



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 6

Antígeno probado: Cadenas Ligeras Lambda

Tejido probado: Amígdala

Instrucciones: Los participantes fueron invitados a teñir con anticuerpo anti-cadenas ligeras Lambda 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.

Cadenas ligeras Lambda

Todas las inmunoglobulinas (Igs) comparten la misma estructura de cuatro cadenas polipeptídicas, dos pesadas y dos ligeras. Los dos tipos existentes de cadenas ligeras (Kappa y Lambda) tienen un peso molecular de 22.5kDa. Ambas cadenas ligeras tienen una región constante y una variable y pueden ser fácilmente distinguibles por las propiedades antigénicas de su región constante.

Expresión en tejidos normales: Como en el resto de las fracciones de Igs, la demostración de cadenas ligeras Lambda puede ser difícil por la existencia la gran cantidad de inmunoglobulinas presentes en el suero, que son causantes del fondo en la inmunotinción.

Las Igs son producidas por los linfocitos B maduros desde su estadio de linfocito pequeño virgen, a lo largo de todas sus fases de activación hasta la de célula plasmática, pero la cantidad de Igs en diferentes linfocitos B puede variar considerablemente. Los linfocitos no estimulados, vírgenes, contienen solo pequeñas cantidades de cadenas pesadas mu. Durante la maduración de los linfocitos en la zona del manto expresan IgM en la superficie y también IgD. Cuando las células se activan y se transforman en células plasmáticas, son capaces de acumular en el

citoplasma y de secretar Igs, mientras que la expresión de membrana se pierde. Las células plasmáticas producen un exceso de cadenas ligeras, que normalmente se secretan sin unirse a otras moléculas.

La mayoría de las células B activadas producen IgM, pero alrededor de un 10% acumulan y secretan otro tipo de Ig, principalmente IgG o IgA. Las moléculas de Ig que contienen cadenas Kappa son ligeramente más frecuentes que las que contienen Lambda.

Expresión en Neoplasias: Mientras que las proliferaciones reactivas de linfocitos B están compuestas por un número casi igual de células que producen cadenas ligeras Kappa o Lambda, las proliferaciones neoplásicas de linfocitos B muestran restricción de cadenas ligeras, es decir, son monoclonales, produciendo sólo cadenas Kappa o Lambda. Por lo tanto, la demostración de cadenas ligeras es un procedimiento muy importante en el diagnóstico de neoplasias de linfocitos B (linfomas y leucemias). La cantidad de Igs producida por cada linfocito suele ser pequeña, por lo que es necesaria una técnica de detección muy sensible.

En las proliferaciones neoplásicas de células plasmáticas es mucho más fácil demostrar monoclonalidad, puesto que la cantidad de Igs acumuladas en su citoplasma es enorme y la técnica de detección no precisa tener una alta sensibilidad.

Utilidad: El marcador individual más importante de neoplasia de linfocitos B es la restricción de cadenas ligeras. La caracterización de plasmacitomas/mieloma múltiple exige demostrar también el perfil de restricción de cadenas pesadas y ligeras. Sin embargo, debemos tener en cuenta que las neoplasias de precursores B no expresan Igs.

Número de laboratorios participantes:

- Remitidos: 86
- Contestados: 65, (75,5%) para el GCP y 64 (74,41%) para el Control Local.

Anticuerpos y Métodos evaluados:

Anticuerpos Primarios, proveedores y diluciones:

Proveedor	Código	Clon	Dilución
Dako	A0193	Policlonal	1:1.500-1:80.000
Dako	N1513	Policlonal	Prediluido 1:4-1:10
Dako	M0614	N10/2	1:50
Dako	P0130 HRP	Policlonal	1:5.000
Ventana	760-2515	Policlonal	Prediluido 1:2
Master Diagnóstica	MAD-005077QD	Policlonal	Prediluido
Biomeda		V1057	1:1000
Menarini	MV049Vc	HP6054	1:200
Zymed	08-0032 08-1032	HP6054	Prediluido
Biogenex	AM049	HP6054	Prediluido
Biocare	PM014AA	LcN-2	Prediluido
Lab Vision- Neomarkers	RB-334-A	Policlonal	1:500

Aunque referidos por los participantes en sus formularios, se consideraron errores de identificación los anticuerpos siguientes: Dako A0101 (para inmunoprecipitación), A0418 y H0070 (no en catálogo del proveedor), F019902 y TC051 (marcados con FITC/RPE).

