



FIBAO

FUNDACIÓN PÚBLICA ANDALUZA PARA LA
INVESTIGACIÓN BIOSANITARIA DE ANDALUCÍA ORIENTAL
ALEJANDRO OTERO



Curso Control de la Calidad y la Acreditación en el Laboratorio de Anatomía Patológica

LA INMUNOHISTOQUÍMICA Y EL CONTROL DE CALIDAD EN ANATOMÍA PATOLÓGICA

Raimundo García del Moral Garrido
Director de la UGC Intercentros de
Anatomía Patológica de Granada

OBJETIVOS Y DEFINICIÓN DE LA INMUNOHISTOQUÍMICA

- Aplicación de los inmunoensayos a las secciones tisulares.
- Localización inmunológica de proteínas en su medio ambiente natural.
- Evaluación simultánea de la morfología e identificación y localización de proteínas dentro de las células y tejidos.
- Procedimientos analíticos diagnósticos empleados en la identificación segura y caracterización de tipos tisulares en enfermedades neoplásicas y no neoplásicas.
- **¿La inmunohistoquímica cuantifica?:** No, la intensidad de la señal no representa la cantidad real de proteína acumulada en el tejido.

ESTUDIOS INMUNOHISTOQUÍMICOS DE CLASE I

- Cualquier test inmunohistoquímico para cuya interpretación por el patólogo son esenciales los antecedentes clínicos del paciente y los restantes parámetros anatomopatológicos de la lesión.
- Habitualmente describen el grado de diferenciación de un tumor.
- Aunque sus resultados no son descritos de forma exhaustiva en el informe sí son incorporados por el patólogo en su interpretación diagnóstica del caso.
- Es relativamente sencillo disponer de controles internos y externos válidos para el procedimiento.

ESTUDIOS INMUNOHISTOQUÍMICOS DE CLASE II

- Cualquier prueba inmunohistoquímica no relacionada directamente con el diagnóstico histopatológico de caso y que proporciona información sobre el pronóstico o la terapéutica a realizar en el paciente.
- Pueden indicar tanto la evolución clínica del paciente como tener valor predictivo sobre la respuesta del paciente a un tratamiento determinado.
- Son ampliamente demandados y utilizados por los clínicos.
- Requieren incorporar en el informe anatomopatológico una descripción explícita y detallada cualitativa o cuantitativa de los resultados obtenidos .
- Su empleo necesita un extenso soporte científico previo.
- Dependiendo de su uso algunos de estos tests pueden también ser empleados como de clase I: CD117, CD20, etc.

ESTUDIOS INMUNOHISTOQUÍMICOS DE CLASE II: TIPOS

CLASIFICACIÓN DE LOS TESTS IHQ DE CLASE II SEGÚN EL CAP

Activos	En consideración	En discusión
ER	C4d	Nucleofosmina 1 (NPM1) en AML
PR	DOG1	FOXP1 en DLBCL
HER2	Proteína MMR	Centerina (GCET1) en DLBCL
Ki67		IgG/IgG4 en enfermedad IgG4
CD117		c-Myc en DLBCL
CD20		

AVANCES TECNOLÓGICOS EN INMUNOHISTOQUÍMICA

- La inmunohistoquímica ha sido empleada en patología diagnóstica desde hace 4 décadas.
- Solamente en los últimos 10 años han ocurrido avances tecnológicos que permiten:
 - Hacerla reproducible
 - Afinar y calibrar adecuadamente los procedimientos
 - Armonizar y optimizar la difusión de los procedimientos entre distintos laboratorios
 - Estandarizar y automatizar el método específico



ESTANDARIZACIÓN U OPTIMIZACIÓN EN IHQ

- El término ***estandarización*** es repetidamente mal usado en inmunohistoquímica puesto que:

- a.El procesamiento de los tejidos aún no puede ser automatizado y estandarizado de forma completa en la mayoría de los laboratorios.

