



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 IHQ LINFOIDE

### Ronda nº 6

**Antígeno probado:** CD-246 ( ALK )

**Tejido probado:** Linfoma anaplásico de células grandes ( ALCL )

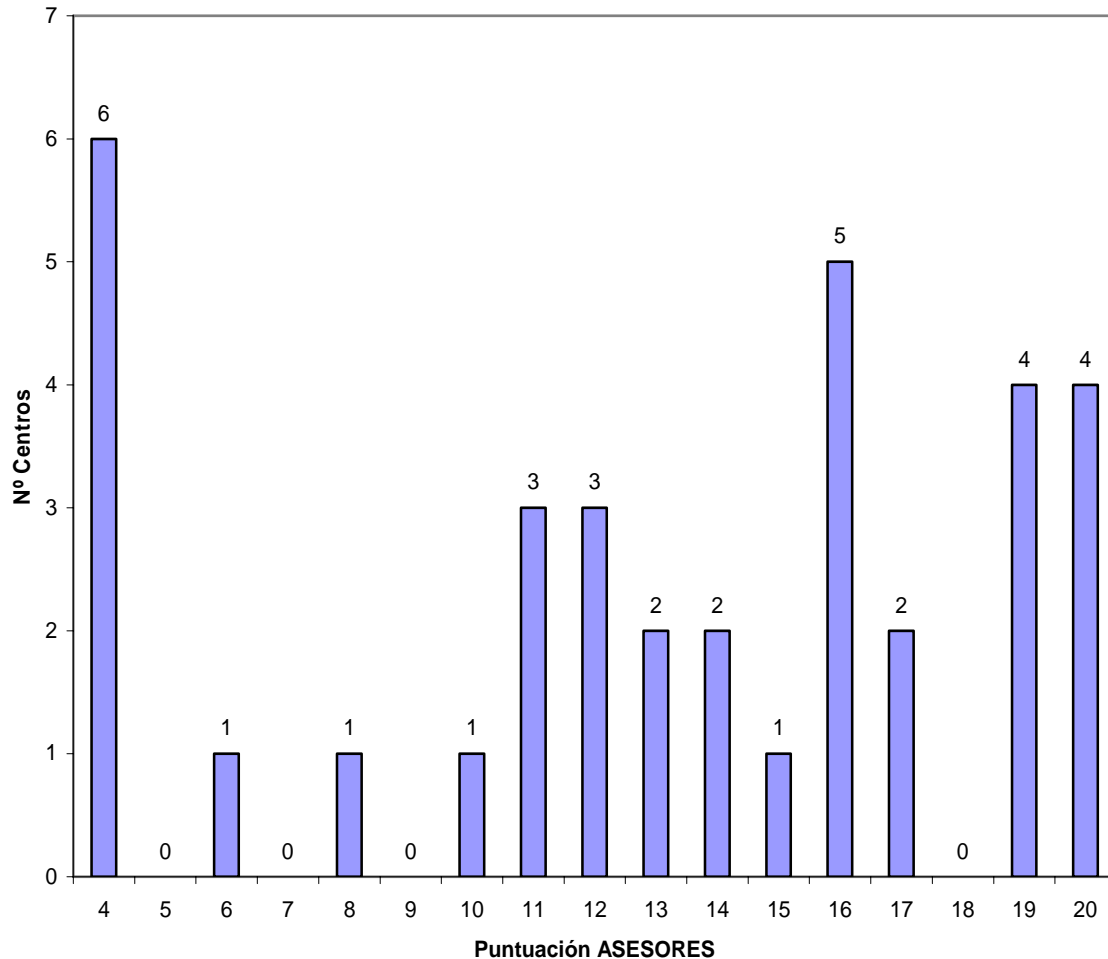
**Instrucciones:** Los participantes fueron invitados a teñir con CD-246 ( ALK ) la preparación remitida por el programa (Linfoma anaplásico de células grandes fijado en formol al 10% ) y su propia preparación control, devolviendo ambas preparaciones para su evaluación.

