



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

12ª Ronda

Antígeno probado: HMB-45

Tejido probado: SEAP-GCP: Ganglio linfático con metástasis de Melanoma
LOCAL: Mayoritariamente ganglio linfático con metástasis de melanoma, Melanoma primario, nevus con melanoma.

Instrucciones: Los participantes fueron invitados a teñir con HMB-45 la preparación remitida por el Programa de Garantía de Calidad (GCP), de un ganglio linfático con metástasis de melanoma, fijado en formol al 10% durante 24 horas; y su propia preparación utilizada como control. Ambas preparaciones fueron devueltas para su evaluación, así como las condiciones y protocolos de tinción utilizados.

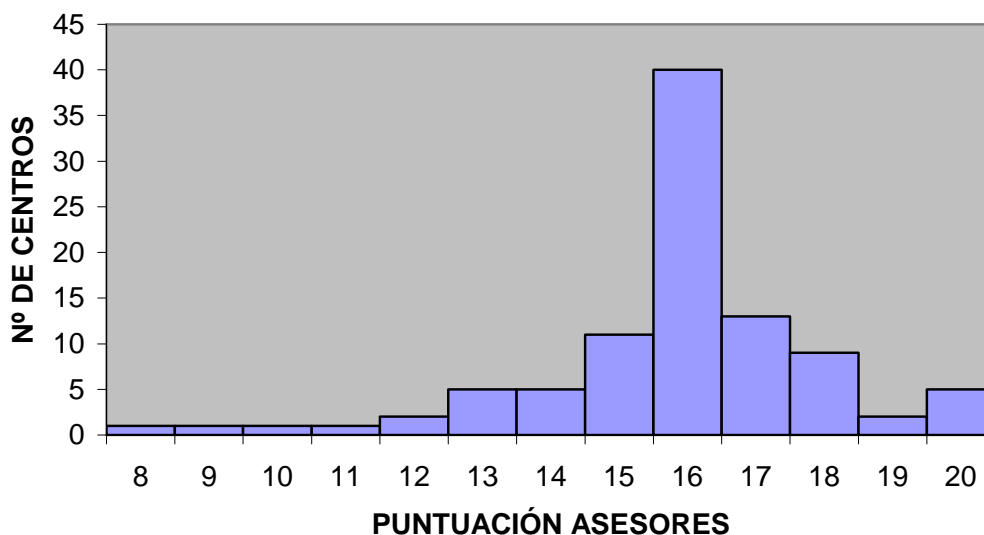
Número de laboratorios participantes:

- Remitidos: 108 GCP y 108 Local
- Contestados: 96, 88,8 % (GCP) y 93, 86,1 % (Control Local)

Estudio de los controles remitidos por el GPC:

Los resultados de la evaluación fueron los siguientes:

HMB-45 12ª Ronda Control GCP



Considerando como aceptable una puntuación superior a 12, el 93,8 % de las preparaciones remitidas fueron consideradas como aceptables, y un 71,8 % con puntuación igual o superior a 16/20, fueron consideradas óptimas o muy buenas. Estos resultados son muy positivos, observándose una sensible mejora con respecto a la ronda anterior (nº 6), donde tan sólo un 21,33% obtuvieron resultados óptimos y un 62,67 % aceptables.

La mayoría de los centros participantes han obtenido un nivel superior al mínimo considerado para aceptar la técnica en su aplicación rutinaria para el diagnóstico y con un mínimo de sensibilidad para la detección de melanomas con tinción heterogénea.

