



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

Ronda nº 4

Antígeno probado: CD10

Tejido probado: Amígdala

Instrucciones: Los participantes fueron invitados a teñir con CD10 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.

CD10 o Common acute lymphocytic leukemia antigen (CALLA) es un marcador de superficie celular. Esta glicoproteína de 90-110 kDa (también llamada neprilisina y endopeptidasa neutra) es una peptidasa dependiente del zinc, que degrada diversos péptidos bioactivos. Parece tener un papel modulador de la respuesta celular a sustratos peptídicos.

Expresión en tejidos normales: CD10 se expresa en una gran variedad de tejidos normales, como en el borde en cepillo de los enterocitos de la parte superior del tracto gastrointestinal, en los conductillos biliares, en riñón a nivel del epitelio glomerular y del borde en cepillo de las células de los túbulos proximales, en células mioepiteliales mamarias, en glándulas salivares y sudoríparas, células glandulares prostáticas, células estromales endometriales, algunas células endoteliales, células trofoblásticas placentarias, y una minoría de miofibroblastos (incluyendo células perianexiales de la piel). También se detecta en la metaplasia apocrina mamaria. En medula ósea se expresa en la superficie de las stem cells y en células mielopoyéticas (incluidos neutrófilos).

En los tejidos linfoides no neoplásicos, CD10 se expresa intensamente en las células de los centros foliculares (folículos secundarios) y en los endotelios vasculares, con un patrón de tinción de membrana con variable difusión a citoplasma. Puede encontrarse también en algunos pocos linfocitos B maduros y en una subpoblación de linfocitos T parafoliculares.

Expresión en Neoplasias: se trata de un marcador importante para el diagnóstico de la Leucemia Linfoblástica Aguda, ya que esta presente en las células leucémicas de fenotipo pre-B, que representan al 85% de los casos de LLA. Se expresa también en el Linfoma Folicular, Linfoma de Burkitt, algunos casos de Linfoma Difuso de Célula Grande y algunos linfomas del manto. Se demuestra en la mayoría de los Linfomas T angioinmunoblásticos y algunas leucemias/linfomas linfoblasticos T. También se detecta en crisis blásticas linfoides de la leucemia mieloide.

Entre las neoplasias no hematológicas, CD10 se expresa en la mayoría de los sarcomas del estroma endometrial, en la mayoría de los hepatocarcinomas, carcinomas de células renales (excepto el cromóforo), carcinomas uroteliales, carcinomas prostáticos, tumor pancreático sólido pseudopapilar y algunos casos de otros carcinomas, como carcinomas colorectales de patrón de crecimiento agresivo. Se ha descrito su expresión en carcinomas mamarios metaplásicos. En algunos carcinomas mamarios, las células estromales que rodean a nidos infiltrantes expresan CD10, lo que se ha asociado a peor pronóstico.

Utilidad: La principal utilidad de este marcador es la clasificación de las leucemias/linfomas B, aunque también puede ser válido para la identificación de carcinomas (como el hepatocelular y el de células renales o el metaplásico mamario) y del sarcoma estromal uterino.

Número de laboratorios participantes:

- Remitidos: 83
- Contestados: 62, (74,7%) para el GCP y 60 (72,3%) para el Control Local.

Anticuerpos y Métodos evaluados:

Anticuerpos Primarios, proveedores y diluciones:

Proveedor	Código	Clon	Dilución
Biocare Medical	CM129C	56C6	1/10-1/20-1/50
Biocare Medical	PM129AA	56C6	Prediluido
Novocastra	NCL-CD10-270	56C6	1/10-1/15-1/20- 1/25-1/30-1/50- 1/80-1/100- 1/200
Novocastra	RTU-CD10-270	56C6	Prediluido
Master Diagnóstica	002022QD	56C6	Prediluido
Zymed	08-1287	56C6	Prediluido

Recuperación antigénica:

- Microondas
- Olla a presión
- Baño María
- Autoclave
- PT Module Lab Vision
- Raypa Termostatic Bath
- Dectocking Chamber de Biocare Medical
- Benchmark Ventana
- BondMax Vision Biosystems
- Digestión enzimática con Proteinasa K

