



**SeAP-IAP**

[Sociedad Española de Anatomía Patológica]  
[International Academy of Pathology]

**SEAP**

**Calle Ancora, 3, 2º B**

**28045 MADRID**

Tfno. y Fax 91 539 86 28

MAIL: CALIDAD@SEAP.ES



GARANTÍA DE CALIDAD

**Programa de Garantía de  
Calidad en Patología**

## Módulo de HEMATOPATOLOGIA

### **Ronda nº 28**

**Antígeno probado:** CD246 (ALK1)

**Tejido probado:** matriz multitejido que contiene: dos cores de Linfoma de Hodgkin fijados en formol 24 h., dos cores de hígado fetal fijados en formol 48 h., dos cores de linfoma anaplasico ALK+ fijados en formol 48 h., dos cores de amígdala reactiva fijados en formol 48 h. y un core marcador pulmón.

**Instrucciones:** Los participantes fueron invitados a teñir con CD246 (ALK1) la preparación remitida por el programa y su propia preparación control, devolviendo ambas preparaciones para su evaluación

***Número de laboratorios participantes:***

- ***Remitidos:*** 68
- ***Contestados:*** 46

Los restantes 22 laboratorios no disponen de este anticuerpo.

Los criterios consensuados usados en la evaluación para considerar la tinción CD 246 como óptima fueron los siguientes:

Tinción intensa y bien definida predominantemente en las células grandes atípicas de los cores de linfoma anaplásico. Siguiendo este criterio se evaluó la tinción de 1 a 5 como sigue:

- 1: No tinción demostrable
- 2: Tinción inadecuada sin evidencia de positividad en células diana
3. Tinción débil en núcleo o citoplasma
4. Tinción homogénea, sin tinción de fondo.
5. Tinción marcando nucleó o citoplasma en la totalidad de las células atípicas del linfoma anaplásico, ausencia de tinción inespecífica de fondo y bien contrastada

### **Características, utilidad y variabilidad de la expresión**

EL gen ALK fue descubierto a finales de los 80, cuando se observó que los linfomas anaplásicos de células grandes (LACG) CD 30 + podían estar relacionados con la translocación cromosomal 2-5, en la que el gen nucleofosmina (NPM) localizado en 5q35 se fusiona con el gen ALK localizado en 2p23. Con la fusión, la parte del gen NPM que codifica la parte N-terminal de la proteína NPM se yuxtapone a la parte del gen ALK que codifica toda la zona citoplasmática de la proteína ALK. Como consecuencia, el gen ALK está bajo el control del promotor de NPM, lo cual induce a una transcripción permanente y ubica del gen híbrido NPM-ALK, lo que da como resultado la producción de una proteína NPM-ALK quimérica-de 80 kDa,( conteniendo 40% de la porción amino-terminal de NPM junto al dominio completo citoplasmático de ALK). Se han descrito otras translocaciones que afectan al gen ALK, incluyendo t(1;2)(q21;p23), inversión 2(p23;q35), t(2;3)(p23;q21), t(2;17)(p23;q23), y t(x;2)(q11-12;p23). En estos incommunes reordenamientos del gen ALK se yuxtaponen a TPM3, codificando una tropomiosina no muscular; TFG (fusión TRCK codificando un polipéptido; ATIC, el cual codifica un enzima, 5- aminoimidazol - 4carboximida - 1b - D -ribonucleotido transformilasa/iosina monofosfato ciclohidosilasa participantes en el metabolismo purinico; CLTC, codificando el gen de cadena pesada; o el MSN miembros de la familia de la proteina 4.1 asociado a polipéptidos.

Aproximadamente el 80% de los LACG están relacionados con la translocación cromosomal 2-5; pudiendose identificar cualitativamente por microscopia óptica utilizando métodos de pruebas inmunohistoquímicas, el anticuerpo marca la proteína ALK humana normal y la proteína NPM-ALK quimérica, y es una herramienta útil para la identificación del subgrupo de LACG que son ALK positivos.

ALK también se ha detectado por inmunohistoquímica en algunos sarcomas, especialmente en rhabdomyosarcomas; sin embargo, en la mayoría de los tumores de partes blandas, excepto en el tumor miofibroblástico inflamatorio, la tinción es francamente débil.

