



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

6ª RONDA

Antígeno probado: CD138

Tejido probado: Amígdala

Instrucciones: Los participantes fueron invitados a demostrar CD138 en las preparaciones proporcionadas.

CD138: CD138 / syndecan-1

Es una proteína transmembranal de 30.5 kDa. Se expresa en células hematopoyéticas, principalmente en las fases tardías de la diferenciación de las células B, en células plasmáticas. Siendo negativo en las células precursoras pre-B de la médula ósea. Se expresa también en células endoteliales, fibroblastos, y en epitelios simples y estratificados así como en hepatocitos normales. Es un marcador mayoritariamente expresado en Mielomas

La función del CD138 es en gran parte desconocida. Sin embargo, la porción intracelular de CD138 parece unir el citoesqueleto con los componentes celulares (1), mientras que la parte extracelular de la molécula parece unirse a diferentes ligandos. Presumiblemente, el CD138 desempeña un papel en las funciones celulares, como la proliferación, la muerte celular programada, la adhesión entre la matriz celular y las células, así como entre célula y célula (5); por ejemplo, media la adhesión de las células de mieloma al colágeno del tipo I (2).

La expresión del CD138 se reduce durante la transformación maligna de diversos epitelios (7) y el antígeno es perdido (desprendido) rápidamente por las células de mieloma que entran en apoptosis, por lo que el CD138 es un marcador de células de mieloma viables (1, 2). El CD138 se pierde con la malignización de varios epitelios estratificados (7). Junto con BCL-6 y IRF4, el CD138 puede resultar útil para el diagnóstico de linfomas no Hodgkin asociados a SIDA y linfomas Hodgkin relacionados con el VIH (8) Las células marcadas por el anticuerpo muestran una tinción limitada a la membrana superficial celular.

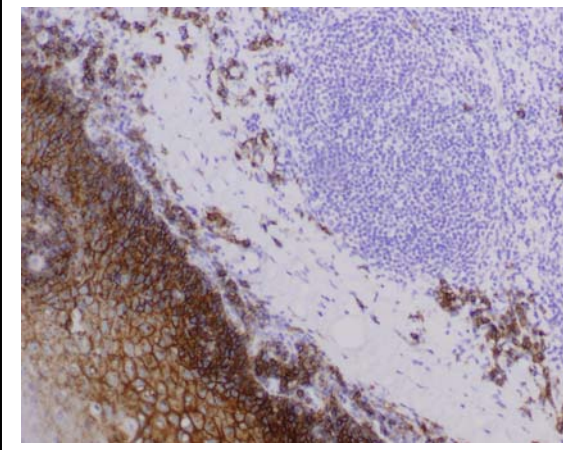
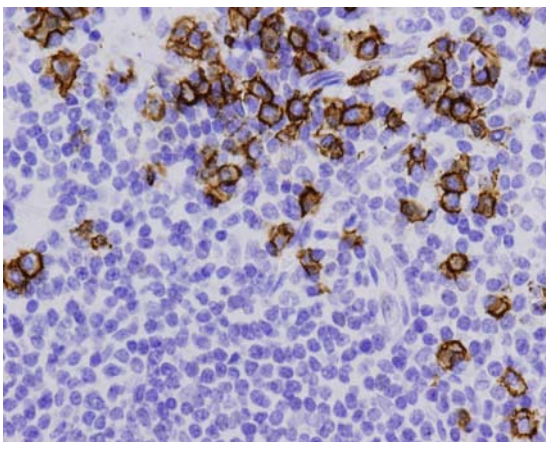
En médula ósea de pacientes con mieloma múltiple, todos los tipos de células plasmáticas son marcados por el anticuerpo, entre ellos las células plasmáticas reticulares, polimórficas, asíncronas y blásticas (3).

Número de laboratorios participantes:

- Remitidos: 86
- Contestados: 39 para el control GCP con una participación del 45%.