Detección:

- Dako Envision
- Dako LSAB+/2
- Kit Ventana
- Kit Bond Polymer Define Detection Vision Biosystems
- Biogenex

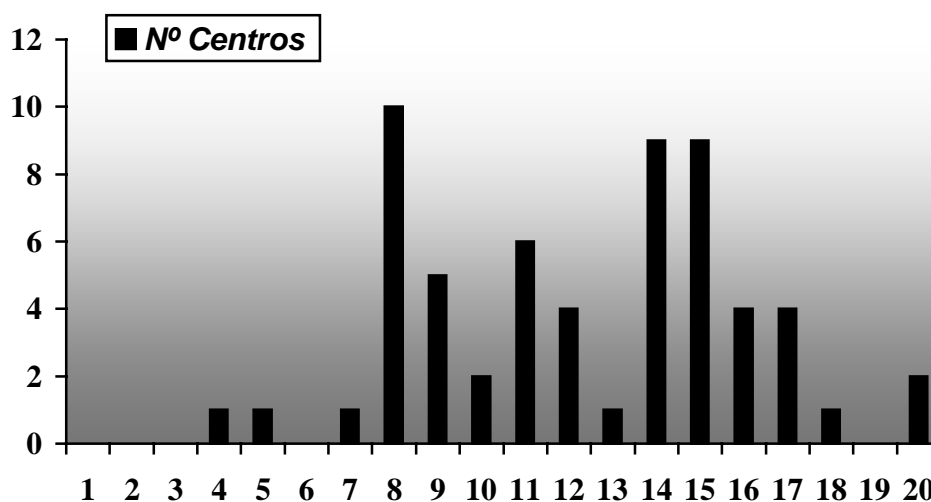
Automatización:

- Dako Techmate 500
- Lab Vision Autostainer
- Biogenex 6000
- Ventana Benchmark XT
- Bond Max Vision Biosystems

Estudio de los controles locales:

Los controles locales correspondían a tejidos linfoides (amígdalas, ganglios linfáticos no neoplásicos, linfomas) y riñón normal.

Los resultados de la evaluación fueron los siguientes:



PUNTUACION DE LOS ASESORES

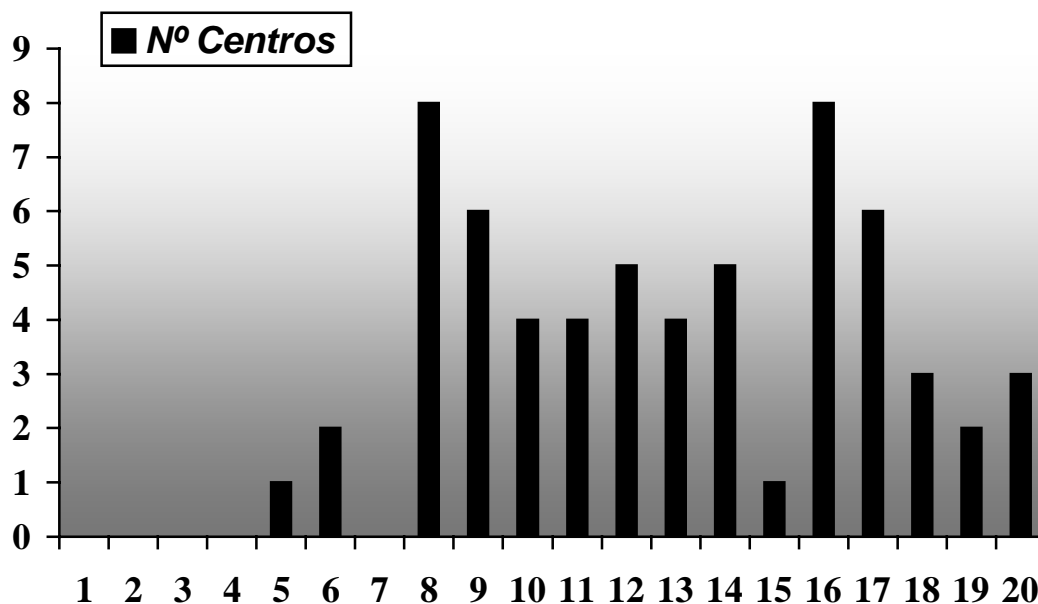
Ya que una puntuación igual o superior a 12 se considera aceptable, el 55% (33) de las 60 preparaciones remitidas se consideraron como aptas, con un 18,3% (11) con una puntuación igual o superior a 16/20, consideradas como óptimas o cercanas.

