



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 10

Antígeno probado: CD20

Tejido probado: Amígdala

1.-Instrucciones: Los participantes fueron invitados a teñir con anticuerpo anti-CD20, la preparación remitida por el programa, además de la preparación utilizada como control local en cada laboratorio o centro.

En esta Ronda, la preparación remitida por el programa estaba compuesta de una matriz linfoide en la que se incluyeron:

- 3 amígdalas con diferente tiempo de fijación (24, 48 y 72 horas en Formol tamponado)
- 2 linfomas de Hodgkin clásicos
- Leucemia Linfocítica Crónica (LLC)

2.- Información relacionada con CD20

CD 20 es una proteína transmembranal, que se expresa en los precursores de las células B y en las células B maduras, pero se pierde tras su diferenciación en células plasmáticas.

Se caracteriza por poseer un peso molecular de 32-37 kDa. En las células B en reposo, el CD 20 aparece en una forma no fosforilada de 32 kDa. Tras la estimulación con mitógenos, el CD20 se fosforila, dando lugar a 2 isoformas de 35 a 37 kDa,.

Su naturaleza bioquímica lo encuadra dentro de la familia de las proteínas con cuatro segmentos transmembrana.

Su función biológica en la célula es: formar un canal de calcio cuando oligomeriza; por ello, podría regular la activación de las células B.

Expresión en tejidos normales:

El CD20 se expresa en el 95% de células B normales de sangre periférica, tejidos linfoides y médula ósea.

En amígdala se expresa en las células de los centros germinales, linfocitos del manto y linfocitos interfoliculares.

No se expresa en: células T, histiocitos ni células plasmáticas. Tampoco se expresa en epidermis, glándulas sebáceas, folículos pilosos, epitelio folicular de tiroides, neumocitos, ni epitelio bronquial del pulmón.

Expresión en Neoplasias: Su sobreexpresión es muy frecuente en la mayoría de neoplasias B.

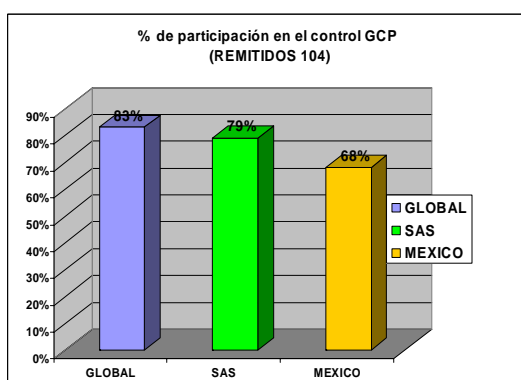
Así, alrededor del 50% de LLA-B, 95% de LLC y en la mayoría de leucemias prolinfocíticas y leucemias de células peludas, en el 90% linfomas B no-Hodgkin (NHL).

En Linfomas de Hodgkin, se puede observar débil expresión en la membrana de las células Reed-Sternberg o bien ausencia de expresión

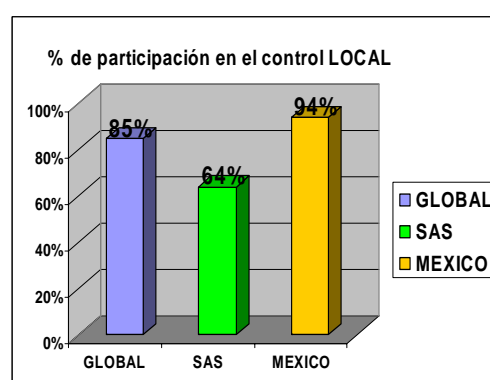
3.- Número de laboratorios participantes:

De los 104 laboratorios participantes, remitieron los controles aportados por la SEAP y hojas de evaluación, los siguientes centros:

- **Para el Control GCP:** 86 centros, es decir, el (83%) Global, 29 (79%) en la Comunidad Autónoma de Andalucía (SAS) Y 16 (68%) de México
- **Para el Control Local.** el (85%) Global, 64 % en la Comunidad Autónoma de Andalucía (SAS) Y (94%) de México



Grafica 1:
% de participación en el control GCP



Grafica 2:
% de centros que enviaron control local

En general, la participación fue bastante elevada, siendo ligeramente superior en la aportación de controles locales.

