

MÓDULO DE PATOLOGÍA QUIRÚRGICA GENERAL

1.ª RONDA

Antígeno probado: Ki-67.

Tejido probado: Amígdala.

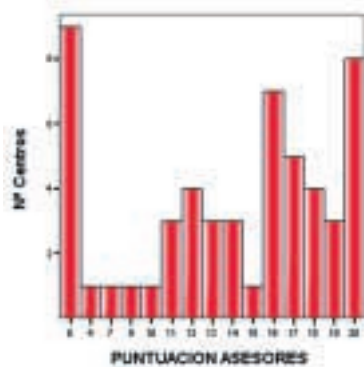
Instrucciones: Los participantes fueron invitados a teñir con Ki-67 la preparación remitida por el programa (amígdala fijada en formol al 10%, pH 7 durante 24 horas) y su propia preparación control, devolviendo ambas preparaciones para su evaluación. Este anticuerpo, por su difusión, ha sido el elegido para valorar la estabilidad de la técnica en el tiempo, y por tanto aparecerá en las tres rondas de este año.

Número de laboratorios participantes:

— Remitidos: 54.

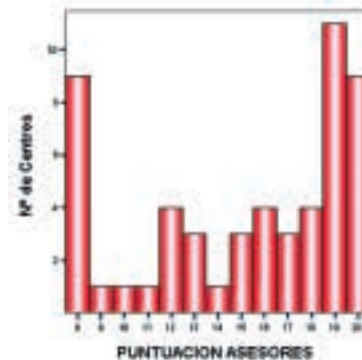
— Contestados: 49.

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



Considerando que una puntuación superior a 12 se considera aceptable, el 75,6 % de las preparaciones remitidas se consideraron como aceptables, con un 60% con una puntuación igual o superior a 16/20, consideradas como óptimas o cercanas. Los principales problemas detectados han sido una alta frecuencia de pretratamiento excesivo (sobrecalentamiento, pH inadecuado) de forma generalizada, y específicamente en los casos con puntuación inferior a 16/20 una intensidad de la tinción o un número de núcleos teñidos inferior al esperable. En los casos con menor puntuación, además, destacaban los artefactos técnicos generales (hidratación, contraste inadecuado por exceso o defecto, defectos en la manipulación con rotura del corte, etc), y especialmente una inadecuada selección de los tejidos control, bien por problemas técnicos (especialmente fijación o artefacto del tejido) o por el tipo de tejido (especialmente tumores con difícil apreciación del número de núcleos inmunorreactivos esperado).

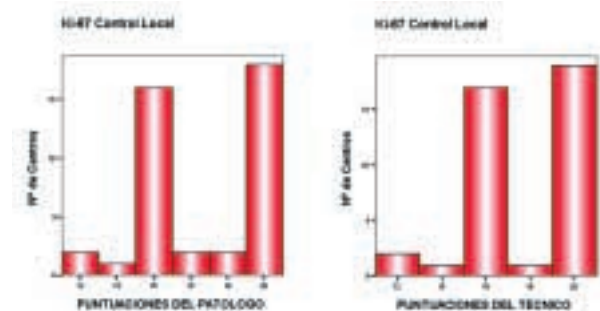
Estudio de los controles remitidos por el programa GCP:



Considerando que una puntuación superior a 12 se considera aceptable, el 84,4% de las preparaciones remitidas se consideraron aceptables, con un 68,9% con una puntuación igual o superior a 16/20, consideradas como óptimas o cercanas. Los principales problemas detectados han sido por una parte una alta frecuencia de pretratamiento excesivo (sobrecalentamiento, pH inadecuado) de forma generalizada, y específicamente en los casos con puntuación inferior a 16/20 una intensidad de la tinción o un número de núcleos teñidos inferior al esperable. En los casos con menor puntuación, además, destacaban los artefactos técnicos generales (hidratación, contraste inadecuado por exceso o defecto, defectos en la manipulación con rotura del corte, etc.).

