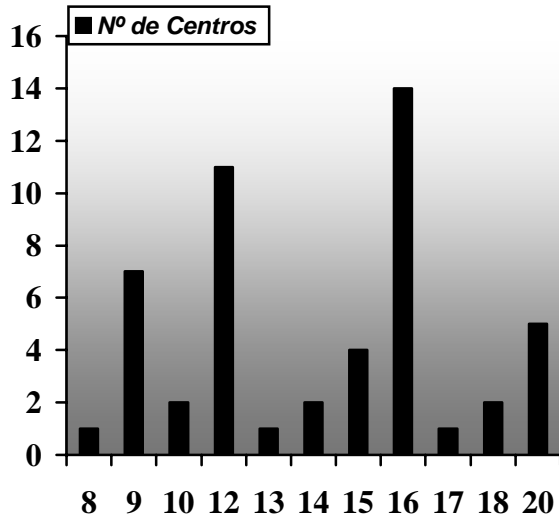
Un 24% de los centros participantes no alcanza el nivel de sensibilidad suficiente para considerar que la técnica puede aplicarse de manera rutinaria y nunca hubieran diagnosticado un linfoma de Hodgkin con fenotipo clásico.

Los principales problemas detectados han sido una alta frecuencia de tinción negativa del caso enviado o de tinción ligera, insuficiente o irregular.