Los linfomas anaplasicos de células grandes ALK positivos suelen corresponder a gente joven, con enfermedad avanzada (estadio III o IV), suele acompañarse de fiebre, y con afectación extranodal; asociándose a un buen pronóstico y buena respuesta a quimioterapia.

En resumen la principal aplicación es la identificación de linfomas anaplasicos de células grandes.

Mientras los primeros estudios inmunohistoquímicos utilizaban anticuerpos policlonales, actualmente la mayoría son monoclonales (ALK1 y ALKc); la práctica totalidad de los laboratorios han utilizado la clona ALK1 (80%) donde están incluidos la práctica totalidad de los que han obtenido puntuación superior a 16/20.

Los varios patrones de translocación son importantes para la localización de la proteína fusionada y son importantes para la interpretación de los resultados de inmunohistoquímica. La tinción citoplasmática, nuclear y nucleolar se asocia con la translocación nucleofosmina/ALK; la tinción citoplasmática difusa y de membrana se asocia con tropomiosina; la tinción citoplasmática difusa con la fusión TRCK gen ALK y ATIC/ALK; la tinción punteada citoplasmática con la cadena pesada/ALK ; y la tinción de membrana nuclear con RANBP2/ALK. Todas estas translocaciones resultan en la dimerización del segmento N- terminalde la proteína ALK y en su consecuente activación

## **Anticuerpos Primarios:**

El clon más utilizado fue ALK-1, lo utilizaron 32 laboratorios, comercializado por diferentes proveedores, pero también se utilizó el clon 5A4 y un laboratorio utilizó el clon D5F3

### **1. DAKO:**

Referencia:

IR 641 Prediluido, 18 laboratorios

M7195 1/25 ,1 laboratorio

GA 641 Prediluido ,1 laboratorio

Tiempo: 10 a 30 minutos

Algunos utilizaron Linker Mouse

### **2. LEICA:**

Referencia:

PA0306,1 laboratorio. No especifica dilución, 15 m. a temperatura ambiente

NCL-L-ALK, 2 laboratorios

1/50- 20m. a 24° y 15m. a T.A.

**3. MASTER DIAGNOSTIC:**

Referencia:

MAD-001720 QD 3 laboratorios

Diluciones: Prediluido

Tiempo: 10 a 20 minutos

**4. ROCHE:**

Referencia: 800-2918 18 laboratorios

Diluciones: Prediluido

Tiempo: 16m. a 1h. con temperaturas de 36° a 37°.

Algunos utilizaron kit amplificador

**5. PALEX MEDICA:**

Referencia: 204M-18 1 laboratorio

Diluciones: Prediluido

Tiempo: 40 minutos

**6. CELL SIGNALING:**

Referencia: 6679072001 1 laboratorio

Diluciones: Prediluido

Tiempo: 16 minutos a 37°

**Recuperación antigénica:**

**1. PT-LINK DAKO:**

Solución: HIGH, (Target retrieval solution pH 9), 20 minutos a 95°,

Solución: LOW, ( Target retrieval solution pH 6), 20 minutos a 95°,

**2. BENCHMARK VENTANA:**

Recuperación CC1 con el sistema automatizado de  
Ventana Medical Systems en la plataforma BenchMark XT y Ultra

Recuperación CC2 con el sistema automatizado de  
Ventana Medical Systems en la plataforma BenchMark XT y Ultra

**3. BOND MAX:**

Epitope Retrieval SOL.1

Epitope Retrieval SOL.2

## **Detección:**

Anticuerpos Secundarios

1. DAKO: Envision Flex (HRP) R/U 20m.
2. MASTER DIAGNOSTICA: R/U 10m.
3. ULTRAVIEW® ROCHE:  
R/U, 760-500,760-700 A 36°
4. BOND Refine Polymer (LEICA): R/U 7m.

## **Automatización:**

Todos los laboratorios usaron las siguientes plataformas automáticas.