Un 45% (26) de los centros participantes no alcanza el nivel mínimo para considerar que la técnica puede aplicarse de manera rutinaria.

El principal problema detectado ha sido la escasa sensibilidad de la técnica, con una intensidad de la tinción o número de células inmunorreactivas inferior al esperable. Problemas menos frecuentes, han sido los artefactos técnicos generales y los debidos a un exceso de pretratamiento.

Estudio de los controles remitidos por el programa GCP:

Se remitió un corte de amígdala fijada en formol e incluida en parafina para su inmunotinción para CD10. El resultado de la evaluación fue:



PUNTUACION DE LOS ASESORES

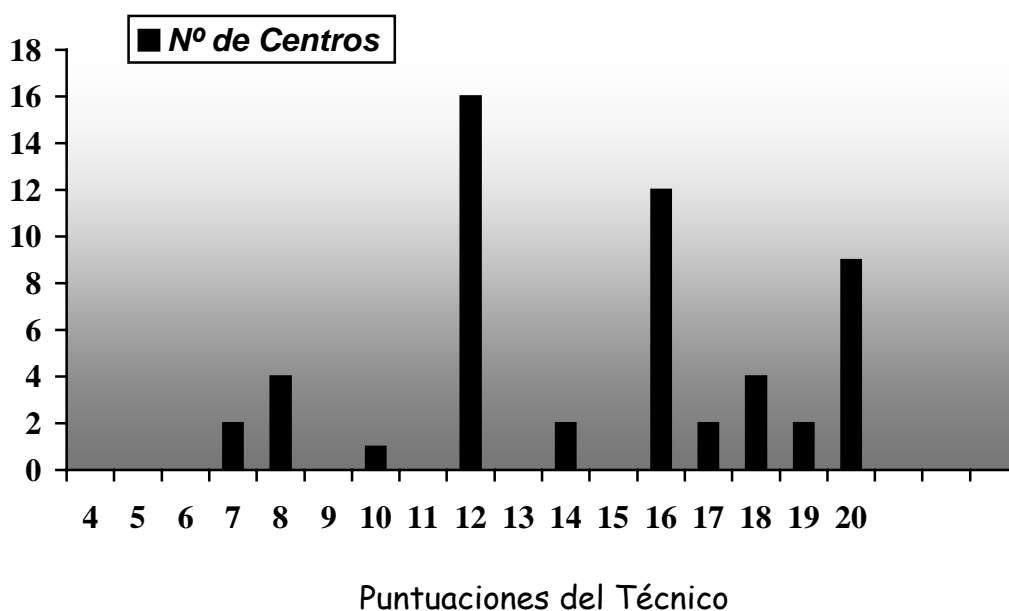
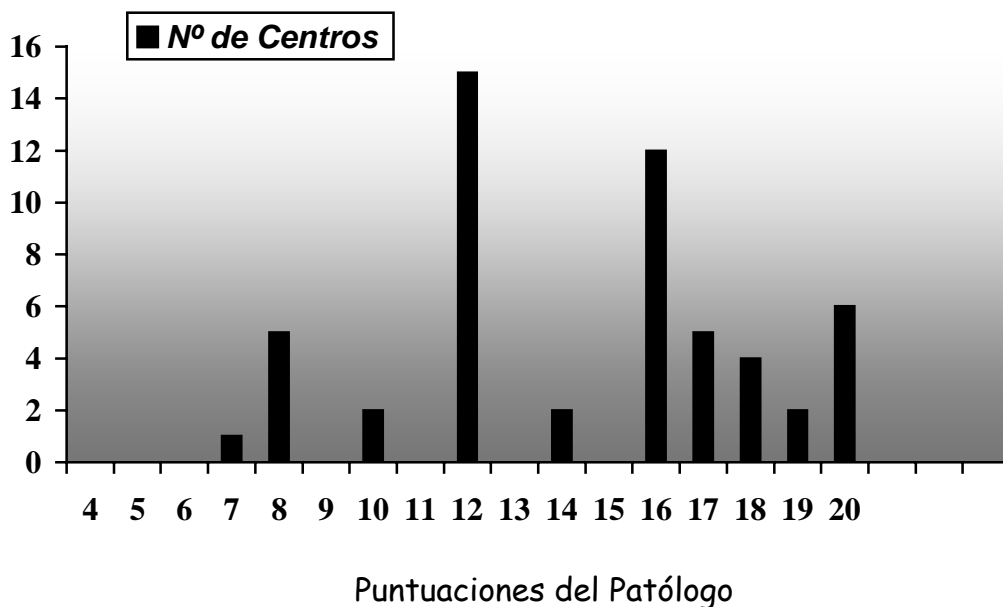
Si consideramos aceptable una puntuación igual o superior a 12, el 59,6% (37) de las 62 preparaciones remitidas alcanzaron este nivel. Un 35,5% (22) obtuvieron una puntuación igual o superior a 16/20, considerada como óptima o cercana. Un 40,3% (25) de los centros no alcanzaron la calidad suficiente para considerar que la técnica puede aplicarse de manera rutinaria.

