



Aanbeveling:
Ingangscntrole van antistoffen t.b.v. flowcytometrie

Augustus 2016

Werkgroep NVC ISO 15189

Leden:

- A. Bloem**
- A. Claessen**
- C. Koelman**
- J. Lambers**
- J. Leuvenink**
- P. de Schouwer**
- V.H.J. van der Velden**

Dit document beschrijft hoe bij flowcytometrische analyses aan de ISO15189 verificatienorm 5.3.2.3 kan worden voldaan voor de ingangscntroles van antistoffen.

1. Norm ISO15189 (december 2012):

Binnen de ISO15189 worden er eisen gesteld aan reagentia en verbruiksartikelen. Met betrekking tot acceptatietesten is de volgende norm gesteld:

Normeis 5.3.2.3: "Reagentia en verbruiksartikelen – Acceptatietesten

"Van elke nieuwe samenstelling van onderzoekkits met gewijzigde reagentia of procedure, of een nieuwe batch of levering, moet alvorens deze voor onderzoek worden gebruikt, de werking worden geverifieerd.

Van verbruiksartikelen die van invloed kunnen zijn op de kwaliteit van onderzoeken moet de werking worden geverifieerd alvorens ze bij onderzoeken worden toegepast."

De norm zegt dat "alvorens" (voordat) reagentia of een procedure in gebruik mag worden genomen, deze moeten zijn getest en goed bevonden. In de dagelijkse diagnostische praktijk kan een strikte invoering van deze normeis tot een aanzienlijke kostenstijging leiden. Aangezien de werkgroep het patiëntenrisico als uiterst laag inschat wanneer controles worden uitgevoerd voordat patiënten gegevens worden vrijgegeven, stelt de werkgroep de volgende ruimere interpretatie van normeis 5.3.2.3 voor:

"Van elke nieuwe samenstelling van onderzoekkits met gewijzigde reagentia of procedure, of een nieuwe batch of levering, of van verbruiksgoederen die van invloed kunnen zijn op de kwaliteit van onderzoeken, moet de werking aantoonbaar worden geverifieerd alvorens de uitslagen worden vrijgegeven."

Ook de Raad voor Accreditatie (RvA) heeft aangegeven deze ruimere interpretatie van de normeis aanvaardbaar te vinden.

2. Uitgangspunt

Uitgangspunt is dat er reeds is voldaan aan onderstaande procedures:

1. Procedures voor Inkeuring en Opslag
 - 1) Inkeuring bij ontvangst door het magazijn/lab: transport condities (voor zover mogelijk), controle verpakking, productnummer, houdbaarheid, bijsluitercontrole
 - 2) Opslag: opslagconditiesZowel inkeuring bij ontvangst als opslag kunnen verricht worden volgens labbrede werkwijzen. Er zijn geen aanvullende criteria nodig voor antistoffen.

2. Procedures voor het werken met gevalideerde apparatuur en de juiste instrument settings
3. Procedures voor gebruik van de juiste verdunning van de afzonderlijke antistoffen om het optimale expressieniveau te bereiken.
4. Procedures voor gebruik van gevalideerde of geverifieerde antistof-fluorochroomcombinaties en -mixen daarvan.
5. (Klinische) validatie van de mix in geval van een zelf samengestelde mix. In geval van een CE/IVD gecertificeerde kit, of in de literatuur goed beschreven mix van antistoffen, volstaat verificatie bij gebruik volledig in overeenstemming met de methode door de fabrikant of literatuur aangegeven.

In het voorliggende document worden bovenstaande onderwerpen niet behandeld en richtlijnen voor de uitvoering van deze procedures worden dan ook niet beschreven in dit document.

3. Focus

Deze richtlijn is van toepassing voor elke nieuwe batch of levering van een antistof conjugaat (dit is van belang: dezelfde kloon-fluorochroom combinatie moet op deze wijze getest worden. Alleen “antistof” betekent dat met dezelfde kloon andere fluorochromen kunnen worden toegepast). Een risicoanalyse is de basis voor het bepalen welke parameters geverifieerd dienen te worden.

Bijvoorbeeld:

1. Kwantitatieve bepalingen: bijvoorbeeld absolute aantallen, percentages van populaties, maar ook MFI-waarden zijn mogelijk
2. Kwalitatieve bepalingen: bijvoorbeeld positief vs negatief of zwakke, normale of hoge expressie (zie richtlijnen NVC op www.cytometrie.nl).

Voor de risicoanalyse kan er worden opgemerkt dat het resultaat van flowcytometrische bepalingen vaak niet enkel op één antistof gebaseerd is, maar juist op een combinatie van verschillende antistoffen.