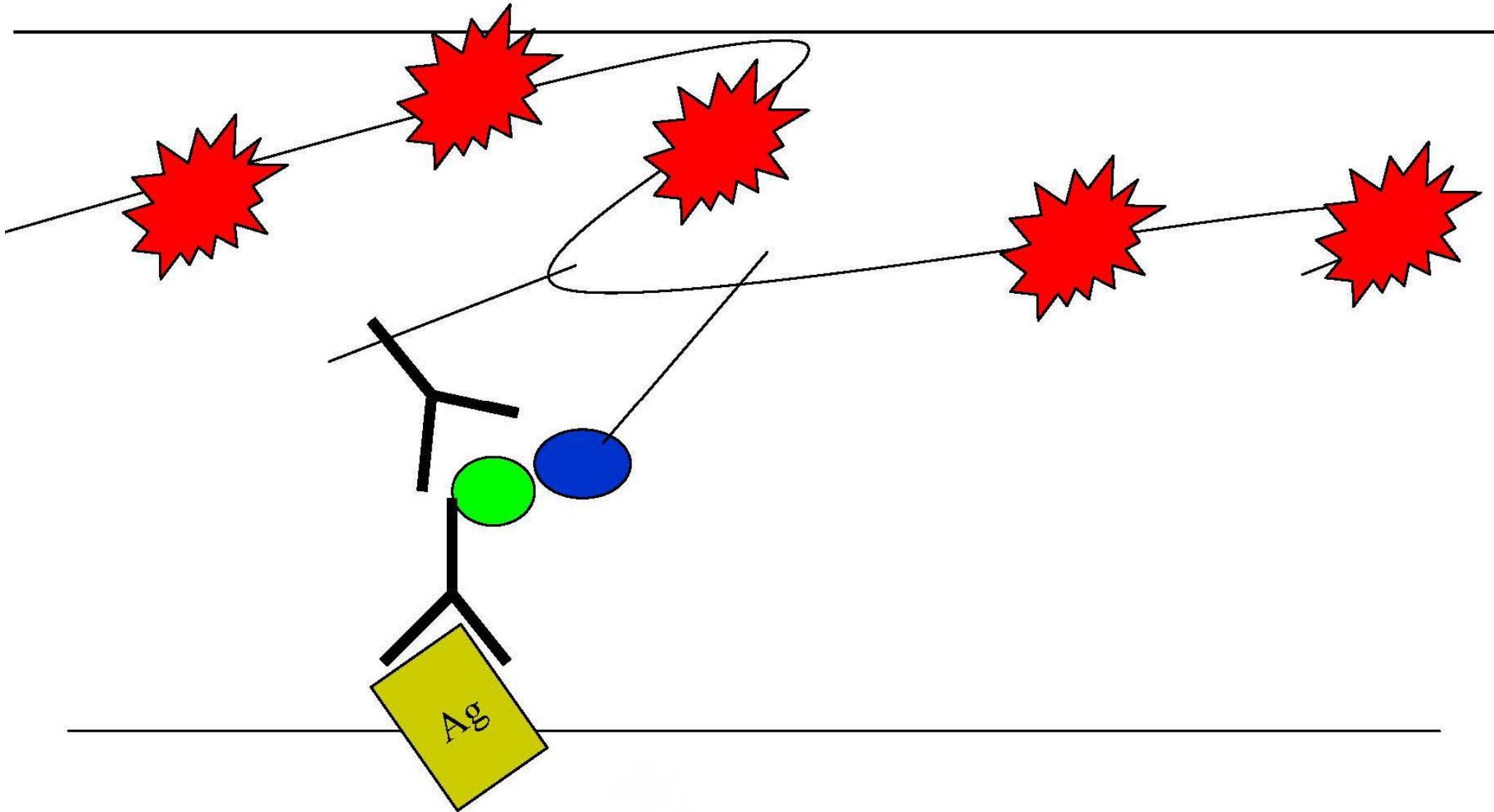
- b.Cada cáncer es único desde el punto de vista genético y por tanto contiene marcadores difíciles de estandarizar.

- c.No existen controles y valores de referencia de tipo *gold standard* para muchas de las pruebas.

Por ej.: Un metro es la distancia a la que la luz viaja en el vacío en $1/299,792,458$ segundos.

