



Aanbeveling:
Ingangsccontrole 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 ingangsccontroles 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 verbruiksartikelen 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 werkgroepen 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 antigenen 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-thymocytair 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 ingangscntrole 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 LLD/MID
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 aqisitie 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. JHT

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

Monster	MFI+ Nieuwe mix = A	MFI+ Oude mix = B	Verschil (%) (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

Aankleuringstron voldoet: ja/nee*

Conclusie mix: voldoet voldoet niet*

Verificatie in monocad ingevoerd ABK 15/mrt/2016

Analyse uitgevoerd door: JHT 4/3

Datum:

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

auteur

verificateur

leidendevende

verantwoordelijke

Bereiding myeloïde mix scr AL

Bij: BER 035 en AN 008

CD36	FITC	40 µl onverdund	(1 µl / test)	Sanquin	catnr M1613
CD13	PE	200 µl onverdund	(5 µl / test)	BD	catnr 347406
CD33	PE	200 µl onverdund	(5 µl / test)	BD	catnr 345799
CD45	PerCP	200 µl onverdund	(5 µl / test)	BD	catnr 345809
CD34	APC	20 µl onverdund	(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		Lotnr	Lotnr	Lotnr	Lotnr	Mon o cad	Bijzonderheden
		CD36 FITC	CD13 PE	CD33 PE	CD45 PerCP	CD34 APC			
12 jan 2016	TW	CH	800200677	5233088	4272675	5026086	5220804	CH	
27 jan 2016	GR	AD	800200677	5233088	4272675	5026086	5220804	GR	
3 mrt 2016	IB	JIT	800200677	5189089	5233088	5230743	5220804	JIT	
10 mrt 2016	Malb	APC	800200677	5233088	5189089	5230743	5220804	APC	

auteur CLP
 verificateur _____
 leidinggevende _____
 verantwoordelijke _____

doQu

Controle verlopen monoklonalen:

2-11-2015

Moab	Fluorochroom	Batchnummer	Exp. Datum	Verdun-ning	Akkoord
CO3	Ftk	3150839	31-3-2015		AR
CO7	Ftk	24	9-11-2015		AR
CO15	Ftk	60773	31-1-2011	1:10	AR
CO16	Ftk	44821	30-4-2011		AR
CO22	Ftk	4038949	31-10-15		AR
CO42	Ftk	3219862	31-5-15		AR
CO57	Ftk	36295	30-9-10		AR
CO59	Ftk	22	19-6-12		AR
HGA-D2	Ftk	3206717	31-1-2015		AR
FMC7	Ftk	92903	10-2014		AR
J&M	Ftk	51504	02-2012	1:4	AR
J&A	Ftk	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
CO4	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	16-3-15		AR
q3	PE	06	10-5-2008		AR
CO14	PE	33831	22-7-2011		AR
J&M	PE	35050	30-9-2008		AR
HGA-D2	PE	17233	31-3-2006		AR
HGA-AR	PE	02140	30-6-2011		AR
CO3	Percep	3102763	28-2-2015	1:2	AR
CO7	ARC	123374	04-2015		AR
CO27	ARC	4276807	31-8-2015	1:2	AR
CO38	ARC	3157604	28-2-2015	1:5	= gevonden
CO38	ARC	4184662	31-5-15	1:4	AR
HGA-D2	ARC	20083	30-9-2009	1:5	AR
3/imp/3/9	Combi	4108593	30-9-15	nieuw besteld	!
4/12/3	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	YRL	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

Eliket 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 Buis 1 / LST

Naam materiaal + datum: ~~XXXXXXXXXX~~ 0804965
 gecontroleerd door en paraaf

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

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

Datum vrijgifte: AR 12.2.2016
 Paraaf:

Buis 2 1^e fase: (voor 20x)
 Pipetteer in een bruin invriescupje

Bereidingsdatum: 15-02-2016
 Houdbaar tot: 01-03-2016

		gepipetteerd door en paraaf	gecontroleerd door en paraaf
CD14 FITC	200 µl	YRL	AR
CD33 PE	200 µl		AR
CD45 Percp	100 µl		AR
CD117 APC	20 µl		AR
CD34 PeCy7	100 µl		AR
PBS/Azide	280 µl		AR

Eliket 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 Buis 2

Naam materiaal + datum: ~~XXXXXXXXXX~~ 9365422
 gecontroleerd door en paraaf ~~XXXXXXXXXX~~ 7009625

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

Datum vrijgifte: 150216
 Paraaf: ARG

Leukemie en lymfoom bereiding en controle buis
 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	3158658	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			