*Resultados de la Autoevaluación*



Puntuaciones del Patólogo

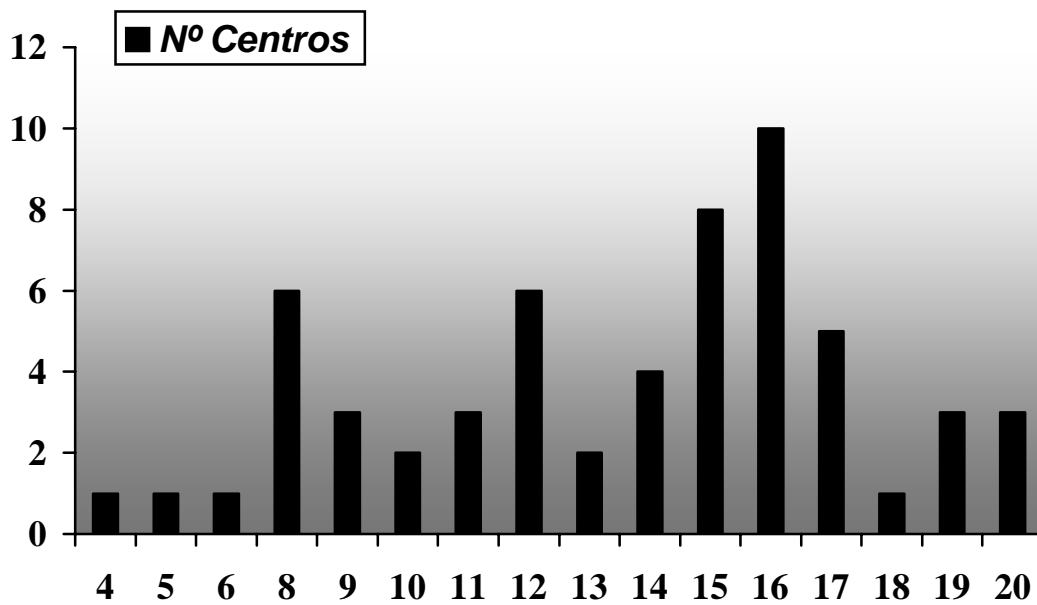


#### Puntuaciones del Técnico

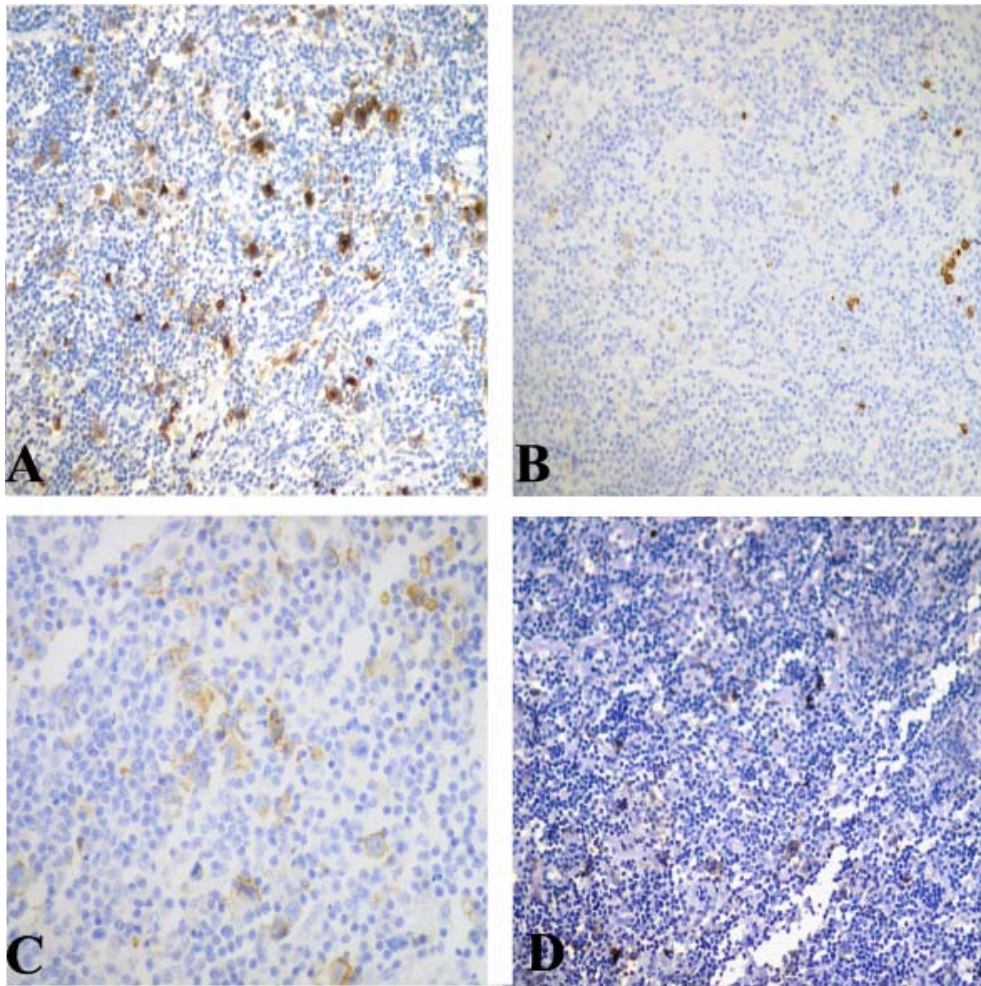
Los resultados demuestran que en opinión de los patólogos locales 68% de preparaciones aceptables con una puntuación igual o superior a 16/20 de 33% para los técnicos y un 39 % para los patólogos.

Sigue observándose una notable discrepancia con las valoraciones de los asesores externos (que eran del 40%) aunque menor que en el caso de los controles locales.

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



#### Puntuación de los Asesores



**Figura 2: Variabilidad en la detección del control CGP para CD15.** La fila superior representa dos protocolos con olla EDTA pH9 con el clon MMA de Master diagnóstica. Compárese la intensidad y la cantidad de células positivas que se obtienen con el protocolo **A** versus la pobre expresión del protocolo **B**. La fila inferior representa dos protocolos con olla citrato pH6,1 y el clon C3D1 de Dako. El protocolo **C** consigue demostrar menos células positivas aunque preserva bien la morfología. El protocolo **D** es más agresivo y no permite demostrar un número razonable de células positivas.

Teniendo en cuenta que una puntuación igual o superior a 12 se considera aceptable, el 71.2% (42) de las preparaciones remitidas se estimaron aceptables. Un 37% (22) obtuvieron una puntuación igual o superior a 16/20, consideradas como óptimas o cercanas. Tres casos se evaluaron con 20 puntos.