4.-Anticuerpos y Métodos evaluados:

4.1.-Anticuerpo Primario y proveedores:

El único Clon utilizado y remitido en esta ronda ha sido L26.

En la tabla 1 se reflejan las casas comerciales

Proveedor	Nº laboratorios	Clon
Dako	57	L26
Master Diagnóstica	12	L26
Novocastra/Vision Biosystems	10	L26
BIOCARE	1	L26
Zymed	2	L26
CELL MARQUE	3	L26
Ventana	2	L26

Tabla 1

4.2.-Recuperación antigénica

Se han utilizando diversos métodos de recuperación antigénica, los tampones utilizados fueron: Citrato 10 mM a diferente pH, Tris-EDTA pH 9, EDTA pH 8.

En cuanto a los equipos de desenmascaramiento utilizados, se incluye: Microondas, Olla a presión, Baño María, Autoclave y PT Module Lab Vision Y DAKO.

Cabe destacar que con mas frecuencia se están introduciendo los equipos que llevan incorporado el sistema de desenmascaramiento en el inmunoteñidor (Benchmark de Ventana y BondMax de Vision Biosystems).

4.3.-Detección

Los Sistemas de Visualización utilizados para demostrar CD20, fueron:

Kit Dako Envision

Kit Dako LSAB+ /2

Kit Dako Envision-Flex

Kit Ventana Iview

Kit Bond Polymer Define Detection Vision Biosystems

Kit Masvision polivalente Master Diagnóstica

4.4.-Automatización

los inmunoteñidores utilizados fueron los siguientes:

Dako Techmate 500

Dako Horizon

Dako Autostainer

Lab Vision Autostainer
Ventana Benchmark XT
Bond Max Vision Biosystems

5.- Guía utilizada para la evaluación:

La preparación remitida por el programa, estaba compuesta de una matriz linfoide con:

- 3 amígdalas con diferente tiempo de fijación (24, 48 y 72 horas en Formol tamponado)
- 2 linfomas de Hodgkin clásicos
- Leucemia Linfocítica Crónica (LLC)

Los criterios para considerar óptima la expresión de CD20 en el control GCP fueron los siguientes:

- Expresión intensa y bien definida de membrana, en las células B del CENTRO GERMINAL, del manto folicular y células B interfoliculares en las 3 amígdalas de diferente fijación, así como intensa expresión de las células neoplásicas del control de LLC y células B de los controles de linfoma Hodgkin, siendo uno de ellos intensamente positivas las células acompañantes, y el otro negativo con escasas células positivas .
- En todos los tejidos se valoró la ausencia de fondo o tinción inespecífica, así como la ausencia de artefactos técnicos, en especial la ausencia de degradación del tejido por sobrecalentamiento.

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	Expresión de membrana en células B diana, suficiente para diagnóstico, aunque mejorable en intensidad o artefactos
4	Tinción de células diana adecuada
5	Tinción óptima con clara detección de linfocitos B en los 3 controles de amígdala y ausencia de fondo, así como intensa expresión en el control de LLC y en las células B acompañantes de uno de los Linfomas Hodgkin.

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

El resultado de la evaluación se resume en la tabla 2 y gráficas (3-6)

GCP total asesores	GCP	SAS	MEXICO
menor de 12	6%	4%	27%
mayor=12	94%	96%	72%
mayor=16	44%	52%	1%
valor=20	1%	0%	0%

Tabla 2: resultados por categorías de valoración

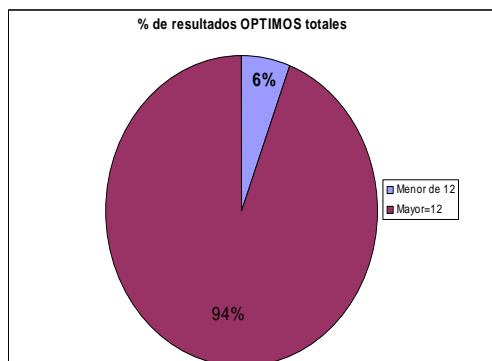
GCP: resultados globales

SAS: resultados en la Comunidad Autónoma de Andalucía

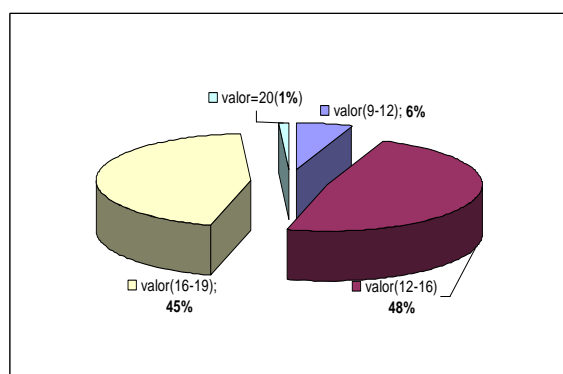
MEXICO: referidos a los centros de México

