



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 QUIRÚRGICA GENERAL

Ronda nº 8

Antígeno probado: CD68

Tejido probado: SEAP-GCP - Amígdala
LOCAL - Mayoritariamente Amígdala o Ganglio Linfático

Instrucciones: Los participantes fueron invitados a teñir con CD68 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.

Consideraciones Generales: Los anticuerpos anti CD68 detectan una glicoproteína de unos 110kD de peso molecular, localizada en el citoplasma y frecuentemente relacionada con lisosomas. Se observa positividad de expresión en células de distinto origen y diferenciación (mieloide, monocítico, histiocítico). Son positivos los macrófagos de tipo monocitario y células preursoras mieloides de médula ósea. Los histiocitos de tejidos linfoides normales y las células de kupffer, aunque también los mastocitos y la microglia.

En neoplasias, son positivos los tumores fibro-histiocíticos como el xantogranuloma juvenil, la histiocitosis de células de Langerhans, algunos subtipos de leucemias mieloides (según el anticuerpo utilizado), algunos tumores epiteliales y células epitelioideas de algunos melanomas.

Utilidad: Los anticuerpos anti CD68 son útiles en el diagnóstico de tumores fibro-histiocíticos, histiocitosis y en patologías con gran cantidad de histiocitos. En algunas proliferaciones o cambios gliales y en melanomas. La clona PG-M1 puede ser útil en la identificación de la diferenciación

monocítica de algunas leucemias mieloides con un patrón correspondiente a CD14.

Clones disponibles: Existen varios anticuerpos monoclonales contra CD68, con reactividad y especificidad variable según el clon. Los clones más usados son KP-1, PG-M1, Ki-M6, Ki-M7 y EBM11.

MG-M1 da mayor señal y menor ruido de fondo que KP1, pero tiñe un rango menor de células (en leucemias mieloides agudas KP1 tiñe también los subtipos no monocíticos, que son negativos con PG-M1 y CD14). Debe hacerse recuperación antigénica por calor y es preferible utilizar un tampón o *buffer* alcalino (ej. Tris-EDTA pH9).

Consejos para la selección de un buen control:

Como norma general, no es recomendable, en este marcador ni en otros, utilizar como control positivo un tejido tumoral, ya que la expresión del marcador dependerá del propio tumor y puede ser heterogénea dentro del mismo tumor y distinta entre tumores de distintos individuos.

Se recomienda emplear como control un tejido normal que contenga células o elementos positivos para el marcador deseado (siempre que sea posible y exista en tejidos normales). Esta recomendación se basa en que la expresión de los distintos marcadores suele ser muy similar entre las distintas áreas de los tejidos normales y entre distintos individuos. Además el tejido debe estar fijado en condiciones conocidas y controladas.

Inmunotinción óptima para CD68: Se consideró una inmunotinción óptima la que mostraba teñidos el número de células esperado, (ausencia o tinción débil de otras células inflamatorias o epiteliales) 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).

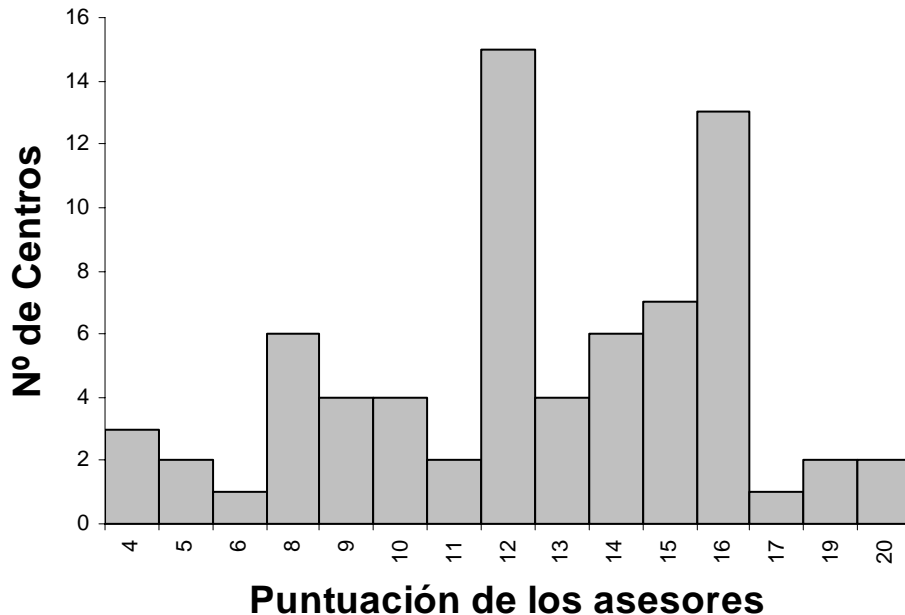
Los criterios generales de puntuación empleados son los reflejados en las hojas de resultados individuales remitidas.