Recuperación antigénica:

- Microondas
- Olla a presión
- Baño María
- Autoclave
- PT Module Lab Vision
- Benchmark Ventana
- BondMax Vision Biosystems
- Digestión enzimática con Proteinasa K de Dako
- Digestión con Proteasa 2 de Atom

Detección:

Kit Dako Envision
Kit Dako LSAB+/
Kit Ventana Iview
Kit Bond Polymer Define Detection Vision Biosystems
Biogenex
Masvision polivalente Master Diagnóstica

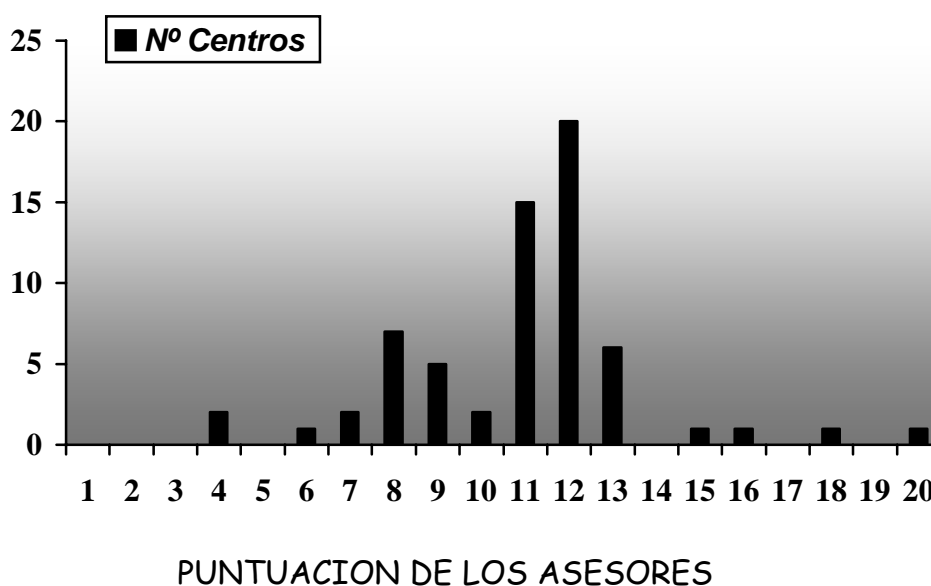
Automatización:

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

Estudio de los controles locales:

Los controles locales correspondían en su mayoría a amígdalas no neoplásicas, aunque también se recibieron multibloques (2), linfoma no Hodgkin (1) hueso con plasmocitoma (1), piel (1), intestino (1) y médula ósea (2).

Los resultados de la evaluación fueron los siguientes:



Ya que una puntuación igual o superior a 12 se considera aceptable, el 46,8% (30) de las 64 preparaciones remitidas se consideraron como aptas, con un

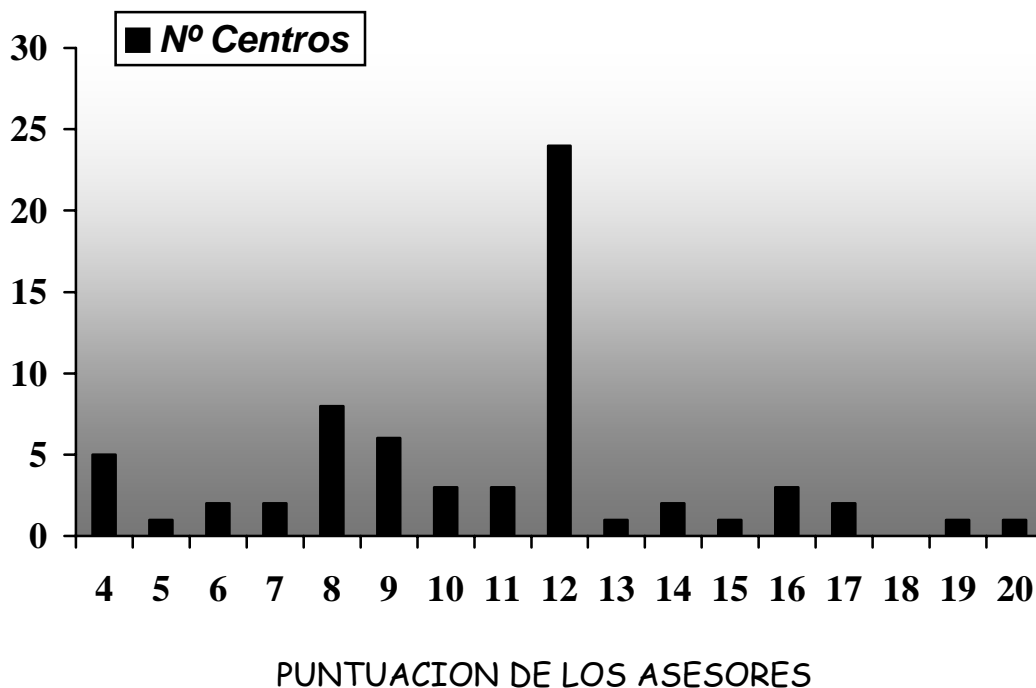
4,6% (3) con una puntuación igual o superior a 16/20, consideradas como óptimas o cercanas.