Si consideramos aceptable una puntuación igual o superior a 12, el 94% de las 104 preparaciones remitidas alcanzaron este nivel. Un 44% obtuvieron una puntuación igual o superior a 16/20, considerada como óptima o cercana. Únicamente el 1% obtuvo la puntuación máxima 20/20.

El 6% de los centros no alcanzaron la calidad suficiente para considerar que la técnica pueda aplicarse de manera rutinaria.

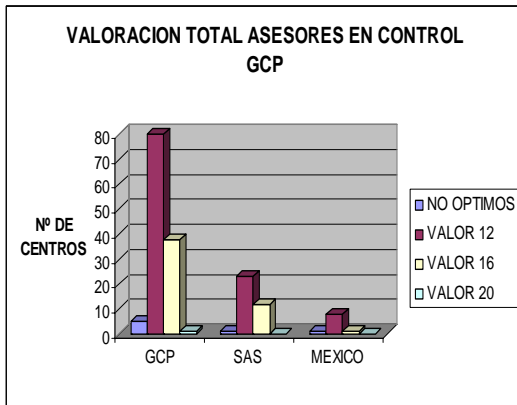


Gráfica 3: % de resultados globales OPTIMOS respecto al total

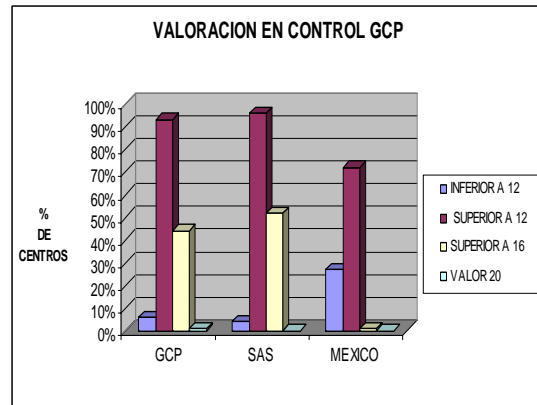


Gráfica 4: % de resultados globales por categorías: aceptables, óptimos y excelentes

En cuanto a las preparaciones "NO OPTIMAS" con valoraciones inferiores a 12, cabe destacar que solo 5 centros del total de participantes, entre los que se incluye 1 centro del SAS y 3 centros de México, han sido NO OPTIMOS con valoraciones comprendidas entre 9 y 11.



Grafica 5: Resultados en el control aportado por GCP, referidos por nº de centros globales, del SAS y de México.



Grafica 6: Resultados en % en el control aportado por GCP.

GCP: hace referencia a los resultados globales de todos los participantes, incluyendo SAS y México.

SAS: resultados obtenidos en la Comunidad Autónoma de Andalucía

México: resultados obtenidos en los centros participantes de México

En referencia a la Comunidad Autónoma de Andalucía, los resultados fueron los siguientes:

- ✓ Valoraciones aceptables, de 12 o superior: el 96%
- ✓ Valoraciones de 16 o superior el 52%.

En cuanto a las valoraciones obtenidas por los centros de México que han participado:

- ✓ Valoraciones aceptables, de 12 o superior: el 72%
- ✓ Valoraciones de 16 o superior el 1%.

8.- Estudio de los controles locales:

La participación ha sido muy semejante tanto en los controles locales como en los controles GCP, y en general ha sido globalmente muy elevada.