1. DAKO AUTOSTAINER LINK 48 16 laboratorios
  2. DAKO OMNIS 1 laboratorio
  3. LAB VISION AUTOSTAINER 480 S 1 laboratorio
  4. LAB VISION AUTOSTAINER 720 1 laboratorio
  5. VENTANA BENCHMARK XT 4 laboratorios
  6. VENTANA BENCHMARK ULTRA 16 laboratorios
  7. BOND MAX 4 laboratorios
- 2 Laboratorios no especificaron que plataforma automática utilizaron  
Ningún laboratorio lo hizo de forma manual.

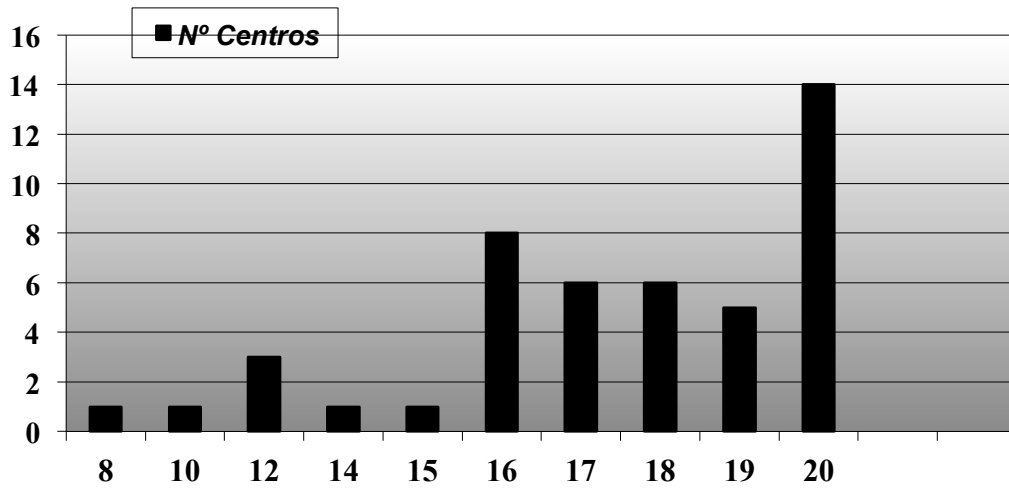
## **Estudio de los controles en el programa GCP:**

Cada caso se evaluó de forma independiente por cada asesor 1 de a 5 según los criterios siguientes:

Los resultados de la evaluación fueron los siguientes:

- 1: No tinción demostrable
- 2: Tinción inadecuada sin evidencia de positividad en células diana
3. Tinción débil en núcleo o citoplasma
4. Tinción homogénea, sin tinción de fondo.
5. Tinción marcando nucleó o citoplasma en la totalidad de las células atípicas del linfoma anaplásico, ausencia de tinción inespecífica de fondo y bien contrastada

### ***Evaluación de los asesores.***



#### **Puntuación de los Asesores**

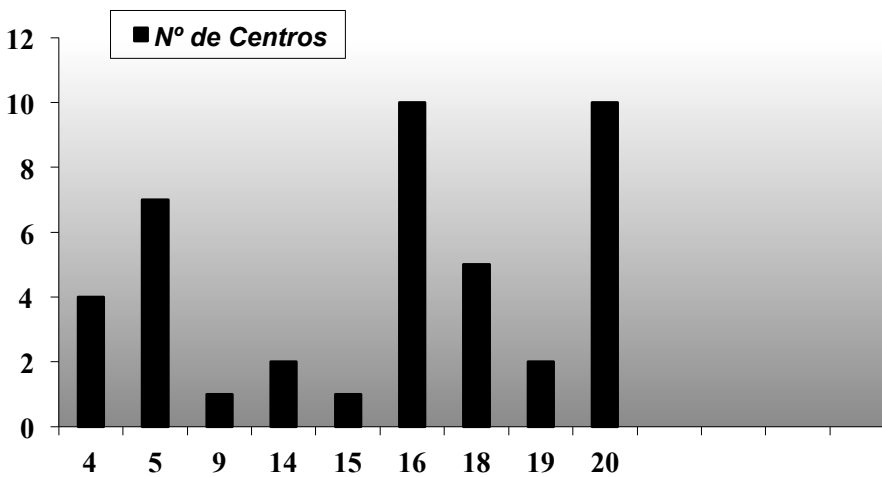
Considerando que una puntuación igual o superior a 12 se considera aceptable, el 90 % de las preparaciones evaluadas se consideraron como óptimas o buenas y las restantes, un 10% pobres, 14 protocolos se evaluaron con 20 puntos.