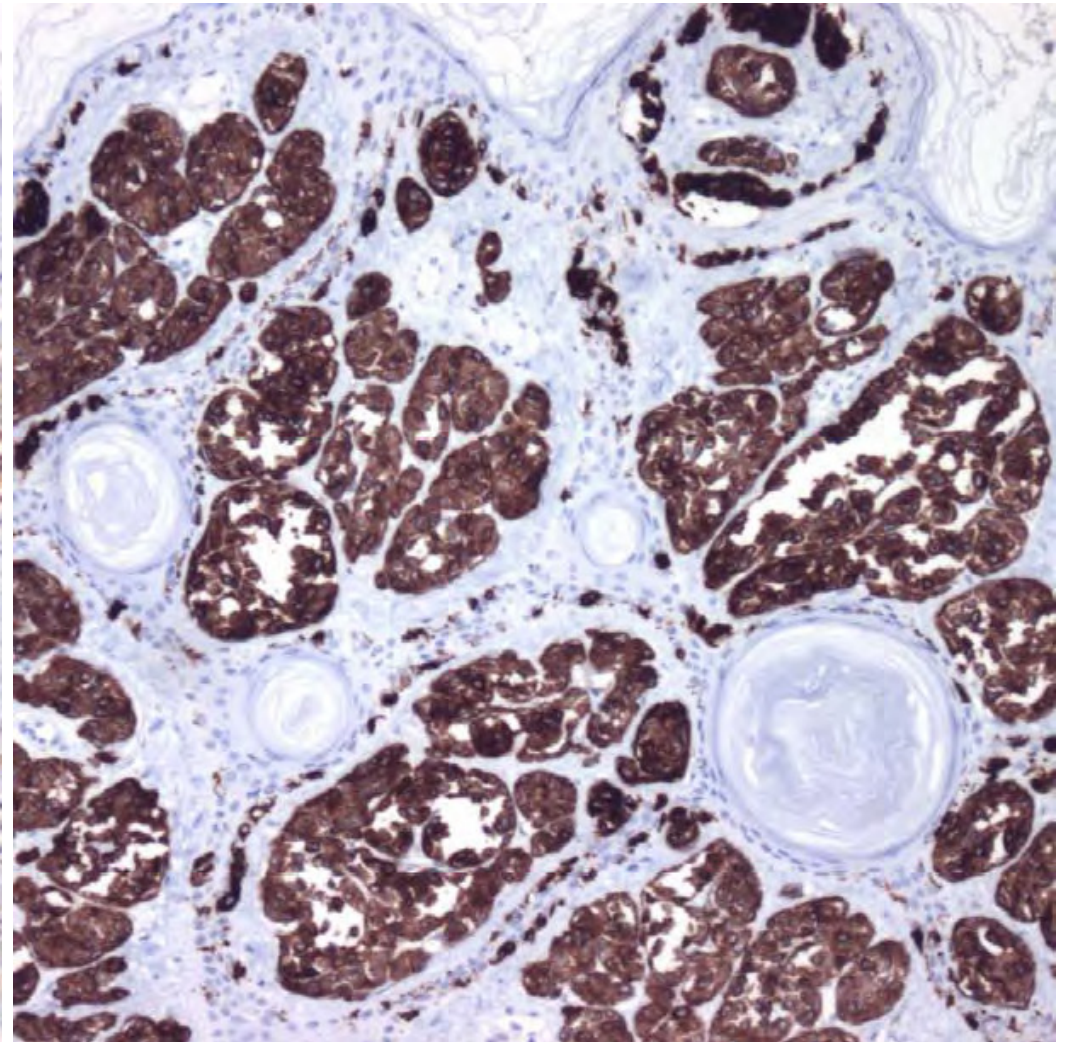
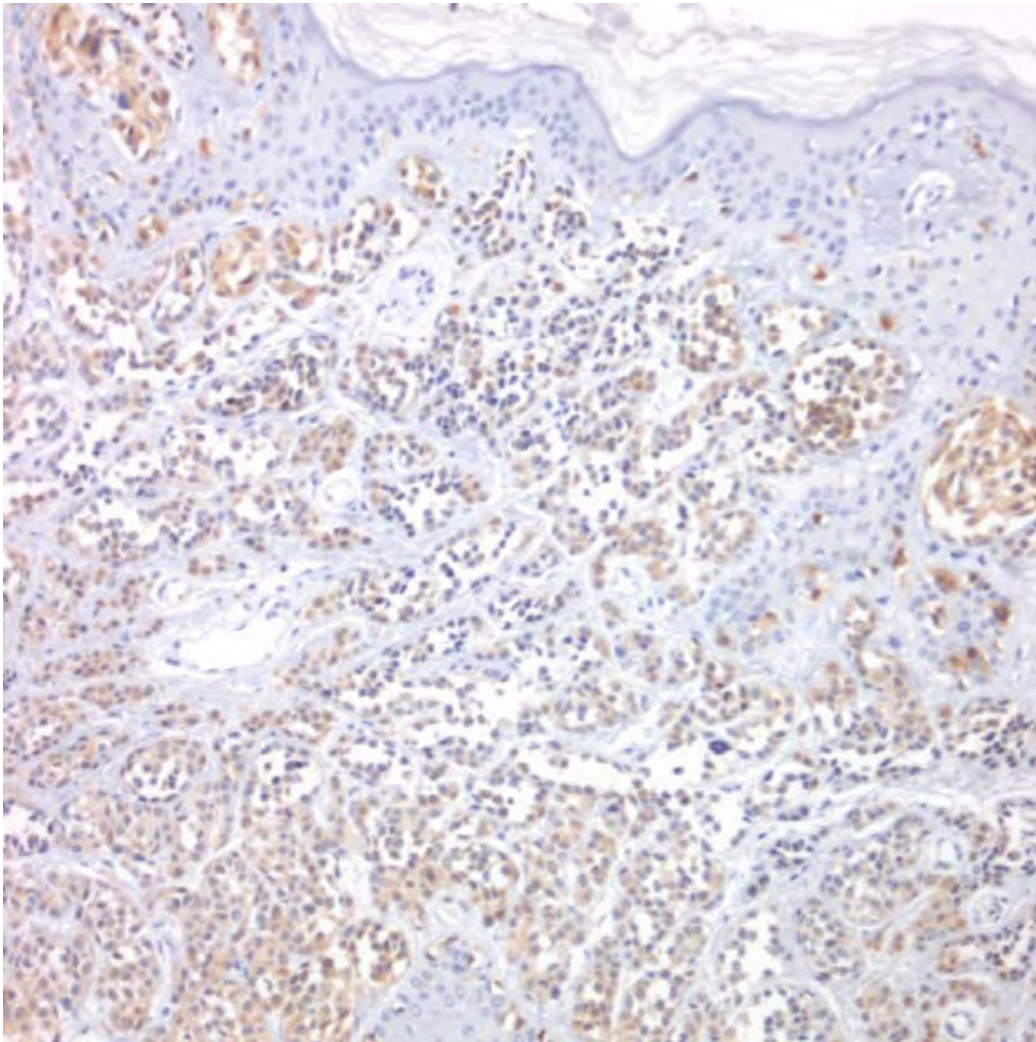
- a.Por todo ello en lugar de estandarización es más correcto emplear el término **optimización**.