Los resultados obtenidos se detallan en las tabla 3. y graficas 7 y 8

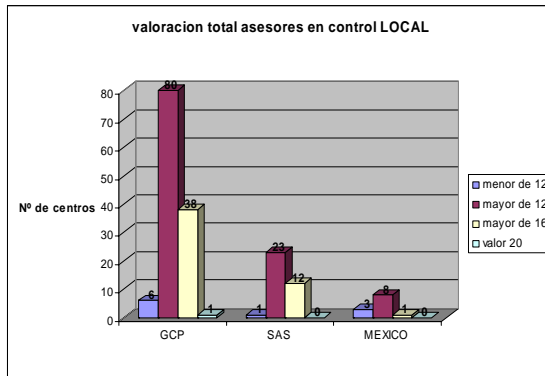
Total	GCP	SAS	MEXICO
menor de 12	7%	4%	27%
mayor=12	93%	96%	73%
mayor=16	44%	55%	9%
valor =20	1%	0%	0%

Tabla 3: resultados en % por categorías de valoración

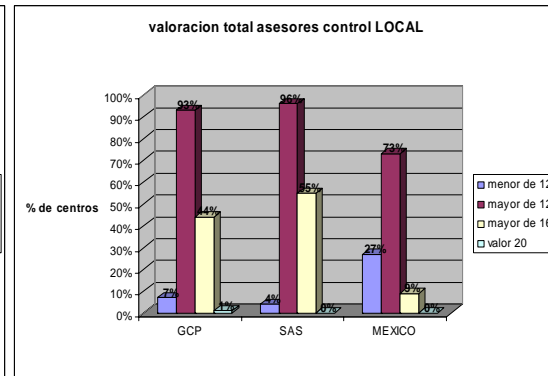
GCP: resultados globales

SAS: resultados en la Comunidad Autónoma de Andalucía

MEXICO: referidos a los centros de México



Gráfica 7: valoración en los controles locales, por nº de centros.



Gráfica 8: valoración en los controles locales, por % y según categorías.

La puntuación igual o superior a 12 se considera aceptable, por lo que el 93% de preparaciones remitidas se consideraron aptas, con un 44% con una puntuación igual o superior a 16/20, consideradas como óptimas o cercanas y (1%) de excelentes con valor igual 20.

Los resultados para la Comunidad Autónoma de Andalucía (SAS), fueron sensiblemente superiores: Un 96 % de óptimas para el diagnóstico, siendo un 55%, con valoraciones de 16 o superior.

En referencia a los laboratorios participantes de México, obtuvieron resultados aceptables el 73% y óptimos el 9% (con valores de 16 o superiores)

En cuanto a los NO OPTIMOS: Un 7% del total de centros participantes (4% en SAS) y (27% de México) no alcanzaron 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 inmuno reactivas inferior al esperable. Problemas menos frecuentes, han sido los artefactos técnicos generales y los debidos a un exceso de pretratamiento.

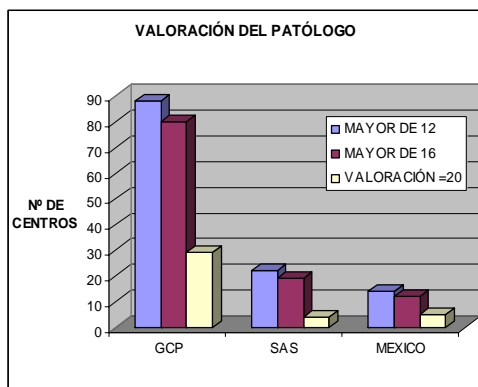
En cuanto a los controles locales remitidos:

- ❑ amígdalas no neoplásicas (66),
- ❑ apéndice (5),
- ❑ adenopatía (11)
- ❑ apéndice (1)
- ❑ controles multitejidos (1 Tissue array)
- ❑ 1 Linfoma HD
- ❑ 2 L. foliculares

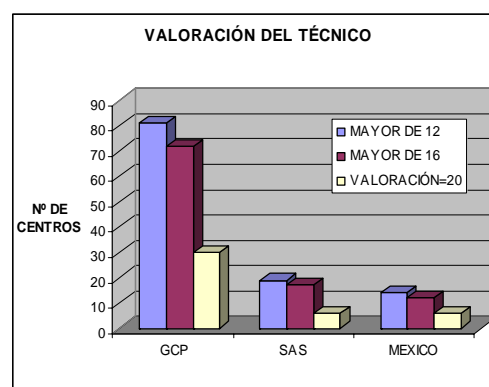
9.- Resultados de la autoevaluación:

El 65% de los técnicos y el 90% de los patólogos remitieron su valoración de los controles GCP y locales.