Guía utilizada para la evaluación: Cada uno de los cuatro asesores concedieron una puntuación entre 0 y 5, lo que daba una puntuación entre 0 y 20 puntos. La puntuación fue como sigue:

PUNTUACION	PATRON DE TINCION
0	No remisión de preparaciones
1-2	Tinción de membrana inferior de lo esperado, tanto en nº de células como en intensidad
3	Tinción esperada aunque focal de células plasmáticas
4-5	Tinción generalizada esperada: con adecuada inmunoreactividad de membrana en las células plasmáticas y células epiteliales de la amígdala

Otras variables que se han tenido en consideración han sido:

- Ausencia/Presencia de fondo
- Señal inespecífica
- Calidad global de la técnica (ausencia de burbujas, tinción irregular, efecto borde)
- Preservación de la muestra tras la recuperación antigénica.

Inmunotinción óptima: Se ha considerado óptima cuando se pudo observar:

- Tinción membrana en células plasmáticas y células epiteliales de amígdalas reactivas
- Ausencia total de fondo
- Buena técnica histológica

Resultados de la Evaluación

Anticuerpos y métodos evaluados:

- Anticuerpos primarios

Anti-CD138	Casa Comercial
MI15	DAKO DIAGNOSTICOS
BC113/B4)	MENARINI
5F7	MASTER DIAGNOSTICA
5F7	OXFORD BIOTECHNOLOGY
1B12	MENARINI
BC/B-B4	BIOCARE
AT 13/5	DAKO

Recuperación antigénica:

Aparatos utilizados:

- Microondas
- Olla a presión
- Baño María
- Autoclave

Soluciones de recuperación antigénica (Tampones)

- Citrato a diferente pH
- EDTA pH 8 y 9

Tratamiento enzimático:

- Pepsina

Sistemas de Visualización:

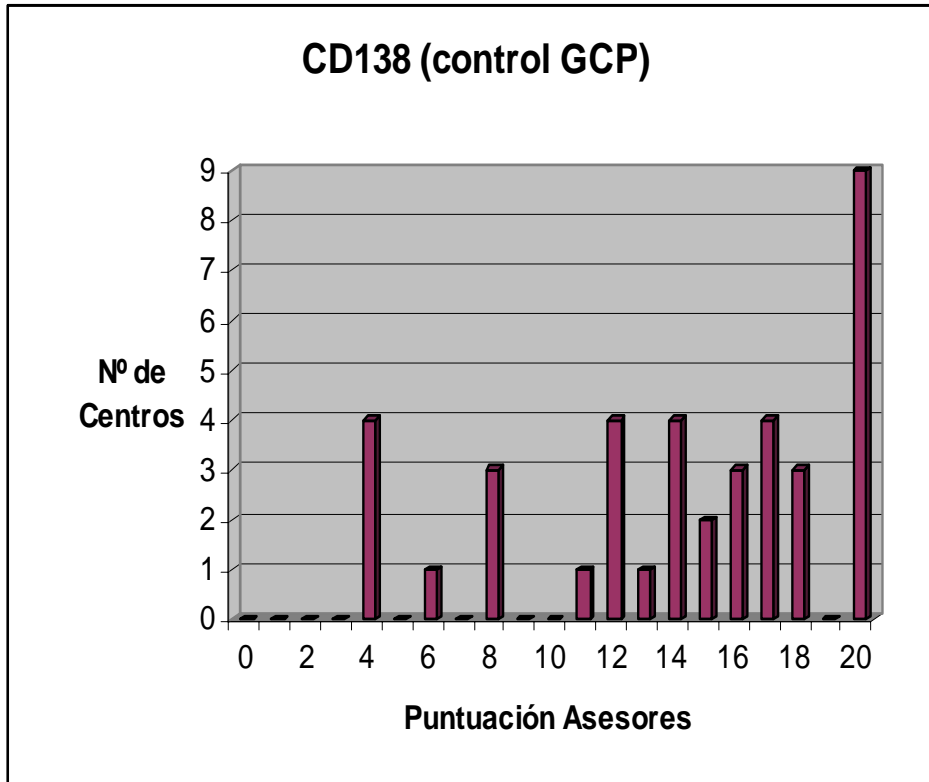
- IVIEW de Ventana
- LSAB de DAKO
- EnVision de DAKO
- Novolink de Novocastra
- Masvision de Master Diagnostica

1.-Estudio de controles GCP enviados a cada centro: Los participantes remitieron el control de amígdala reactiva aportado por el CGP e inmunoteñido para CD138.