Un 53,1% (34) 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. La excesiva tinción de fondo ha sido un problema menor, ya que su intensidad no impide, en general, la interpretación de la técnica. 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 cadenas ligeras Lambda. El resultado de la evaluación fue:



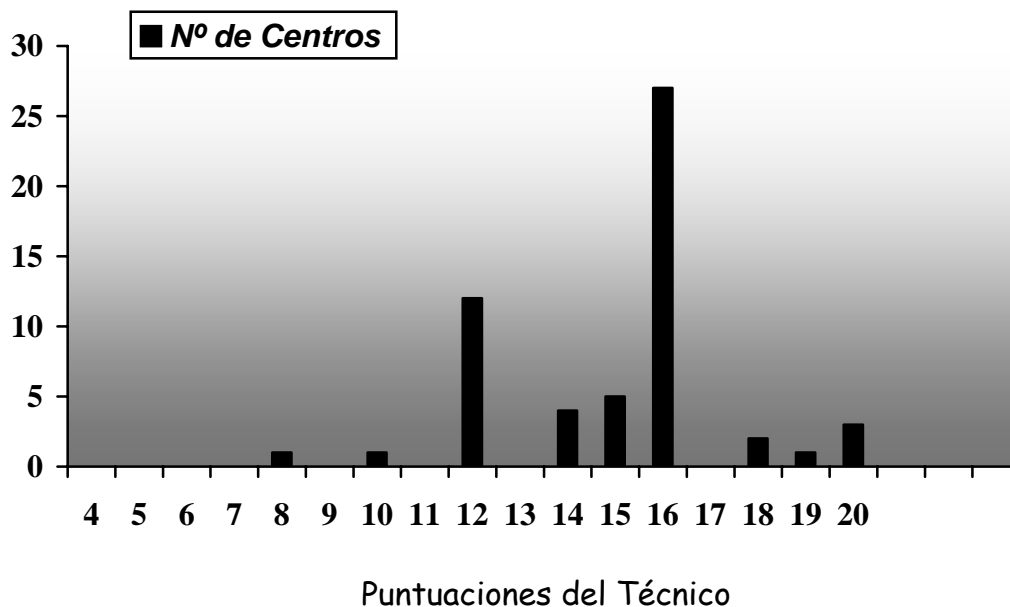
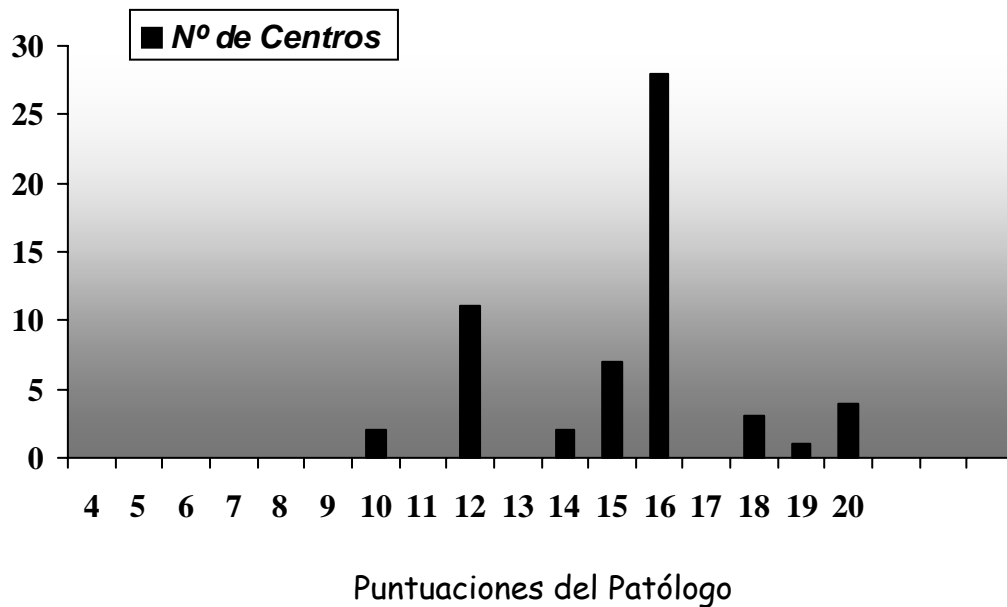
Si consideramos aceptable una puntuación igual o superior a 12, el 53,8% (35) de las 65 preparaciones remitidas alcanzaron este nivel. Un 10,9% (7) obtuvieron una puntuación igual o superior a 16/20, considerada como óptima o cercana. Un 46,8% (30) de los centros no alcanzaron la calidad suficiente para considerar que la técnica puede aplicarse de manera rutinaria.

