Miltenyi Biotec

Applications CliniMACS® Plus

Manuel d'utilisation



Les éléments du système CliniMACS incluant réactifs, jeux de tubulures, instruments et tampon PBS/EDTA, sont conçus, fabriqués et testés selon un système de qualité certifié ISO 13485. Dans les pays de l'UE, les éléments du système CliniMACS sont disponibles en tant que dispositifs médicaux marqués CE, pour leur usage prévu respectif, sauf indication contraire. Aux États-Unis, le CliniMACS CD34 Reagent System incluant le CliniMACS Plus Instrument, le CliniMACS CD34 Reagent, le CliniMACS Tubing Set TS et le CliniMACS Tubing Set LS ainsi que le CliniMACS PBS/EDTA Buffer, est approuvé par la FDA en tant que dispositif à usage humanitaire (HUD) et autorisé par la loi fédérale des États-Unis pour le traitement de patients atteints de leucémie aiguë myéloïde (LAM) en première rémission complète. L'efficacité de ce dispositif n'a pas été démontrée pour cette indication. Tous les autres produits de la gamme CliniMACS ne sont disponibles que pour une utilisation dans le cadre d'une demande approuvée de nouveau médicament expérimental (IND), d'une exemption de dispositif expérimental (IDE) ou d'une approbation de la FDA En Australie, les éléments suivants du système CliniMACS Prodigy sont compris dans l'Australian Register of Therapeutic Goods (ARTG) et sont donc approuvés pour livraison: CliniMACS Prodigy, CliniMACS CD34 Reagent, jeux de tubulures CliniMACS Prodigy et CliniMACS PBS/EDTA Buffer. Seulement ces produits compris dans l'ARTG peuvent être utilisés en Australie.

Sauf indication contraire expressément mentionnée, les produits et les services de Miltenyi Biotec ne sont destinés qu'à des fins de recherche et pas à l'usage thérapeutique ou diagnostique.

Copyright © 2023Miltenyi Biotec ou de ses filiales. Tous droits réservés.

Aucune partie de cette publication ne peut être reproduite, sauvegardée sur un système de recherche, transmise, publiée, ni diffusée sous quelque forme que ce soit ou par quelconque moyen électronique, mécanique, par photocopie, microfilm, enregistrement ou autre, sans l'autorisation écrite préalable de Miltenyi Biotec. Toutefois, nonobstant ce qui précède, les propriétaires du Système CliniMACS Prodigy peuvent faire des copies aux seules fins de la formation du personnel dans l'utilisation ou l'entretien de l'unité au sein de leur entreprise ou organisation.

CliniMACS, MACS, MACSmix, le logo Miltenyi Biotec et le MiniMACS sont des marques ou marques déposées de Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG et/ou de ses filiales dans différents pays du monde. Tous les autres marques commerciales mentionnées dans cette documentation sont la propriété de leurs détenteurs respectifs et ne sont utilisés qu'à des fins d'identification.

Applications CliniMACS® Plus

Manuel d'utilisation

Logiciel version 2.4x

Édition: 2023-02
210-003-234/01

MD CE 0123

Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG
Friedrich-Ebert-Straße 68
51429 Bergisch Gladbach
Allemagne

Miltenyi Biotec Technical Support
+49 2204 8306-3803
technicalsupport@miltenyi.com

www.miltenyibiotec.com

Informations essentielles

Ce manuel d'utilisation fournit des instructions pour l'utilisation des applications CliniMACS Plus. Les instructions, avertissements, précautions d'emploi et autres informations importantes pour l'utilisation du CliniMACS Plus Instrument sont fournis dans le manuel d'utilisation du CliniMACS Plus Instrument.

⚠ AVERTISSEMENT

L'utilisation du système CliniMACS Plus doit impérativement et exclusivement être réservée à des opérateurs formés. Avant de mettre en service le système, il convient de lire attentivement et de comprendre les consignes de sécurité, les avertissements, les précautions d'emploi et les instructions pour le bon fonctionnement du CliniMACS Plus Instrument figurant dans les notices d'utilisation du système CliniMACS Plus (y compris, mais sans s'y limiter, les consignes de sécurité figurant au chapitre 3 « Informations importantes sur la sécurité » dans le manuel d'utilisation du CliniMACS Plus Instrument et au chapitre 3 « Avertissements et précautions d'emploi » à la page 27 dans ce manuel d'utilisation) ainsi que dans toute recommandation de sécurité publiée par Miltenyi Biotec. Accorder une attention particulière à tous les avertissements affichés sur l'instrument ou fournis avec les consommables, les accessoires, les matériels supplémentaires et les équipements. Suivre toutes les instructions et procédures à tout moment durant l'utilisation de l'instrument, en veillant à respecter strictement toutes les consignes de sécurité, les avertissements, les précautions d'emploi et les instructions. Le non-respect des consignes de sécurité, avertissements, précautions d'emploi et instructions contenus dans les notices d'utilisation pourrait causer un dysfonctionnement de l'instrument, des dommages matériels, la perte des cellules cibles, des blessures corporelles et/ou la mort.

Table des matières

1	**Introduction**	**11**
1.1	Informations générales	11
1.2	Marquage des cellules avec les réactifs CliniMACS	12
1.3	Séparation cellulaire magnétique à gradient élevé	13
1.4	Stratégies de séparation	14
1.4.1	Stratégie d'enrichissement	15
1.4.2	Stratégie de déplétion	16
2	**Glossaire**	**19**
2.1	Représentation graphique	19
2.2	Glossaire des symboles	19
2.3	Glossaire des termes	20
3	**Avertissements et précautions d'emploi**	**27**
3.1	Processus	27
3.2	Les réactifs CliniMACS et les conjugués de biotine	28
3.3	Manipulation de matériels biologiques dangereux	29
3.4	Produit cellulaire de départ	30
4	**Le système CliniMACS Plus**	**31**
4.1	CliniMACS Plus Instrument	31
4.2	Les réactifs CliniMACS et les conjugués de biotine	31
4.3	Les jeux de tubulures CliniMACS	31
4.4	CliniMACS PBS/EDTA Buffer	31
4.5	Accessoires CliniMACS	32
4.6	Matériels supplémentaires requis	32
4.7	Équipement requis	33
5	**Aperçu des applications**	**35**
5.1	Vos cellules cibles en quatre ÉTAPES	35
5.2	Tableau synoptique	37