La participación ha sido del 45%.

1.a. - Valoración global del control GCP por los Asesores

El reparto de puntuación se puede apreciar en la siguientes tabla:



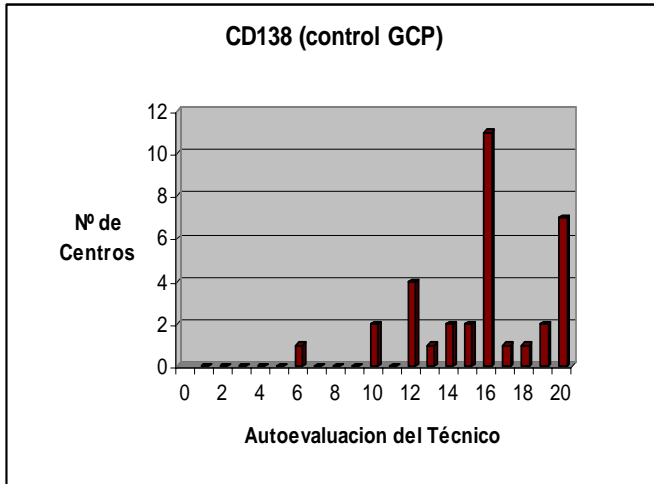
Gráfica nº 1

Sorprendentemente la valoración para CD138, a pesar de ser un marcador no frecuentemente utilizado, los laboratorios que lo han remitido, han obtenido excelentes valoraciones.

- Inmunotinción óptima para el diagnóstico, el 77 % de los centros remitidos.
- Inmunotinción buena con valoraciones iguales o superior a 16: el 49%.
- Inmunotinción excelente con valor de 20: el 23%.

1.b.- Autoevaluación en el control GCP por parte de los Técnicos de cada centro.

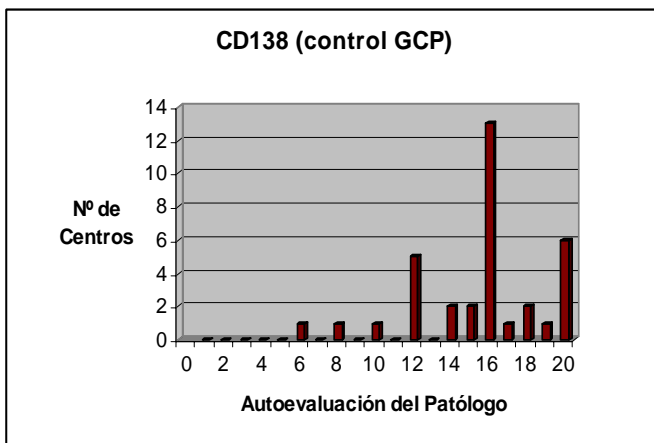
La participación ha sido del 87% y los resultados son los reflejados en las siguientes gráficas



Grafica nº 2

1.c.- Autoevaluación en el control GCP por parte de los Patólogos de cada centro.