Un 18.3% de los centros no alcanzaron la calidad suficiente para considerar que la técnica puede aplicarse de manera rutinaria. Dos centros enviaron para evaluación amígdalas reactivas. Estos casos no se evaluaron y se añadió un comentario de control inapropiado. Uno de ellos, además, no demostró ninguna positividad.

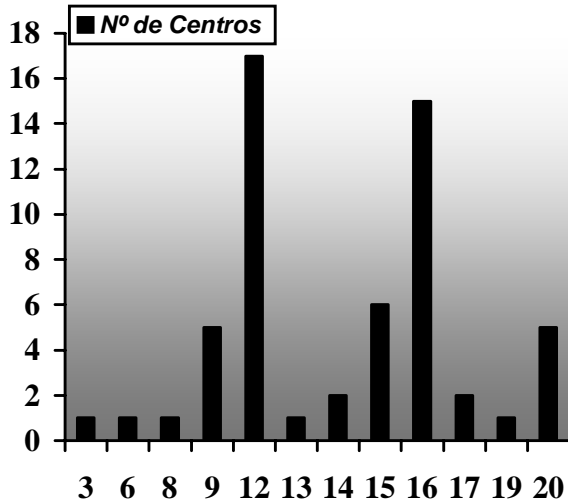
Existieron grandes discrepancias en los resultados respecto al control local, con una alta frecuencia de tinción irregular, con áreas del tejido mostrando una intensidad de la tinción o número de células inmunorreactivas inferior al esperable. La evaluación demostró también la alta frecuencia de tinciones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

*Resultados de la autoevaluación:*

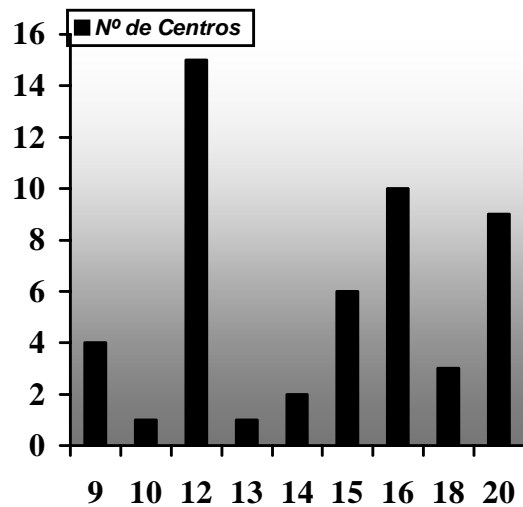
El 89.8 % de los técnicos y el 98.3 % de los patólogos participantes remitieron su valoración de los controles locales y del control del GCP.

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

**Control Local**



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 38 % de los casos tenían una puntuación igual o superior a 16/20. Este porcentaje era del 38 % 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. Un exceso de confianza en el control interno de positividad (polimorfonucleares) podría ser la causa de no incluir controles externos sistemáticos.



**Mejor método** (puntuación de 16/20 en las preparaciones del GCP):

3 centros recibieron la máxima puntuación en esta serie que fue de 20 pero sólo en el control local. Solo 1 protocolo obtuvo, además máxima puntuación en el control CGP. Por tanto, aunque no existe protocolo óptimo; al menos el siguiente parece recomendable.

Bloqueo: Agua oxigenada

Automatización: Dako Techmate

Recuperación antigénica con calor: Olla a presión

Tampón y pH: EDTA pH9

Anticuerpo primario: Master Diagnóstica MMA /DAKO C3D1 30 minutos a temperatura ambiente.

Método de detección: ENVISION

Cromógeno: DAB 10 minutos a temperatura ambiente

### **Comentarios:**

Observamos buenos resultados con diversos anticuerpos, aunque algunos de los métodos han demostrado escasa sensibilidad en la demostración de las células de Hodgkin e irregularidad en la tinción. La mayor sensibilidad con ausencia de fondo se ha observado con el anticuerpo monoclonal C3D1 de Dako y MMA de Master Diagnóstica.