6	**Aperçu des ÉTAPES 1-4 en fonction de l'application**	**41**
6.1	Enrichissement de cellules CD34 positives	41
6.1.1	ÉTAPE 1 : Préparation cellulaire et marquage magnétique	41
6.1.2	ÉTAPE 2 : Sélection du programme de séparation	43
6.1.3	ÉTAPE 3 : Installation des jeux de tubulures CliniMACS	44
6.1.4	ÉTAPE 4 : Séparation CliniMACS Plus	44
6.2	Enrichissement de cellules CD14 positives	44
6.2.1	ÉTAPE 1 : Préparation cellulaire et marquage magnétique	44
6.2.2	ÉTAPE 2 : Sélection du programme de séparation	47
6.2.3	ÉTAPE 3 : Installation des jeux de tubulures CliniMACS	47
6.2.4	ÉTAPE 4 : Séparation CliniMACS Plus	48
6.3	Enrichissement/déplétion avec le CliniMACS Anti-Biotin Reagent	48
6.3.1	ÉTAPE 1 : Préparation cellulaire et marquage magnétique	48
6.3.2	ÉTAPE 2 : Sélection du programme de séparation	53
6.3.3	ÉTAPE 3 : Installation des jeux de tubulures CliniMACS	53
6.3.4	ÉTAPE 4 : Séparation CliniMACS Plus	53
6.4	Enrichissement de cellules CD56 positives	54
6.4.1	ÉTAPE 1 : Préparation cellulaire et marquage magnétique	54
6.4.2	ÉTAPE 2 : Sélection du programme de séparation	57
6.4.3	ÉTAPE 3 : Installation des jeux de tubulures CliniMACS	57
6.4.4	ÉTAPE 4 : Séparation CliniMACS Plus	57
6.5	Déplétion de cellules CD3 positives	58
6.5.1	ÉTAPE 1 : Préparation cellulaire et marquage magnétique	58
6.5.2	ÉTAPE 2 : Sélection du programme de séparation	62
6.5.3	ÉTAPE 3 : Installation des jeux de tubulures CliniMACS	62
6.5.4	ÉTAPE 4 : Séparation CliniMACS Plus	63
6.6	Déplétion de cellules CD19 positives	64
6.6.1	ÉTAPE 1 : Préparation cellulaire et marquage magnétique	64
6.6.2	ÉTAPE 2 : Sélection du programme de séparation	66
6.6.3	ÉTAPE 3 : Installation des jeux de tubulures CliniMACS	66
6.6.4	ÉTAPE 4 : Séparation CliniMACS Plus	66

6.7	Déplétion de cellules CD3 positives et de cellules CD19 positives	67
6.7.1	ÉTAPE 1 : Préparation cellulaire et marquage magnétique	67
6.7.2	ÉTAPE 2 : Sélection du programme de séparation	70
6.7.3	ÉTAPE 3 : Installation des jeux de tubulures CliniMACS	70
6.7.4	ÉTAPE 4 : Séparation CliniMACS Plus	70
6.8	Enrichissement/déplétion de cellules CD8 positives	71
6.8.1	ÉTAPE 1 : Préparation cellulaire et marquage magnétique	71
6.8.2	ÉTAPE 2 : Sélection du programme de séparation	75
6.8.3	ÉTAPE 3 : Installation des jeux de tubulures CliniMACS	75
6.8.4	ÉTAPE 4 : Séparation CliniMACS Plus	75
6.9	Enrichissement/déplétion de cellules CD25 positives	76
6.9.1	ÉTAPE 1 : Préparation cellulaire et marquage magnétique	76
6.9.2	ÉTAPE 2 : Sélection du programme de séparation	81
6.9.3	ÉTAPE 3 : Installation des jeux de tubulures CliniMACS	81
6.9.4	ÉTAPE 4 : Séparation CliniMACS Plus	81
6.10	Enrichissement/déplétion de cellules CD4 positives	82
6.10.1	ÉTAPE 1 : Préparation cellulaire et marquage magnétique	82
6.10.2	ÉTAPE 2 : Sélection du programme de séparation	86
6.10.3	ÉTAPE 3 : Installation des jeux de tubulures CliniMACS	86
6.10.4	ÉTAPE 4 : Séparation CliniMACS Plus	86
6.11	Déplétion simultanée de cellules CD4 positives et de cellules CD8 positives	87
6.11.1	ÉTAPE 1 : Préparation cellulaire et marquage magnétique	87
6.11.2	ÉTAPE 2 : Sélection du programme de séparation	90
6.11.3	ÉTAPE 3 : Installation des jeux de tubulures CliniMACS	91
6.11.4	ÉTAPE 4 : Séparation CliniMACS Plus	91
6.12	Enrichissement de cellules CD1c (BDCA-1) positives – Partie 1 : Déplétion de cellules CD19 positives et marquage de cellules CD1c (BDCA-1) positives	91
6.12.1	ÉTAPE 1 : Préparation cellulaire et marquage magnétique	91
6.12.2	ÉTAPE 2 : Sélection du programme de séparation	94
6.12.3	ÉTAPE 3 : Installation des jeux de tubulures CliniMACS	94

6.12.4 ÉTAPE 4 : Séparation CliniMACS Plus 94
6.13 Enrichissement de cellules CD1c (BDCA-1) positives – Partie 2 : Flexible Labeling System 95
6.13.1 ÉTAPE 1 : Préparation cellulaire et marquage magnétique 95
6.13.2 ÉTAPE 2 : Sélection du programme de séparation 97
6.13.3 ÉTAPE 3 : Installation des jeux de tubulures CliniMACS 97
6.13.4 ÉTAPE 4 : Séparation CliniMACS Plus 97
6.14 Enrichissement de cellules CD304 (BDCA-4) positives 98
6.14.1 ÉTAPE 1 : Préparation cellulaire et marquage magnétique 98
6.14.2 ÉTAPE 2 : Sélection du programme de séparation 100
6.14.3 ÉTAPE 3 : Installation des jeux de tubulures CliniMACS 100
6.14.4 ÉTAPE 4 : Séparation CliniMACS Plus 100
6.15 Déplétion de cellules TCRα/β positives 101
6.15.1 ÉTAPE 1 : Préparation cellulaire et marquage magnétique 101
6.15.2 ÉTAPE 2 : Sélection du programme de séparation 104
6.15.3 ÉTAPE 3 : Installation des jeux de tubulures CliniMACS 104
6.15.4 ÉTAPE 4 : Séparation CliniMACS Plus 104
6.16 Déplétion de cellules CD45RA positives 105
6.16.1 ÉTAPE 1 : Préparation cellulaire et marquage magnétique 105
6.16.2 ÉTAPE 2 : Sélection du programme de séparation 108
6.16.3 ÉTAPE 3 : Installation des jeux de tubulures CliniMACS 108
6.16.4 ÉTAPE 4 : Séparation CliniMACS Plus 108
6.17 Enrichissement de cellules humaines avec le CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma) 109
6.17.1 ÉTAPE 1 : Préparation cellulaire et marquage magnétique 109
6.17.2 ÉTAPE 2 : Sélection du programme de séparation 122
6.17.3 ÉTAPE 3 : Installation des jeux de tubulures CliniMACS 122
6.17.4 ÉTAPE 4 : Séparation CliniMACS Plus 123

7 Explication détaillée des ÉTAPES 1-4 125

7.1 ÉTAPE 1 : Préparation cellulaire et marquage magnétique 125
7.1.1 Premières actions requises 125

