



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 GENERAL

Ronda nº 9

Antígeno probado: Proteína S100

Tejido probado: Apéndice.

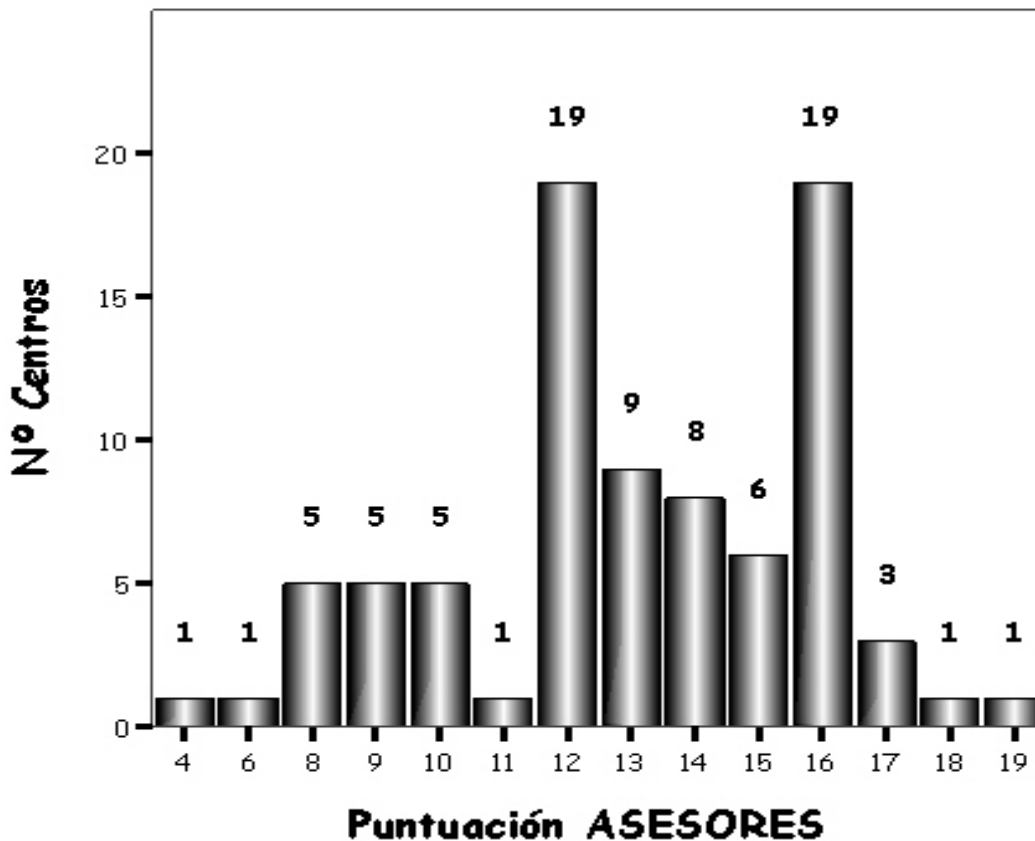
Instrucciones: Los participantes fueron invitados a teñir con S100 la preparación remitida por el programa (apéndice fijado en formol al 10%, pH 7 durante 24 horas) y su propia preparación control, devolviendo ambas preparaciones para su evaluación. Este anticuerpo, por sus especiales características, ha sido el elegido para valorar la estabilidad de la técnica en el tiempo, y por tanto se ha incluido en las tres rondas de este año 2006.

Número de laboratorios participantes:

- Remitidos: 94
- Contestados: 86 **GCP** (91,5%) y 84 (89,4%) **Control Local**

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

S100 9ª RONDA CONTROL LOCAL



Considerando que una puntuación igual o superior a 12 se considera aceptable, el 80,9 % de las preparaciones remitidas se consideraron como aceptables, con un 25,5 % 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 pretratamiento excesivo (sobrecalentamiento, pH inadecuado) de forma generalizada, así como ligera tinción de fondo y tinción inadecuada de algunas células y específicamente en los casos con puntuación inferior a 16/20, una intensidad de la tinción inferior a la 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).