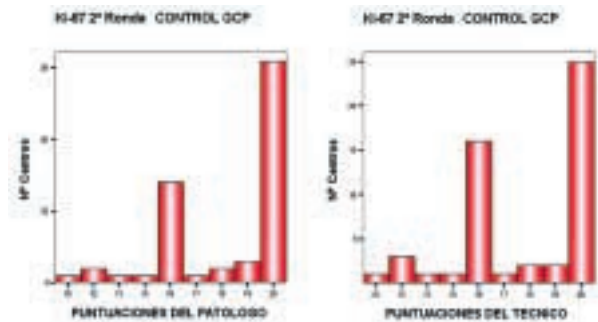
Resultados de la autoevaluación: Como se indica en las instrucciones remitidas, la autoevaluación es una parte importante del programa de Garantía de Calidad. El 86% de los técnicos y el 89% de los patólogos participantes remitieron sus resultados. Los resultados obtenidos en esta ronda son los siguientes:

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 92,5 % de los casos tenían una puntuación igual o superior a 16/20. Este porcentaje era del 87,8% en el caso de los patólogos.

Control del GCP



Los resultados son similares al control local, con un 92,5% de preparaciones con una puntuación igual o superior a 16/20 para los técnicos locales, y un 92,7% para los patólogos.

Inmunotinción óptima: Se consideró una inmunotinción óptima a la que mostraba teñidos el número de núcleos esperado (centros germinales, áreas interfolliculares y porción basal del epitelio) 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.

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

Método: Estreptavidina marcada.

Bloqueo: Agua oxigenada.

Automatización: Dako Techmate 500 u Horizon.

Digestión enzimática: No.

Recuperación antigénica con calor: Olla a presión, 2 minutos a presión máxima, en tandas de 40 preparaciones.

Tampón y pH: Citrato a pH 6.

Anticuerpo primario: Dako, clon MIB1, prediluido durante 25-30 minutos a temperatura ambiente.

Cromógeno: Dako DAB K5001, 5-10 minutos a temperatura ambiente.

Comentarios: En conjunto, la mayoría de los resultados eran adecuados para su utilización rutinaria. Sin embargo hay un porcentaje apreciable con deficiencias técnicas, que podrían ocasionar una infravaloración del número de núcleos inmunorreactivos en un caso problema, que habitualmente no son percibidas ni por el técnico responsable ni por el patólogo. Una de las principales conclusiones que se pueden extraer de la comparación entre los controles locales y los remitidos desde el GCP es la recomendación de emplear como control tejido no neoplásico (p. ej. amígdala) con un número y localización de núcleos inmunorreactivos conocido, y fijado en condiciones conocidas y controladas.

2.ª RONDA

Antígeno probado: Ki-67.

Tejido probado: Amígdala.

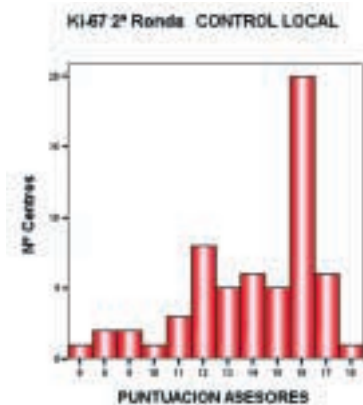
Instrucciones: Los participantes fueron invitados a teñir con Ki-67 la preparación remitida por el programa (amígdala fijada en formol al 10%, pH 7 durante 24 horas) y su propia preparación control, devolviendo ambas preparaciones para su evaluación. Este anticuerpo, por su difusión, ha sido el elegido para valorar la estabilidad de la técnica en el tiempo, y por tanto aparecerá en las tres rondas de este año.

Número de laboratorios participantes:

— Remitidos: 65.

— Contestados: 61 (GCP) y 60 (Control Local).