7.1.2 Marquage magnétique des cellules 126
7.2 ÉTAPE 2 : Sélection du programme de séparation 139
7.2.1 Allumer le CliniMACS Plus Instrument 139
7.2.2 CD34 SELECTION 1/2 139
7.2.3 ENRICHMENT 1.1 141
7.2.4 ENRICHMENT 3.2 146
7.2.5 DEPLETION 2.1 148
7.2.6 DEPLETION 3.1 153
7.3 ÉTAPE 3 : Installation des jeux de tubulures CliniMACS 160
7.3.1 CliniMACS Tubing Set et CliniMACS Tubing Set LS 160
7.3.2 Installation alternative pour jeux de tubulures CliniMACS 175
7.3.3 CliniMACS Depletion Tubing Set 180
7.4 ÉTAPE 4 : Séparation CliniMACS Plus 196
7.4.1 CD34 SELECTION 1/2 196
7.4.2 ENRICHMENT 1.1 200
7.4.3 ENRICHMENT 3.2 204
7.4.4 DEPLETION 2.1 208
7.4.5 DEPLETION 3.1 212

8 Guide de dépannage 217

8.1 Miltenyi Biotec Technical Support 217
8.2 Préparation du produit de leucaphérèse 217
8.3 Le CliniMACS Plus Instrument et les jeux de tubulures CliniMACS 218
8.3.1 Messages d'erreur 218
8.3.2 Installation et amorçage du jeu de tubulures 218
8.4 Séparation cellulaire automatisée 219
8.4.1 Messages d'avertissement 219
8.4.2 Événements imprévus : tous les programmes de séparation 220
8.4.3 Événements imprévus : Programmes d'enrichissement uniquement 222
8.4.4 Événements imprévus : CD34 SELECTION 1/2 223
8.4.5 Événements imprévus : ENRICHMENT 1.1 224
8.4.6 Événements imprévus: ENRICHMENT 3.2 225
8.4.7 Programme d'urgence (pour programmes d'enrichissement uniquement) 226

8.4.8 Événements imprévus : DEPLETION 2.1 227
8.4.9 Événements imprévus : DEPLETION 3.1 228
8.5 Performance de la séparation cellulaire 230
8.5.1 Événements imprévus : Programmes d'enrichissement uniquement 230
8.5.2 Événements imprévus : CD34 SELECTION 1/2, ENRICHMENT 1.1 232
8.5.4 Événements imprévus : CD34 SELECTION 1/2 233
8.5.5 Événements imprévus : ENRICHMENT 1.1 233
8.5.6 Événements imprévus : DEPLETION 2.1 et DEPLETION 3.1 233

9 Mentions légales 235
9.1 Garantie limitée 235
9.2 Marques commerciales 236

1 Introduction

1.1 Informations générales

Le système CliniMACS Plus propose un ensemble d'outils permettant de réaliser des séparations cellulaires standard de haute qualité pour des applications thérapeutiques.

Le système CliniMACS Plus repose sur la technologie de séparation cellulaire magnétique (technologie MACS®) développée par Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG. Miltenyi Biotec a rendu possible l'utilisation de cette technologie pour des applications cliniques en répondant aux exigences des normes règlementaires européennes.

Les réactifs CliniMACS et les conjugués de biotine sont destinés uniquement à l'usage *in vitro* et non pour une utilisation thérapeutique ou en injection directe chez le patient.

Les réactifs CliniMACS associés au système CliniMACS Plus sont destinés à la séparation de cellules humaines.

Miltenyi Biotec, en tant que fabricant du système CliniMACS Plus, ne fait aucune recommandation à propos de l'utilisation de cellules séparées à des fins thérapeutiques et ne fait aucune assertion concernant un bénéfice clinique.

Pour la production et l'utilisation de cellules cibles chez l'homme, la législation et les règlementations nationales doivent être respectées, par exemple, pour l'UE la Directive 2004/23/CE (Tissus et cellules humaines) ou la Directive 2002/98/CE (Sang humain et composants sanguins). Ainsi, chaque utilisation clinique des cellules cibles se fera sous l'unique responsabilité de l'utilisateur d'un système CliniMACS Plus.

GARANTIE LIMITÉE
Toute utilisation du système CliniMACS Plus non expressément décrite dans ce manuel d'utilisation rend toute garantie nulle et non avenue.

IMPORTANT
Avant d'utiliser le système CliniMACS Plus ou tout élément en dehors de la Communauté Économique Européenne, l'approbation règlementaire du système CliniMACS Plus ou de tout élément CliniMACS doit être confirmée dans votre pays.

1.2 Marquage des cellules avec les réactifs CliniMACS

Le tri cellulaire magnétique MACS (Magnetic Cell Sorting) est un outil à l'efficacité prouvée pour la séparation de nombreux types de cellules, dans les laboratoires de recherche mais aussi dans les applications cliniques. Des suspensions cellulaires sont séparées dans un champ magnétique en utilisant un marquage immunomagnétique spécifique au type de cellules recherchées, p. ex. cellules progénitrices hématopoïétiques humaines CD34 positives à partir de populations cellulaires hématologiques hétérogènes.

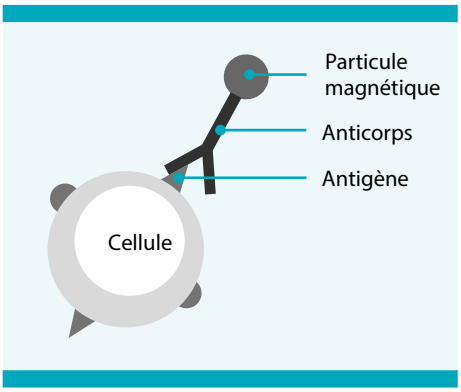


Figure 1.1 : Marquage magnétique des cellules

À l'aide du système CliniMACS Plus, les cellules peuvent être marquées magnétiquement de trois façons différentes :

- Directement, en effectuant une procédure de marquage en une étape, avec des anticorps spécifiques à l'antigène, conjugués à des billes de fer-dextran superparamagnétiques (voir Figure 1.1).
- Indirectement, en effectuant une procédure de marquage en deux étapes appelée Flexible Labeling System. Lors de la première étape, les cellules sont marquées avec des anticorps spécifiques à l'antigène, conjugués à la biotine. Lors de la deuxième étape, ces anticorps sont marqués avec des anticorps spécifiques à la biotine, conjugués à des billes de fer-dextran superparamagnétiques (voir Figure 1.2).
- Indirectement, dans une procédure de marquage en deux étapes appelée CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma). Dans un premier temps, toutes les cellules sont restimulées *in vitro* pour sécréter la cytokine (par ex. IFN-gamma). Lors de la première étape du marquage, les cellules restimulées sont marquées par une molécule hybride, composée d'un anticorps spécifique au leucocyte et d'un anticorps spécifique à la cytokine, appelée CliniMACS IFN-gamma Catchmatrix Reagent. Les cellules sont ensuite incubées