El 20% aproximado de centros que no alcanzan la calidad suficiente para considerar que la técnica es aceptable para la rutina, han utilizado anticuerpos que han demostrado buenos resultados en otros centros, lo que demuestra la necesidad de mejorar las condiciones de recuperación antigénica y los métodos de detección empleados.

Sorprendentemente en este caso y a diferencia de la mayoría de las técnicas analizadas, la percepción local sobre los resultados es similar a la valoración de los observadores externos. Para los técnicos participantes el 38 % de los casos tenían una puntuación igual o superior a 16/20. Este porcentaje era del 38 % 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. Un exceso de confianza en el control interno de positividad (polimorfonucleares) así como el abaratar los costos de la técnica podría ser la causa de no incluir controles externos sistemáticos que este panel de asesores recomienda encarecidamente.

### **Referencias seleccionadas**

Arber D, Weiss L. CD15: a review. Appl Immunohistochem 1993;1:17-30.

Bahia DM, Yamamoto M, Chauffaille Mde L, Kimura EY, Bordin JO, Filgueiras MA, Kerbauy J. Aberrant phenotypes in acute myeloid leukemia: a high frequency and its clinical significance. Haematologica. 2001 Aug;86(8):801-6.

Brooks SA, Leathem AJ. Expression of the CD15 antigen (Lewis x) in breast cancer. *Histochemical Journal*, 1995;27(9):689-93.

Charalambous C, Singh N, Isaacson PG. Immunohistochemical analysis of Hodgkin's disease using microwave heating. *Journal of Clinical Pathology*, 1993;46(12):1085-8.

Gocht A, Struckhoff G, Lhler J. CD15-containing glycoconjugates in the central nervous system. *Histol Histopathol*. 1996 Oct;11(4):1007-28.

Perkins PL, Ross CW, Schnitzer B. CD30-positive, anaplastic large-cell lymphomas that express CD15 but lack CD45. A possible diagnostic pitfall. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*. 1992;116(11):1192-6.

Mayer B, Funke I, Johnson JP. High expression of a Lewis(x)-related epitope in gastric carcinomas indicates metastatic potential and poor prognosis. *Gastroenterology*, 1996;111(6):1433-46.

Nakamori S, Kameyama M, Imaoka S, Furukawa H, Ishikawa O, Sasaki Y, Kabuto T, Iwanaga T, Matsushita Y, Irimura T. Increased expression of sialyl Lewisx antigen correlates with poor survival in patients with colorectal carcinoma: clinicopathological and immunohistochemical study. *Cancer Research*, 1993;53(15):3632-7.

Ogata K, Nakamura K, Yokose N, Tamura H, Tachibana M, Taniguchi O, Iwakiri R, Hayashi T, Sakamaki H, Murai Y, Tohyama K, Tomoyasu S, Nonaka Y, Mori M, Dan K, Yoshida Y. Clinical significance of phenotypic features of blasts in patients with myelodysplastic syndrome. *Blood*. 2002 Dec 1;100(12):3887-96. Epub 2002 Jul 18.

Ohtani H, Fukushi Y, Orikasa S, Nagura H. Qualitative difference of subcellular localization of tumor-associated carbohydrate (Le(x)) antigens in renal cell carcinoma and normal kidney. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 1991;39:479-84.

Reifenberger G, Sieth P, Niederhaus M, Wechsler W. Expression of CD15 in tumours of the nervous system. *Histochemical Journal*, 1992;24(11):890-901.

Stetler-Stevenson M, Arthur DC, Jabbour N, Xie XY, Molldrem J, Barrett AJ, Venzon D, Rick ME. Diagnostic utility of flow cytometric immunophenotyping in myelodysplastic syndrome. *Blood*. 2001 Aug 15; 98(4): 979-87.

Valente AM, Taatjes DJ, Mount SL. Comparison of the pattern of expression of Leu-M1 antigen in adenocarcinomas, neutrophils and Hodgkin's disease by immunoelectron microscopy. *Histochemistry and Cell Biology*, 1995;103:181-6.