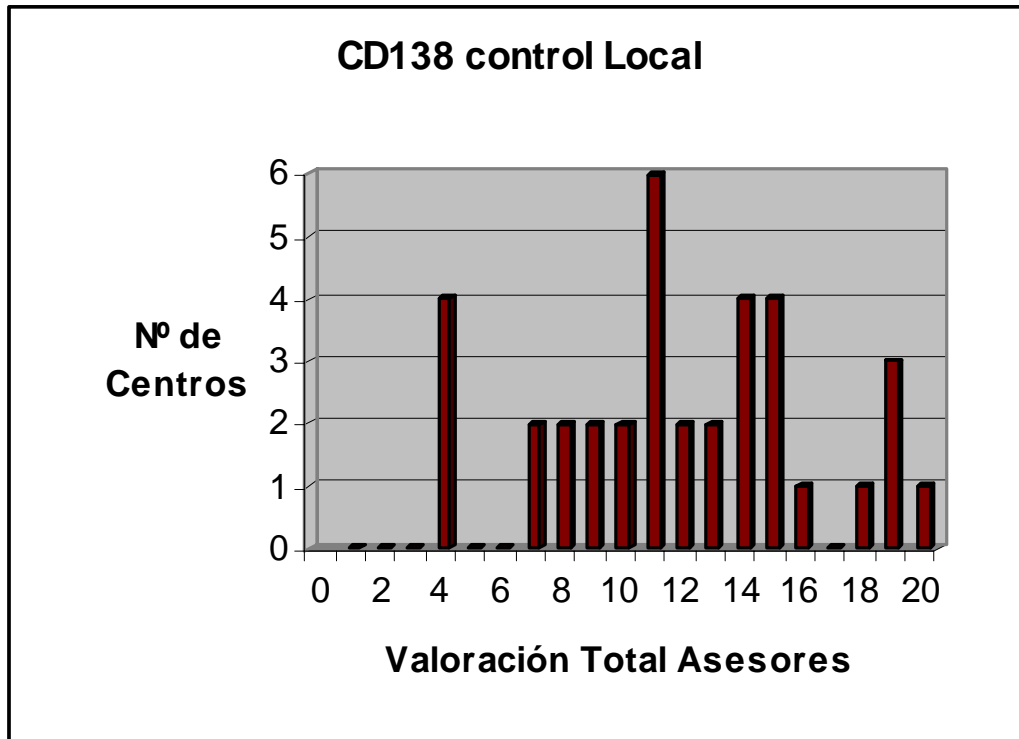
La participación ha sido del 90%



Gráfica 3

Como en ocasiones anteriores, podemos observar que las valoraciones locales son sensiblemente superiores a las valoraciones realizadas por observadores externos.

2.a.- Estudio de controles locales de cada centro: Las puntuaciones otorgadas por el grupo de 4 asesores en la 6ª Ronda de Patología Linfoide, en los controles locales remitidos fue según se refleja en la gráfica:



Gráfica 4

La participación ha sido del 41%.

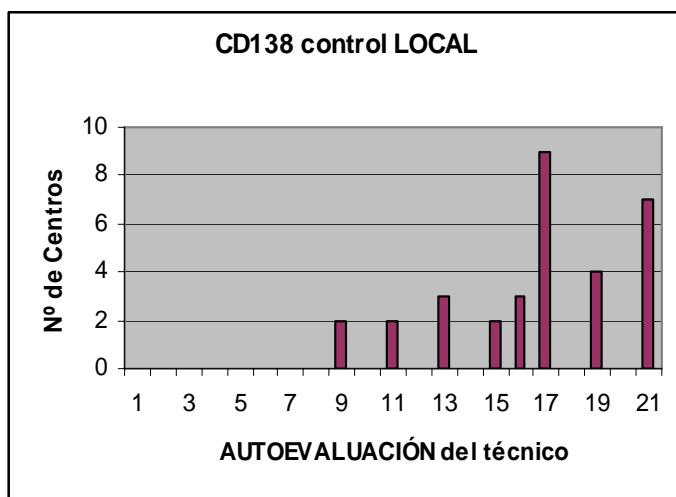
Del análisis de resultados se deduce que:

- Valoración óptima (12 o superior) en el control local lo obtuvieron el 51% global.
- Valoración de 16 o superior: el 17% global.
- Excelente, el 3%.