Número de laboratorios participantes:

- Remitidos: 94 GCP
- Contestados: 74; 78,7% (Control Local) y 72; 76,59% (control GCP)

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

CD68 8ª Ronda CONTROL LOCAL



Considerando que una puntuación superior a 12 se considera aceptable, el 67,5% de las preparaciones remitidas se consideraron como aceptables, con un 24,32% con una puntuación igual o superior a 16/20, consideradas como óptimas o cercanas. Estos resultados, aunque son positivos, son mejorables. El 44,59% de las preparaciones obtuvieron una puntuación de entre 12 y 15, considerada aceptable, pero no excelente. 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. Un total de 22 centros (29,7%) no fueron evaluados: en 20 de ellos no fue posible la evaluación de las preparaciones debido a que no fueron remitidas y 2 centros carecían del anticuerpo solicitado.

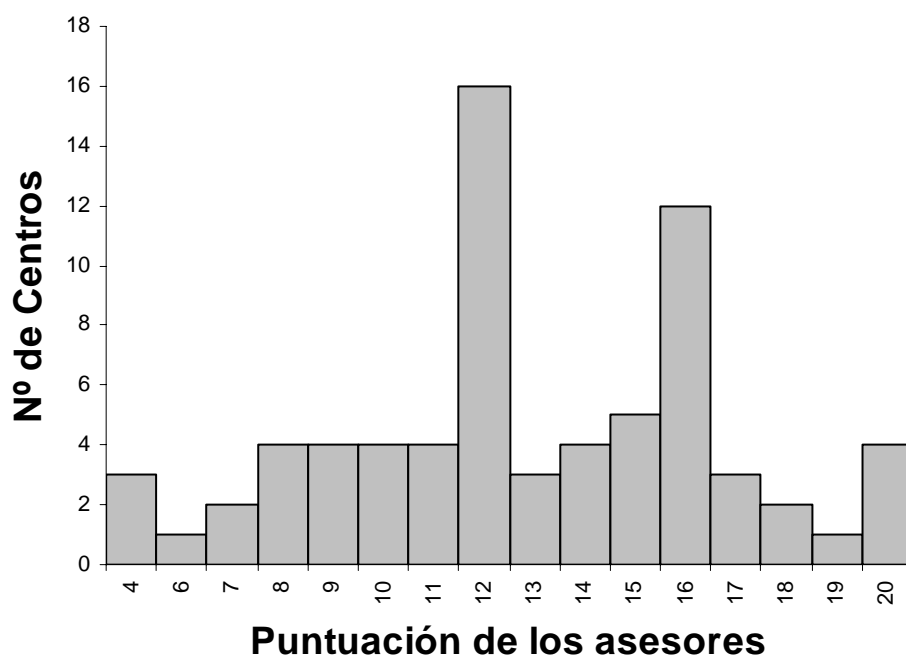
Los principales problemas detectados han sido una alta frecuencia de pretratamiento excesivo del tejido, generalmente por recuperación antigénica por calor, que conlleva una tinción de fondo indeseada o tinción inadecuada de algunas células. Todo ello puede provocar un incremento en la expresión de la señal en células de estirpe distinta, que puede inducir a errores en el diagnóstico debido a una falsa interpretación de positividad. En el caso de utilizar olla a presión para la recuperación antigénica con calor, es aconsejable, ajustar el tiempo a los resultados obtenidos y

mantener un estricto control sobre los sistemas de cierre (gomas...) y válvulas que con frecuencia se obstruyen debido al alto contenido en sales de las soluciones tamponadas utilizadas. Es recomendable cambiar la olla o estos sistemas con frecuencia.