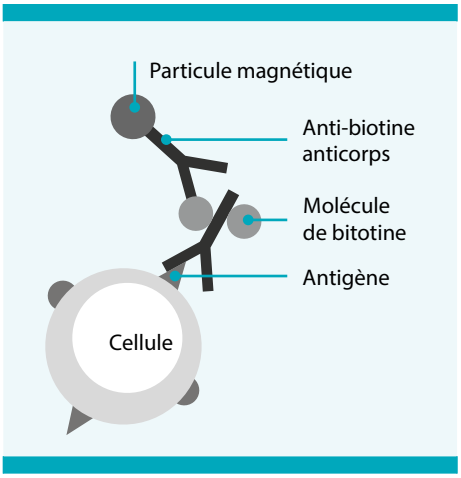


Figure 1.2 : Flexible Labeling System

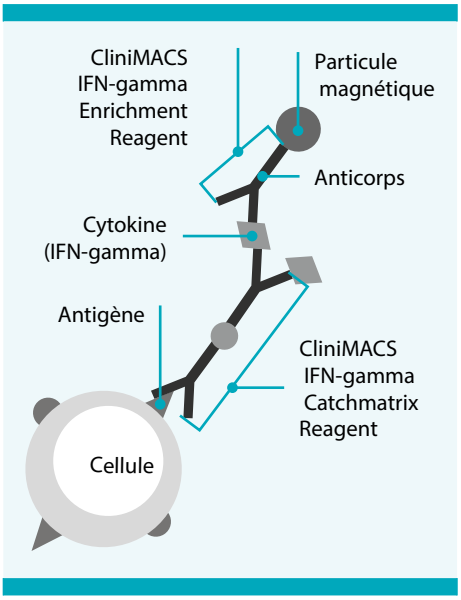


Figure 1.3 : CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma)

pour permettre la sécrétion de cytokine, qui est « capturée» par la matrice de capture sur la surface de la cellule. Ensuite, la seconde étape du marquage consiste à marquer les cellules qui sécrètent de la cytokine avec des anticorps spécifiques à la cytokine conjugués à des billes superparamagnétiques de fer-dextran (CliniMACS IFN-gamma Enrichment Reagent) (voir Figure 1.3).

1.3 Séparation cellulaire magnétique à gradient élevé

La suspension des cellules marquées magnétiquement est chargée sur le CliniMACS Plus Instrument qui est préparé avec un jeu de tubulures. Cette unité de séparation cellulaire magnétique à gradient élevé se compose d'une colonne de séparation équipée d'une matrice ferromagnétique ainsi que d'un aimant permanent puissant spécialement développé à cette fin.

Ce système à gradient élevé permet de générer des forces magnétiques puissantes et une rapide démagnétisation. Lorsque de petites structures ferromagnétiques, comme la matrice de la colonne, sont placées dans le champ magnétique, elles perturbent l'homogénéité du champ. Cela conduit à la génération de gradients magnétiques élevés. Dans leur environnement immédiat, les structures ferromagnétiques génèrent des forces magnétiques 10.000 fois plus puissantes que dans des géométries conventionnelles. Ce champ à gradient élevé attire les cellules marquées vers la matrice et les retient efficacement. Après avoir retiré la colonne de l'aimant, la rapide démagnétisation de la matrice de la colonne permet de libérer les cellules retenues.

1.4 Stratégies de séparation

Le système CliniMACS Plus permet à l'utilisateur de choisir entre divers programmes de séparation. En général, les programmes de séparation se subdivisent en stratégies d'enrichissement (CD34 SELECTION 1 et 2, ENRICHMENT 1.1 et ENRICHMENT 3.2) et en stratégies de déplétion (DEPLETION 2.1 et DEPLETION 3.1).

Enrichissement de cellules marquées magnétiquement

Lorsqu'on choisit une stratégie d'enrichissement, les cellules marquées magnétiquement (marquées préalablement avec un réactif CliniMACS) sont retenues dans la colonne de séparation et les cellules non marquées sont éluées. Les cellules marquées (cellules cibles) sont recueillies dans la Cell Collection Bag et les cellules non marquées (cellules non cibles) sont recueillies dans la Negative Fraction Bag (voir Figure 1.4).

Déplétion de cellules marquées magnétiquement

La technologie MACS est également très efficace pour la déplétion de populations de cellules spécifiques. Les cellules non désirées sont marquées avec des particules superparamagnétiques et sont séparées des cellules cibles lors du passage dans la colonne magnétique à gradient élevé. Contrairement à la stratégie d'enrichissement, les cellules non marquées (cellules cibles) sont recueillies dans la Cell Collection Bag et les cellules marquées (cellules non cibles) sont recueillies soit dans la Negative Fraction Bag (voir Figure 1.5) ou dans la Non-Target Cell Bag (voir Figure 1.6 et Figure 1.7).

1.4.1 Stratégie d'enrichissement

Enrichissement de cellules à l'aide du CliniMACS Tubing Set ou du CliniMACS Tubing Set LS