**Número de laboratorios participantes:**

- Remitidos: 87
- Contestados: 54 ( 62%) **GCP** y 35 (40.2%) **Control Local**

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

**ALK 6ª RONDA CONTROL LOCAL**

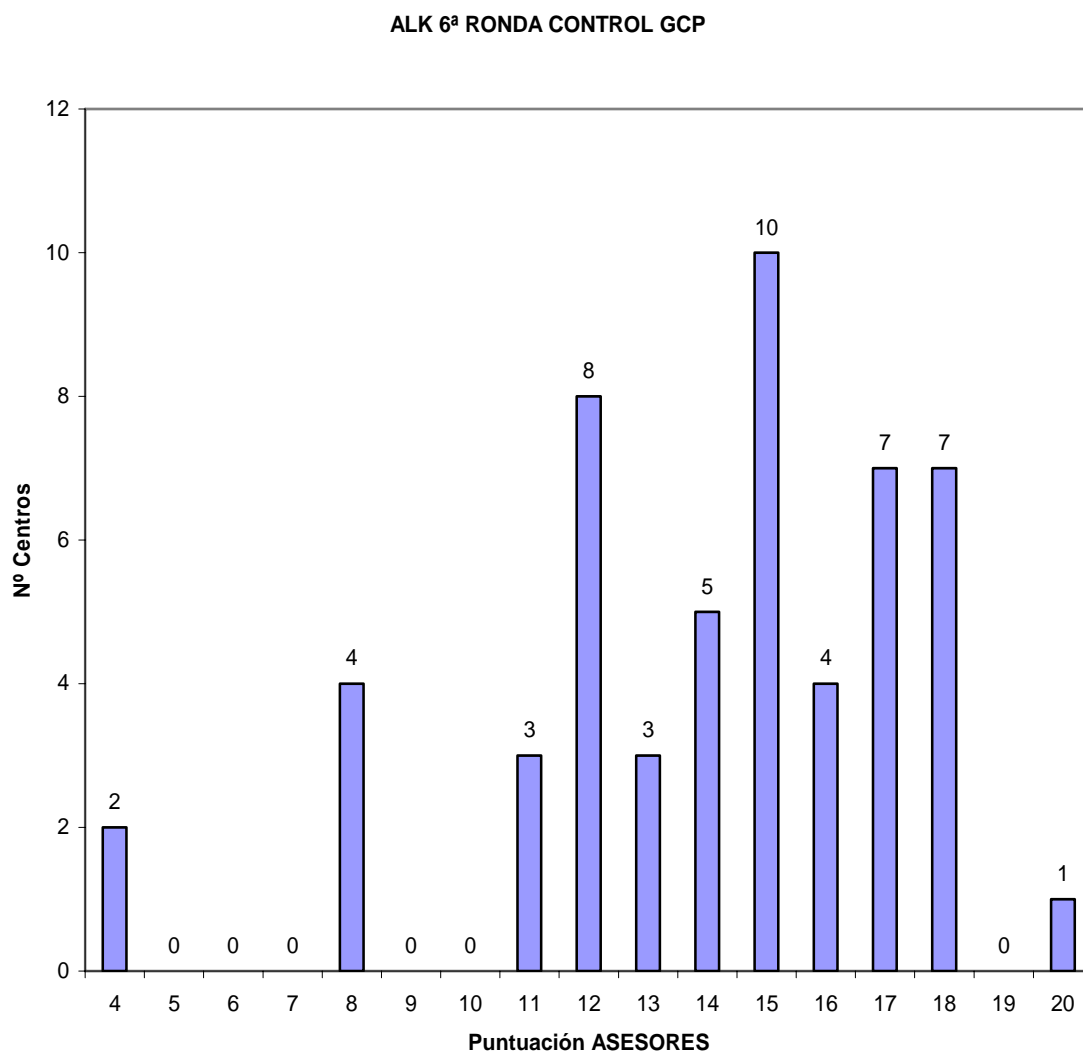


Considerando que una puntuación igual o superior a 12 se considera aceptable, el 65,71 % de las preparaciones remitidas se consideraron como aceptables, con un 42,8 % con una puntuación igual o superior a 16/20, consideradas como óptimas o próximas al grado óptimo. Los principales problemas detectados han sido una alta frecuencia de tinción insuficiente, tinción ligera o muy ligera y en los casos con puntuación inferior a 16/20, intensidad de la tinción inferior a la esperable e irregular. En los casos con menor puntuación, además, destacaban la tinción esencialmente negativa, los artefactos técnicos generales (hidratación, contraste inadecuado por exceso o defecto, defectos en la manipulación con rotura del corte, etc) aunque en proporción baja. Llama la atención el envío de dos casos de controles inadecuados (probablemente por no tener casos de LACG).

Los tejidos utilizados como control, en los laboratorios que lo especificaron fueron:

- Ganglio linfático con linfoma anaplásico de células grandes: 30
- Linea celular Karpas: 2
- Glandular salivar con LACG:1
- Amigdalita ( control no valido): 2

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