Solo dos de los centros participantes no alcanza el nivel de sensibilidad suficiente para considerar que la técnica puede aplicarse de manera rutinaria en el diagnóstico anatomopatológico.

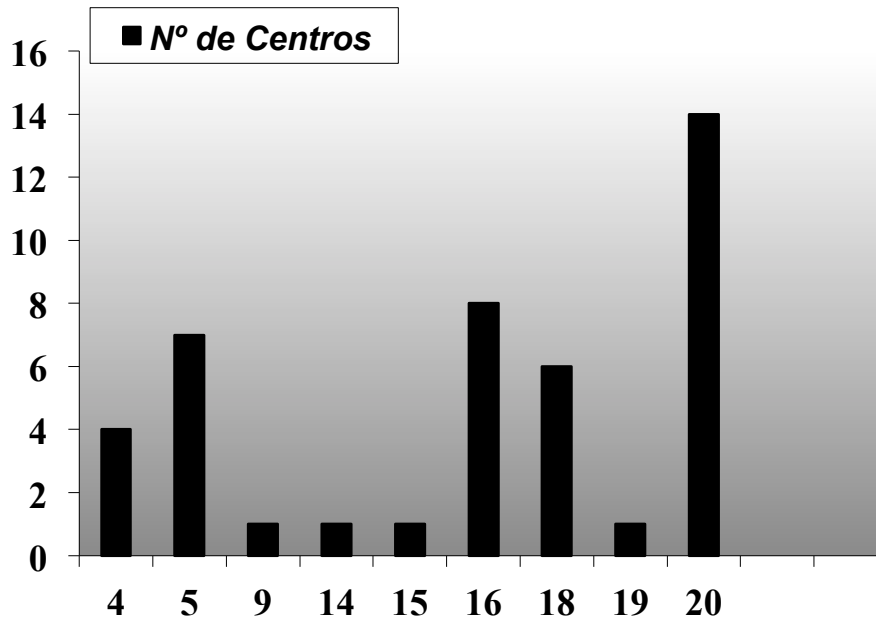
Los principales problemas detectados han sido: tinción ligera e irregular.

### **Resultados de la Autoevaluación**

#### **Puntuaciones del Patólogo**



### Puntuaciones del Técnico local

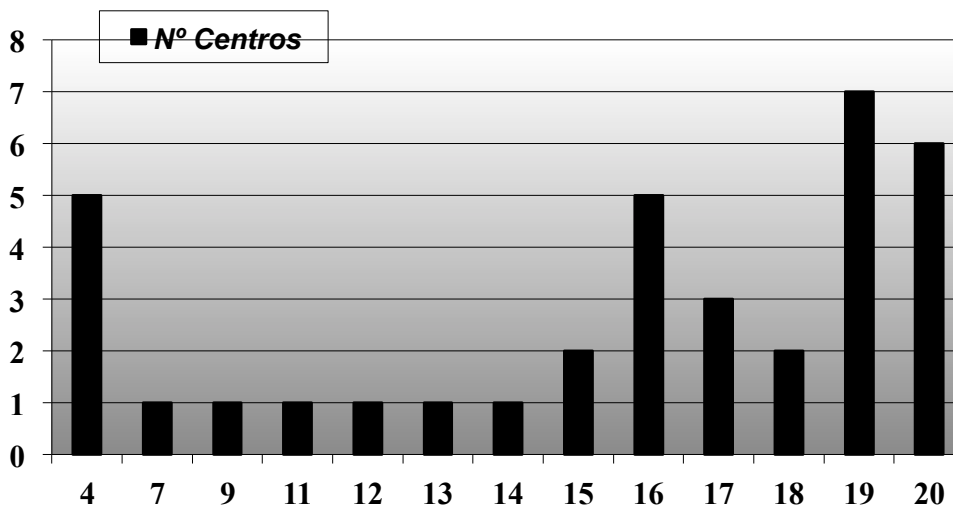


Los resultados demuestran que en opinión de los patólogos locales 38% de preparaciones son aceptables con una puntuación igual o superior a 14/20 y el 40% para los técnicos.