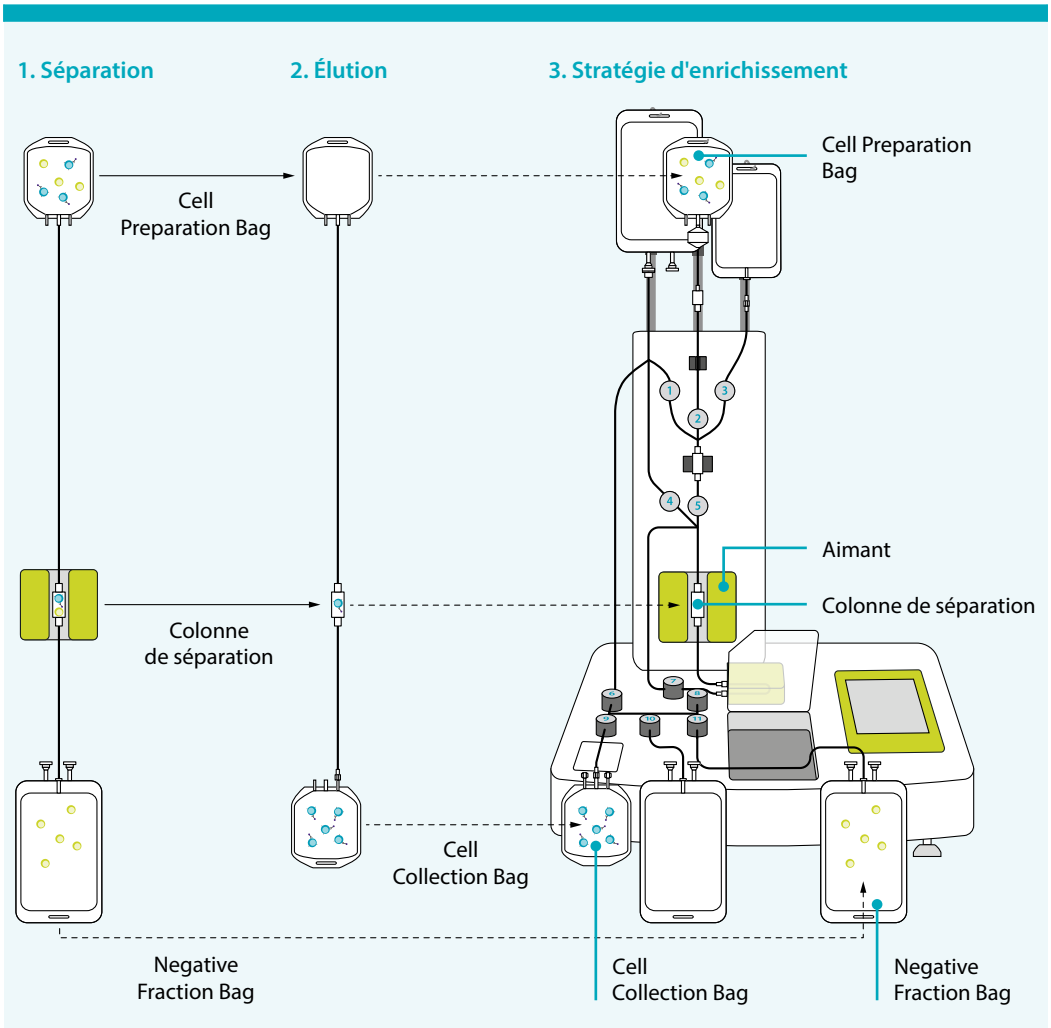


Figure 1.4 : Stratégie des programmes d'enrichissement utilisant le CliniMACS Tubing Set ou le CliniMACS Tubing Set LS

1. L'aimant est en position « ON ». Les cellules marquées magnétiquement sont retenues dans la colonne de séparation alors que les cellules non marquées (cellules non cibles) traversent la colonne pour être recueillies dans la Negative Fraction Bag.
2. L'aimant est en position « OFF ». Les cellules marquées magnétiquement (cellules cibles) sont libérées de la colonne de séparation et recueillies dans la Cell Collection Bag.
3. Dans le programme d'enrichissement, les cellules marquées magnétiquement sont retenues dans la colonne de séparation alors que les cellules non marquées (cellules non cibles) traversent la colonne pour être recueillies dans la Negative Fraction Bag. Lorsque l'aimant est mis en position « OFF », les cellules marquées magnétiquement (cellules cibles) sont libérées de la colonne et recueillies dans la Cell Collection Bag. **Remarque :** La fraction de cellules cibles est toujours collectée dans la Cell Collection Bag.

1.4.2 Stratégie de déplétion

Déplétion de cellules à l'aide du CliniMACS Tubing Set LS : DEPLETION 2.1

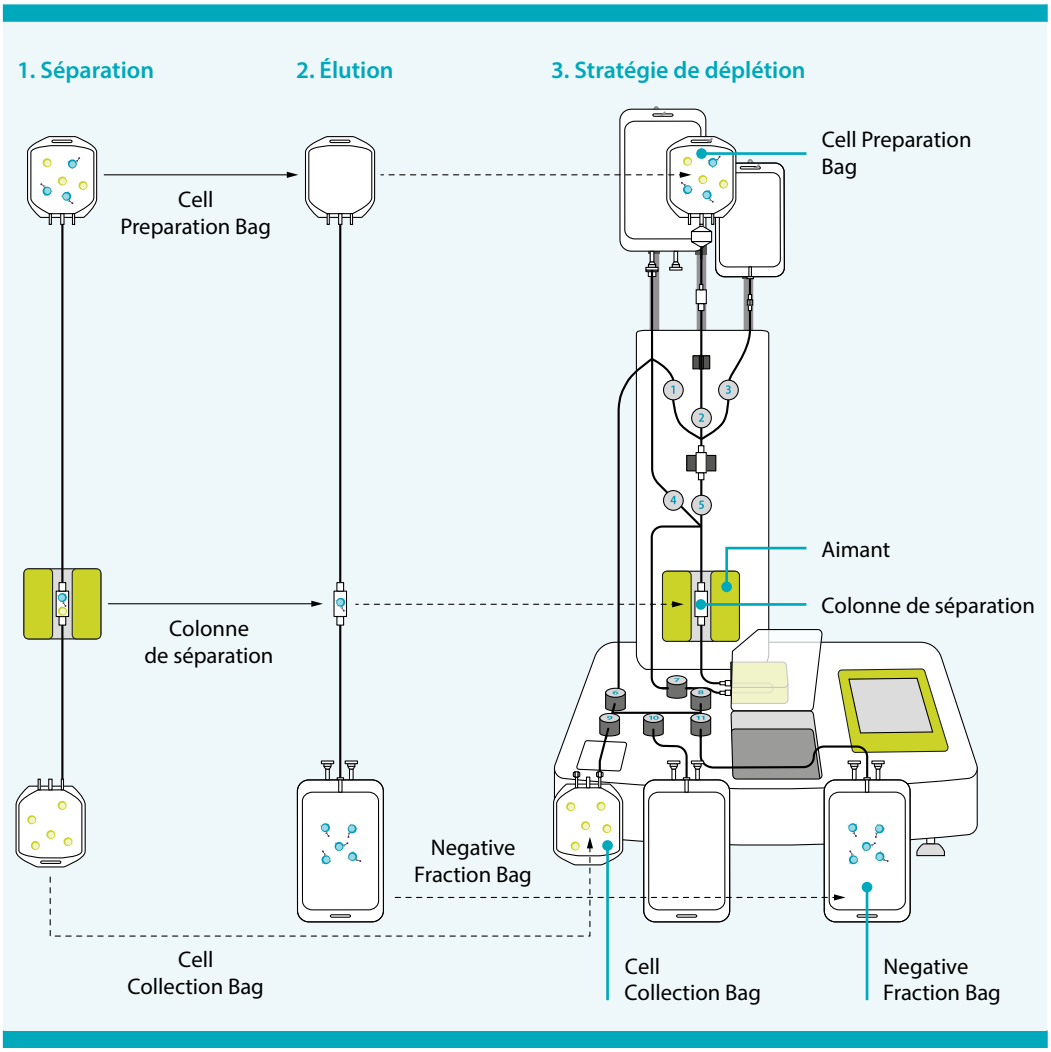


Figure 1.5 : Stratégie du programme de déplétion DEPLETION 2.1 à l'aide du CliniMACS Tubing Set LS

1. L'aimant est en position « ON ». Les cellules marquées magnétiquement sont retenues dans la colonne de séparation alors que les cellules non marquées (cellules cibles) traversent la colonne pour être recueillies dans la Cell Collection Bag.
2. L'aimant est en position « OFF ». Les cellules marquées magnétiquement (cellules non cibles) sont libérées de la colonne de séparation et recueillies dans la Negative Fraction Bag.
3. Dans le programme de déplétion (DEPLETION 2.1), les cellules marquées magnétiquement sont retenues dans la colonne de séparation alors que les cellules non marquées (cellules cibles) traversent la colonne pour être recueillies dans la Cell Collection Bag. Lorsque l'aimant est mis en position « OFF », les cellules marquées magnétiquement (cellules non cibles) sont libérées de la colonne et recueillies dans la Negative Fraction Bag. **Remarque :** La fraction des cellules cibles est toujours collectée dans la Cell Collection Bag.