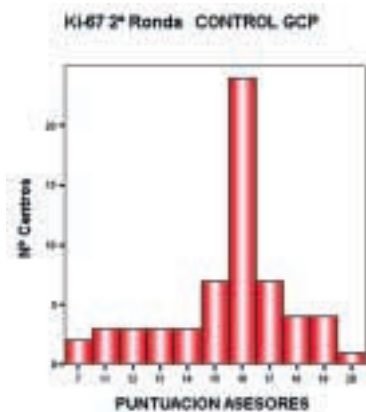
Estudio de los controles de cada centro: Los resultados de la evaluación fueron los siguientes:



Considerando que una puntuación superior a 12 se considera aceptable, el 71,7% de las preparaciones remitidas se consideraron como aceptables, con un 45% con

una puntuación igual o superior a 16/20, consideradas como óptimas o cercanas. Estos resultados son inferiores a los observados en la primera ronda, aunque el mayor número de participantes no permite una comparación adecuada. Los principales problemas detectados han sido una alta frecuencia de pretratamiento excesivo (sobrecalentamiento, pH inadecuado) de forma generalizada, y específicamente en los casos con puntuación inferior a 16/20 una intensidad de la tinción o un número de núcleos teñidos inferior al esperable. En los casos con menor puntuación, además, destacaban los artefactos técnicos generales (hidratación, contraste inadecuado por exceso o defecto, defectos en la manipulación con rotura del corte, etc), y especialmente una inadecuada selección de los tejidos control, bien por problemas técnicos (especialmente fijación o artefacto del tejido) o por el tipo de tejido (especialmente tumores con difícil apreciación del número de núcleos inmunorreactivos esperado).

Estudio de los controles remitidos por el programa GCP:

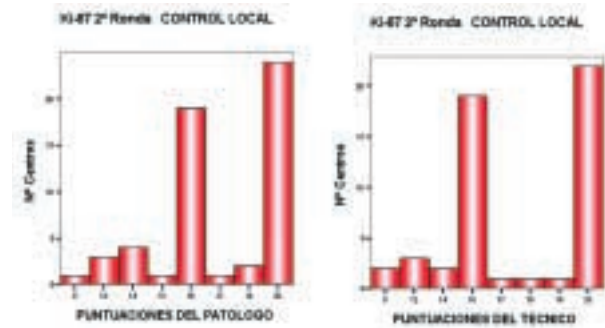


Considerando que una puntuación superior a 12 se considera aceptable, el 86,9% de las preparaciones remitidas se consideraron aceptables, ligeramente superior al de la primera ronda. Un 65,6% obtuvieron una puntuación igual o superior a 16/20, consideradas como óptimas o cercanas. Los principales problemas detectados han sido por una parte una alta frecuencia de pretratamiento excesivo (sobrecalentamiento, pH inadecuado) de forma generalizada, y específicamente en los casos con puntuación inferior a 16/20 una intensidad de la tinción o un número de núcleos teñidos inferior al esperable. En los casos con menor puntuación, además, destacaban los artefactos técnicos generales (hidratación, contraste inadecuado por exceso o defecto, defectos en la manipulación con rotura del corte, etc)

Resultados de la autoevaluación: Como se indica en las instrucciones remitidas, la autoevaluación es una

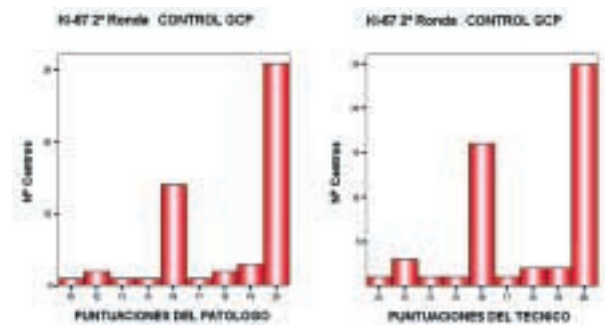
parte importante del programa de Garantía de Calidad. El 85% de los técnicos y el 91,7% de los patólogos participantes remitieron sus resultados. Los resultados obtenidos en esta ronda son los siguientes:

Control Local



Como se puede observar en los gráficos, al igual que en la 1.ª ronda la percepción local sobre los resultados de la técnica es superior a la valoración de los observadores externos. Para los técnicos participantes el 86,3% de los casos tenían una puntuación igual o superior a 16/20, ligeramente inferior al observado en la 1ª ronda. Este porcentaje era del 83,6% en el caso de los patólogos, con similar variación respecto a la ronda anterior.

Control del GCP



Los resultados son similares al control local, con un 88,5% de preparaciones con una puntuación igual o superior a 16/20 para los técnicos, y un 91,1% para los patólogos, ambos ligeramente inferiores a los observados en la 1.ª ronda.