2.b.-Autoevaluación en el control LOCAL por parte de los Técnicos de cada centro:

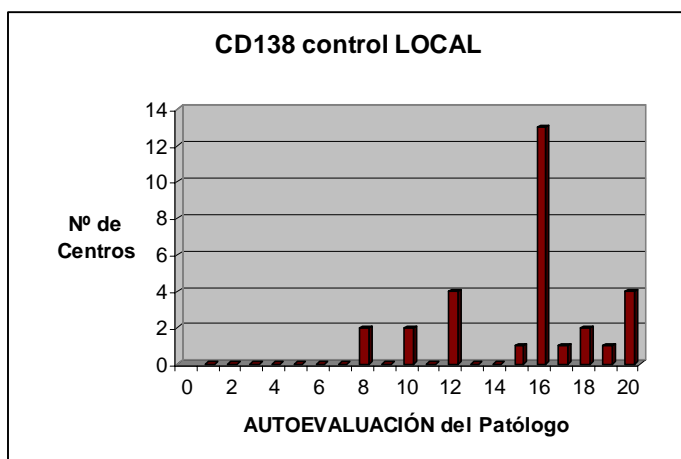
En lo referente a las valoraciones otorgadas por parte del personal técnico de cada centro, cabe destacar que:

- El 90% valoración de 12 o superior
- El 65% valoración de 16 o superior
- El 22% valoración 20



Gráfica 5

2.c.-Autoevaluación en el control LOCAL por parte de los Patólogos de cada centro:



Gráfica 6

- Autovaloraciones de 12 o superiores fueron remitidas por el 82% de los centros.
- El 75% Global otorgaron valoraciones de 16 o superiores
- El 20% se concedieron valoraciones de 20

3.- Protocolos de los mejores métodos (puntuación de 20/20):

A)

- Método de Visualización: Dako LSAB kit k5001
- Inmunoteñidor automático: TechMate Horizon de Dako
- Buffer y pH: Buffer Dako
- Bloqueo: H₂O₂

- Recuperación antigénica: PT module, 30 minutos en tampón EDTA pH 8
- Anticuerpo primario: Clon MI15 de DAKO, a dilución 1:35 durante 30 minutos a t^a ambiente
- Cromógeno: Dako DAB K5001

B)

- Método de Visualización: Dako Envision kit k5007
- Inmunoteñidor automático: Autostainer de DAKO
- Buffer y pH: Buffer: información no aportada
- Bloqueo: H₂O₂
- Recuperación antigénica: Tampón EDTA 1mM pH 9 en autoclave durante 8 minutos
- Anticuerpo primario: Clon MI15 de DAKO, a dilución 1:50 durante 30 minutos a t^a ambiente
- Cromógeno: DAB

C)

- Método de Visualización: DakoCytomation LSAB-HRP K5001
- Inmunoteñidor automático: TechMate 500
- Bloqueo: H₂O₂
- Recuperación antigénica: Olla a presión, 2 minutos en tampón Citrato pH 6,5
- Anticuerpo primario: Clon MI15 de DAKO

D)

- Sistema de Visualización: IVIEW de VENTANA
- Sistema automatizado; BENCHMARK XT
- Bloqueo: H₂O₂
- Recuperación antigénica: por calor en BENCHMARK
- Anticuerpo primario: MI115 de DAKO
- Cromógeno: DAB.

E)

Sistema de Visualización: NOVOLINK de Novocastra

- Sistema automatizado: TECHMATE 500 DAKO
- Bloqueo: H₂O₂
- Recuperación antigénica: por calor en MODULO PT DE VITRO, con EDTA pH: 8 durante 18 minutos
- Anticuerpo primario: MI115 de DAKO
- Cromógeno: DAB.

4.-Comentarios:

Los resultados a nivel global indican una demostración de CD138 óptima para el diagnóstico. Siendo aconsejable revisar los mejores protocolos para aquellos laboratorios donde no fue del todo óptima la valoración.