Déplétion de cellules à l'aide du CliniMACS Depletion Tubing Set : DEPLETION 3.1 (Partie 1 : Staged Cell Loading [Bulk Loading Stage])

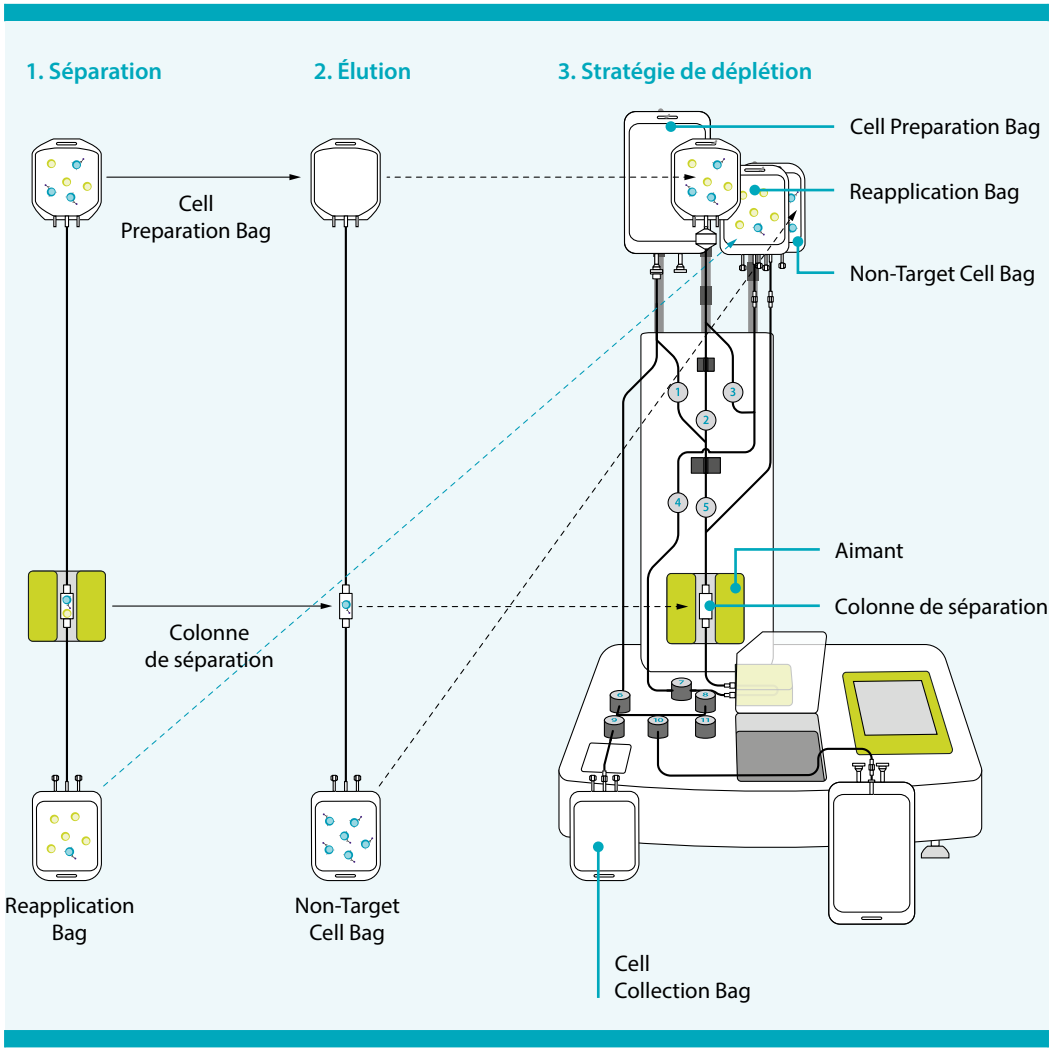


Figure 1.6 : Stratégie du programme de déplétion DEPLETION 3.1 à l'aide du CliniMACS Depletion Tubing Set (Partie 1)

1. Staged Cell Loading (Bulk Loading Stage) : L'aimant est en position « ON ». Les cellules marquées magnétiquement sont retenues dans la colonne de séparation alors que les cellules non marquées (cellules cibles) traversent la colonne pour être recueillies dans la Reapplication Bag.

2. L'aimant est en position « OFF ». Les cellules marquées magnétiquement (cellules non cibles) sont libérées de la colonne de séparation et recueillies dans la Non-Target Cell Bag.

3. Dans le programme de déplétion (DEPLETION 3.1), les cellules marquées magnétiquement sont retenues dans la colonne de séparation alors que les cellules non marquées (cellules cibles) traversent la colonne pour être recueillies dans la Reapplication Bag afin d'être rechargées sur la colonne de séparation dans une seconde déplétion sensible (voir Figure 1.7). Lorsque l'aimant est mis en position « OFF », les cellules marquées magnétiquement (cellules non cibles) sont libérées de la colonne et recueillies dans la Non-Target Cell Bag.

Déplétion de cellules à l'aide du CliniMACS Depletion Tubing Set : DEPLETION 3.1 (Partie 2 : Sensitive Sample Loading [Sensitive Loading Stage])