Hay laboratorios que no se autoevalúan.

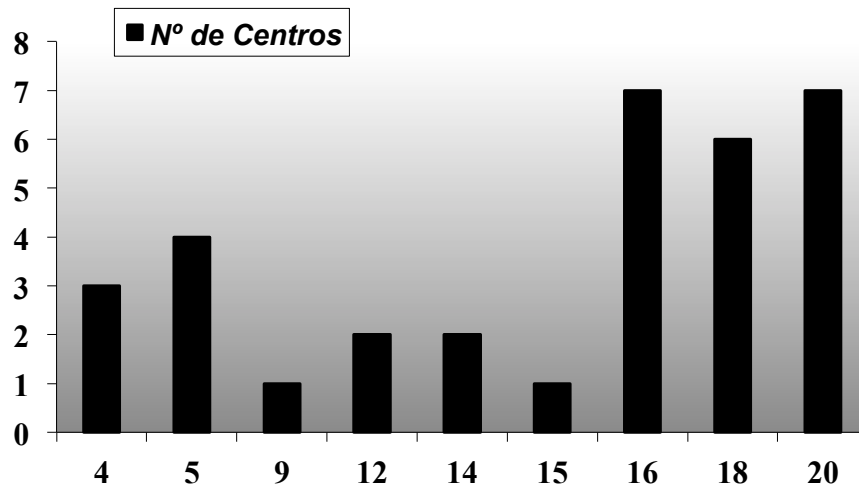
### Control Local

#### *Evaluación de los asesores*

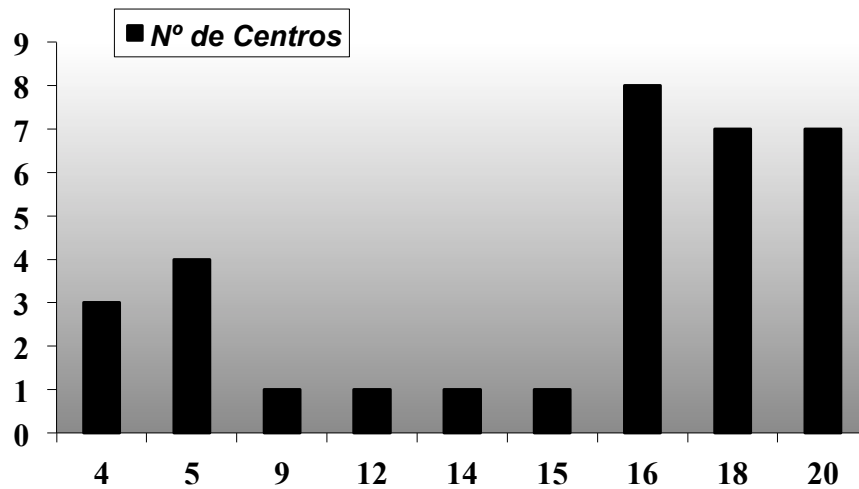


Considerando que una puntuación igual o superior a 12 se considera aceptable, el 71.5% de las preparaciones evaluadas se consideraron como óptimas o buenas y las restantes con un 28.5% pobres o (no aceptables)

### Puntuaciones del Patólogo



### Puntuaciones del Técnico



Los resultados demuestran que en opinión de los patólogos locales 80% de preparaciones son aceptables con una puntuación igual o superior a 16/20 y el 75% para los técnicos.

Hay laboratorios que no se autoevalúan.

Hay laboratorios que no disponen de control para este anticuerpo.

Hay algunos laboratorios que el control que usan no es el adecuado por lo que no se puntúa



## **Mejores métodos:**

### **METODO 1:**

Fijación: formol tamponado, 24 h.

Automatización: Benchmark Ventana

Recuperación antigénica: CC1 64m.

