



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 7

Antígeno probado: Proteína S100

Tejido probado: Apéndice.

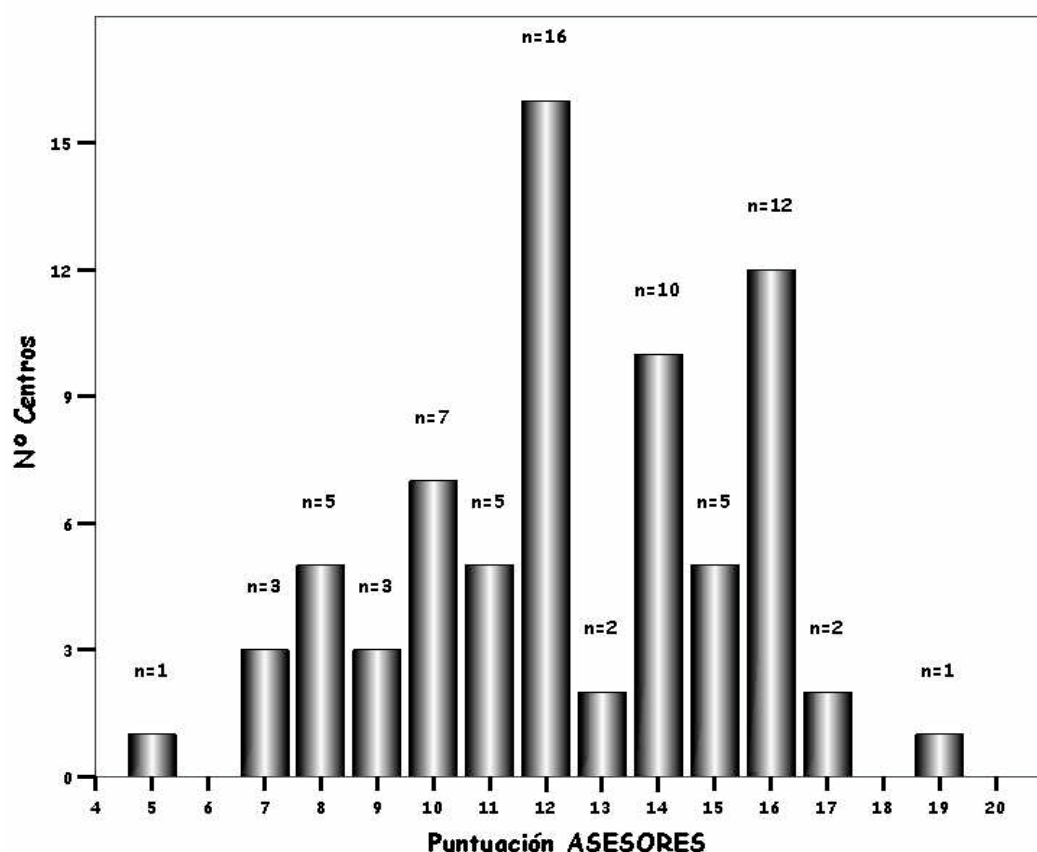
Instrucciones: Los participantes fueron invitados a teñir con S100 la preparación remitida por el programa (apéndice fijado en formol al 10%, pH 7 durante 24 horas) y su propia preparación control, devolviendo ambas preparaciones para su evaluación. Este anticuerpo, por sus especiales características, 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: 86
- Contestados: 74 **GCP** (86%) y 72 (85,7%) **Control Local**