Op basis van een risicoanalyse dienen de gekozen werkwijze(s) van de verificatie/ acceptatie op voorhand beschreven te zijn, waarbij vooraf acceptatiecriteria worden vastgesteld. De resultaten en de conclusies van de verificaties dienen te worden gedocumenteerd. Voorbeelden van acceptatie criteria zoals die in de laboratoria van de werkgroepleden worden gehanteerd zijn te vinden in de bijlage.

Verificatie van de werking van de antistof *gedurende* de uitvoer van patiëntendiagnostiek op basis van systematische opvolging (“ongoing verification”) is alleen toegestaan indien er voldoende representatief patiëntenmateriaal over is om de bepaling te kunnen herhalen indien een antistof(mix)

niet aan de acceptatiecriteria blijkt te voldoen (na de analyse, maar vóór het vrijgeven van het resultaat aan de kliniek).

4. Werkwijze

Verificatie en acceptatie van de werking van de antistoffen dient plaats te vinden en gedocumenteerd te worden voordat uitslagen vrijgegeven worden.

Er zijn verschillende opties voor het verifiëren van de werking van nieuwe batches en of leveringen van antistoffen of mixen daarvan:

Situatie A: Losse antistoffen die in een vaste combinatie en concentratie gepipetteerd worden.

Mogelijke aanpak

- Iedere antistof vooraf accepteren m.b.v. een representatieve commerciële controle, beads waar de betreffende antigeen aan gekoppeld wordt, of een representatief controle materiaal zoals bloed of beenmerg met bekende expressie(patronen).
- Controleren a.d.h.v. positieve en negatieve interne controles binnen het patiëntenmonster zelf. Deze interne controles dienen te worden gedefinieerd op basis van:
 - 1) Een andere antistof (bv CD19 bij acceptatietest CD20; CD45) en/of
 - 2) Reactiviteits patroon van de antistof van de vorige en geaccepteerde batch.
 - 3) Scatter-eigenschappen (SSC/FSC)

Hierbij dient opgemerkt te worden dat alléén bij positieve resultaten de betreffende antistof direct kan worden geaccepteerd, waarbij dezelfde S/N ratio en MFI behaald dient te worden. Bij een negatieve uitslag kan niet worden vastgesteld of de betreffende antistof correct heeft gewerkt; data verkregen met zo'n antistof zijn alleen acceptabel wanneer:

- 1) Het resultaat van de bepaling niet enkel op deze antistof gebaseerd is; én
- 2) Er een aantoonbare systematische opvolging en periodieke beoordeling plaatsvindt van de resultaten van dit reagens ("ongoing validation"; waarbij na het evalueren van andere patiëntenmonsters, met positiviteit voor de betreffende marker, achteraf de werking van de antistof kan worden vastgesteld)

Situatie B: Batch van een mix van antistoffen in een vaste combinatie en concentratie (mix gepipetteerd door lab of een kant en klaar geleverde mix door een firma).

Mogelijke aanpak

Monster(s) waarbij alle te accepteren antistoffen de verwachte aankleuring hebben laten zien. Dit kan betreffen commerciële controles, interne controles, positieve aankleuring in andere representatieve monsters, al dan niet via "ongoing verification".

Situatie C: Losse antistoffen die bij een bekende mix gepipetteerd worden

Mogelijke aanpak

Conform Losse antistoffen: zie situatie A of B.

Situatie D: Antistoffen die gericht zijn tegen antigenen die niet voorkomen op normale bloed of beenmerg monsters en die daarom moeilijker via bovenstaande richtlijnen zijn te accepteren.

Mogelijke aanpak

- Controle materiaal beschikbaar: bv beads, cellijnen, thymus of op patienten materiaal. Vooraf vastgestelde parameters kunnen getoetst worden door het resultaat te vergelijken met dat van een eenzelfde reeds geverifieerde antistof of een mix van antistoffen.
- Bij patiëntenmateriaal kan gekozen worden voor “ongoing validation”, indien het resultaat van de bepaling niet enkel op deze antistof gebaseerd is. Bijvoorbeeld: CD1a is cruciaal om een common-thymocyttaire T-ALL te definiëren. Deze subclassificatie is echter niet klinisch relevant; in dit geval is CD1a daarom ook zonder acceptatietest te gebruiken, mits er een aantoonbare en systematische opvolging van het monoklonaal plaatsvindt.
- “Ongoing validation” van zeldzame antistoffen is niet bruikbaar indien de resultaten van deze antistof het klinisch handelen direct beïnvloeden: Bijvoorbeeld: Voor analyse van een Langerhanscelhistiocytose is CD1a cruciaal voor de flowcytometrische conclusie, dus in dat geval moet de CD1a antistof voor rapportage van de data naar de kliniek geverifieerd zijn en is verificatie middels “ongoing validation” onvoldoende.