Al igual que en el control local, pero de manera algo menos llamativa, la técnica ha mostrado en un elevado porcentaje de centros muy escasa sensibilidad, con intensidades y detección de células muy inferiores a lo esperable.

Resultados de la autoevaluación:

El 90% de los técnicos y patólogos remitieron su valoración de los controles locales. Respecto a la evaluación de los controles GCP, el 88,7% de los técnicos y el 90,3% de los patólogos participantes realizaron la evaluación. Los resultados obtenidos del análisis de tales datos son los siguientes:

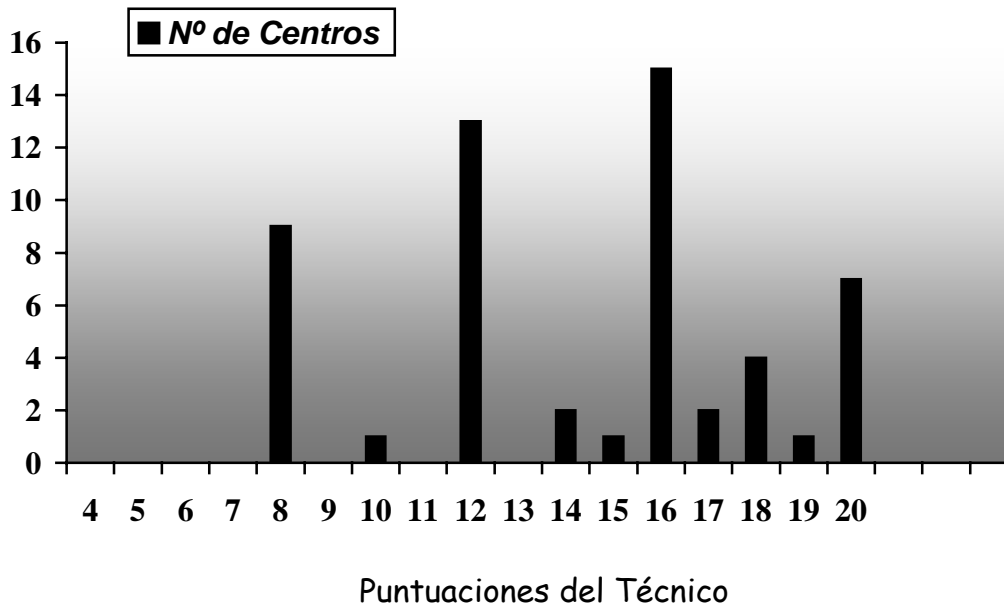
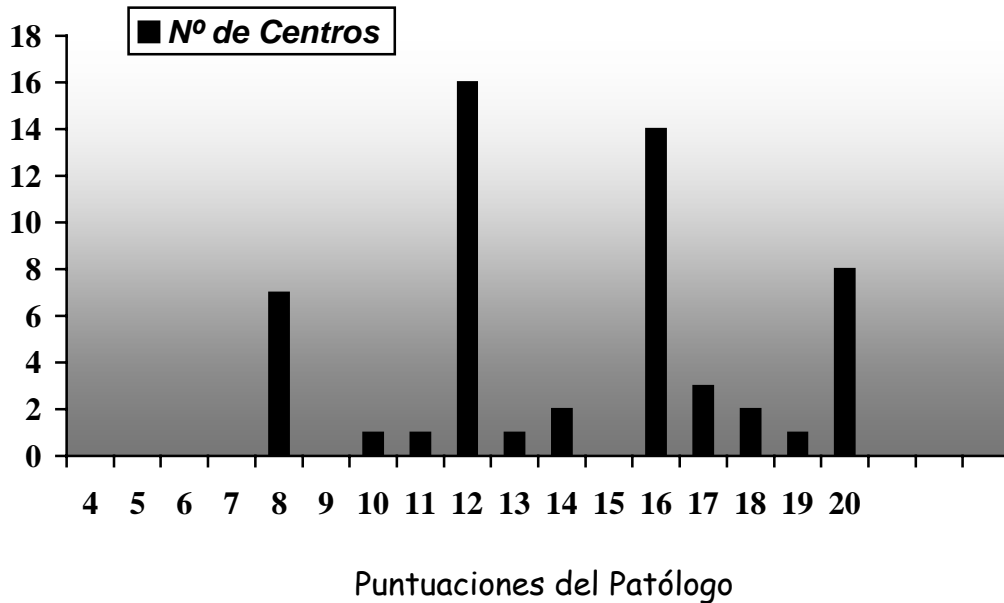
Control Local