Inmunotinción óptima: Se consideró una inmunotinción óptima a la que mostraba teñidos el número de núcleos esperado (centros germinales, áreas interfoliculares y porción basal del epitelio) 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.

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

Método: Dako Envision.

Bloqueo:

Automatización: Dako Techmate 500.

Digestión enzimática: No.

Recuperación antigénica con calor: Olla a presión, 5 minutos a presión máxima.

Tampón y pH: Citrato a pH 6,2.

Anticuerpo primario: ATOM, NCL-Ki-67-MMI, dilución 1/10 durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Cromógeno: Dako DAB K5007, 5-10 minutos a temperatura ambiente.

Comentarios: En conjunto, la mayoría de los resultados eran adecuados para su utilización rutinaria. Sin embargo hay un porcentaje apreciable con deficiencias técnicas, que podrían ocasionar una infravaloración del número de núcleos inmunorreactivos en un caso problema, que habitualmente no son percibidas ni por el técnico responsable ni por el patólogo. Una de las principales conclusiones que se pueden extraer de la comparación entre los controles locales y los remitidos desde el GCP es la recomendación de emplear como control tejido no neoplásico (p. ej. amígdala) con un número y localización de núcleos inmunorreactivos conocido, y fijado en condiciones conocidas y controladas.

3.ª RONDA

Antígeno probado: Ki-67.

Tejido probado: Amígdala.

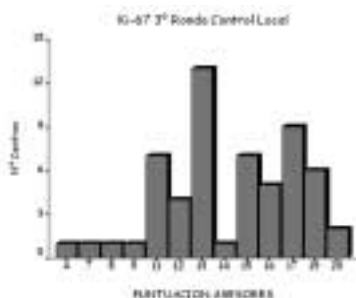
Instrucciones: Los participantes fueron invitados a teñir con Ki-67 la preparación remitida por el programa (amígdala fijada en formol al 10%, pH 7 durante 24 horas) y su propia preparación control, devolviendo ambas preparaciones para su evaluación. Este anticuerpo, por su difusión, ha sido el elegido para valorar la estabilidad de la técnica en el tiempo, y por tanto ha sido incluido en las tres rondas de este año.

Número de laboratorios participantes:

— **Remitidos:** 76.

— **Contestados:** 63 (GCP) y 58 (Control Local).

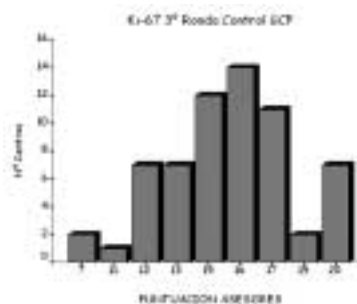
Estudio de los controles de cada centro: Los resultados de la evaluación fueron los siguientes:



Considerando que una puntuación superior a 12 se considera aceptable, el 74,1% de las preparaciones remitidas se consideraron como aceptables, con un 37,9% con una puntuación igual o superior a 16/20, consideradas como óptimas o cercanas. Estos resultados son ligeramente distintos a los observados en la segunda ronda, con un aumento ligero de las preparaciones aceptables y una lige-

ra disminución de las óptimas. Los principales problemas detectados han sido una alta frecuencia de pretratamiento excesivo (sobrecalentamiento, pH inadecuado) de forma generalizada, y específicamente en los casos con puntuación inferior a 16/20, una intensidad de la tinción o un número de núcleos teñidos inferior al esperable. En los casos con menor puntuación, además, destacaban los artefactos técnicos generales (hidratación, contraste inadecuado por exceso o defecto, defectos en la manipulación con rotura del corte, etc), y especialmente una inadecuada selección de los tejidos control, bien por problemas técnicos (especialmente fijación o artefacto del tejido) o por el tipo de tejido (especialmente tumores con difícil apreciación del número de núcleos inmunorreactivos esperable).