Los problemas mas frecuentes que se ha podido detectar han sido:

- ❑ tinción adecuada pero de intensidad mejorable
- ❑ un exceso y defecto de pretratamiento antigénico
- ❑ heterogeneidad de tinción
- ❑ artefactos derivados de la capilaridad
- ❑ tinción focal
- ❑ débil reactividad

Sugerencias para disminuir los problemas o artefactos detectados:

- ❑ Utilizar controles de expresión conocida como puede ser amígdala reactiva.
- ❑ Evitar utilizar muestras tumorales como controles de rutina
- ❑ Revisar los protocolos de desenmascaramiento.
- ❑ Ajustar las diluciones y tiempos de incubación de los reactivos.
- ❑ Revisar las caducidades de los reactivos.
- ❑ Evitar que las preparaciones se deshidraten durante la técnica de inmunotinción.
- ❑ Revisar las preparaciones tras el proceso de inmunotinción, estableciendo un control de calidad interno

5.-Referencias:

1. Wijdenes J, Clément C, Klein B, Dore J-M. New B-cell CD antigens. BC29: CD138 (syndecan-1) workshop panel report. In: Kishimoto T, Kikutani H, von dem Borne AEG, Goyert SM, Mason DY, Miyasaka M, et al., editors. Leucocyte typing VI. White cell differentiation antigens. Proceedings of the 6th International Workshop and Conference; 1996 Nov 10-14; Kobe, Japan. New York, London: Garland Publishing Inc.; 1997. p. 249-52.
2. Jourdan M, Ferlin M, Legouffe E, Horvathova M, Liautard J, Rossi JF, et al. The myeloma cell antigen syndecan-1 is lost by apoptotic myeloma cells. *Br J Haematol* 1998;100:637-46.
3. Costes V, Magen V, Legouffe E, Durand L, Baldet P, Rossi J-F, et al. The MI15 monoclonal antibody (anti-syndecan-1) is a reliable marker for quantifying plasma cells in paraffin-embedded bone marrow biopsy specimens. *Hum Pathol* 1999;30:1405-11.
4. van Zaanen HCT, Vet RJWM, de Jong CM, von dem Borne AEGKr, van Oers MHJ. A simple and sensitive method for determining plasma cell

isotype and monoclonality in bone marrow using flow cytometry. *Br J Haematol* 1995;91:55-9.

5. Gattei V, Godeas C, Degan M, Rossi FM, Aldinucci D, Pinto A. Characterization of anti-CD138 monoclonal antibodies as tools for investigating the molecular polymorphism of syndecan-1 in human lymphoma cells. *Br J Haematol* 1999;104:152-62.

6. Sebestyén A, Berczi L, Mihalik R, Paku S, Matolcsy A, Kopper L. Syndecan-1 (CD138) expression in human non-Hodgkin lymphomas. *Br J Haematol* 1999;104:412-9.

7. Inki P, Jalkanen M. The role of syndecan-1 in malignancies [review]. *Ann Med* 1996;28:63-7.

8. Carbone A, Gloghini A, Larocca LM, Capello F, Pierconti F, Canzonieri V, et al. Expression profile of MUM1/IRF4, BCL-6, and CD138/syndecan-1 defines novel histogenetic subsets of human immunodeficiency virus-related lymphomas. *Blood* 2001; 97:744-51.

9. Horvathova M, Gaillard JP, Liautard J, Duperray C, Lavabre-Bertrand T, Bourquard P, et al. B30.6. Identification of novel and specific antigens of human plasma cells by mAb. In: Schlossman SF, Boumsell L, Gilks W, Harlan JM, Kishimoto T, Morimoto C, et al., editors. *Leucocyte typing V. White cell differentiation antigens. Proceedings of the 5th International Workshop and Conference; 1993 Nov 3-7; Boston, USA.* Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press; 1995. p. 713-4.

10. Costes V, Magen V, Legouffe E, Durand L, Baldet P, Rossi J-F, et al. The MI15 monoclonal antibody (anti-syndecan-1) is a reliable marker for quantifying plasma cells in paraffin-embedded bone marrow biopsies. *Hum Pathol* 1999;30: 1405-11.