



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

8ª RONDA

Antígeno probado: CD8

Tejido probado: Amígdala

Instrucciones: Los participantes fueron invitados a demostrar CD8 en las preparaciones proporcionadas.

CD8: es una glicoproteína de membrana de 30-34 kDa que se encuentra en:

- células T citotóxicas y células (NK) Natural Killer
- 80% de los timocitos,
- 20-35% de linfocitos periféricos
- 80% de las células T intra-epiteliales
- células sinusoides del bazo y alguna célula aislada T

En Amígdala se expresa en la zona interfolicular en aproximadamente el 30-40% de las células T. Las células B deben ser negativas.

Número de laboratorios participantes:

- **Inscritos:** 89 centros
- **Contestados:** 62 para el control GCP, con una participación del 70%

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

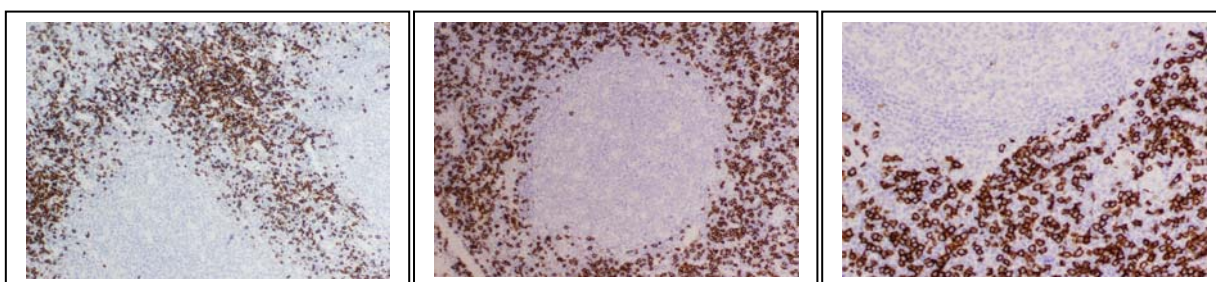
PUNTUACION	PATRON DE TINCION
0	No remisión de preparaciones
1-2	Ausencia de señal o tinción de membrana inferior de lo esperado, tanto en nº de células como en intensidad. No óptimo para ser utilizado en diagnóstico.
3	Tinción válida para diagnóstico, aunque mejorable
4-5	Tinción generalizada esperada: con adecuada inmunoreactividad de membrana en las células T

Para la valoración, se han tenido en consideración otras variables, tales como:

- 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 T interfoliculares de la amígdala
- Ausencia total de fondo
- Buena técnica histológica



Resultados de la Evaluación

Anticuerpos y métodos evaluados:

- Anticuerpos primarios

Anti-CD8	Casa Comercial
4B11	Novocastra, VI TRO,
C8/ 144B	DAKO, NEOMARKERS, ATOM
1A5	Novocastra, Biocare
SP16	MASTER DI AGNOSTI CA
1B12	MENARI NI

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

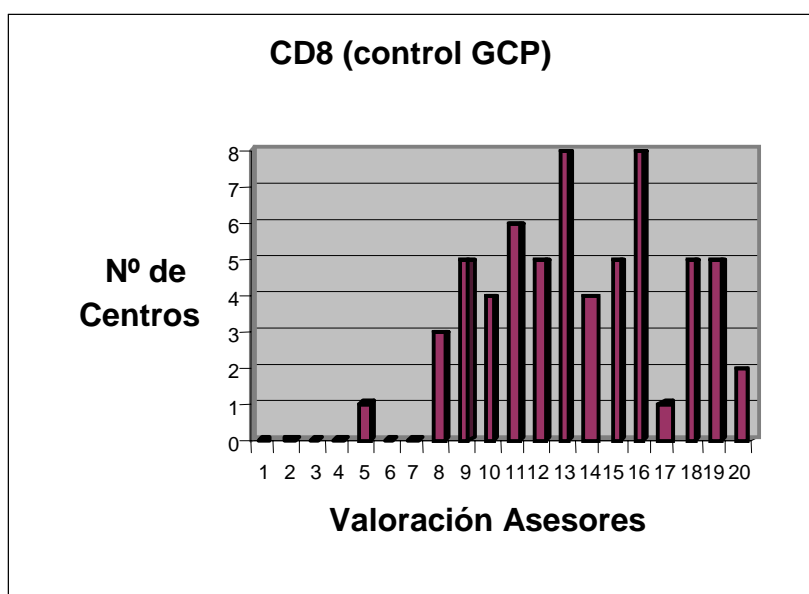
Sistemas de Visualización:

- I VIEW 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 CD8. La participación ha sido del 70%

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

El reparto de puntuación se puede apreciar en las siguientes gráficas:



Gráfica nº 1

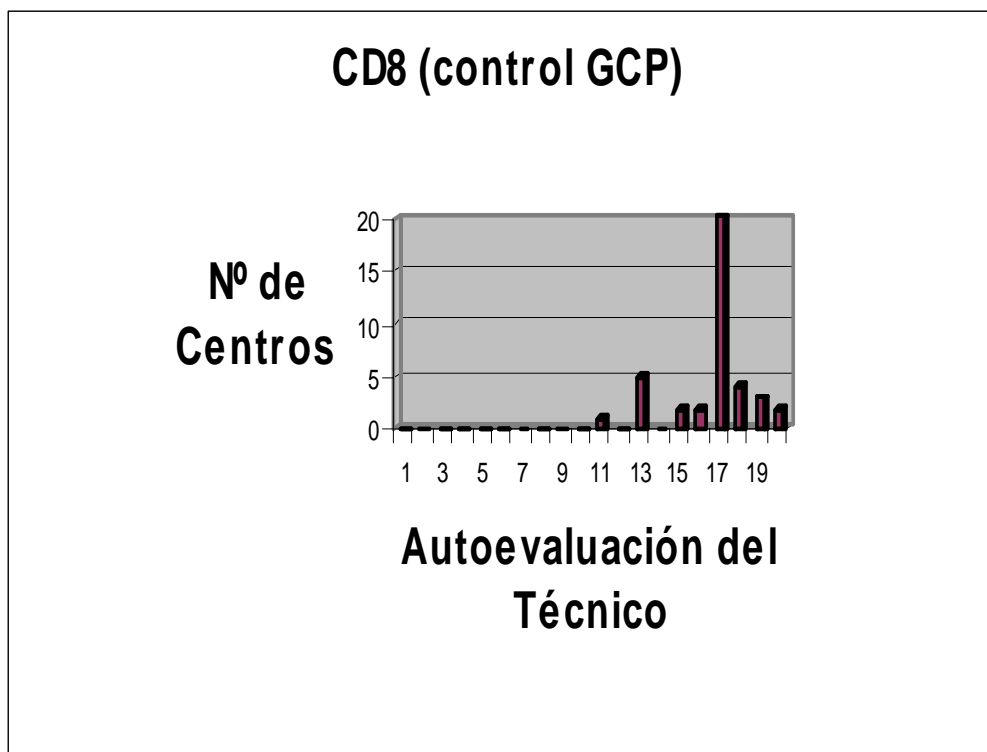
La Grafica nº 1, refleja los resultados globales en el control de amígdala que se envió a cada uno de los centros.

Se observa:

- Inmunotinción óptima para el diagnóstico con valores de 12 o superior, en el 69 % de los centros remitidos.
- Inmunotinción buena con valoraciones iguales o superior a 16: el 34%.
- Inmunotinción excelente con valor de 20: 3%

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

La participación ha sido del 95% y los resultados son los reflejados en la siguiente gráfica:

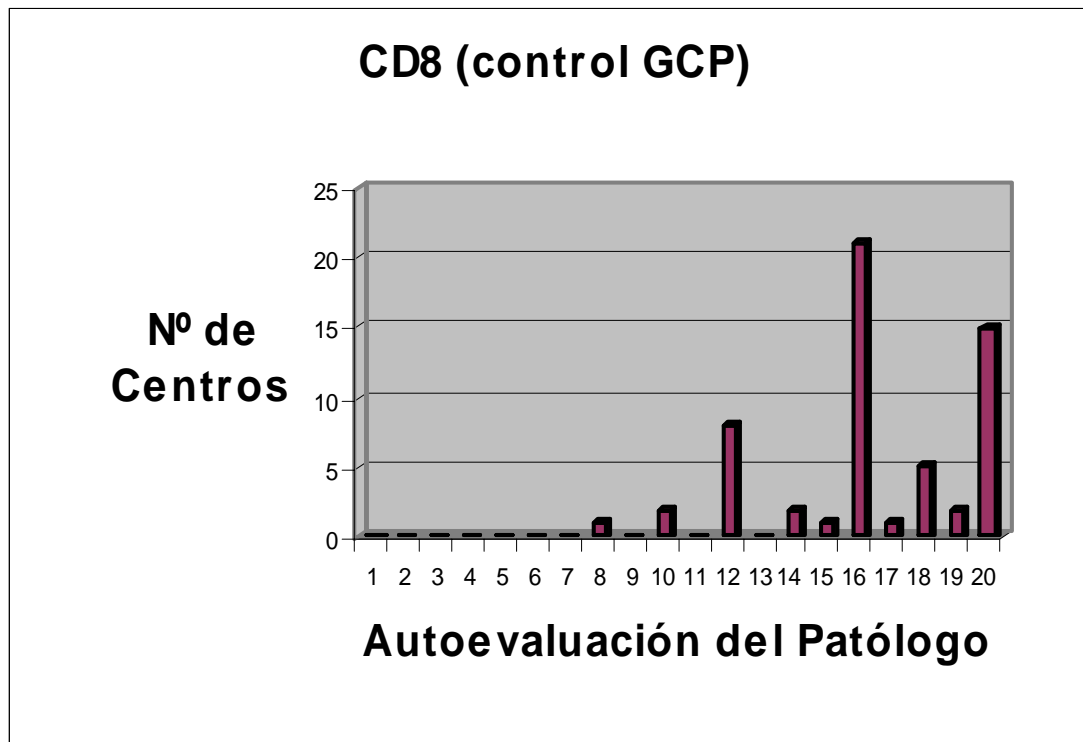


Grafica nº 2

- Inmunotinción óptima para el diagnóstico, el 98 % de los centros remitidos.
- Inmunotinción buena con valoraciones iguales o superior a 16: el 83%.
- Inmunotinción excelente con valor de 20: el 34%

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

La participación ha sido del 94%

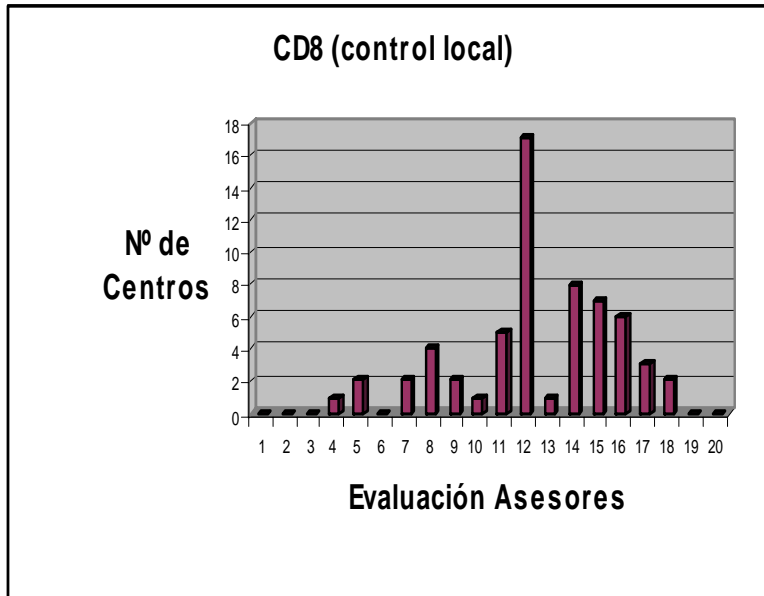


Gráfica 3

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

- Valoraciones de 12 o superior en el 95% de los centros
- Valoración de 16 o superior, en el 76% de los centros
- Valoración de 20: en el 26%

2.a.- Estudio de controles locales de cada centro: Las puntuaciones otorgadas por el grupo de 4 asesores en la 8ª Ronda de Patología Linfoide, en los controles locales remitidos fue según se refleja en la gráfica:

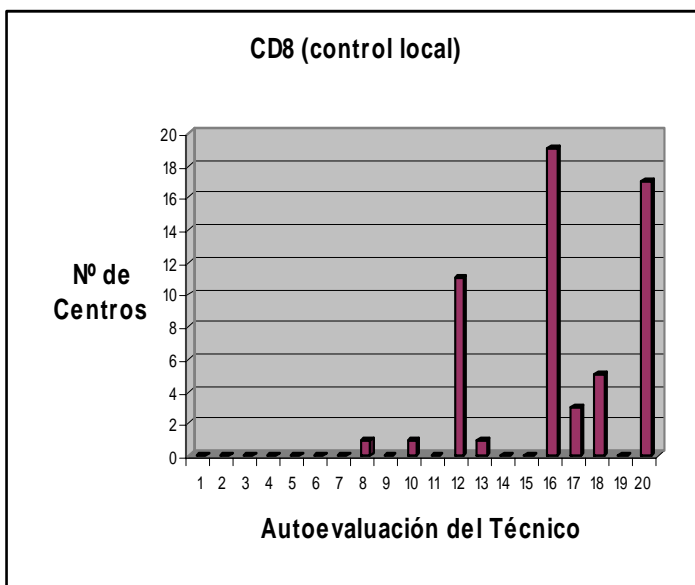


Gráfica 4

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 72% global
- Valoración de 16 o superior: el 18% global
- Ningún centro con valoración excelente

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

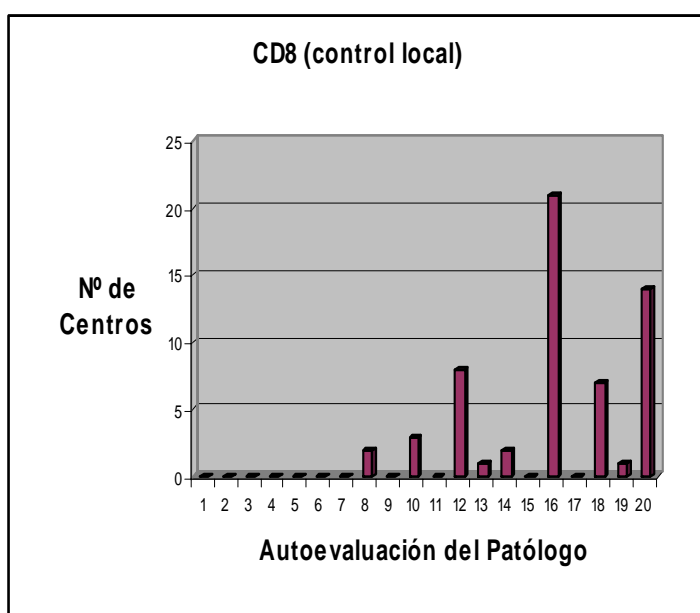


Gráfica 5

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

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 Envision K5007
- Inmunoteñidor automático: TechMate Horizon de Dako
- Buffer y pH: Buffer Dako
- Bloqueo: H₂O₂
- Recuperación antigénica: Olla a presión, 2 minutos, tampón EDTA pH 8
- Anticuerpo primario: Clon SP16 de Master Diagnostica, prediluido, 30 minutos a t^a ambiente
- Cromógeno: DAB

B)

- ❑ Método de Visualización: Polímero Bio-Systems
- ❑ Inmunoensayador automático: BOND-MAX
- ❑ Bloqueo: H₂O₂
- ❑ Recuperación antigénica: Información no aportada
- ❑ Anticuerpo primario: Clon C8/144 de DAKO, a dilución 1:100
- ❑ Cromógeno: DAB

4. -Comentarios:

Los resultados a nivel global indican una demostración de CD8 óptima para el diagnóstico. Siendo aconsejable revisar los mejores protocolos para aquellos laboratorios donde no fue 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
- ❑ tinción focal
- ❑ débil reactividad
- ❑ tinción con fondo

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:

Mason DY, Cordell JL, Gaulard P, Tse AG, Brown MH. Immuno-histological detection of human cytotoxic/suppressor T cells using antibodies to a CD8 peptide sequence. *J Clin Pathol.* 1992 Dec;45(12):1084-8.

Patey-Mariaud de Serre N, Cellier C, Jabri B et al: Distinction Between Coeliac Disease and Refractory Sprue: A Simple Immu-nohistochemical Method. *Histopathology* 37:70-77, 2000.

Williamson SL, Steward M, Milton I, Parr A, Piggott NH, Krajewski AS, Angus B, Horne CH. New monoclonal antibodies to the T cell antigens CD4 and CD8. Production and characterization in forma-lin-fixed paraffin-embedded tissue. *Am J Pathol.* 1998 Jun;152(6):1421-6