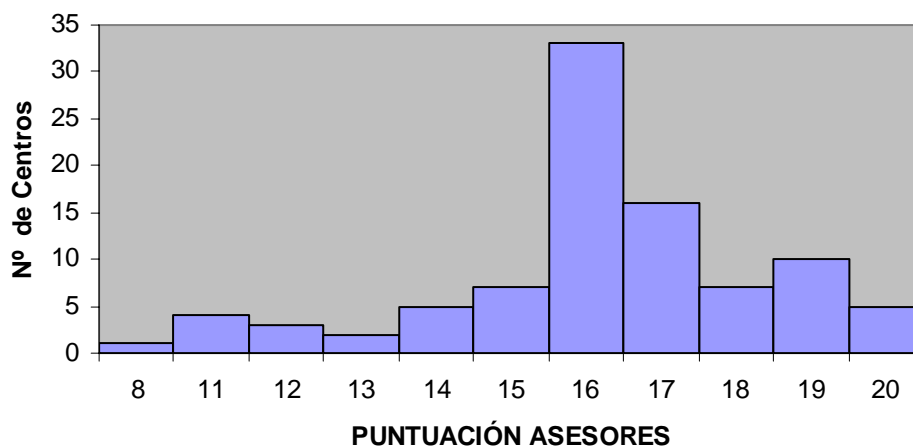
Los principales problemas detectados fueron una alta frecuencia de tinción inadecuada o inespecífica de algunas células, lo que puede llevar a falsos positivos en ganglios linfáticos, o a un incremento del índice de Breslow por mala interpretación de la positividad de algunas células. Otro de los problemas detectados ha sido la excesiva tinción de fondo, que puede

conducir a una interpretación errónea de la técnica por sobre tinción o por tinciones irregulares. En los casos con puntuaciones inferiores a 12, la técnica no era lo suficientemente sensible para su utilización en rutina diagnóstica (tinciones débiles o irregulares), o bien una selección inadecuada del tejido como control, artefactos técnicos o degradación del tejido por pretratamiento excesivo que dificultaba su interpretación.

Estudio de los controles de cada centro:

Los resultados en la evaluación fueron los siguientes:

HMB-45 12ª Ronda Control Local



Considerando como aceptable una puntuación superior a 12, el 91,3 % de las preparaciones remitidas fueron consideradas como aceptables, y un 76,3 % con puntuación igual o superior a 16/20, fueron consideradas óptimas o muy buenas. Estos resultados son muy positivos, y se ha observado una sensible mejora con respecto a la ronda anterior (nº 6), donde un 46,05 % obtuvieron resultados óptimos y un 67,11 % aceptables.

La mayoría de los centros participantes han obtenido un nivel superior al mínimo considerado para aceptar la técnica en su aplicación rutinaria para el

diagnóstico y con un mínimo de sensibilidad para la detección de melanomas con tinción heterogénea.

Los controles más utilizados han sido:

- Piel con melanoma primario: 41 (50,6 %).
- Ganglio con metástasis de melanoma: 15 (18,5 %).
- Piel: 12 (14,8 %).
- Metástasis de melanoma: 7 (8,6 %).
- Nevus: 3 (3,7 %).
- Metástasis partes blandas: 3 (3,7 %).
- No consta: 12 (13 %).

Los principales problemas detectados fueron una alta frecuencia de tinción inadecuada o inespecífica de algunas células. Al igual que el control remitido por el GCP, otro de los problemas detectados ha sido la excesiva tinción de fondo o tinciones irregulares. En los casos con puntuaciones inferiores a 12, la técnica no era lo suficientemente sensible para su utilización en rutina diagnóstica (tinciones débiles o irregulares), o bien una selección inadecuada del tejido como control, artefactos técnicos o degradación del tejido por pretratamiento excesivo que dificultaba su interpretación. Las discrepancias observadas entre los resultados obtenidos con el control ofrecido por el GCP y los controles locales ponen de manifiesto la importancia del procesamiento previo del tejido en la minimización de artefactos técnicos generales y en el aumento en la reproducibilidad de la técnica inmunohistoquímica.

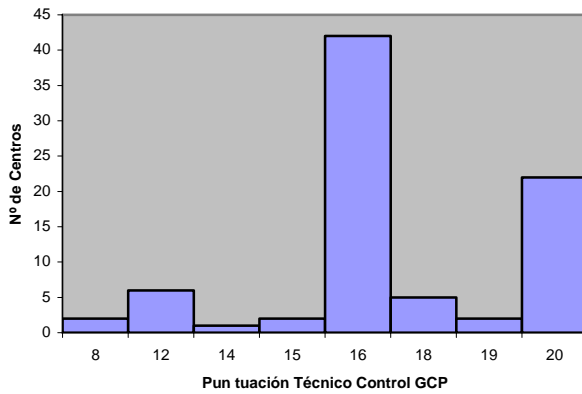
Resultados de la autoevaluación:

La autoevaluación es una parte importante del Programa de Garantía de Calidad. El 85,4 % de los técnicos y el 94,8 % de los patólogos participantes remitieron su valoración de las preparaciones del GCP. En el caso de los

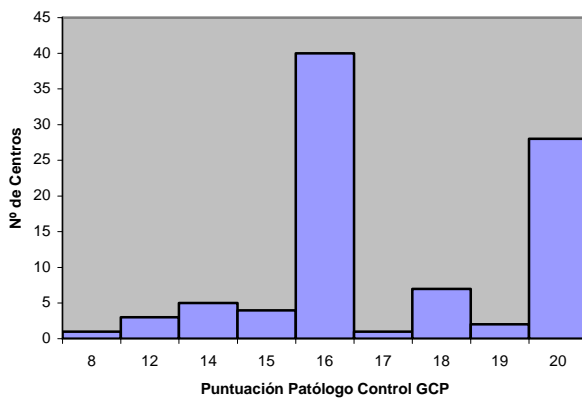
controles locales este porcentaje fue del 83,9 % y el 93,5 % respectivamente. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Control GCP

HMB-45 12ª Ronda Control GCP



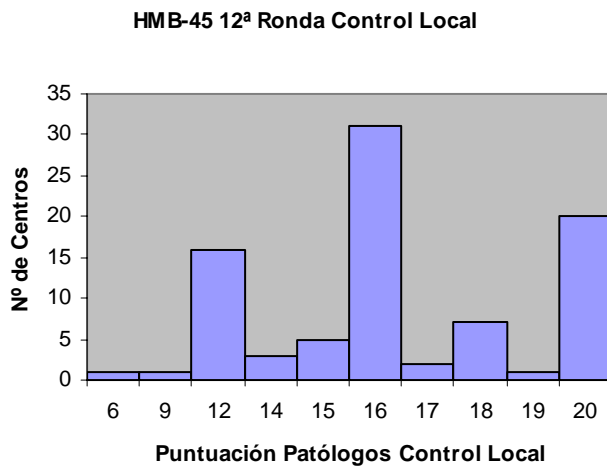
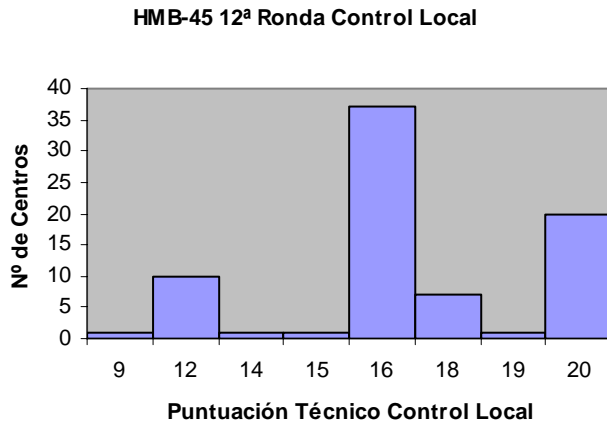
HMB-45 12ª Ronda Control GCP



Como se puede observar en los gráficos la percepción local sobre la calidad de la técnica es superior a la valoración de los observadores externos. Así, para los técnicos participantes el 86,5 % de las preparaciones control del GCP tenían una puntuación igual o superior a 16/20. Este porcentaje fue del 81,2 % en el caso de los patólogos. En ambos casos existe una tendencia a la sobrevaloración de los resultados de la técnica, que se podría corregir con una observación más detallada y objetiva de la tinción. Sería de utilidad la

aplicación de criterios usados por el GCP para la valoración de las preparaciones; como la presencia de pretratamientos excesivos, tinciones de fondo, irregulares o inespecíficas.

Control Local



En la autoevaluación remitida de los controles locales los resultados siguen siendo similares en el caso de los técnicos, con un 83,3 % de los casos con valoración óptima (superior o igual a 16/20), mientras que el porcentaje disminuye al 65,5 % de los patólogos, situándose por debajo incluso de la evaluación realizada por los observadores externos del GCP (76,3 %).