Como se puede observar en los gráficos y seguimos reconociendo en la mayoría de las técnicas analizadas, la percepción local sobre los resultados es muy superior a la valoración de los observadores externos. Para los

patólogos y técnicos participantes, el 76,6% de las preparaciones eran válidas para diagnóstico (mayores o iguales a 12/20) y el 48,3% de los casos obtenían una puntuación excelente, igual o superior a 16/20. Esas cifras eran muy superiores a las de los observadores externos (55% y 18,3%, respectivamente).

Control del GCP



Los resultados son similares al control local, con un 43,5% de preparaciones con una puntuación igual o superior a 16/20 para los patólogos, y un 46,7 % para los técnicos. En ambos grupos, más del 75% de las tinciones eran

consideradas suficientes para uso diagnóstico, lo que contrasta con la evaluación externa (59,6%).

Inmunotinción óptima:

Se consideró una inmunotinción óptima a la que mostraba teñidos el número de células esperado 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).

En el caso de los tejidos linfoides, se consideró óptimo el marcaje de las células centrofoliculares y de los endotelios vasculares. En el riñón se valoró la tinción de los túbulos proximales y del epitelio glomerular. El patrón de tinción era de membrana, aunque con variable difusión a citoplasma. En todos los tejidos se puntuó la ausencia de fondo o tinción inespecífica y de artefactos técnicos.

Mejores métodos:

Obtuvieron una puntuación de 20/20 en las preparaciones del GCP:

Método 1:

Bloqueo: Agua oxigenada

Automatización: Dako Autostainer Plus

Digestión enzimática: No

Recuperación antigénica con calor: Baño María 20 minutos.

Tampón y pH: Tris-EDTA pH 9

Anticuerpo primario: Novocastra NCL-CD10-270. Dilución 1/10 durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Método de detección: Dako Envision K5007

Cromógeno: Dako DAB K5001, 5 minutos a temperatura ambiente

Método 2:

Bloqueo: Agua oxigenada

Automatización: Dako Techmate 500

Digestión enzimática: No.

Recuperación antigénica con calor: Olla a presión 2 minutos.

Tampón y pH: Citrato pH 6,5

Anticuerpo primario: Novocastra NCL-CD10-270 Dilucion 1/10 durante 40 minutos a temperatura ambiente.

Método de detección: Novocastra (Polymer Novolink) RE 7112.