UN BUEN EJEMPLO DE PORQUÉ ES DIFÍCIL ESTANDARIZAR EN INMUNOHISTOQUÍMICA



OTRO EJEMPLO MÁS:

MELAN A



EL CONTROL DE CALIDAD EN IHQ (I)

- La gran complejidad de los test empleados en inmunohistoquímica, la dificultad para estandarizarlos y la ausencia de valores de referencia ha llevado a que:
 - a. Los procedimientos de control de calidad vayan muy por detrás de los de Análisis Clínicos.
 - b. Las agencias de calidad públicas y las compañías privadas interesadas en calidad que existen en cada país sean pocas y tengan una influencia menor en las necesarias mejoras.
 - c. Aún no estén definidas la sensibilidad y la especificidad de cada determinación en numerosos laboratorios.

EL CONTROL DE CALIDAD EN IHQ (II)

- No hay definición precisa o acuerdo sobre que muestras deben usarse como controles positivos y negativos.
- No es sencillo ni barato conseguir muestras adecuadas para control de calidad. Además los hospitales no generan recursos para ello.
- Los calibradores estandarizados para las pruebas apenas existen.
- La filosofía de calidad entre los facultativos, técnicos, directivos de los hospitales, clínicos usuarios, etc. brilla por su ausencia.
- No obstante es posible comenzar a hacer cosas: Gráficos de Levy-Jenning empleando la patología digital.

EL CONTROL DE CALIDAD EN IHQ (II)