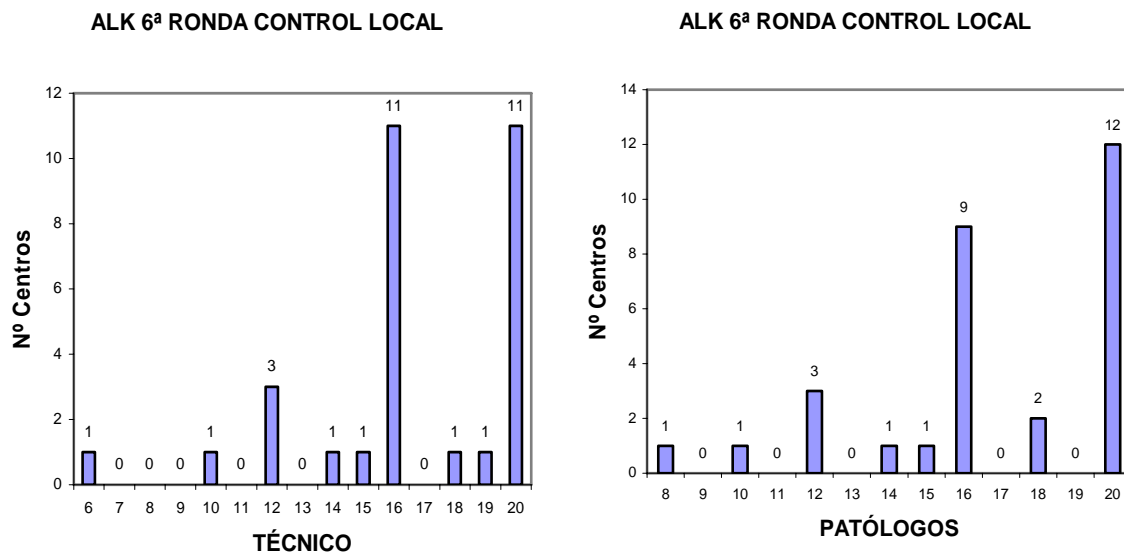
Considerando que una puntuación igual o superior a 12 se considera aceptable, el 83.3% de las preparaciones remitidas se consideraron aceptables. Un 35.2 %

obtuvieron una puntuación igual o superior a 16/20, consideradas como óptimas o muy cerca de la tinción óptima. El principal problema detectado ha sido una intensidad de la tinción o un número de células teñidas inferior al esperable, con una menor frecuencia de ligera o moderada tinción de fondo. Este hecho puede tener como consecuencia una disminución de la sensibilidad de la técnica, con posibles problemas para la detección de casos con relativa escasez de antígeno. Existe escasos casos de artefactos técnicos generales (hidratación, contraste inadecuado por exceso o defecto, defectos en la manipulación con rotura del corte, etc), con lo que se ha mejorado con respecto a otras rondas.

**Resultados de la autoevaluación:** Como se indica en las instrucciones remitidas, la autoevaluación es una parte importante del programa de Garantía de Calidad. El 88.57 % de los técnicos y el 85.7 % de los patólogos participantes remitieron su valoración de los controles locales y el 88.8 % y el 88.8 % respectivamente del control del GCP. Estas cifras se pueden considerar muy adecuadas y refleja el compromiso tanto de los técnicos como de los patólogos para el correcto desarrollo del programa de garantía de calidad.