Estudio de los controles remitidos por el programa GCP:

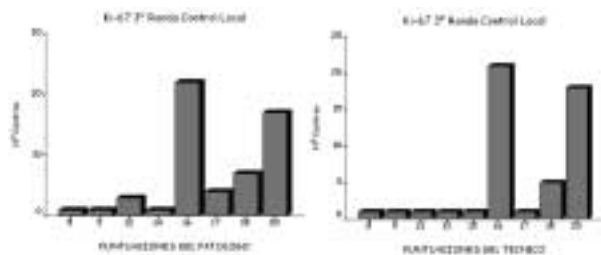


Considerando que una puntuación superior a 12 se considera aceptable, el 84,1% de las preparaciones remitidas se consideraron aceptables, ligeramente inferior al

de la segunda ronda. Un 54% obtuvieron una puntuación igual o superior a 16/20, consideradas como óptimas o cercanas. Los principales problemas detectados han sido por una parte una alta frecuencia de pretratamiento excesivo (sobrecalentamiento, pH inadecuado) de forma generalizada, y específicamente en los casos con puntuación inferior a 16/20 una intensidad de la tinción o un número de núcleos teñidos inferior al esperable. En los casos con menor puntuación, además, destacaban los artefactos técnicos generales (hidratación, contraste inadecuado por exceso o defecto, defectos en la manipulación con rotura del corte, etc.).

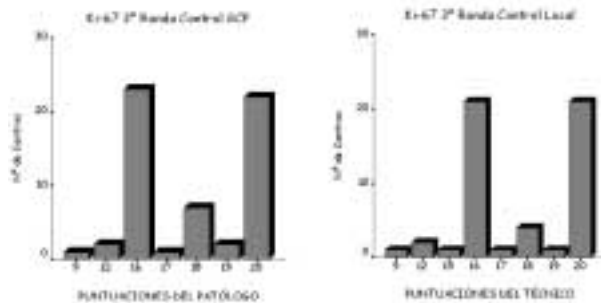
Resultados de la autoevaluación: Como se indica en las instrucciones remitidas, la autoevaluación es una parte importante del programa de Garantía de Calidad. El 65,8% de los técnicos y el 73,7% de los patólogos participantes remitieron su valoración de los controles locales y el 68,4 y el 76,3 respectivamente del control del GCP. Los resultados obtenidos en esta ronda son los siguientes:

Control Local



Como se puede observar en los gráficos, al igual que en las rondas anteriores la percepción local sobre los resultados de la técnica es superior a la valoración de los observadores externos. Para los técnicos participantes el 90 % de los casos tenían una puntuación igual o superior a 16/20, similar a la de las anteriores rondas. Este porcentaje era del 89,3% en el caso de los patólogos.

Control del GCP



Los resultados son similares al control local, con un 92,3% de preparaciones con una puntuación igual o superior a 16/20 para los técnicos, y un 94,8% para los patólogos, ambos ligeramente superiores a los observados en la 2.ª ronda, y similares a los de la 1ª ronda. Sigue observándose una notable discrepancia con las valoraciones de los asesores externos (54% frente a 94,8%).

Inmunotinción óptima: Se consideró una inmunotinción óptima a la que mostraba teñidos el número de núcleos esperado (centros germinales, áreas interfoliculares y porción basal del epitelio) 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.

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

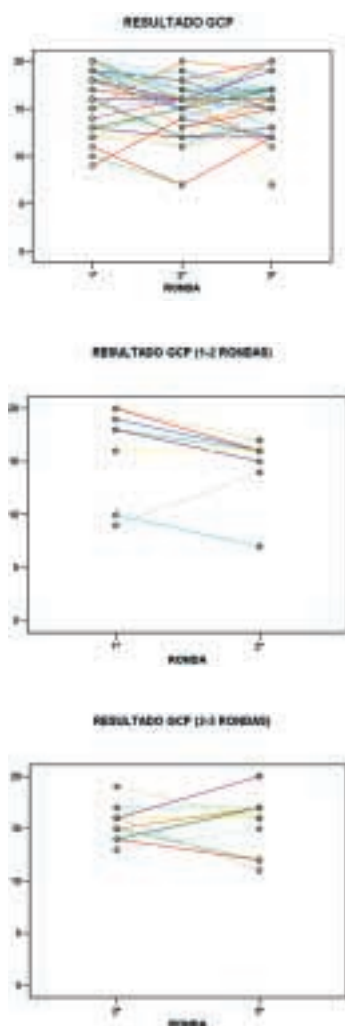
- Método:* Dako Envision, Streptavidina marcada.
- Bloqueo:* Agua oxigenada.
- Automatización:* Dako Techmate 500, Biogenex Optimax.
- Digestión enzimática:* No.
- Recuperación antigénica con calor:* Olla a presión, 5 minutos a presión máxima.
- Tampón y pH:* Citrato a pH 6-6,5.
- Anticuerpo primario:* DAKO, clon MIB-1, dilución 1/50- 1/100 durante 20-30 minutos a temperatura ambiente.
- Cromógeno:* Dako DAB K5007, 5-10 minutos a temperatura ambiente.