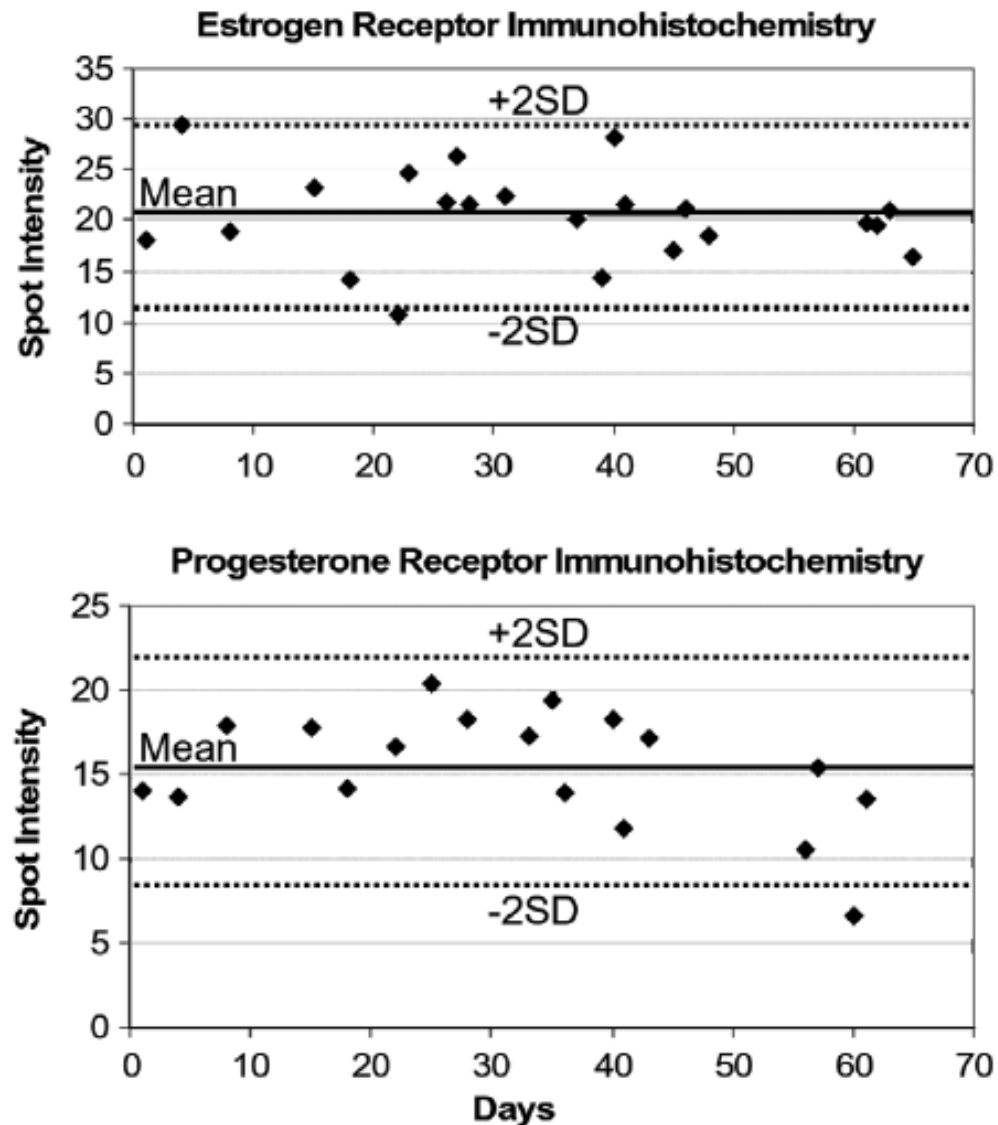
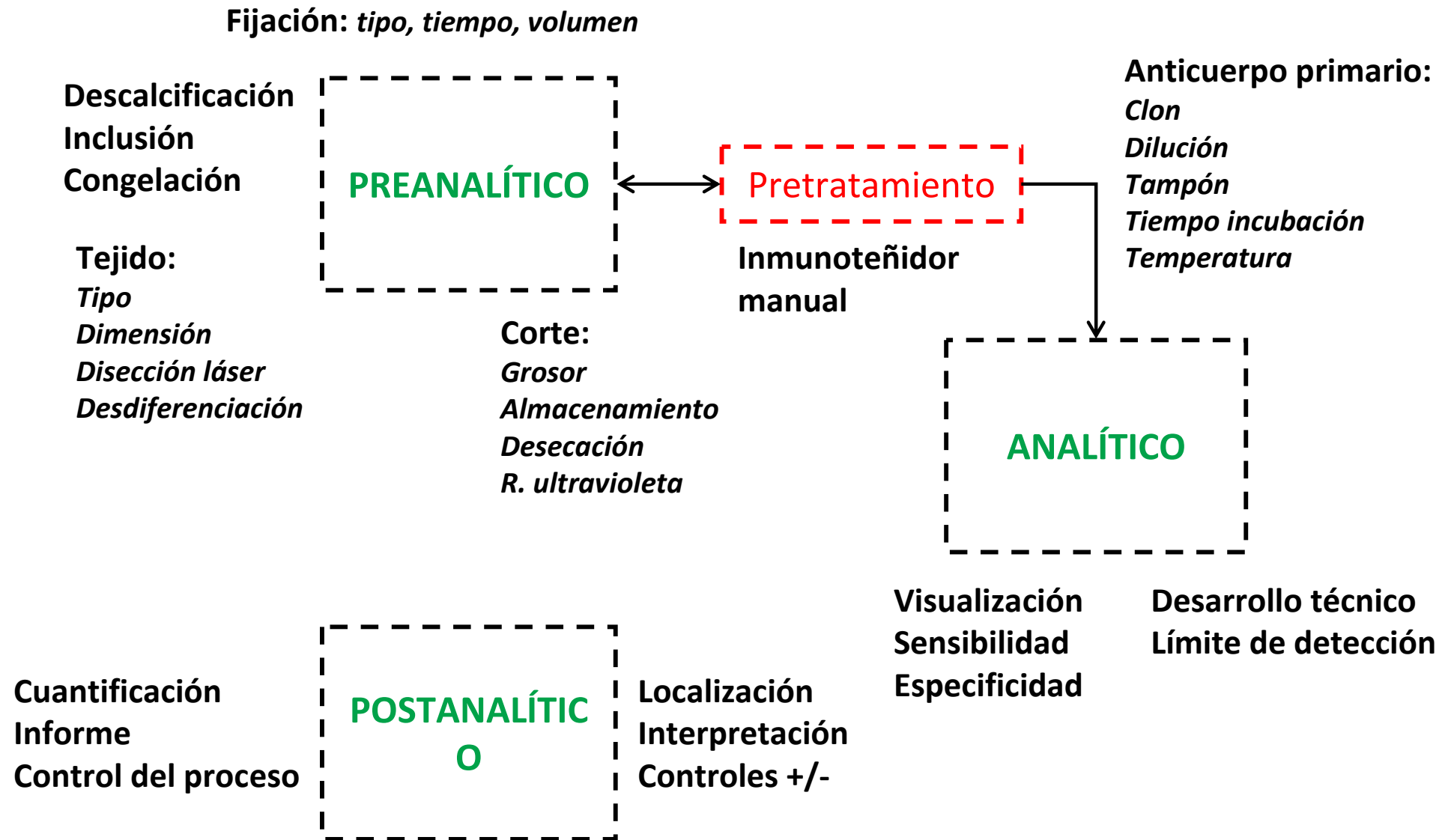