Los resultados obtenidos en esta ronda son los siguientes:

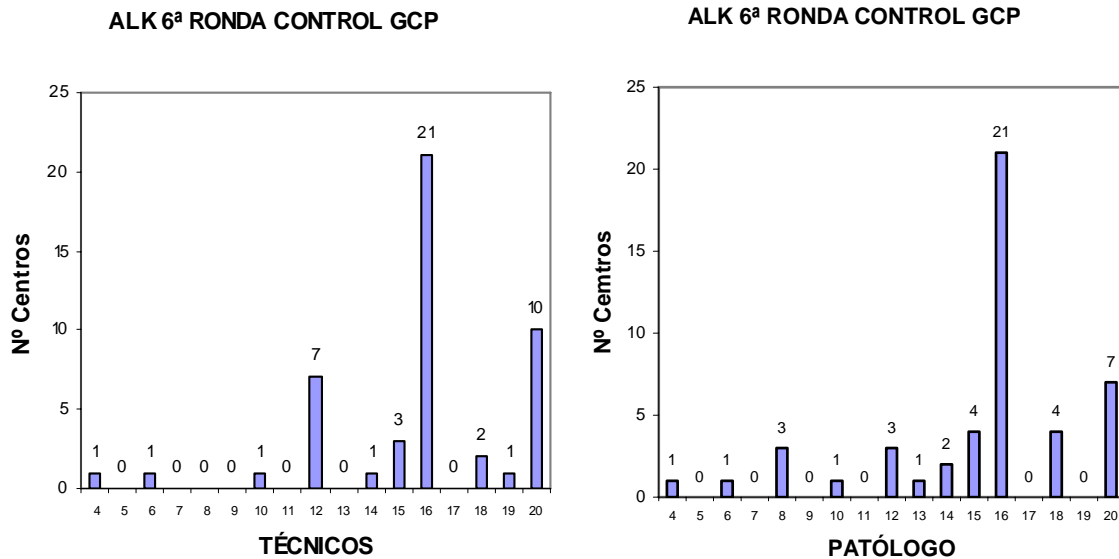
### Control Local



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 77.5 % de los casos tenían una puntuación igual o superior a 16/20. Este porcentaje era del 76.6 % en el caso

de los patólogos. Estos valores son más del doble de lo observado de acuerdo con la valoración externa.

## Control del GCP



Los resultados son similares al control local, con un 70.83 % de preparaciones con una puntuación igual o superior a 16/20 para los técnicos, y un 66.6% para los patólogos. Es evidente la notable discrepancia con las valoraciones de los asesores externos (35.2 % frente a 68 % de media). La apreciación de los técnicos y de los patólogos sigue siendo superior a la de los asesores externos, y quizás fuera adecuada una labor de instrucción sobre la valoración de la técnica, en la que puede ser útil la consulta a las imágenes en la web de la SEAP, con ejemplos de diferentes casos representativos de cada una de las valoraciones, así como de los criterios empleados por éstos para valorar una inmunotinción óptima.

**Inmunotinción óptima:** Se consideró una inmunotinción óptima a la que mostraba teñidas con un patrón citoplasmático y/o nuclear las células tumorales de casos de ALCL CD 30+ , 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. Para ejemplos de las diferentes valoraciones se puede visitar la página web de la SEAP, en el apartado del programa de Garantía de Calidad.

**Anticuerpos empleados:**

Los anticuerpos empleados de acuerdo con la información proporcionada por los diferentes laboratorios son:

**DAKO Monoclonal, clona ALK1: 41**

**Novocastra, clona ALK1: 1**

**Menarini Monoclonal: 2**

**Master Diagnostico, clon 5A4: 8**

**Vitro, clon SP8: 1**

**Atom Benchmark Monoclonal, clona ALK1: 2**

**Zymed, clona 2AL4: 1**

**Mejores métodos** (puntuación de 20/20 en las preparaciones del GCP):

Método: Novolink

Bloqueo: Agua oxigenada

Automatización: DAKO Techmate 500

Digestión enzimática: NO

Recuperación antigénica con calor: SI: PT modelo Vitro. Tampón EDTA, ph 8, 18 minutos

Anticuerpo primario: DAKO monoclonal, prediluido 1/20 durante 20 minutos a temperatura ambiente.