En los casos con puntuaciones inferiores a 12/20, además, destacaban las tinciones muy ligeras o inexistentes, tinciones irregulares que pueden inducir a errores en el diagnóstico tinción de fondo excesiva que no permitía discernir la positividad real del fondo, o la inadecuada selección del tejido de control elegido, sin presencia de células con expresión positiva para CD68.

Estudio de los controles remitidos por el programa GCP:

CD68 8ª Ronda CONTROL GCP

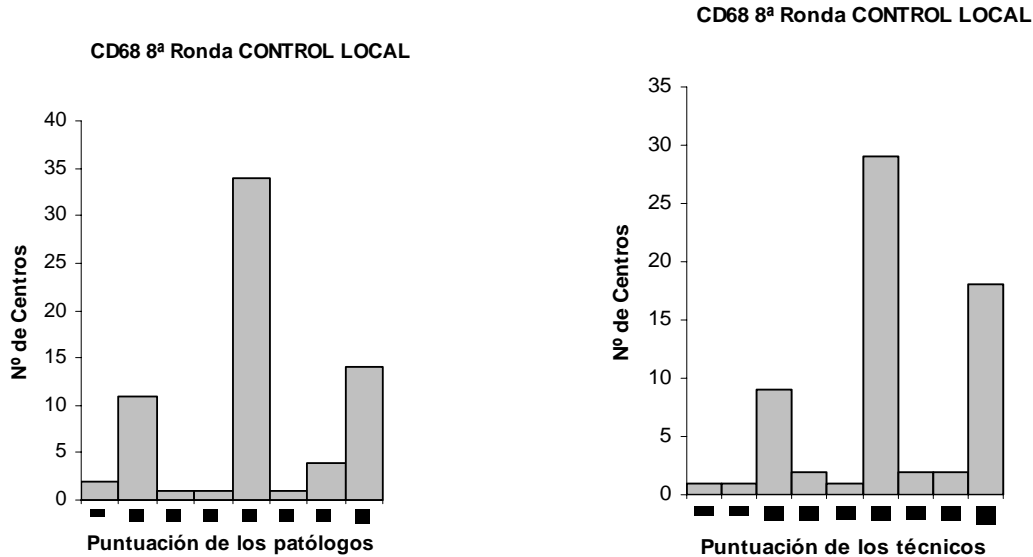


Considerando que una puntuación igual o superior a 12 se considera aceptable, el 69,4% de las preparaciones remitidas se consideraron aceptables. Un 30,5% obtuvieron una puntuación igual o superior a 16/20, considerada como óptima o cercana. Los principales problemas detectados han sido por una parte una alta frecuencia de tinción de fondo, tinción inadecuada de algunas células o la presencia de degradación del tejido por exceso de pretratamiento; 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 12/20, 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 87,83% de los técnicos y el 91,89% de los patólogos participantes remitieron su valoración de los controles locales y el 93,05% y el 95,83% respectivamente del control del GCP. Los resultados obtenidos son los siguientes:

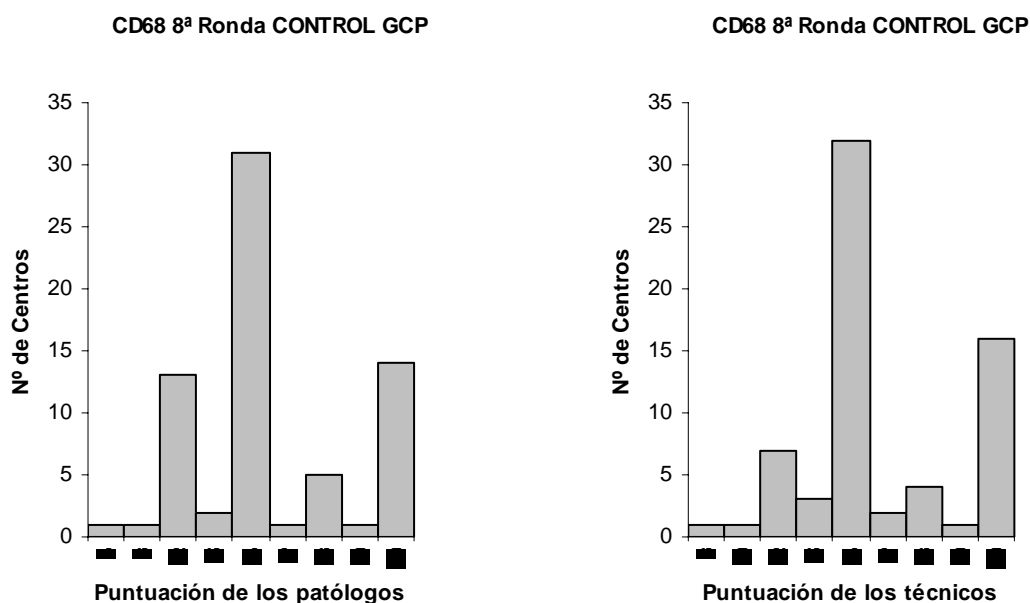
Control Local



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 78,4% de los casos tenían una puntuación igual o superior a 16/20. Este porcentaje era del 77,94% en el caso de los patólogos. En ambos casos esas cifras casi triplican las de los

observadores externos. La tendencia generalizada a sobrevalorar los resultados de la técnica, se corrige al observar detalladamente y de manera objetiva la tinción y la intensidad de la misma, así como puntuar detalles como la presencia de fondo, la degradación del tejido por pretratamiento excesivo, la uniformidad de tinción en el conjunto de la preparación o la tinción inespecífica no deseada.

Control del GCP



Los resultados son similares al control local, con un 82,08% de preparaciones con una puntuación igual o superior a 16/20 para los técnicos, y un 75,36% para los patólogos. Sigue observándose una discrepancia con las valoraciones de los asesores externos (30,5% frente a 75,36%), que supera el doble del valor. Estas diferencias pueden deberse a la uniformidad de fijación y de condiciones técnicas de los controles GCP.

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

Método: Dako Tech Mate / Envision, Streptavidina marcada

Bloqueo: Agua oxigenada 3%

Automatización: Biotech Tech Mate 500 / Dako Autostainer; Bond Max Menarini

Digestión enzimática: La mayoría de los centros no realizan recuperación enzimática.

Recuperación antigénica con calor: La mayoría de centros usan olla a presión con tampón citrato pH 7,3 durante 2 minutos a máxima presión, algunos autoclave.

Tampón y pH: pH 7, 7,3 o 7,6;

Anticuerpo primario: Dako N1577 Clon KP1, prediluido, o Dako M876 Clon PG-M1, a dilución 1:140 y con incubación de entre 15 y 30 minutos a temperatura ambiente.

Cromógeno: DAB Dako K3222 a 1:20 durante 5 minutos, K3468 durante 10 minutos a temperatura ambiente.

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 irregulares o en casos con tinciones insuficientes. También se ha observado la presencia de escaso contraste con Hematoxilina en centros en los que se han utilizado nuevos sistemas de detección con determinados teñidores automáticos de reciente implantación. Observación parcialmente solventable aumentando el tiempo de tinción con hematoxilina. La mayoría de centros en los que se ha detectado degradación del tejido por excesivo pretratamiento con calor, que en ocasiones iba acompañado de fondo, se observó la utilización de olla a presión durante un tiempo superior a 2 minutos.

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 (bazo con linfoma T u otros tumores que no expresan CD68, ganglio linfático con antracosis que interfiere con la tinción de inmunohistoquímica, etc.), 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.

En el caso de CD68 es preferible escoger amígdala, ganglio linfático o apéndice cecal normal. Los macrófagos de los centros germinales y lámina propia se tiñen de forma distintiva. Se observa también una débil tinción de algunos linfocitos T. Con la clona KP1 puede verse una débil tinción de células epiteliales.