Al igual que en el control local, 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

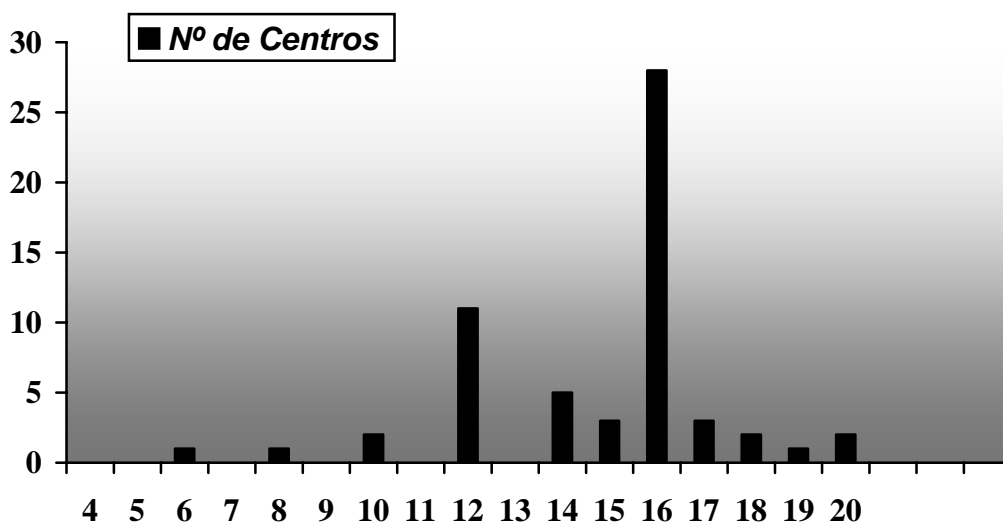
El 90% de los técnicos y patólogos remitieron su valoración de los controles locales. Respecto a la evaluación de los controles GCP, el 87,5% de los técnicos y el 89% de los patólogos participantes realizaron la evaluación. Los resultados obtenidos del análisis de tales datos son los siguientes:

Control Local

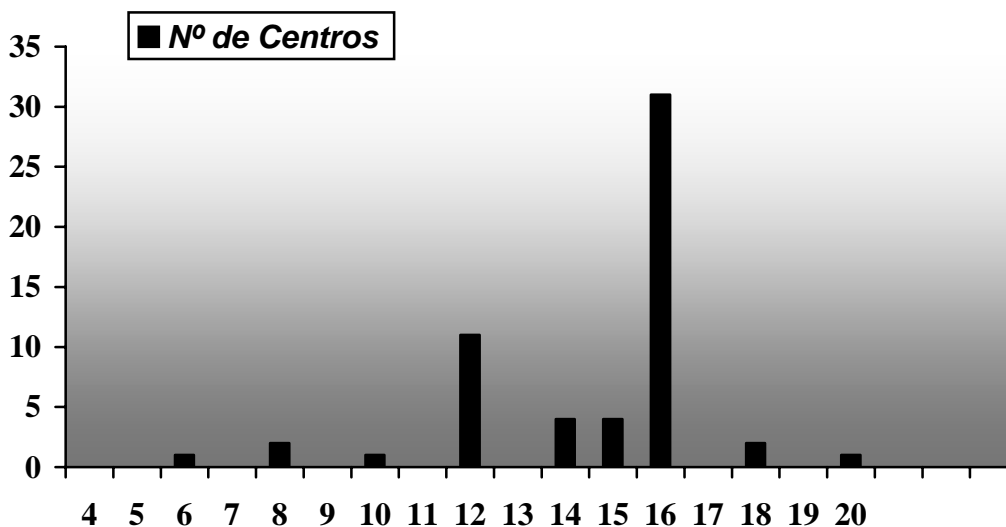


Como se puede observar en los gráficos y seguimos reconociendo en la mayoría de las técnicas analizadas, la percepción local sobre los resultados es muy superior a la valoración de los observadores externos. De hecho, salvo en cuatro evaluaciones, el resto ha considerado su técnica válida para diagnóstico, reflejando que el nivel de sensibilidad exigido a la detección es muy inferior del que debiera. Para los patólogos y técnicos que han remitido su evaluación, el 96,5% de las preparaciones eran válidas para diagnóstico (mayores o iguales a 12/20) y el 60% de los casos obtenían una puntuación excelente, igual o superior a 16/20. Esas cifras eran muy superiores a las de los observadores externos (46,8% y 4,6%, respectivamente).

Control del GCP



Puntuaciones del Patólogo



Puntuaciones del Técnico

Los resultados son similares al control local, con un 93,2% de preparaciones con una puntuación igual o superior a 12/20 para los patólogos, y un 92,9% para los técnicos, consideradas suficientes para uso diagnóstico, lo que contrasta con la evaluación externa (53,8%).

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 una inmunotinción óptima la que mostraba una tinción citoplásmica intensa en aproximadamente la mitad de las células plasmáticas y una inmunorreactividad franca de membrana en aproximadamente la mitad de las células B de la zona del manto, permitiéndose una ligera tinción de fondo del resto. En todos los tejidos se puntuó la ausencia de fondo moderado-intenso o tinción inespecífica y de artefactos técnicos, en especial la no degradación del tejido por sobrecalentamiento.

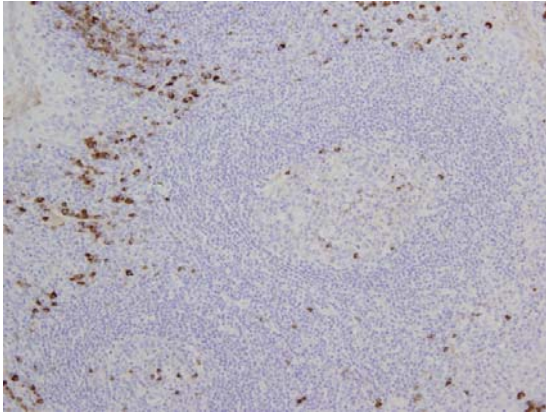
Guía utilizada para la evaluación:

Los criterios para considerar óptima una tinción para Cadenas Ligeras Lambda en una amígdala fueron:

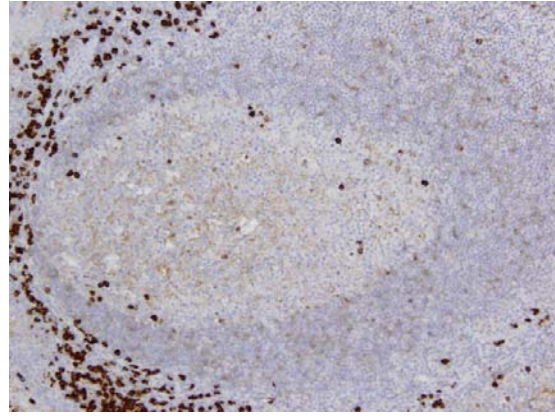
- Tinción fuerte y definida del 50% de las células B normales del manto.
- Fuerte tinción citoplasmática en las células plasmáticas
- Débil fondo general.