Los resultados obtenidos del análisis de datos son los siguientes:



Gráfica 9: Valoración del Patólogo Local



Gráfica 10: Valoración del Técnico Local

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 localmente es inferior.

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

- El 100% de los participantes consideraron tener buena inmuno reactividad, frente al 93% considerado óptimo por los evaluadores de la SEAP.
- El 88% de los centros, consideró excelente la inmuno tinción en el control GCP, frente al 44% considerado desde el control de calidad externo.
- El 37% se dieron valor 20, frente al 1% otorgado por los evaluadores externos.

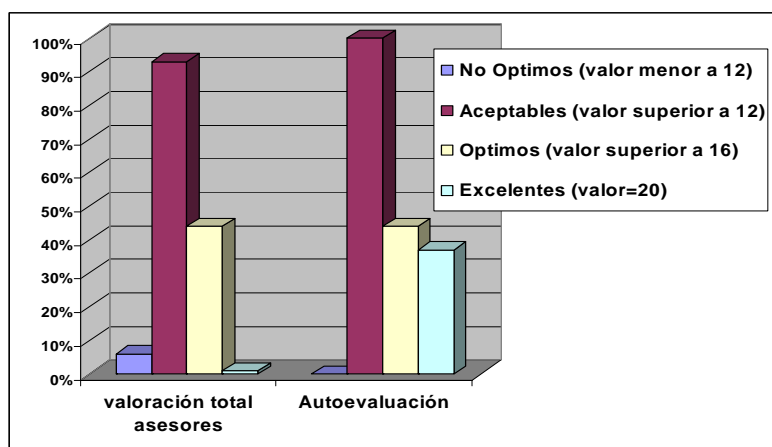


Figura 11: Datos comparativos referentes a la valoración otorgada por los asesores de la SEAP frente a los datos de la Autoevaluación.

10.- Los protocolos de los mejores resultados para CD20 en esta ronda han sido:

20/20 GCP:

Metodo 1:

Automatización: DAKO AUTOSTAINER

Recuperación antigénica con calor: PT module con tampón Tris /EDTA Ph 9 durante 20 minutos a 95°.

Anticuerpo primario: L26 de DAKO a 1:100 . 20 minutos.

Método de detección: ENVISION FLEX

Metodo 2: (19/20 control GCP)

Automatización: BENCHMARK VENTANA

Anticuerpo primario: Dako: Clon L26 , dilución 1:800, durante 32 minutos a 37°C

Método de detección: ULTRAVIEW UNIVERSAL

Metodo 3: (19/20 control GCP)

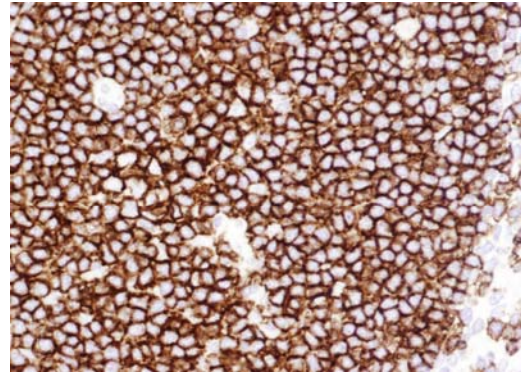
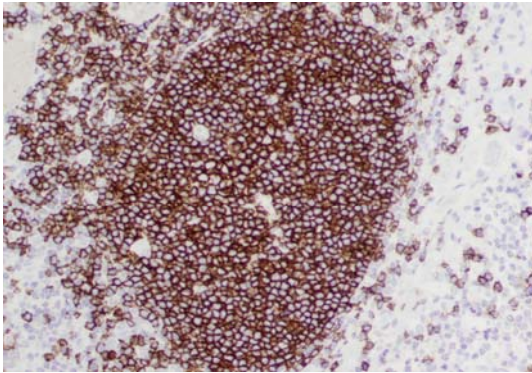
Automatización: TM 500 (DAKO)