ANTICUERPOS Y MÉTODOS EVALUADOS:

Anticuerpos Primarios: El clon HMB-45 fue utilizado por todos los centros:

- DAKO: concentrado (N1545) o prediluido (M0634): 55 (59,7 %).
- Master Diag: 15 (16,3 %).
- Biocare Med: 5 (5,4 %)
- Biogenex, Zymed, Novocastra: 4 (4,3 %).
- Menarini: 3 (3,2 %).
- Vitro, Enzo, Atom, Signet: 1 (0,1 %)

Recuperación Antigénica: Es recomendable la utilización de recuperación antigénica mediante calor (90,3 % de los centros). El método más utilizado fue la olla (50,5 %) con tampón citrato pH: 6 (52 %), seguido de TBS (17,8 %) o pH: 7-8-9 (12,5 %). Un menor número de centros utilizaron microondas (10,7 %) u otros sistemas de calor (Baño maría, autoclave, Módulo PT...).

La mayoría de los centros no realizaron digestión enzimática (97,5 %). Para este anticuerpo no sería recomendable su utilización ya que podría producir una difusión de la tinción a nivel extracelular, dificultando así su valoración adecuada.

Sistema de Detección: El sistema más utilizado ha sido Dako Envision (42,1 %), seguido de Streptavidina marcada (21 %) y Polímero de Menarini (16,8 %).

Automatización: - Dako Autostainer/ Techmate 500/ Horizon: 58,7 %.

- Bond X/ Bond Max: 17,5 %.
- Ventana (Benchmark): 12,5 %.
- Labvision: 11,5 %.

IMMUNOTINCIÓN ÓPTIMA:

Se consideró inmunotinción óptima la que mostraba una tinción fuerte y adecuada (citoplasmática y granular) de la mayoría de las células neoplásicas con ausencia o mínima tinción de fondo y una adecuada relación de la intensidad de la tinción con respecto al contraste utilizado. En aquellos melanomas con gran cantidad de pigmento, sería recomendable la utilización de contratinción con Giemsa en lugar de hematoxilina, ya que permite diferenciar las células tumorales que muestran el pigmento marrón del cromógeno respecto a los histiocitos que han fagocitado pigmento que muestran un color verdoso. Otra opción utilizada por varios laboratorios es la Fosfatasa Alcalina o Fast Red que genera un pigmento rojizo, permitiendo así su diferenciación del pigmento melánico marrón.

MEJORES MÉTODOS EMPLEADOS (puntuación 20/20 en las preparaciones del GCP).

Método: EnVision, Novolink, ABC streptavidina, XTIVIEW V.1

Bloqueo: Agua oxigenada.

Automatización: Dako Autostainer, Dako Horizon, Dako Techmate 500, Ventana Benchmark XT.

Recuperación antigénica con calor: La mayoría de los centros usan olla a presión con tampón citrato pH 6 durante 2-3 minutos a presión máxima.

Tampón y pH: Citrato pH 6, TBS pH 7,4, Buffer Dako S-3006.

Anticuerpos primarios:

- Dako M0634 Clon HMB45 a dilución entre 1/50 y 1/150 con incubación de 30 minutos a temperatura ambiente.
- Zymed 08-1050 Clon HMB45 Prediluido con incubación de 32 minutos a 37 grados.

- Biogenex MU001-H6 Clon HMB45 a dilución 1/200 con incubación 20 minutos a temperatura ambiente.

Cromógeno: Dako DAB K5007, K3468 y K50015 durante 5 a 10 minutos a temperatura ambiente. AEC Biogenex HK-121-5K durante 10 minutos, y DAB Zymed sin constar más datos sobre el procedimiento.

Comentarios: En general las tinciones de la mayoría de los centros son óptimas y aceptables, y por lo tanto aplicables al diagnóstico de lesiones neoplásicas de forma rutinaria. La valoración del HMB-45 en esta ronda ha sido muy satisfactoria, con un mayor número de centros con tinciones aceptables y óptimas o muy buenas respecto a la Ronda anterior (6ª Ronda) (Tinciones aceptables Ronda actual: 93,8 % vs 6ª Ronda: 62,67 %; Tinciones óptimas Ronda actual: 71,8 % vs 6ª Ronda: 21,33 %). Por tanto, los resultados han sido buenos, aunque podrían mejorarse con la aplicación de procedimientos referidos como inmunotinción óptima, reflejados por los laboratorios que han obtenido mejores resultados.