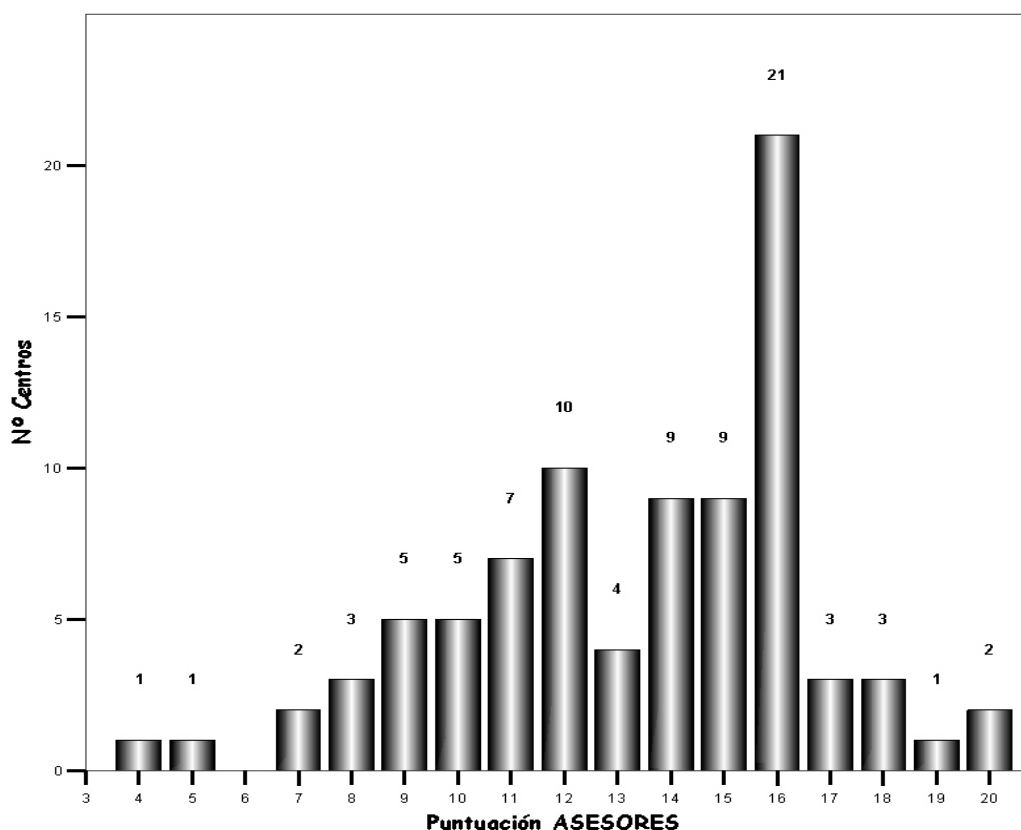
Los tejidos utilizados como control, en los laboratorios que lo especificaron fueron:

- Apéndice: 43
- Piel: 7
- Melanoma (cutáneo o metastático): 9
- Intestino: 4
- Otros (Neurofibroma, nevus, amígdala, feocromocitoma, neurilemoma): 17

En relación con las rondas anteriores ha aumentado notablemente el uso del apéndice, propuesto por el GCP, como control

Estudio de los controles remitidos por el programa GCP:

S100 9ª RONDA CONTROL GCP



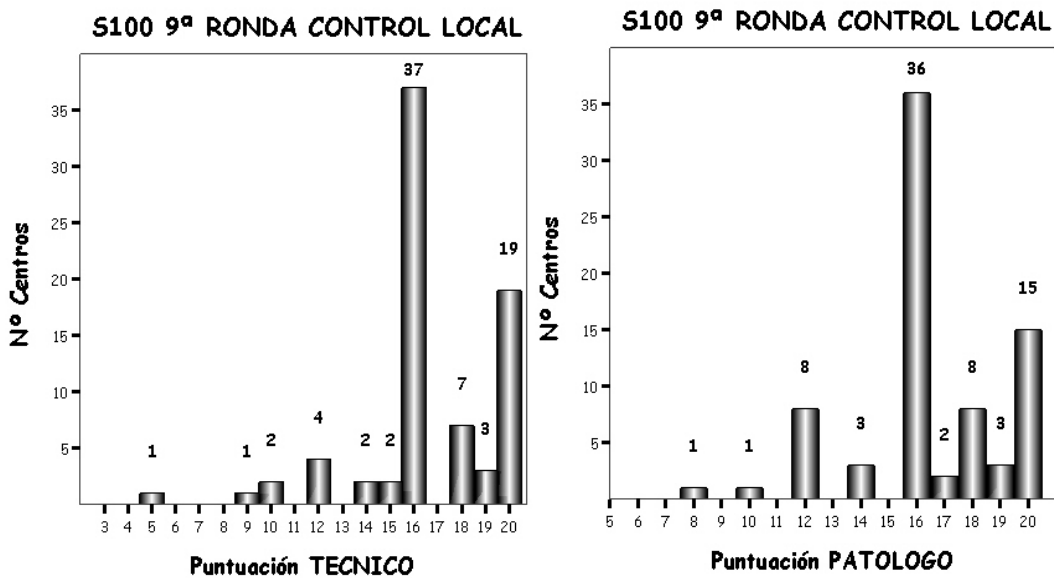
Considerando que una puntuación igual o superior a 12 se considera aceptable, el 72,1% de las preparaciones remitidas se consideraron aceptables. Un 34,9 % obtuvieron una puntuación igual o superior a 16/20, consideradas como óptimas o muy cerca de la tinción óptima. El principal problema detectado ha 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. Como en rondas anteriores siguen observándose artefactos técnicos generales (hidratación, contraste inadecuado por exceso o defecto, defectos en la manipulación con rotura del corte, etc), que suponen una merma global de la calidad de la técnica.

Resultados de la autoevaluación: Como se indica en las instrucciones remitidas, la autoevaluación es una parte importante del programa de Garantía de Calidad. El 83 % de los técnicos y el 81,9 % de los patólogos participantes remitieron su valoración de los controles locales y el 85,1 % y el 84 % respectivamente del control del GCP. Estas cifras son ligeramente superiores a las de las rondas previas; aunque inferiores a las de la 8ª ronda con lo que, al parecer, este es un aspecto que se tiene en cuenta cada vez más.

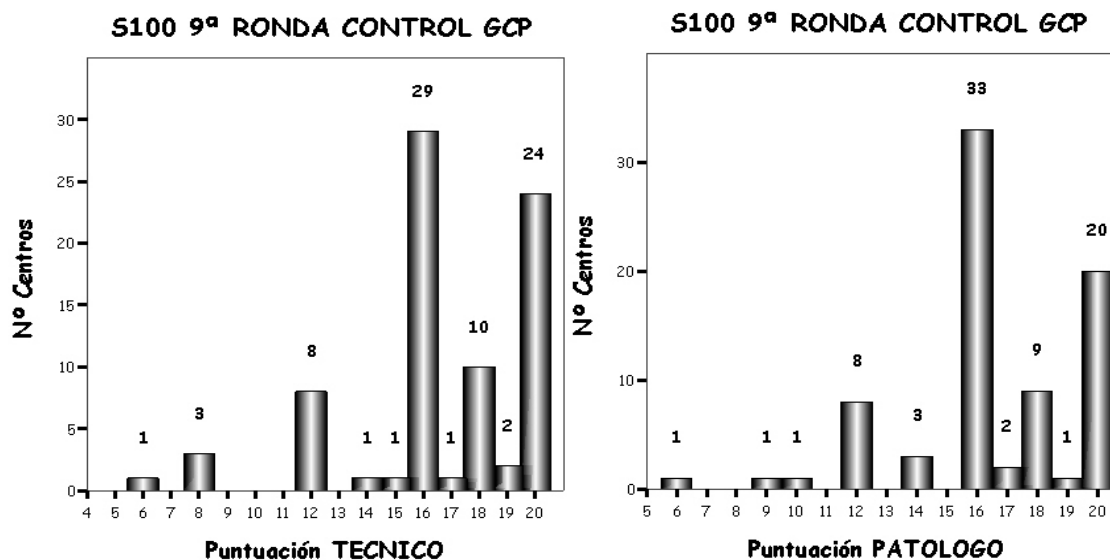
Los resultados obtenidos en esta ronda son los siguientes:

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 84,6 % de los casos tenían una puntuación igual o superior a 16/20. Este porcentaje era del 81,9 % 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 82,5 % de preparaciones con una puntuación igual o superior a 16/20 para los técnicos, y un 82,3 % para los patólogos. Es evidente la notable discrepancia con las valoraciones de los asesores externos (35 % frente a 82 % de media), aunque las diferencias han disminuído ligeramente con respecto a las rondas anteriores. La apreciación de los técnicos y de los patólogos sigue siendo muy 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 o citoplasmático y nuclear las células (neuronas y células de Schwann) de los plexos nerviosos intestinales y terminaciones nerviosas intersticiales, adipocitos del tejido adiposo, macrófagos de la lámina propia y células dendríticas de los centros foliculares de los folículos linfoides, 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 Policlonal	50
Clon 4c4-9 (Master 7, Signet 1, Atom 1)	8
Novocastra Policlonal	9
Biogenex 15E2E2	4
Menarini Policlonal	2
Biogenex Policlonal	3
Zymed Zy44	2
Vitro Policlonal	2
Biomeda Policlonal	1
Signet Policlonal	1
Ventana Policlonal	1

En resumen, 70 laboratorios (83,3 %) utilizaron un anticuerpo policlonal frente a 14 que emplearon un anticuerpo monoclonal. A lo largo de las tres rondas se observa un ligero aunque progresivo desplazamiento hacia la utilización preferente de anticuerpos policlonales frente al uso de monoclonales.

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

Método: ENVISION

Bloqueo: Agua oxigenada

Automatización: DAKO Tech-Mate 500

Digestión enzimática: NO

Recuperación antigénica con calor: SI: Microondas, 750 W, 20 minutos en tampón comercial "Target Retrieval" a pH 9

Anticuerpo primario: DAKO policlonal, 1:5000 durante 30 minutos a temperatura ambiente (23 °C).

Cromógeno: DAB DAKO.

(puntuación de 19/20 en las preparaciones del GCP):

Método: ENVISION

Bloqueo: No consta

Automatización: DAKO Tech-Mate 500

Digestión enzimática: NO

Recuperación antigénica con calor: SI: Olla a presión, 8 minutos a presión máxima en tampón citrato a pH 6

Anticuerpo primario: Biogenex Policlonal

Cromógeno: No consta

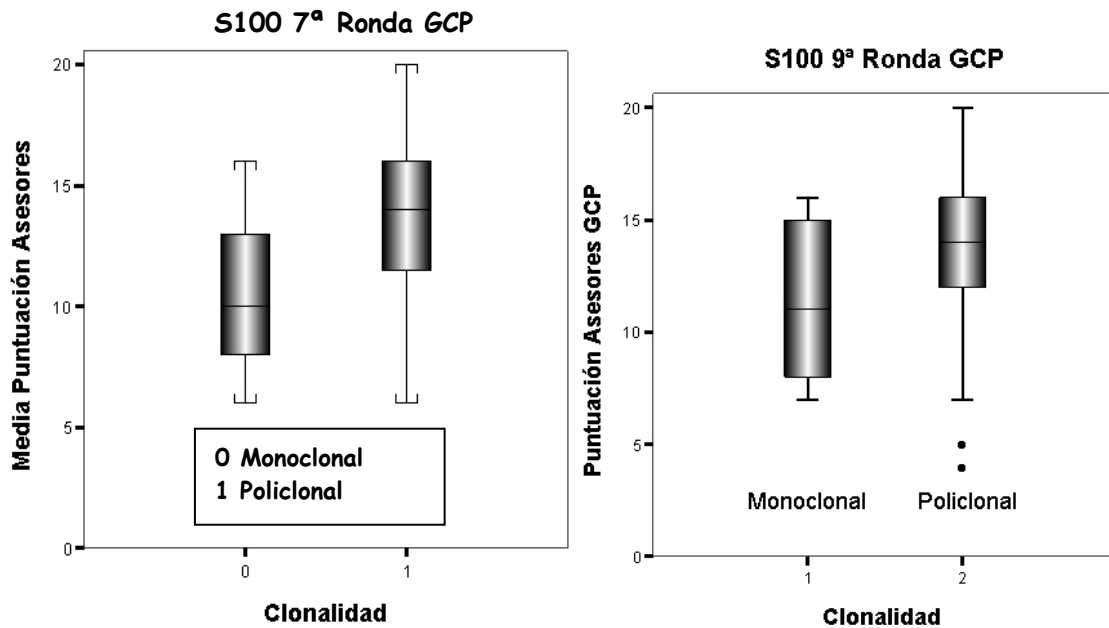
Comentarios: En conjunto, la mayoría de los resultados son adecuados para su utilización rutinaria. Sin embargo hay un porcentaje apreciable con deficiencias, especialmente en la intensidad de la tinción, que podrían ocasionar una disminución en la sensibilidad de la técnica para la detección de células con relativamente escasa cantidad de antígeno, que habitualmente no son percibidas ni por el técnico responsable ni por el patólogo, como había ocurrido en las rondas previas. Sin embargo al comparar los resultados de las tres rondas se observa una progresiva mejoría de los resultados, con prácticamente un tercio de los laboratorios con resultados óptimos en la 9ª ronda.