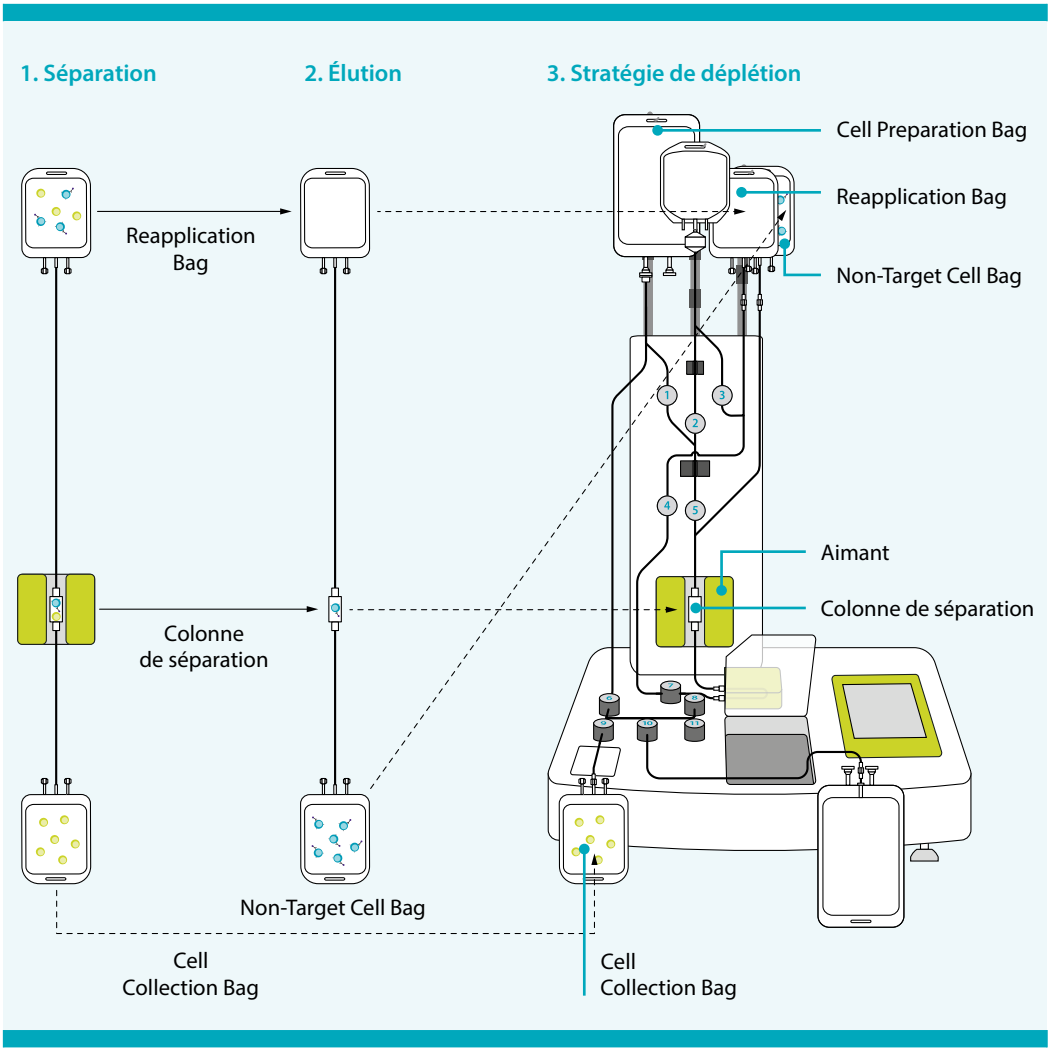


Figure 1.7 : Stratégie du programme de déplétion DEPLETION 3.1 à l'aide du CliniMACS Depletion Tubing Set (Partie 2)

4. Sensitive Sample Loading (Sensitive Loading Stage) : L'aimant est en position « ON ». Les cellules de la Reapplication Bag sont rechargées sur la colonne de séparation. Les quelques cellules marquées magnétiquement restantes sont retenues dans la colonne de séparation, alors que les cellules non marquées (cellules cibles) traversent la colonne pour être recueillies dans la Cell Collection Bag.
5. L'aimant est en position « OFF ». Les cellules marquées magnétiquement (cellules non cibles) sont libérées de la colonne de séparation et recueillies dans la Non-Target Cell Bag.
6. À la fin de la séparation, les cellules marquées (cellules non cibles) se trouvent dans la Non-Target Cell Bag et les cellules non marquées (cellules cibles) dans la Cell Collection Bag. **Remarque :** La fraction de cellules cibles est toujours collectée dans la Cell Collection Bag.

2 Glossaire

2.1 Représentation graphique

L'aperçu suivant représente les vignettes utilisées dans ce manuel d'utilisation pour informer l'utilisateur des risques potentiels qu'il encourt si les avertissements et précautions d'emploi décrits ne sont pas respectés. Le niveau de risque classifie le risque comme décrit ci-dessous. Le niveau, le type et la source du risque, ainsi que les conséquences éventuelles, les interdictions et les mesures sont signalés comme suit. Les icônes sur le côté gauche spécifient le risque.

⚠ AVERTISSEMENT

Indique une situation dangereuse qui, si elle n'est pas évitée, peut causer des blessures graves ou entraîner la mort.

⚠ ATTENTION

Indique une situation dangereuse qui, si elle n'est pas évitée, peut causer des blessures de gravité mineure ou modérée.

AVIS

Indique des informations considérées comme importantes, mais non liées aux dangers (p. ex. les messages relatifs aux dommages matériels).

IMPORTANT

Avise l'utilisateur sur des pratiques ou des informations importantes, n'impliquant pas de blessure à la personne ni de dommages matériels.

2.2 Glossaire des symboles

Un aperçu des symboles utilisés pour le système CliniMACS Plus est fourni dans le manuel d'utilisation du CliniMACS Plus Instrument. Le glossaire des symboles représente les symboles utilisés dans les manuels d'utilisation et l'étiquetage des produits CliniMACS.

2.3 Glossaire des termes

Aphérèse	Méthode de prélèvement sanguin durant lequel un composant désiré du sang entier prélevé est sélectionné et retenu, et le sang résiduel est réinjecté dans l'organisme du donneur
Anticorps anti-biotine	Cet anticorps reconnaît les cellules qui ont été marquées préalablement avec un anticorps biotinylé ou un ligand approprié
Compartiment des poches	Compartiment du CliniMACS Plus Instrument dans lequel sont placés la Negative Fraction Bag et la Buffer Waste Bag
Support de poche	Support monté sur le CliniMACS Plus Instrument pour accrocher la Cell Preparation Bag, la Non-Target Cell Bag, la Priming Waste Bag, la Reapplication Bag et la poche de tampon
BDCA	Blood Dendritic Cell Antigen
Blood Dendritic Cell Antigen	Cellule dendritique plasmacytoïde
Buffer Waste Bag	Poche pour collecter le tampon pendant la séparation des cellules à l'aide du CliniMACS Plus Instrument
Antigène CD1c (BCDA-1)	Le gène CD1c fait partie d'un ensemble de gènes CD1 qui serait relié au CMH. Les gènes CD1 sont regroupés dans une région de 170 000 bp du chromosome humain 1q23.1. Les protéines encodées dans cette région (CD1a-e) sont des hétérodimères composés d'une chaîne lourde de CD1 associée de manière non convalente à de la ß2-microglobuline. Le CD1c est impliqué dans la présentation de l'antigène des glycolipides microbiens ou des antigènes de lipopeptides aux lymphocytes T. Dans le sang périphérique humain, le CD1c (BDCA-1) est exprimé sur les cellules dendritiques myéloïdes de type 1 (MDC1) et sur un sous-ensemble de lymphocytes B. Il se trouve dans le nœud lymphatique, les zones du manteau et les centres germinatifs, dans la zone marginale de la rate et dans le sang périphérique humain des fœtus et des adultes.
Antigène CD3	L'antigène CD3 est présent sur les lymphocytes T humains matures, les thymocytes et un sous-ensemble de cellules NK. Il est associé au récepteur de lymphocytes T (TCR) et il est responsable de la transduction du signal du TCR. L'antigène CD3 est un complexe de cinq chaînes invariables: γ, δ, ε, ζ et η. L'anticorps CD3 reconnaît tous les lymphocytes T, c'est-à-dire qu'il réagit avec 70 à 80% des lymphocytes du sang périphérique humain et avec 65 à 85% des thymocytes. L'épitope reconnu par l'anticorps est situé sur la chaîne ε du complexe CD3.