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

S100 7ª RONDA CONTROL LOCAL



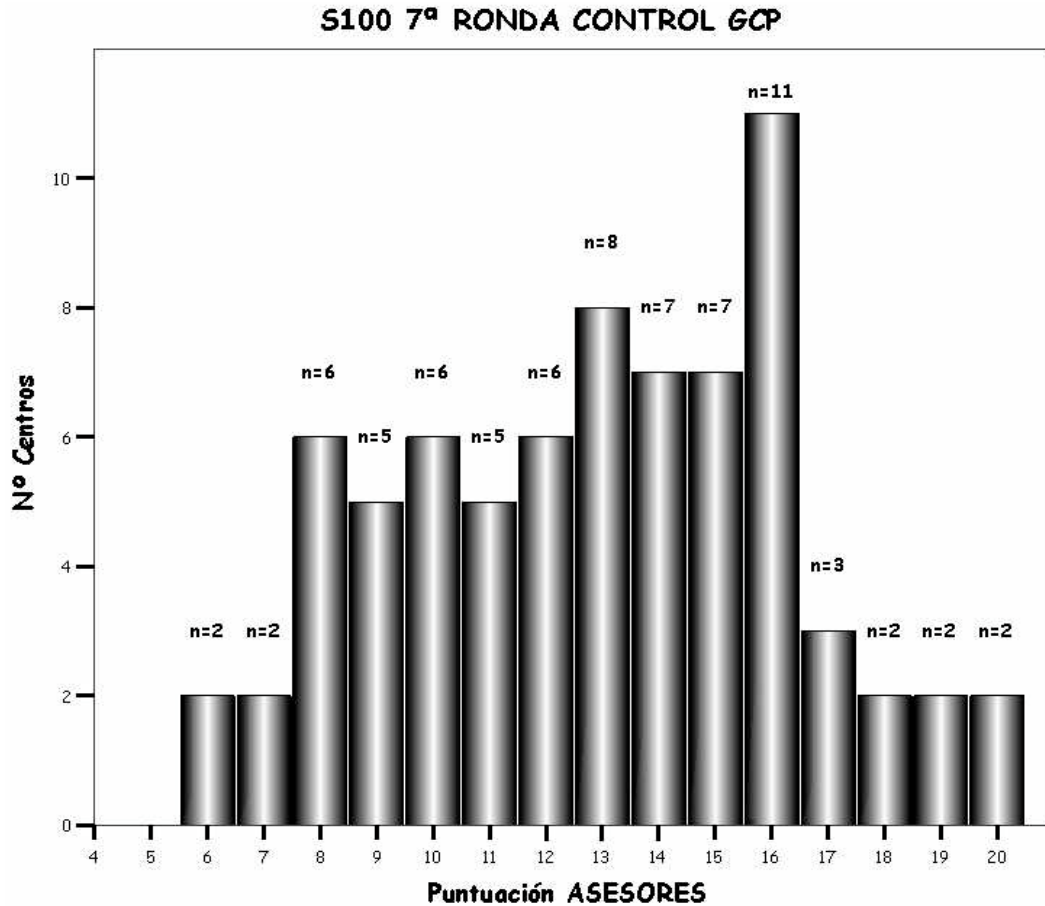
Considerando que una puntuación igual o superior a 12 se considera aceptable, el 66,4 % de las preparaciones remitidas se consideraron como aceptables, con un 20,8 % con una puntuación igual o superior a 16/20, consideradas como óptimas o próximas al grado óptimo. Los principales problemas detectados 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: 24
- Piel: 16
- Melanoma (cutáneo o metastático): 11
- Intestino: 4

- Otros (Neurofibroma, nevus, amígdala, feocromocitoma, neurilemoma): 14

Estudio de los controles remitidos por el programa GCP:

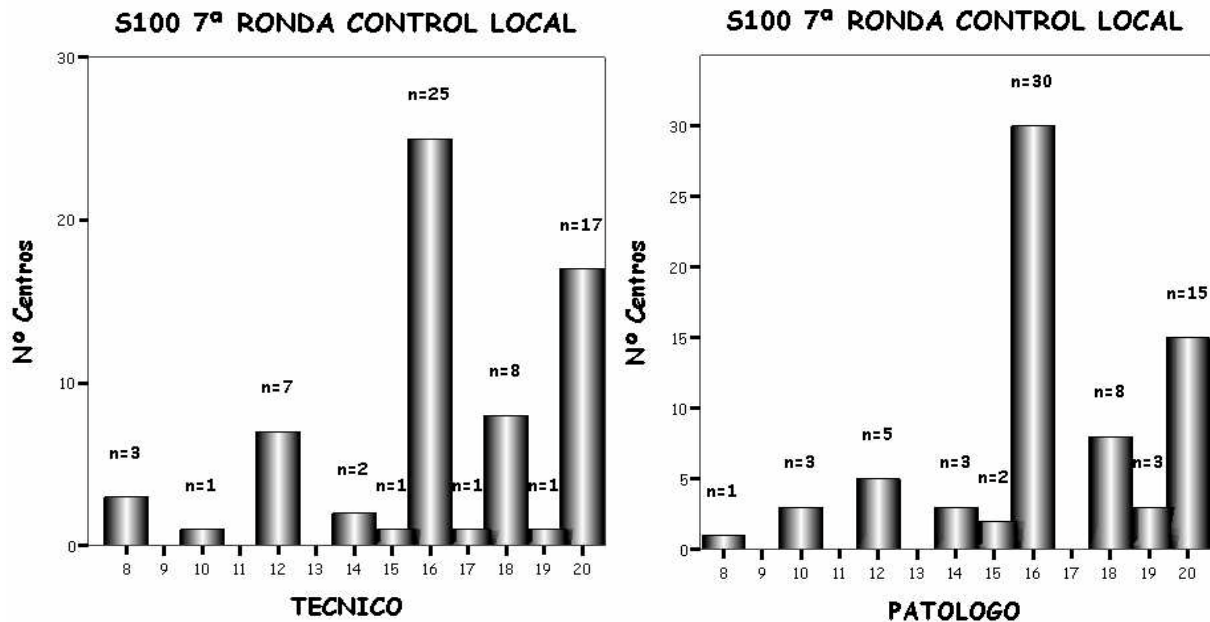


Considerando que una puntuación igual o superior a 12 se considera aceptable, el 64,8% de las preparaciones remitidas se consideraron aceptables. Un 27 % obtuvieron una puntuación igual o superior a 16/20, consideradas como óptimas o muy cerca de la tinción óptima. El principal problema detectado ha 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 76,7 % de los técnicos y el 81,4 % de los patólogos participantes remitieron su valoración de los controles locales y el 77,9 % y el 84,7 % respectivamente del control del GCP. Estas cifras son similares a las de las rondas previas; sin embargo casi una cuarta parte de los técnicos no remite la evaluación de su trabajo.

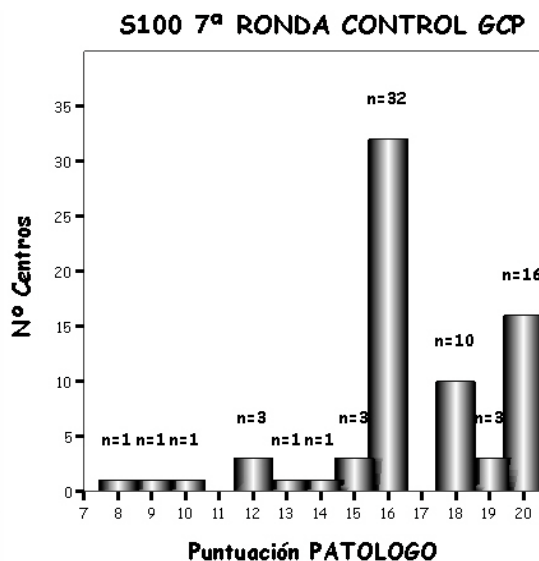
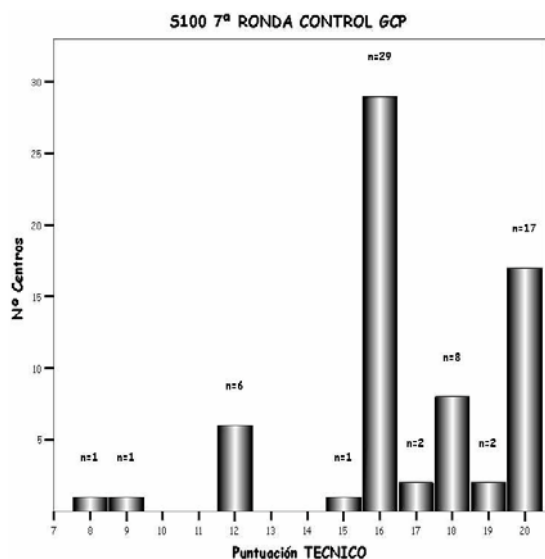
Los resultados obtenidos en esta ronda son los siguientes:

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 78,8 % de los casos tenían una puntuación igual o superior a 16/20. Este porcentaje era del 80 % en el caso de los patólogos. Estos valores son más del cuádruple de lo observado de acuerdo con la valoración externa.

Control del GCP



Los resultados son similares al control local, con un 86,6 % de preparaciones con una puntuación igual o superior a 16/20 para los técnicos, y un 84,7 % para los patólogos. Es evidente la notable discrepancia con las valoraciones de los asesores externos (27 % frente a 85 % de media). 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, adipositos 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	39
Clon 4c4-9 (Master 10, Signet 1, Atom 1)	12
Novocastra Policlonal	8
Biogenex 15E2E2	4
Menarini Policlonal	3
Biogenex Policlonal	2
Zymed Zy44	2
Biocare (No específica poli o monoclonalidad)	1
Biomeda Policlonal	1
Signet Policlonal	1
Ventana Policlonal	1

En resumen, 55 laboratorios (75,3 %) utilizaron un anticuerpo policlonal frente a 18 que emplearon un anticuerpo monoclonal.

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

Método: ENVISION

Bloqueo: Agua oxigenada

Automatización: DAKO AUTOSTAINER

Digestión enzimática: NO

Recuperación antigénica con calor: SI: Olla a presión 3 minutos en tampón citrato a pH 6

Anticuerpo primario: DAKO policlonal, prediluido durante 10 minutos a temperatura ambiente (23 °C).

Cromógeno: DAB DAKO 2% 5 min.

(puntuación de 18/20 en las preparaciones del GCP):

Método: ABC Streptavidina

Bloqueo: Agua oxigenada

Automatización: DAKO AUTOSTAINER

Digestión enzimática: NO

Recuperación antigénica con calor: NO

Anticuerpo primario: Novocastra Policlonal, a dilución 1:200 durante 30 minutos a temperatura ambiente (23 °C).

Cromógeno: DAB DAKO 10 min a temperatura ambiente.

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.

La proteína S-100 tiene un peso molecular de 21kDa, es soluble en agua altamente ácida. Inicialmente se aisló del parénquima cerebral, pero posteriormente se ha visto que se produce en una amplia variedad de células normales y neoplásicas de origen mesodérmico, neuroectodérmico y epitelial. Puede encontrarse tanto de localización en las membranas celulares, como en el citoplasma y el núcleo. Forma dímeros con dos subunidades alfa y beta con notable homología en la secuencia aminoacídica. Hay tres formas de la proteína, alfa-alfa conocida como S-100 A0: alfa-beta conocida como S-100A y beta-beta conocida como S-100B. El gen que codifica la cadena alfa se localiza en la región cromosómica 1q21. Hasta hoy se conocen 10 subtipos de cadena alfa. El gen que codifica la cadena beta se localiza en la región 21q22. Sólo se conoce un tipo de cadena beta. Como la mayoría de las células que expresan la proteína S-100 contienen la cadena beta (excepciones notables son las neuronas y los histiocitos) se ha convertido casi en sinónimo de la proteína.