FIGURE 8. Levy-Jennings charting for estrogen and progesterone receptor immunohistochemistry, over a 2-month period. The mean and ± 2 SD boundaries are also shown. No staining failures occurred in this time frame.

EL CONTROL DE CALIDAD EN IHQ (III)

- Dentro de unos límites la **centralización de los mecanismos de supervisión** (controles, evaluación de la tecnología de cada laboratorio, indicación de mejoras tecnológicas, etc.) **es útil** aunque la **mejora continua** surge del compromiso de los profesionales con su propia Unidad y este es el motor de la **formación continuada** del profesional. Esto no invalida que la suscripción a un sistema de calidad externo sea recomendable.
- La alternativa de **centralizar totalmente los procedimientos complejos** desmotiva a los profesionales y todo para que al final los índices estadísticos kappa de correlación entre expertos tampoco sean válidos en numerosos casos.
- **¿Por qué no centralizar directamente los diagnósticos?**
- La solución es automatizar y protocolizar para lo cual la **patología digital y la telepatología** son la clave.

LOS ERRORES MÁS COMUNES EN INMUNOHISTOQUÍMICA



Modificado de Nielsen S: Most common laboratory pitfalls in immunohistochemistry. Nordiq Seminar, Krakow, 2010.

LOS “KITS” DEL BULLI





COMBINANDO LAS VARIABLES EXPUESTAS, EN INMUNOHISTOQUÍMICA PUEDE HABER MÁS DE CUATRO MILLONES DE PROTOCOLOS DISTINTOS ¡Y EL 99% ERRÓNEOS O AL MENOS SOMETIDOS A POSIBLES MEJORAS!

REQUISITOS BÁSICOS PARA LA CALIDAD EN IHQ

- **FIJACIÓN Y PROCESAMIENTO APROPIADOS DEL TEJIDO**
- **EFICIENTE RECUPERACIÓN ANTIGÉNICA**
- **ADECUADA ELECCIÓN DEL ANTICUERPO PRIMARIO Y EL CLON EN SU CASO**
- **SISTEMA DE DETECCIÓN ESPECÍFICO, SEGURO Y POTENTE**
- **CONTROLES POSITIVOS Y NEGATIVOS APROPIADOS**

QC PREANALÍTICO EN IHQ: PROBLEMAS DE FIJACIÓN

Enorme variabilidad en el proceso de fijación:

- a. Sistema de obtención de la muestra** (exfoliación, aspiración, punción con aguja, endoscopio, punch, rasurado, bisturí, etc.).
- b. Estado de la biopsia** (necrótico, isquémico o parcialmente autolítico dependiendo del tratamiento realizado tras la obtención, artefactado por desecación, mala fijación, etc.).
- c. Tipo de fijador** (formol, etanol, acetona, B5, Bouin, etc.).
- d. Pretratamientos empleados** (decalcificación, congelación, etc.).
- e. Tiempo de estancia en la formalina** (depende del que toma la muestra, del que la transporta, de quien la registra, la talla, de cuando se coloca para la inclusión, de si es fin de semana y se pasa horas esperando el comienzo del proceso, etc.).