Cada uno de los cuatro asesores concedió una puntuación entre 0 y 5, lo que daba una puntuación total entre 0 y 20 puntos. La puntuación fue como sigue:

Puntuación	Patrón de tinción
0/No remitido	No remisión de preparación
1	Ausencia de tinción significativa
2	Tinción insuficiente de células diana
3	Tinción únicamente de células plasmáticas (citoplasmática)
4	Tinción de citoplasma de células plasmáticas y de membrana en células del manto, aunque de intensidad mejorable
5	Tinción adecuada de células plasmáticas y del 50% de células del manto folicular



Puntuación: 3



Puntuación 5

Mejores métodos:

Obtuvo una puntuación de 20/20 en la preparación del GCP:

Bloqueo: ¿?

Automatización: Ventana Benchmark XT

Digestión enzimática: Proteasa 1 durante 12 min.

Recuperación antigénica con calor: ¿?

Tampón y pH: ¿?

Anticuerpo primario: Zymed 08-1032 Clon HP6054, Prediluido, durante 20 minutos a 37°C.

Método de detección: Ventana XT IVIEW V1

Cromógeno: ¿?

Obtuvo una puntuación de 19/20 en la preparación del GCP:

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: Dako A0193 Policlonal, Dilucion 1/20.000 durante 40 minutos a temperatura ambiente.

Método de detección: Dako Chemmate Kit (LSAB).

Cromógeno: Dako DAB, 7'5 minutos a temperatura ambiente

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

Bloqueo: Agua oxigenada

Automatización: Dako Autostainer

Digestión enzimática: No.

Recuperación antigénica con calor: Olla a presión 2 minutos.

Tampón y pH: pH 6 (Dako S1699)

Anticuerpo primario: Dako N1513 Policlonal, Prediluido, durante 30 min a temperatura ambiente.

Método de detección: Dako Chemmate Kit (LSAB)

Cromógeno: Dako DAB 10 minutos a temperatura ambiente.

Comentarios:

El análisis de los resultados de inmunotinción con diversos anticuerpos monoclonales y policlonales muestra que en ambas circunstancias pueden alcanzarse buenos resultados, aunque en la mayoría de los centros, el método empleado no alcanza la sensibilidad debida. Observamos, según las puntuaciones adjudicadas en la autoevaluación, que la mayor parte de los centros considera una buena tinción la demostración de cadenas ligeras Lambda únicamente en los citoplasmas de células plasmáticas, sin considerar que una buena técnica debería detectar también las moléculas de cadenas ligeras presentes en la membrana de los linfocitos B en vías de activación (centro folicular y el 50% del manto) y que esta sería la mayor utilidad de la determinación en el panel linfoide. Por esta misma razón, no se puede considerar adecuado utilizar como control de tinción a las células plasmáticas o sus neoplasias, ya que la cantidad de moléculas presentes en su citoplasma es mucho más elevada que la esperada en las neoplasias de linfocitos B.

A pesar de que se ha descrito que los métodos de recuperación antigénica por digestión enzimática pudieran disminuir la capacidad del anticuerpo de detectar los antígenos de membrana (2), lo cierto es que en nuestra serie se han observado magníficas detecciones utilizando esta metodología. Es posible que un pretratamiento mediante calor a pH6.0 permita un rango más amplio de variabilidad en la fijación de las muestras y una determinación más reproducible de las cadenas ligeras Lambda.

El principal problema de esta determinación ha sido, por lo tanto, la tinción insuficiente, que puede atribuirse principalmente a una recuperación antigénica inadecuada o una concentración muy baja del anticuerpo primario.

Sin embargo, esta concentración, debe calibrarse cuidadosamente, para evitar una excesiva tinción de fondo que impida la interpretación de los resultados.

Referencias:

1. Jaffe ES et al (Eds) WHO Classification Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue. IARC Press 2001.
2. Ashton-Key M, Jessup E, Isaacson PG. Immunoglobulin light chain staining in paraffin-embedded tissue using a heat mediated epitope retrieval method. *Histopathology*. 1996 Dec;29(6):525-31.
3. Vernon SE, Morgan TW. Immunoglobulin light chain staining of lymph node biopsies: an interlaboratory comparison. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 1981 Nov-Dec; 11(6):525-9.
4. www.nordiqc.org