Comentarios: En conjunto, la mayoría de los resultados eran adecuados para su utilización rutinaria. Sin embargo hay un porcentaje apreciable con deficiencias técnicas, que podrían ocasionar una infravaloración del número de núcleos inmunorreactivos en un caso problema, que habitualmente no son percibidas ni por el técnico responsable ni por el patólogo. Una de las principales conclusiones que se pueden extraer de la comparación entre los controles locales y los remitidos desde el GCP es la recomendación de emplear como control **tejido no neoplásico** (p. ej. amígdala) con un **número y localización de núcleos inmunorreactivos conocido**, y fijado en condiciones conocidas y controladas.

ANÁLISIS COMPARATIVO DE LAS TRES RONDAS

El objetivo de incluir este anticuerpo en las tres rondas del año 2004 era intentar evaluar la estabilidad y la reproducibilidad de la técnica dentro de cada laboratorio, así como sus variaciones a lo largo de un periodo relativamente prolongado. Idealmente se habrían comparado los tres resultados de cada laboratorio; sin embargo sólo se disponen de datos en las tres rondas de 37 laboratorios (48,7%). Con datos de la 1.ª y la 2.ª rondas hay 8 (10,5%) y de la 2.ª y 3.ª rondas 15 (19,7%). Los datos analizados corresponden a la preparación remitida por el GCP, para evitar factores locales difícilmente evaluables.

Al analizar los valores absolutos de las puntuaciones obtenidas se observa una notable variación, si bien la amplia escala empleada (4-20) con 16 valores disponibles facilita variaciones puntuales. Aún así, es importante destacar que ningún laboratorio consiguió mantener un nivel óptimo (20 puntos) en las tres rondas. En las gráficas siguientes se presentan los resultados de acuerdo con el número de rondas participadas.



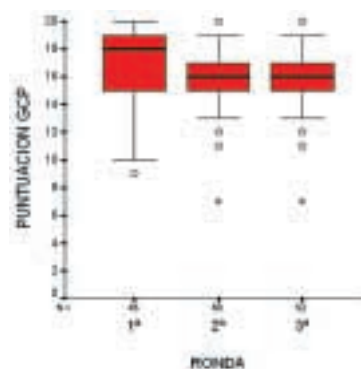
Para el análisis estadístico, de comparación de medias, los hospitales que participaron en las tres rondas se distribuyen en los grupos 1.ª-2.ª y 2.ª-3.ª, de tal modo que quedan 45 en el primer grupo y 52 en el segundo. Los valores medios de puntuación por rondas son:

Ronda	1.ª	2.ª		3.ª
Media	16,71	15,38	15,58	15,69

Hay diferencias estadísticamente significativas entre la 1.ª y la 2.ª ronda ($p < 0,004$), pero no entre la 2.ª y la 3.ª ronda ($p = 0,556$).

Al estudiar únicamente los laboratorios con resultados en las tres rondas vuelven a observarse diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,014$), principalmente por el alto valor de la 1.ª ronda respecto a las otras dos

Ronda	1.ª	2.ª	3.ª
Media	16,81	15,54	15,49



En la gráfica la línea negra representa la mediana, la caja roja media más una desviación estándar, las barras media más dos desviaciones estándar y el resto (círculos y asteriscos) los valores extremos. Aunque los grupos no son homogéneos puede interpretarse que los valores de la 1.ª ronda, más elevados que el resto, los son por el efecto de inicio del control (probablemente un mayor control de la realización de la técnica) y que la disminución y estabilización posterior reflejan más fielmente los resultados que se obtienen de forma rutinaria. Aunque es posible no parece haber un efecto notable de cambios o modificaciones en la técnica como consecuencia de los resultados del programa de GCP, aunque es muy pronto todavía para notar sus posibles efectos.