Anticuerpo secundario: Novocastra, clon RE 7200-K

Cromógeno: DAB DAKO, K 3468.

(puntuación de 18/20 en las preparaciones del GCP): La mayoría (6 de los 8 que han obtenido esta puntuación) han realizado el método antes descrito. Dos de ellos han realizado el siguiente:

Método: ENVISIÓN

Bloqueo: Agua oxigenada

Automatización: DAKO AUTOSTAINER

Digestión enzimática: No especificado

Recuperación antigénica con calor: SI: Microondas, PH 8, 15 minutos, Tampón EDTA, Watios 750

Anticuerpo primario: Master diagnostica, clon 5A4, prediluido durante 30 minutos a 22 °C

Anticuerpo secundario: Dako, clon K 5007, 30mn, Tª 22 °C

Cromógeno: DAB DAKO, 1,5% , sustrato Agua oxigenada, 10 min , Tª 22 °C.

**Comentarios:** En conjunto, la mayoría de los resultados son muy adecuados para su utilización rutinaria. Sin embargo hay un porcentaje moderado con deficiencias, especialmente en la intensidad de la tinción, que podrían ocasionar una disminución en la sensibilidad de la técnica para la detección de células con relativamente escasa cantidad de antígeno, que habitualmente no son percibidas ni por el técnico responsable ni por el patólogo.

La ALK es una proteína tirosina quinasa del receptor de transmembrana de 200 kDa. La expresión postnatal está limitada a unas pocas células diseminadas en el sistema nervioso (algunas células gliales y neuronas, y algunas endoteliales y pericitos ).

EL gen ALK fue descubierto a finales de los 80, cuando se observó que los linfomas anaplasicos de células grandes (LACG) CD 30 + podían estar relacionados con la translocación cromosomal 2-5, en la que el gen nucleofosmina (NPM) localizado en 5q35 se fusiona con el gen ALK localizado en 2p23. Con la fusión, la parte del gen NPM que codifica la parte N-terminal de la proteína NPM se yuxtaponen a la parte del gen ALK que codifica toda la zona citoplasmática de la proteína ALK. Como consecuencia, el gen ALK está bajo el control del promotor de NPM, lo cual induce a una transcripción permanente y ubica del gen híbrido NPM-ALK, lo que da como resultado la producción de una proteína NPM-ALK quimérica-de 80 kDa,( conteniendo 40% de la porción amino-terminal de NPM junto al dominio completo citoplasmático de ALK). Se han descrito otras translocaciones que afectan al gen ALK, incluyendo t(1;2)(q21;p23), inversión 2(p23;q35), t(2;3)(p23;q21), t(2;17)(p23;q23), y t(x;2)(q11-12;p23). En estos incommunes reordenamientos del gen ALK se yuxtaponen a TPM3, codificando una tropomiosina no muscular; TFG (fusión TRCK codificando un polipéptido; ATIC, el cual codifica un enzima, 5-aminoimidazol - 4carboximida - 1b - D -ribonucleotido transformilasa/iosina monofosfato ciclohidrosilasa participantes en el metabolismo purinico; CLTC, codificando el gen de cadena pesada; o el MSN miembros de la familia de la proteína 4.1 asociado a polipéptidos.

Aproximadamente el 80% de los LACG están relacionados con la translocación cromosomal 2-5; pudiéndose identificar cualitativamente por microscopia óptica utilizando métodos de pruebas inmunohistoquímicas, el anticuerpo marca la proteína ALK humana normal y la proteína NPM-ALK quimérica, y es una herramienta útil para la identificación del subgrupo de LACG que son ALK positivos.