Cromógeno: Dako DAB, 10 minutos a temperatura ambiente

Obtuvo una puntuación de 20/20 en las preparaciones de controles locales:

Método 3:

Bloqueo: Agua oxigenada

Automatización: Dako Techmate 500

Digestión enzimática: No.

Recuperación antigénica con calor: Microondas 20 minutos.

Tampón y pH: pH 9

Anticuerpo primario: Novocastra NCL-CD10-270. Dilución 1/10 durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Método de detección: Dako Envision

Cromógeno: ¿?

Comentarios:

Observamos resultados muy diversos con el anticuerpo más utilizado, el monoclonal Clon 56C6. Este anticuerpo muestra buena sensibilidad con métodos de pretratamiento diversos y tampones a diferentes pHs.

En este caso, y a diferencia de otras rondas, se han observado importantes diferencias en los resultados según se analicen los controles locales o el control del GCP, lo que subraya la importancia de la fijación y procesado en los resultados de esta inmunotinción.

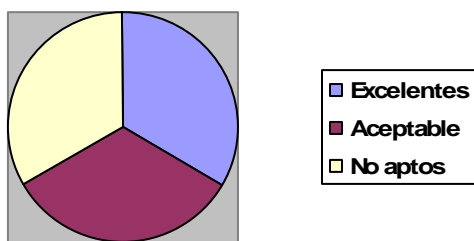
Si atendemos únicamente a los resultados del GCP, aunque observamos una ligera mejoría respecto a la tanda anterior, un 40,3% de los centros no alcanza aún la calidad suficiente para considerar que la técnica es aceptable para la rutina. Un 45% de los controles locales tampoco alcanzaron la calidad suficiente para poder utilizarlos en diagnóstico. Sin embargo, la mayoría de los centros han utilizado el mismo anticuerpo monoclonal, Clon 56C6, proporcionado por varios proveedores, y que ha demostrado muy buenos resultados en algunos laboratorios.

La gran variabilidad en sensibilidad de detección y en intensidad de la señal de unos centros a otros y entre controles locales y externos demuestra la necesidad de controlar la fijación y procesamiento y de ajustar las condiciones de recuperación antigénica, las diluciones del anticuerpo y los métodos de detección empleados.

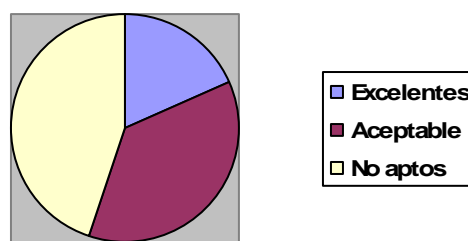
Evolución de los resultados respecto al control de CD10 previo (en 2ª ronda linfoide):

	2ª Ronda	4ª Ronda
% de Aptos Control Local (≥ 12)	66,6%	55%
% de Excelentes Control Local (≥ 16)	33,3%	18,3%
% de Aptos Control GCP (≥ 12)	55,1%	59,6%
% de Excelentes Control GCP (≥ 16)	16,32%	35,5%

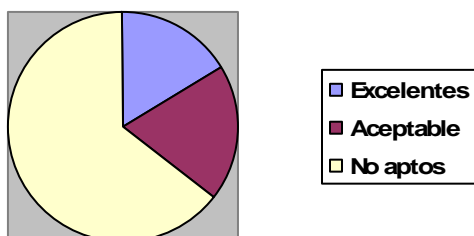
Control Local 2ª Ronda



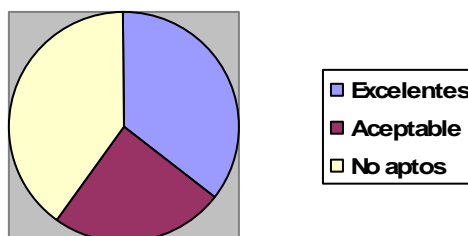
Control Local 4ª Ronda



Control GCP 2ª Ronda



Control GCP 4ª Ronda



Como se puede apreciar en los gráficos, ha existido una mejoría en los resultados obtenidos sobre el control GCP, mientras que las puntuaciones de la evaluación de los controles locales han sido inferiores en esta ronda, lo que nos hace enfatizar la importancia de una buena selección, fijación y procesamiento de los tejidos control.