5. Referenties/bronvermelding

- NEN-EN-ISO 15189, december 2012
- Richtlijn SKML
- Website Streck (www.streck.com): mogelijkheden voor CD-Chex: gestabiliseerde bloedmonsters met daarin positieve controles voor verschillende antistoffen. Ook andere firma's hebben mogelijk vergelijkbare producten.

BIJLAGE 1

Voorbeelden van rapportage ingangscontrole en acceptatie:

Dit betreft enkel ter illustratie hoe in verschillende centra de acceptatietesten momenteel zijn opgezet; dit is niet per definitie volgens de hier beschreven richtlijnen.

**Ingangscntrole antistofmix
Myeloide mix Screening acute leukemie**

KBZ-code	FOR
documentcode	DIV 084
versienr.	001
versiedatum	03 apr 2015
afd./ werplek	LLD
gebruikers	LLDMID
pagina	1 van 2

Behorende bij: AN 008 / PR 019 / BER 035 bij 08

Informatie

Deze ingangscntrole betreft myeloide mix Screening acute leukemie (zie BER 035 bij 08).

Test

Plaats nieuwe mix (na registratie in Monocad) in het bakje "ingangscntrole" in de koelkast.

Zet een normaal beenmerg monster in met de nieuwe en de op dat moment in gebruik zijnde mix volgens (AN008).

Meet en analyseer de data (zie onder) middels aquisitie en analyse template myeloide mix Screening acute leukemie en vul de onderstaande tabel in.

Plaats mix in bakje "in gebruik" als de ingangscntrole is goedgekeurd

Eis

Aankleuringpatronen moeten op het oog vergelijkbaar zijn (arbitrair)

De MFI waarden mogen niet meer dan 30% afwijken van de in gebruik zijnde mix.

Resultaat

Datum dat antistofmix is gemaakt: 10 mrt 2016

Datum dat antistof is getest: 11 mrt 2016 Uitgevoerd door: K.M. J.H.T.

Monster waarop antistofmix is getest: 7888731..... (PID nummer)

Monster	MFI+ Nieuwe mix = A	MFI+ Oude mix = B	Vershil (%) (A-B)/Bx 100	MFI- Nieuwe mix Voldoet?
CD36 FITC	12060	12207	-1	
CD13.33 PE	15669	15453	1	
CD45 PerCP	25504	25190	1	
CD34 APC	23930	22943	4	

} ja

Aankleuringpatroon voldoet: ja/nee
Conclusie mix: voldoet/voldoet niet*

Verificatie in monocad ingevoerd A.B.K. 15/mrt/2016

Analyse uitgevoerd door: J.H.T. 11/3

Datum:

* Doorhalen wat niet van toepassing is. Indien een antistofmix niet voldoet contact opnemen met verantwoordelijke medisch immunoloog

auteur	verificateur	leidinggevende	verantwoordelijke
--------	--------------	----------------	-------------------

Bereiding myeloïde mix scr AL

Bij: BER 035 en AN 008

CD36	FITC	40 µl onverdond	(1 µl / test)	Sanquin	catnr M1613
CD13	PE	200 µl onverdond	(5 µl / test)	BD	catnr 347406
CD33	PE	200 µl onverdond	(5 µl / test)	BD	catnr 345799
CD45	PerCP	200 µl onverdond	(5 µl / test)	BD	catnr 345809
CD34	APC	20 µl onverdond	(0,5 µl / test)	BD	catnr 345804

PBS/BSA + Na-Azide **740 µl**
Totaal 1400 µl

verdelen over 2 gebruiks-ampullen 700µl/ampul

50 µl mix toevoegen per test aan cellen

Bereidingsdatum	Bereid door (paraaf)	Lotnr					Mon o cad	Bijzonderheden
		CD36 FITC	CD13 PE	CD33 PE	CD45 PerCP	CD34 APC		
12 jan 2016	TW	CH	80020967	5233888	4272675	5026086	5229804	CH
23 jan 2016	GP	AB	800209673	5233888	4272675	5026086	5229804	GP
3 mrt 2016	IB	JHC	80020967	5233888	5233888	5230743	5229804	JHC
10 mrt 2016	MAB	ABR	822209673	5233888	5239889	5230743	5229804	ABR

auteur *CLP*
verificateur
leidinggevende
verantwoordelijke

doQu

Controle verlopen monoklonalen:

2-11-2015

Moab	Fluorochroom	Batchnummer	Exp. Datum	Verdun-ning	Akkoord
CO3	Ftc	3150839	31-3-2015		ar
CO7	Ftc	24	9-11-2015		ar
CO15	Ftc	60773	31-1-2011	1:10	ar
CO16	Ftc	44821	30-4-2011		ar
CO22	Ftc	403894	31-10-15		ar
CO42a	Ftc	3219862	31-5-15		ar
CO57	Ftc	36295	30-9-10		ar
CO59	Ftc	22	19-6-12		ar
H(A)D2	Ftc	3206717	31-1-2015		ar
FMC7	Ftc	92963	10-2014		ar
JM	Ftc	51501	02-2012	1:4	ar
JGA	Ftc	80736	02-2015	1:4	ar
CO5	PE	14	20-11-11		ar
CO10	PE	20	9-7-15	1:2	ar
CO16	PE	27337	31-8-2009		ar
CO14	PE	83817	30-6-2002		ar
CO16	PE	20	23-7-2008		ar
CO22	PE	3198818	31-5-2015		ar
CO25	PE	3357680	31-8-2006		ar
CO55	PE	21	4-11-11	1:4	ar
CO56	PE	23	10-3-15		ar
CO3	PE	06	10-5-2008		ar
CO14	PE	33831	22-7-2011		ar
Y6 Mouse	PE	35050	30-9-2008		ar
H(A)D2	PE	17233	31-3-2002		ar
H(A)D2	PE	02140	30-6-2011		ar
CO3	Percep	3102763	28-2-2015	1:2	ar
CO7	ARE	123374	04-2015		ar
CO27	ARE	4276807	31-8-2015	1:2	ar
CO38	ARE	3157604	28-2-2015	1:5	= gevonden
CO38	ARE	4184662	31-5-15	1:4	ar
H(A)D2	ARE	20083	30-9-2009	1:5	ar
3Imp/140	Combi	4110893	30-9-15		nieuw bestel!
41813	Combi	78789	31-5-15		

Eindconclusie: Kappa APC-H7 4020908 30-9-2015 ar.

Opmerkingen: alle expressies moab's binnen norm

Conclusie: ar 10/11/15

Datum: Paraaf:

doQu

Buis 1

Bereidingsdatum: 12-02-2016

Houdbaar tot: 26-02-2016

Voor de LST buis: (Voor 20x)
Pipetteer in een bruin invriescupje

		gepipetteerd door en paraaf	gecontroleerd door en paraaf
CD20 V450	100 µl	YR	Bs
CD4 V450	100 µl		Bs
CD45 V500-C	100 µl		Bs
CD8 FITC	200 µl		Bs
Lambda FITC	200 µl		Bs
CD56 PE	200 µl		Bs
Kappa PE	200 µl		Bs
CD5 Percp-cy5.5	300 µl		Bs
CD19 PE-cy7	100 µl		Bs
TCRgd PE-cy7	100 µl		Bs
CD3 APC (SK7)	100 µl		Bs
CD38 APC-H7	100 µl		Bs

Elikt op invriescupje; LST, buis 1 Datum in gebruik, houdbaar tot datum.
In de koelkast en donker bewaren, dan is deze verdunning 2 weken houdbaar.

Controle samenstelling Bulk
Buis 1 / LST

Naam materiaal + datum:
gecontroleerd door en paraaf

~~XXXXXXXXXX~~ 0804965

gecontroleerd door en paraaf

CD20+CD38 = CD19	YR
kappa+ Lambda = CD20	YR → losruiter 7250412
CD4+CD8 = CD3	YR
NotB/NotT = CD56+ + of CD5+	YR
TCR g/d correleert met CD3	YR

CD38 correleert	YR
CD45 correleert	YR
CD5 = CD3 binnen T	YR

Datum vrijgifte:

12.2.2016

Paraaf:

Buis 2 1^o fase: (voor 20X)

Bereidingsdatum: 15-02-2016

Pipetteer in een bruin invriescupje

Houdbaar tot: 01-03-2016

		gepipetteerd door en paraaf	gecontroleerd door en paraaf
CD14 FITC	200 µl	YR	AR
CD33 PE	200 µl		AR
CD45 Percp	100 µl		AR
CD117 APC	20 µl		AR
CD34 PeCy7	100 µl		AR
PBS/Azide	200 µl		AR

Elikt op invriescupje; buis 2 Datum in gebruik, houdbaar tot datum.
In de koelkast en donker bewaren, dan is deze verdunning 2 weken houdbaar.