Otra forma de analizar los resultados es categorizar las puntuaciones y analizar el cambio o la permanencia de grupo. Así se han considerado tres grupos. El primero con puntuaciones iguales o inferiores a 12, el segundo entre 13 y 15 y el tercero igual o superior a 16.

De los 37 laboratorios con datos de las tres rondas un 32,4% permanecieron en el mismo grupo, otro 32,4%

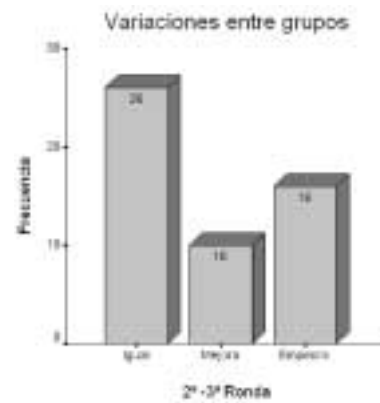
empeoró a lo largo de las tres rondas, un 21,6 mejoró y el resto, 13,6%, presenta variaciones inclasificables (la 2.ª ronda mejor que la 1.ª y peor que la 3.ª p. ej.).



Atendiendo a los datos correspondientes a las dos primeras rondas exclusivamente un 66,7% permanecieron en el mismo grupo, con un 15,6% de mejora y un 17,8% empeoramiento, sobre un total de 45 laboratorios evaluables.

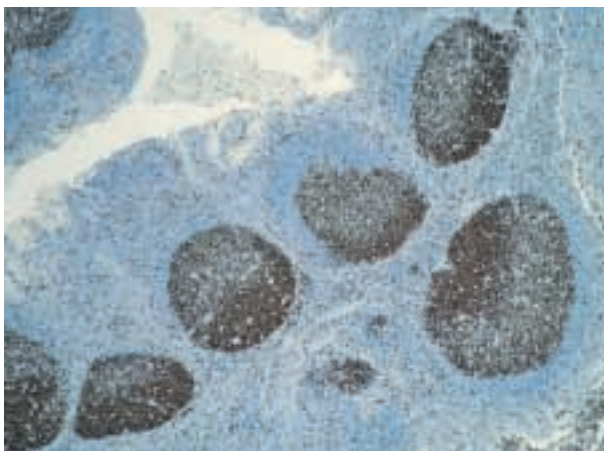


De las dos últimas rondas con datos evaluables de 52 laboratorios, un 50% permanecieron en el mismo grupo, un 19% mejoraron y un 31% empeoraron.



Estos datos no reflejan la situación individual de cada laboratorio. Es decir entre los laboratorios que no varían se han contabilizado tanto los que mantienen altas puntuaciones como los que las mantienen bajas.

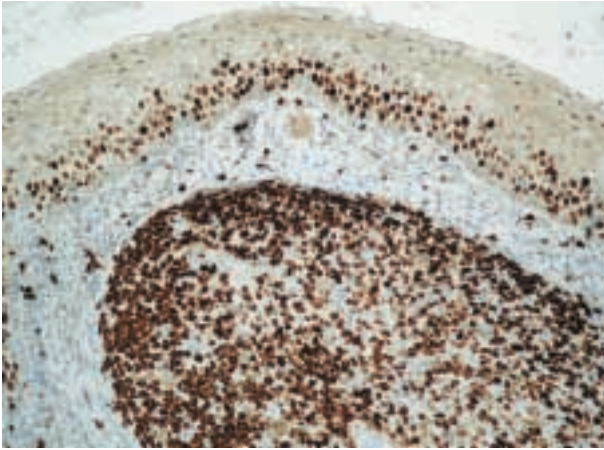
Aunque son datos preliminares y con una notable heterogeneidad si que se puede afirmar, sin correr un riesgo excesivo, que con frecuencia se aprecian variaciones a lo largo del tiempo en los resultados de la determinación inmunohistoquímica de Ki-67, y que es preciso extremar el cuidado en los detalles técnicos, así como en la calidad de los reactivos empleados para obtener una técnica reproducible dentro de un mismo laboratorio a lo largo del tiempo. Es especialmente remarcable que sólo un tercio de los laboratorios consiguieron mantenerse en el mismo grupo de resultados a lo largo de las tres rondas realizadas en 2004.