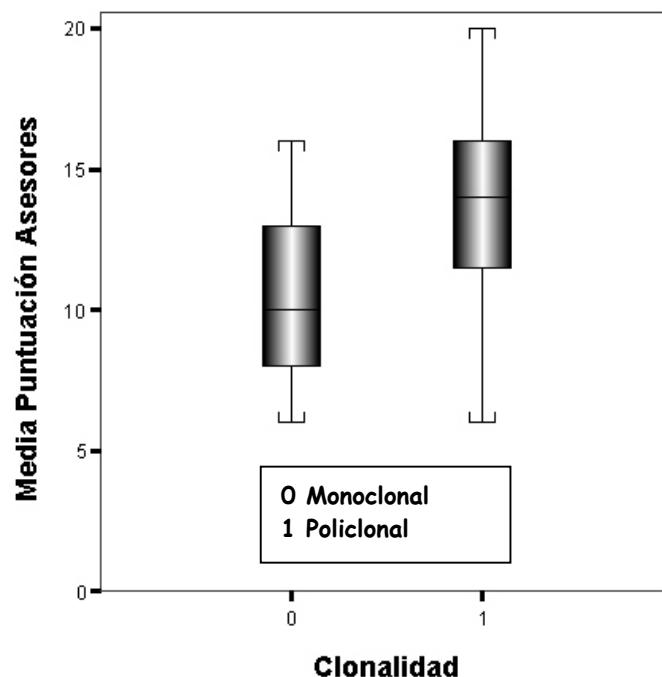
La proteína S-100 tiene una afinidad variable por el calcio y otros metales. Sus funciones biológicas tienen que ver con la difusión de cationes a través de las membranas, ensamblaje de microtúbulos y la actividad de la RNA polimerasa. En las neuronas interviene en la función de las membranas citoplasmáticas, así como en la interacción entre cromosomas y sinaptosomas.

Se expresa (beta) en las células gliales, las células de Schwann y satélite (pero no en las células perineurales), melanocitos, las células mioepiteliales, algunos epitelios glandulares (mama, riñón), células del músculo esquelético y cardíaco, adipocitos y condrocitos, y las células dendríticas (foliculares y cutáneas).

Esta ubicuidad de la expresión dificulta establecer los límites de la sensibilidad y especificidad de la técnica a la hora de la valoración. Por ejemplo la tinción de las neuronas del plexo mientérico es muy variable de unos casos a otros, desde una mínima tinción a hacerlas indistinguibles de las células de Schwann. Algo similar ocurre con los macrófagos de la lámina propia. Sin embargo lo más llamativo es la heterogeneidad en la tinción de

las células dendríticas de los centros foliculares apendiculares (Control del GCP). Algún tipo de tinción (nuclear o citoplasmática, e independiente de la intensidad de la misma) está presente en un 64,3% de las preparaciones. El primer factor que podría influir en esta detección es el tipo de anticuerpo empleado, y en este sentido sólo el 22,2 % de los laboratorios que emplean anticuerpos monoclonales consiguen detectar las células dendríticas frente a un 80,4 % de los que emplean anticuerpos policlonales. 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, con resultados estadísticamente significativos ($p < 0,001$) según el tipo de anticuerpo empleado, con valores medios de 10,5 para los laboratorios con anticuerpo monoclonal y de 13,7 para los laboratorios con anticuerpo policlonal.



Aunque quizás haya que esperar a los resultados de las siguientes rondas para poder extraer conclusiones válidas, quizás sea necesario establecer criterios de valoración en cuanto a la sensibilidad de la técnica distintos según el anticuerpo empleado.

Sobre el método de recuperación antigénica el 70 % de los laboratorios emplearon recuperación con calor (predominantemente en olla a presión), un 18,6 % nada y un 11,4 % tratamiento enzimático. Entre ellos la media de la valoración de los asesores es superior en los casos sin tratamiento o con

tratamiento enzimático (14,3 y 14,8) frente al tratamiento con calor (12,2), si bien la dispersión de valores en el grupo de tratamiento con calor le resta peso a esta diferencia. De hecho los mejores resultados se consiguen con un protocolo que emplea recuperación antigénica con calor en olla a presión.

En resumen, los resultados son relativamente heterogéneos, en gran medida 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.