Controle samenstelling Bulk

Naam materiaal + datum:

~~XXXXXXXXXX~~ 9365422
~~XXXXXXXXXX~~ 7009625

Buis 2

gecontroleerd door en paraaf

CD117 = CD34	YR
CD14 = CD33 sterk +	YR
CD45 correleert	YR

Datum vrijgifte:

150216

Paraaf:

ARG

Leuvenia en lymfocyt bereiding en controle bulk
Versie nummer 2
Afdeling/specialisme

Pagina 2 van 4

Geldig tot: 2 november 2017
1 van 2 beheerde kopieën

VOORBEELD

Overzicht monoklonalen in gebruik

CD4 V450		BD			Kloon	SK3
Binnen	Exp. dd.	Lot. nr.	In gebruik	Titratie contr.	Uit gebruik	
15/08/2013	28/02/2014	2334665	22-8-2013		10-1-2014	
30/12/2013	31/01/2015	3323799	10-1-2014		26-3-2014	
2-4-2014	31/03/2015	3354353	26-3-2014		30-04-2014	
28-4-2014	31-3-2015	4085776	30-04-2014		6-11-2014	
22-5-2014	31-7-2015	4104553	6-11-2014		28-7-2014	
3-7-2014	31-7-2015	4135587	28-7-2014		11-9-2014	
3-7-2014	31-7-2015	4135587	11-9-2014		25-9-2014	
? ?		?	25-9-2014		3-10-2014	
4-8-2014	30-9-2015	4189680	3-10-2014		17-12-2014	
7-10-2014	30-11-2015	4248859	17-12-2014		4-2-2015	
6-1-2015	29-2-2016	4329767	4-2-2015		11-3-2015	
23-2-2015	29-2-2016	4329767	11-3-2015		20-4-2015	
27-3-2015	30-4-2016	5017661	20-4-2015		27-5-2015	
29-4-2015	30-4-2016	5062838	27-5-2015		16-7-2015	
9-6-2015	30-4-2016	5093689	16-7-2015		24/08/2015	
20-7-2015	31-7-2016	5135830	24/08/2015		16-9-2015	
2-9-2015	30-9-2016	5177643	16-9-2015		23-10-2015	
5-10-2015	30-9-2016	5222665	?		7-12-2015	
29-10-2015	30-11-2016	5268677	7-12-2015		8-2-2016	
11-1-2016	28-2-2017	5350806	8-2-2016		11-3-2016	
18-1-2016	28-2-2017	5350806	11-3-2016			
CD20 V450		BD			Kloon	L27
Binnen	Exp. dd.	Lot. nr.	In gebruik	Titratie contr.	Uit gebruik	
15/8/2013	31-5-2015	3156658	22-8-2013		10-1-2014	
3-12-2013	30-6-2015	3219900	10-1-2014		26-3-2014	
16-1-2014	30-11-2015	3309976	26-3-2014		12-5-2014	
14-4-2014	30-11-2015	3350648	12-5-2014		30-6-2014	
16/05/2014	30/11/2015	3350648	30-6-2014		28-7-2014	
3-7-2014	31-3-2016	4091747	28-7-2014		3-7-2014	
25-7-2014	31-5-2015	4129899	3-7-2014		11-9-2014	
4-8-2014	31-3-2016	4105822	11-9-2014		3-11-2014	
16-9-2014	31-7-2016	4205837	3-11-2014		5-12-2014	
13-11-2014	31-7-2016	4205837	5-12-2014		7-1-2015	
15-12-2014	31-7-2016	4261638	7-1-2015		4-2-2015	
15-1-2015	31-7-2016	4261638	4-2-2015		11-3-2015	
23-2-2015	31-10-2016	4324551	11-3-2015		9-4-2015	
23-3-2015	31-10-2016	4324551	9-4-2015		6-5-2015	
21-4-2015	31-10-2016	5033860	6-5-2015		4-6-2015	
15-5-2015	31-1-2017	5056902	4-6-2015		23-7-2015	
16-6-2015	30-4-2017	5110826	23-7-2015		24/08/2015	
31-7-2015	30-4-2017	5148954	24/08/2015		16-9-2015	
2-9-2015	30-4-2017	5148954	16-9-2015		16-10-2015	
5-10-2015	31-7-2017	5215556	16-10-2015		9-11-2015	
27-10-2015	31-7-2017	5253885	9-11-2015		7-12-2015	
17-11-2015	31-7-2017	5253885	7-12-2015		14-1-2016	
23-12-2015	31-10-2017	5294729	14-1-2016		2-11-2016	
25-1-2016	31-10-2017	5307956	2-11-2016		11-3-2016	
18-2-2016	31-10-2017	6019752	11-3-2016			