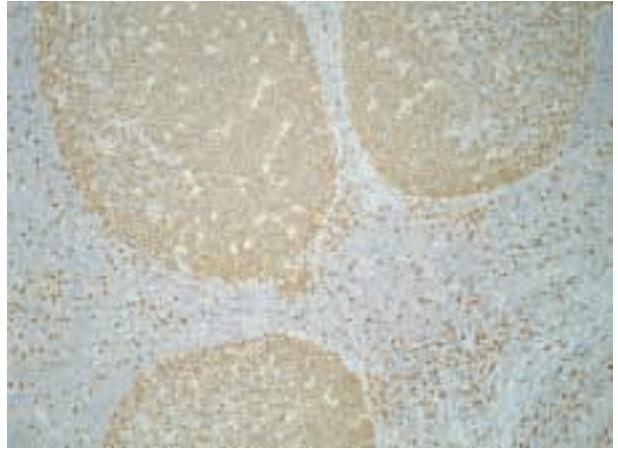
KI67-1: Control del GCP valorado como 20/20. Adecuada inmunorreactividad nuclear limitada a los centros foliculares y escasas células interfoliculares. La tinción permite apreciar la zonificación del centro folicular.



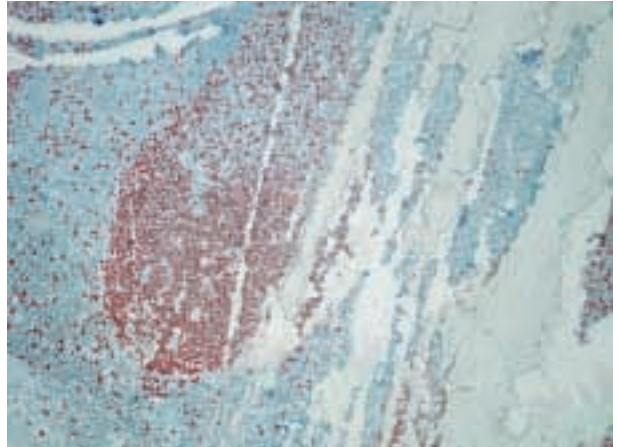
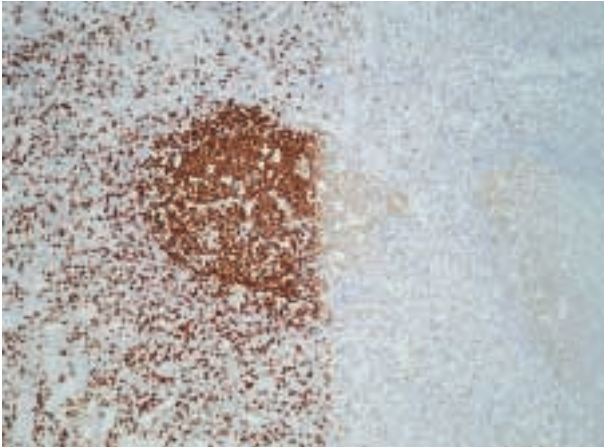
KI67-2: Control del GCP valorado como 19/20. Detalle de la inmunorreactividad nuclear en el centro folicular y en la capa de células basales del epitelio amigdalal. Ligera contratinción de fondo.



KI67-3: Control del GCP valorado como 16/20. Aunque la distribución y la intensidad de la tinción son adecuadas se aprecia una ligera tinción de fondo más patente en las células epiteliales superficiales.



KI67-4: Control del GCP valorado como 14/20. Aunque la distribución de la tinción es adecuada se aprecia una notable disminución de la intensidad en relación con las anteriores.



KI67-5 y 6: Controles del GCP con penalización de la valoración por irregularidad zonal de la tinción o artefactos de técnica histológica (arañazos, hidratación).