Anticuerpo primario: Ref. 800 2918, clon ALK1, prediluido, Roche. 60 min a 37°

Método de detección: Kit Ultraview de Roche

Cromógeno: Kit Ultraview DAB de Roche

### **METODO 2:**

Fijación: formol 10%, 12 h.

Automatización: Bond Max III de Leica

Recuperación antigénica: Epitope retrieval solución 1 Leica

Anticuerpo primario: Ref. NCL-L-ALK, clon 5A4, prediluido, Novocastra. 15 min

Método de detección: Bond Polymer Refine Detection Leica

Cromógeno: DAB prediluido de Leica

### **METODO 3:**

Fijación: formol 10%, 32 h.

Automatización: Autostainer Plus Link Dako

Recuperación antigénica: PT-Link Low 20 min. a 95°

Anticuerpo primario: Ref. IR 641, clon ALK1, prediluido, Dako. 20 minutos

Método de detección: Envision Flex 20 min.

Cromógeno: DAB 10min. prediluido de Dako

### **METODO 4:**

Fijación: formol 10%, 48 h.

Automatización: Omnis Dako

Recuperación antigénica: Low Ph Dako target retrieval solution 30m.

Anticuerpo primario: Ref. GA641, clon ALK1, prediluido, Dako. 17min 30seg a 32°, Linker mouse 10min.

Método de detección: Envision Flex 15 m. a 32°

Cromógeno: DAB prediluido 5min. a 32° de Dako

## **Los controles locales usados:**

El control más usado fue un ganglio con Linfoma Anaplásico en 24 laboratorios.

El resto de laboratorios usaron diversos tejidos:

Cerebelo, pulmón, piel, intestino, apéndice, amígdala, línea celular Karpas,

Apéndice, tumor miofibroblástico.

***Recomendamos que para este anticuerpo como mejor control se use un ganglio afecto de Linfoma Anaplásico o un carcinoma pulmonar con translocación de ALK.***

## **Comentarios:**

Llama la atención la diferencia que hay de tinción del caso programa y el local de un mismo laboratorio. Algunos de los controles remitidos por el mismo centro no se corresponden con el mismo día e incluso algunos son de semanas anteriores a la recepción de los controles del GCP. Recomendamos que ambos controles se realicen simultáneamente para minimizar las diferencias de tinción.

En opinión de estos evaluadores, hay algunos laboratorios que no usan un control adecuado: cerebelo, amígdala reactiva, apéndice... no muestran expresión fisiológica relevante de ALK.

La puntuación de los patólogos siempre es superior a lo de los técnicos.

No se envían todos los datos: de los protocolos, de las maquinas, los tiempos del anticuerpo, las diluciones lo que dificulta el análisis de los resultados obtenidos por los centros.

## **Bibliografía Seleccionada**

1. Le Beau MM, Bitter MA, Larson RA, et al: The t(2;5)(p23;q35): A recurring chromosomal abnormality in Ki-1- positive anaplastic large cell lymphoma. *Leukemia* 1989;3: 866-870.

2. Rimokh R, Magaud JP, Berger F, et al: A translocation involving a specific breakpoint (q35) on chromosome 5 is characteristic of anaplastic large cell lymphoma ('Ki-1 lymphoma'). *Br J Haematol* 1989;71: 31-36.

Kaneko Y, Frizzera G, Edamura S, et al: A novel translocation, t(2;5)(p23;q35), in childhood phagocytic large T-cell lymphoma mimicking malignant histiocytosis. *Blood* 1989;73: 806-813.

3. Bitter MA, Franklin WA, Larson RA, et al: Morphology in Ki-1(CD30)-positive non-Hodgkin's lymphoma is correlated with clinical features and the presence of a unique chromosomal abnormality, t(2;5)(p23;q35). *Am J Surg Pathol* 1990;14: 305-316.

4. Mason DY, Bastard C, Rimokh R, et al: CD30-positive large cell lymphomas ('Ki-1 lymphoma') are associated with a chromosomal translocation involving 5q35. *Br J Haematol* 1990;74: 161-168.

Morris SW, Kirstein MN, Valentine MB, et al: Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science* 1994;263: 1281-1284.