ALK también se ha detectado por inmunohistoquímica en algunos sarcomas, especialmente en rhabdomyosarcomas; sin embargo, en la mayoría de los tumores de partes blandas, excepto en el tumor miofibroblástico inflamatorio, la tinción es francamente débil.

Los linfomas anaplasicos de células grandes ALK positivos suelen corresponder a gente joven, con enfermedad avanzada (estadio III o IV), suele acompañarse de fiebre, y con afectación extranodal; asociándose a un buen pronóstico y buena respuesta a quimioterapia.

En resumen la principal aplicación es la identificación de linfomas anaplasicos de células grandes.

Mientras los primeros estudios inmunohistoquímicos utilizaban anticuerpos policlonales, actualmente la mayoría son monoclonales (ALK1 y ALKc); la práctica totalidad de los laboratorios han utilizado la clona ALK1 (80%) donde están incluidos la práctica totalidad de los que han obtenido puntuación superior a 16/20.

Los varios patrones de translocación son importantes para la localización de la proteína fusionada y son importantes para la interpretación de los resultados de inmunohistoquímica. La tinción citoplasmática, nuclear y nucleolar se asocia con la translocación nucleofosmina/ALK; la tinción citoplasmática difusa y de membrana se asocia con tropomiosina; la tinción citoplasmática difusa con la fusión TRCK gen ALK y ATIC/ALK; la tinción punteada citoplasmática con la cadena pesada/ALK ; y la tinción de membrana nuclear con RANBP2/ALK. Todas estas translocaciones resultan en la dimerización del segmento N-terminal de la proteína ALK y en su consecuente activación.

Debido a la gran especificidad de esta técnica inmunohistoquímica, los resultados obtenidos se pueden considerar satisfactorios ya que hasta un 83% han obtenido una puntuación >12 en el GCP y el 65% en el control local y el 35% y 42% respectivamente, han obtenido una puntuación >16, no superando la puntuación 12 (resultado insatisfactorio) solo un 25% del GCP y un 34% del control local.



No existen diferencias estadísticas significativas en relación con el anticuerpo utilizado ya que la gran mayoría utilizaron el anticuerpo monoclonal clona ALK1. Sobre el método de recuperación antigénica el 100 % de los laboratorios emplearon recuperación con calor, predominantemente en olla a presión ( 72%), y en menor medida baño maría, microondas, autoclave y otros( PT Vitro,T Systec).

En resumen, los resultados son relativamente homogéneos, en gran medida por las características de la diana, el tipo de anticuerpo empleado y el método de la recuperación antigénica. Como suele ser habitual la combinación juiciosa de los diferentes factores implicados parece ser la clave de unos buenos resultados.

### **Bibliografía Seleccionada**

Le Beau MM, Bitter MA, Larson RA, et al: The t(2;5)(p23;q35): A recurring chromosomal abnormality in Ki-1- positive anaplastic large cell lymphoma. *Leukemia* 1989;3: 866-870.

Rimokh R, Magaud JP, Berger F, et al: A translocation involving a specific breakpoint (q35) on chromosome 5 is characteristic of anaplastic large cell lymphoma ('Ki-1 lymphoma'). *Br J Haematol* 1989;71: 31-36.

Kaneko Y, Frizzera G, Edamura S, et al: A novel translocation, t(2;5)(p23;q35), in childhood phagocytic large T-cell lymphoma mimicking malignant histiocytosis. *Blood* 1989;73: 806-813.

Bitter MA, Franklin WA, Larson RA, et al: Morphology in Ki-1(CD30)-positive non-Hodgkin's lymphoma is correlated with clinical features and the presence of a unique chromosomal abnormality, t(2;5)(p23;q35). *Am J Surg Pathol* 1990;14: 305-316.

Mason DY, Bastard C, Rimokh R, et al: CD30-positive large cell lymphomas ('Ki-1 lymphoma') are associated with a chromosomal translocation involving 5q35. *Br J Haematol* 1990;74: 161-168.

Morris SW, Kirstein MN, Valentine MB, et al: Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science* 1994;263: 1281-1284.