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

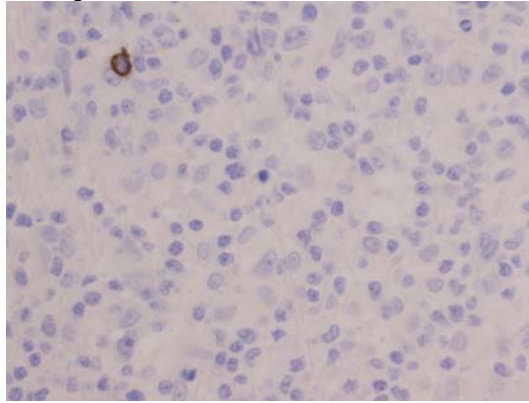
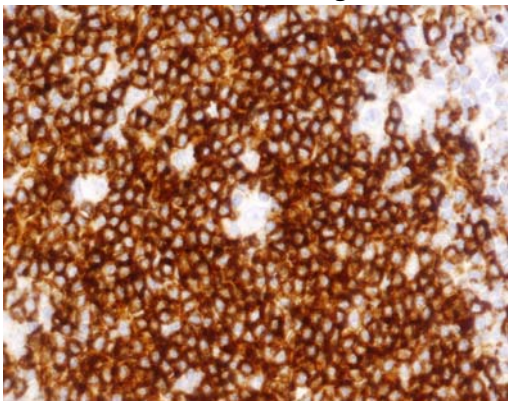
Anticuerpo primario: Dako: Clon L26, 1:200, durante 30 minutos a temperatura ambiente

Método de detección: EnVision (DAKO)

Imágenes de los mejores protocolos

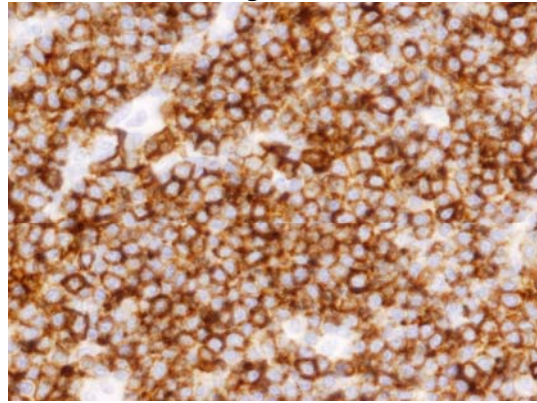
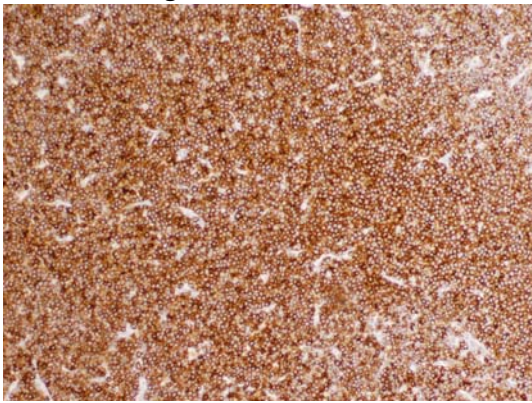


Amígdala de 72 horas de fijación



Linfoma Hodgkin

Linfoma Hodgkin



LLC 10x

LLC 40x

Figura 12: imágenes de la matriz linfoide, para CD20

11.- Evolución de resultados en rondas anteriores.

Hasta el momento se ha incluido CD20 entre los anticuerpos a evaluar, en dos rondas anteriores, concretamente en la Ronda 2 (2004) y en la Ronda 5 (2005).

En la gráfica 13, se resumen los resultados de la evolución a lo largo de estas 3 rondas.

Se puede observar que el % de NO ÓPTIMOS disminuye considerablemente en cada ronda, pasando desde un 30% a un 6%.

Esto conlleva que aumente el % de resultados óptimos.