	7ª Ronda	8ª Ronda	9ª Ronda
≥ 12	66,4 %	76,54 %	72,1 %
≥ 16	20,8 %	29,63 %	34,9 %

Para información de interés sobre las características de la proteína S100 (expresión normal, isoformas, etc) se recomienda consultar el informe de la 7ª Ronda.

Como en las rondas anteriores se encuentra una notable heterogeneidad en la tinción de las células dendríticas de los centros foliculares apendiculares (Control del GCP). Dependiendo de la orientación diagnóstica en la que se emplee este anticuerpo este hecho puede tener importancia diagnóstica.

Los resultados obtenidos de acuerdo con la valoración de los asesores también difieren según el tipo de anticuerpo empleado, con valores medios de 11,5 para los laboratorios con anticuerpo monoclonal y de 13,8 para los laboratorios con anticuerpo policlonal. Estas diferencias no son estadísticamente significativas, como ocurría en la 7ª Ronda.



A pesar de que las diferencias en las valoraciones obtenidas han ido disminuyendo a lo largo de las tres rondas, parece evidente que con los protocolos empleados se obtienen en general mejores resultados con el uso de anticuerpos policlonales frente a los monoclonales.

Sobre el método de recuperación antigénica, de los laboratorios que lo indican, el 72,7 % de los laboratorios emplearon recuperación con calor (predominantemente en olla a presión), un 18,2 % nada y un 9,1 % tratamiento enzimático. Las diferencias que se observaban entre ellos en la media de la valoración de los asesores en la 7ª ronda han desaparecido en la actual con resultados muy similares en los tres grupos (Calor 13,9, enzima 13,4, nada 13,1).

Un aspecto que puede influir en la dispersión de resultados cuando se utiliza la recuperación antigénica con calor es el pH del tampón de recuperación antigénica. Se han empleado tampones con un pH entre 6 y 9, con un marcado predominio de los tampones con pH 6. La media de valoraciones obtenidas es superior con los protocolos que emplean tampones a pH 6 (13,7 frente a 12) con débil significación estadística ($p=0,2$).

En resumen, la heterogeneidad de los resultados ha ido disminuyendo a lo largo de las tres rondas, aunque persisten 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

Allore R, O'Hanlon D, Price R, Neilson K, Willard HF, Cox DR, Marks A, Dunn RJ. Gene encoding the beta subunit of S100 protein is on chromosome 21: implications for Down syndrome. *Science*. 1988;239(4845):1311-3.

Schafer BW, Wicki R, Engelkamp D, Mattei MG, Heizmann CW. Isolation of a YAC clone covering a cluster of nine S100 genes on human chromosome 1q21: rationale for a new nomenclature of the S100 calcium-binding protein family. *Genomics*. 1995;25(3):638-43.

Isobe T, Okuyama T. The amino-acid sequence of S-100 protein (PAP I-b protein) and its relation to the calcium-binding proteins. *Eur J Biochem*. 1978;89(2):379-88.

Herrera GA, Turbat-Herrera EA, Lott RL. S-100 protein expression by primary and metastatic adenocarcinomas. *Am J Clin Pathol*. 1988;89(2):168-76.

Hagen EC, Vennegoor C, Schlingemann RO, Van der Velde EA, Ruitter DJ. Correlation of histopathological characteristics with staining patterns in human melanoma assessed by (monoclonal) antibodies on paraffin sections. *Histopathol* 1986;10:689-700.

Nordic Immunohistochemical Quality: <http://www.nordiqc.org/Epitopes/s-100/s-100.htm>