QC PREANALÍTICO EN IHQ: ESTÁNDARES PROPUESTOS PARA LA FIJACIÓN DEL TEJIDO (I)

- a. **Optimización del tiempo** transcurrido desde la excisión del tejido hasta situarlo en el fijador o alternatively remisión a 4º C envasado al vacío a AP mediante tubo neumático.
- b. **Evitar la manipulación inadecuada** de los tejidos y los tiempos de espera excesivos.
- c. **Anotar el tiempo total de fijación formólica** y los ocurridos en el procesador en caso de largas esperas. Idealmente estos tiempos deben constar en el informe anatomopatológico.
- d. **Las pruebas IHQ de tipo II no son válidas si el tejido ha sido descalcificado.** Las de tipo I pueden realizarse evitando prolongar los tiempos y de ellas deben recogerse: el tiempo anterior de estancia en fijador del tejido, el tipo de agente descalcificante y el tiempo empleado en el proceso.

QC PREANALÍTICO EN IHQ: ESTÁNDARES PROPUESTOS PARA LA FIJACIÓN DEL TEJIDO (II)

- a. **Fijador de elección: formalina neutra (pH entre 7,2-7,6) en tampón fosfato y al 10%** : mínimo de 8 horas; óptimo de 24 (biopsias pequeñas) y 48 horas (biopsias mayores) sin que se superen en ningún caso las 72.
- b. No olvidar que los **tiempos de fijación inferiores a 8 horas** son más deletéreos para el tejido que los superiores a 72 y provocan refijación adicional en los alcoholes del procesador con gran heterogeneidad en las inmunotinciones, sobre todo si además requieren tratamiento proteolítico.
- c. Si la **fijación ha sido superior a 72 horas** para las pruebas de tipo II o de **10 días** para las de tipo I se requiere validación en el primer caso y controles positivos y negativos en el segundo.
- d. Aunque la **proporción relativa de formol y tejido** está en discusión es recomendable que **no sea inferior a 5:1**.

QC PREANALÍTICO EN IHQ: INCLUSIÓN Y ALMACENAMIENTO DEL TEJIDO

1. Aunque exista variabilidad en el **proceso automático de inclusión** entre diferentes laboratorios (concentraciones progresivas de alcoholes, protocolos sin tolueno o xileno, temperaturas y tipo de parafina, etc.) este proceso pueden ser estandarizado en cada uno de ellos.
2. Los problemas surgen con los **bloques de tejido procedentes de otros laboratorios**, ya sea por centralización de procedimientos o consultas de segunda opinión.

QC PREANALÍTICO EN IHQ: TRATAMIENTO DE LOS CORTES

- a. El montaje de los cortes de 3-4 μm de espesor debe hacerse en **portaobjetos especiales** tratados electrostáticamente para evitar el despegamiento del tejido.
- b. Despegamientos parciales pueden originar **falsos positivos** debido al **atrapamiento** de reactivos.
- c. Aunque el **secado de los portas** debe ser optimizado en cada laboratorio un secado a 37° C durante toda la noche o a 60 ° C durante una hora es suficiente para garantizar la adherencia del tejido. Calentamientos excesivos en seco pueden originar la pérdida de antigenicidad.

QC PREANALÍTICO EN IHQ: ALMACENAMIENTO DE CORTES DEL TEJIDO

1. Durante mucho tiempo se ha pensado que los cortes de tejido podían almacenarse indefinidamente. Hoy se sabe que su estancia a temperatura ambiente durante un tiempo deteriora su antigenicidad por acción de determinados **agentes medioambientales**:
 - a. El calor
 - b. La desecación excesiva
 - c. La radiación ultravioleta
2. De manera general puede decirse que **el mejor corte de reserva se encuentra en el bloque de parafina.**
3. ¡Evitemos guardar cortes de control para inmunohistoquímica más de 30 días! Si deben guardarse algunos envolverlos en papel de aluminio y almacenarlos en el congelador a -20° C.

QC ANALÍTICO EN IHQ:

DESENMASCARAMIENTO ANTIGÉNICO (I)

- La mayoría de los epítomos antigénicos están enmascarados por la formalina y necesitan ser recuperados en más del 80% de los casos.
- **Agentes desenmascarantes:**
 - a. **Calor** (de la olla a presión y el microondas al módulo PT:

La eficiencia del procedimiento esencialmente depende de cuatro variables: temperatura, tiempo, pH y composición química de la solución de incubación.
 - b. **Tratamientos proteolíticos con enzimas** (pronasa, proteinasa K, tripsina, pepsina, ficina, etc.):

Dependen del tiempo de fijación del tejido (si es escaso el tratamiento debe ser más corto; si por el contrario ha sido largo el tratamiento enzimático puede ser insuficiente).
- **Métodos:** A optimizar para cada antígeno y procedimiento de inmunotinción.