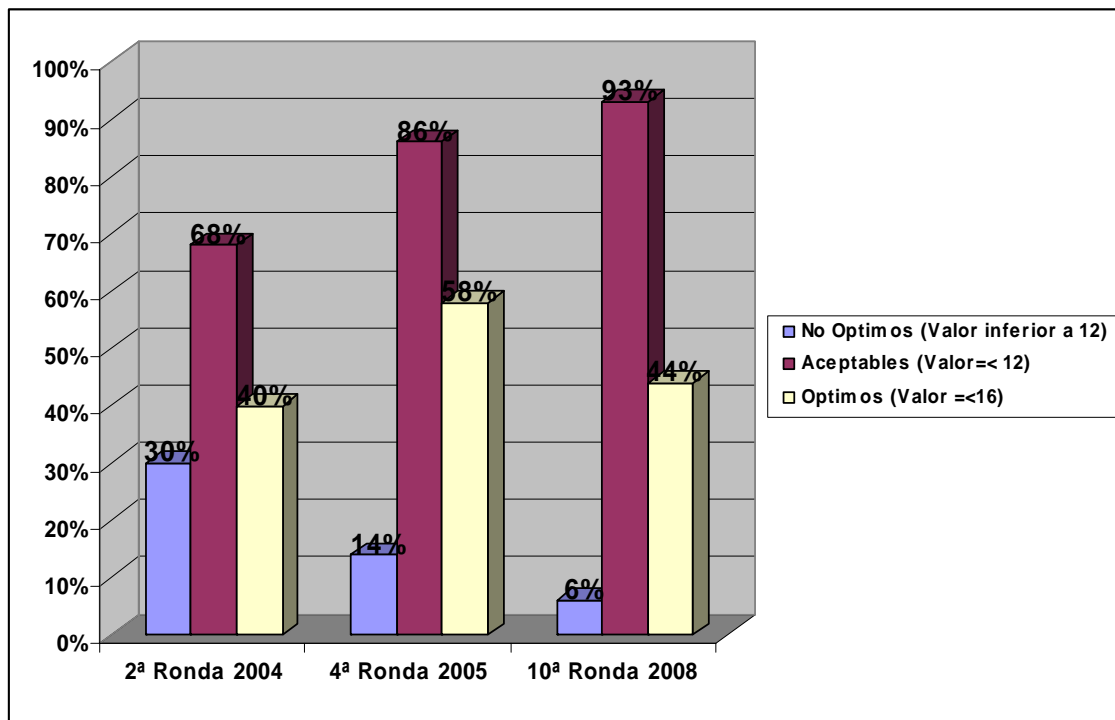


Figura 13: Resultados de CD20 en rondas anteriores (año 2004, 2005) y ronda actual (2008)

12.-Comentarios:

El análisis de los resultados de inmunotinción con diversos equipos de tinción y sistemas de visualización y condiciones de tinción muestra resultados de mayor calidad que en rondas anteriores. El único clon utilizado ha sido L26.

Con los diversos sistemas de recuperación antigénica, se aprecia una mejor calidad de tinción y mayor sensibilidad con el uso de tampones a pH9.

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.

Se aconseja utilizar de forma rutinaria como control positivo de la técnica, tejidos normales de expresión conocida, y en el caso de CD20 se propone la utilización de amígdala reactiva o apéndice.

En referencia a los resultados NO OPTIMOS, que aunque ha ido disminuyendo en las diferentes rondas, corresponde con un 6% de los centros participantes, en los que la técnica no puede considerarse de calidad suficiente, para ser empleada en diagnóstico. Se aconseja revisar los mejores protocolos, como referencia para optimizar la expresión.

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.

12. - Referencias:

- Chang KL, Arber DA, Weiss LM. CD20: A review. *Applied Immunohistochemistry* 1996; 4:1-15.
- 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.
- Jilani I, O'Brien S, Manshuri T, Thomas DA, Thomazy VA, Imam M, Naeem S, Verstovsek S, Kantarjian H, Giles F, Keating M, Albitar M. Transient down-modulation of CD20 by rituximab in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2003 Nov 15;102(10):3514-20.
- Khalidi HS, Brynes RK, Medeiros LJ, Chang KL, Slovak ML, Snyder DS, Arber DA. The immunophenotype of blast transformation of chronic myelogenous leukemia: a high frequency of mixed lineage phenotype in "lymphoid" blasts and A comparison of morphologic, immunophenotypic, and molecular findings. *Mod Pathol*. 1998 Dec;11(12):1211-21.
- Mohrmann RL, Arber DA. CD20-Positive peripheral T-cell lymphoma: report of a case after nodular sclerosis Hodgkin's disease and review of the literature. *Mod Pathol*. 2000 Nov;13(11):1244-52.
- Zukerberg LR, Collins AB, Ferry JA, Harris NL. Coexpression of CD15 and CD20 by Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease. *Am J Pathol*. 1991 Sep;139(3):475-83.
- www.nordiqc.org