QC ANALÍTICO EN IHQ: DESENMASCARAMIENTO ANTIGÉNICO Y pH (II)

- Existen **4 comportamientos posibles** para los antígenos:
- Antígenos que se recuperan a cualquier pH (CD20)
- Antígenos que se recuperan bien a pH muy bajo o alto con notable disminución del proceso entre valores de 3 a 6: Ki67 y receptor de estrógenos.
- La gran mayoría de los antígenos se recuperan mejor a pH alto (Tris/EDTA 8-9) aunque en muchos laboratorios aún se sigue trabajando en rutina a pH 6.
- Antígenos que se recuperan mejor a pH bajo: proteínas priónicas, EMA.

QC ANALÍTICO EN IHQ: ANTICUERPOS PRIMARIOS

1. **En diagnóstico: Anticuerpo primario prediluido optimizado,** recomendaciones predefinidas de pretratamiento y automatización total del laboratorio:
 - a) Permite centrarse en los **problemas específicos** que surjan en la puesta a punto del método.
 - b) Mejora la **seguridad del paciente** evitando errores.
 - c) Asegura la **trazabilidad** al evitar manipulaciones intermedias.
 - d) Facilita la **estandarización** y la **acreditación**.
2. **En investigación: Anticuerpo primario concentrado** donde es imprescindible la **optimización individual** de cada anticuerpo con lo que ello conlleva: ensayo de diferentes desenmascaramientos, uso de detergentes, diluciones, tiempos y temperaturas de incubación, controles, etc.

QC ANALÍTICO EN IHQ: SISTEMAS DE AMPLIFICACIÓN

- **Sistemas de detección indirectos basados en nuevos complejos poliméricos con alto poder de amplificación que permiten:**
- Eliminar la biotina del proceso de revelado.
- Amplificar hasta 10 veces la señal primaria obtenida con los complejos tradicionales de avidina-biotina.
- Acortar los tiempos de incubación de anticuerpo primario y los propios componentes de revelado.
- **¿Qué complejo elegir para una mejor calidad del proceso?**

Para mí lo más importante es mejorar al máximo el **límite de detección del anticuerpo primario** entendido este como la más baja proporción de antígeno que es estadísticamente distinguible de la tinción de fondo inespecífica o el control negativo.

Esta mejora es muy evidente en algunos antígenos que en ocasiones se expresan débilmente como: Bcl-6, CD4, MSH6, etc.

QC ANALÍTICO EN IHQ: SISTEMAS DE AMPLIFICACIÓN

IHC – Most common pitfalls



Complexity

		Quanto Hi Def. EnV.FI.+ Refine Super Sens. Ultra Vis. LP UltraView+amp	
	Ult.Vis. ONE	EnV. FI. UltraView	

Sensitivity

1:25

1:50

1:150

1:500

QC ANALÍTICO EN IHQ: LA ENZIMA Y EL CROMÓGENO

- La universalización de procedimientos, la optimización de recursos, su compatibilidad con los medios hidrofóbidos de inclusión, la facilidad de manejo y el menor precio han impuesto a la **peroxidasa de rábano picante** como sistema de marcaje para potenciar la señal y a la **diaminobencidina** como sustrato a pesar de su demostrado poder carcinogénico.
- Yo prefiero la diaminobencidina potenciada para producir inmunotinciones de color negruzco más que pardo suave.

TRES CUESTIONES QUE POR SÍ MISMAS MERECEN UN CURSO DE INMUNOHISTOQUÍMICA:

- **La tinción inespecífica de fondo:**

Cualquier tinción positiva en el tejido problema que no es resultado de la reacción específica de los anticuerpos con el antígeno al que van destinados.

- **Los controles:**

- a. **Positivos:** Muestras que contienen el antígeno a detectar por el anticuerpo ensayado procedentes de **tejidos normales** (preferible por contener cantidades antígeno predecibles), otros pacientes con **patología equivalente** o **líneas celulares** bien caracterizadas.

- b. **Negativos:** Son tejidos que **no contienen el antígeno problema** y por tanto identifican la **reactividad cruzada** del anticuerpo primario.

EL CONTROL DE CALIDAD EN IHQ: RESUMEN

Es un reto importante pero no misión imposible

Se basa en:

- Usar **controles** apropiados
- Emplear un **sistema de detección** lo más preciso, fiel, sensible y específico posible
- Manejar con eficiencia el **desemascaramiento antigénico** por calor y enzimas cuando sea preciso
- Usar **anticuerpos primarios** optimizados para inmunateñidores automáticos y clones apropiados
- **Armonizar, optimizar y estandarizar** al máximo posible todos los procesos