Antigène CD4	L'antigène CD4 est exprimé sur la plupart des thymocytes et environ sur les deux tiers des lymphocytes T du sang périphérique; il est également exprimé sur les monocytes et les macrophages. Le CD4 est une molécule accessoire dans la reconnaissance d'antigènes étrangers en association avec un CMH de classe II. De plus, le CD4 est un récepteur pour le HIV-1.
Antigène CD8	L'antigène CD8 est un dimère lié par pont disulfure qui existe sous forme d'homodimère CD8 α ou d'hétérodimère CD8 α/β. Le CD8 est fortement exprimé sur les lymphocytes T CD8 positifs, les thymocytes et sur un sous-ensemble de cellules NK et de lymphocytes T γ/δ CD8 positifs. Le CD8 agit dans la reconnaissance de l'antigène en tant que co-récepteur avec les récepteurs des lymphocytes T restreints au CMH I.
Antigène CD14	L'antigène CD14 est une glycoprotéine membranaire de 53-55 kD exprimée sur les monocytes. L'antigène CD14 est connu comme un récepteur du complexe des LPS et de la protéine fixant les LPS (LBP).
Antigène CD19	L'antigène CD19 est une molécule de transduction du signal critique qui régule le développement, l'activation et la différenciation des lymphocytes B. En tant que marqueur de lignée des lymphocytes B, le CD19 est exprimé dès les premiers stades des cellules pro-B jusqu'aux stades de lymphoblastes des lymphocytes B mais l'expression diminue à maturation des lymphocytes B en cellules plasmatiques. L'antigène CD19 est également exprimé sur la plupart des lymphocytes B malins et sur un sous-ensemble de cellules dendritiques folliculaires.
Antigène CD25	L'antigène CD25, récepteur de basse affinité de l'interleukine 2 chaine alpha (IL-2Rα), est exprimé sur les lymphocytes B et T activées, les cellules NK et les monocytes ainsi que sur les lymphocytes T CD4 positives régulatrices. L'antigène CD25 présente trois régions épitopes : A, B et C. L'anticorps du CliniMACS CD25 Reagent reconnaît l'épitope A de la molécule CD25.
Antigène CD34	L'antigène CD34 est une protéine membranaire intégrale hautement glycosylée, de 115 kDa, type 1, de fonction inconnue, exprimée sur 1% à 4% des cellules normales de la moelle osseuse et sur moins de 0,2% des leucocytes normaux du sang périphérique, sur certaines cellules stromales de la moelle osseuse et sur l'endothélium de petits vaisseaux de divers tissus.
Antigène CD45RA	L'antigène CD45RA est exprimé sur les lymphocytes T CD4 et CD8 positifs naïfs, ainsi que sur des sous-ensembles de lymphocytes B, de cellules NK et de monocytes. Il s'agit d'une isoforme de l'antigène leucocytaire commun CD45, une protéine tyrosine phosphatase transmembranaire.

Antigène CD56	L'antigène CD56 appartient à la famille des NCAM (famille des molécules d'adhérence cellulaire neuronale), exprimée dans le système hématopoïétique sur les cellules NK, NKT.
Antigène CD304 (BDCA-4)	L'antigène CD304 (BDCA-4) est une glycoprotéine de surface de 130-140 kDa exprimée dans le sang frais et la moelle osseuse exclusivement sur les cellules dendritiques plasmacytoïdes.
Cell Collection Bag	Poche dans laquelle les cellules cibles purifiées s'accumulent après la séparation
Cell Preparation Bag	Poche dans laquelle est transféré le produit cellulaire et où s'effectuent le marquage magnétique et le lavage des cellules
Produit cellulaire de départ	Produit contenant des cellules utilisées comme matériel de départ pour le processus de séparation CliniMACS Plus, par ex. prélèvement par leucaphérèse, PBMC ou moelle osseuse
CliniMACS Anti-Biotin Reagent	Réactif pour le marquage magnétique des cellules préalablement marquées avec des anticorps ou des ligands biotinylés
CliniMACS CD1c Biotin (BDCA-1)	Anticorps biotinylé pour le marquage de cellules humaines exprimant l'antigène CD1c (BDCA-1) avant le marquage magnétique avec le CliniMACS Anti-Biotin Reagent
CliniMACS CD3 Reagent	Réactif pour le marquage magnétique des cellules exprimant l'antigène CD3
CliniMACS CD4 Reagent	Réactif pour le marquage magnétique des cellules exprimant l'antigène CD4
CliniMACS CD8 Reagent	Réactif pour le marquage magnétique des cellules exprimant l'antigène CD8
CliniMACS CD14 Reagent	Réactif pour le marquage magnétique des cellules exprimant l'antigène CD14
CliniMACS CD19 Reagent	Réactif pour le marquage magnétique des cellules exprimant l'antigène CD19
CliniMACS CD25 Reagent	Réactif pour le marquage magnétique des cellules exprimant l'antigène CD25
CliniMACS CD34 Reagent	Réactif pour le marquage magnétique des cellules exprimant l'antigène CD34
CliniMACS CD45RA Reagent	Réactif pour le marquage magnétique des cellules exprimant l'antigène CD45RA
CliniMACS CD56 Reagent	Réactif pour le marquage magnétique des cellules exprimant l'antigène CD56

CliniMACS CD304 (BDCA-4) Reagent	Réactif pour le marquage magnétique des cellules exprimant l'antigène CD304 (BDCA-4)
CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma)	Combinaison de réactifs comprenant le CliniMACS IFN-gamma Catchmatrix Reagent et le CliniMACS IFN-gamma Enrichment Reagent. Avec le CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma), les cellules sécrétant de l'IFN-gamma peuvent être enrichies après une restimulation *in vitro*.
CliniMACS Depletion Tubing Set	Jeu de tubulures, raccords, colonnes et poches permettant le traitement de la suspension de cellules marquées magnétiquement, et dans lequel s'effectue la séparation magnétique des cellules ; jeu spécialement conçu pour les besoins spécifiques de la déplétion
CliniMACS IFN-gamma du Catchmatrix Reagent	Élément du CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma) pour le marquage de surface des leukocytes avec des anticorps spécifiques IFN-gamma
CliniMACS IFN-gamma Enrichment Reagent	Élément du CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma) pour le marquage magnétique des IFN-gamma liés au CliniMACS IFN-gamma Catchmatrix Reagent sur les cellules sécrétrices d'IFN-gamma
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	Tampon utilisé pour la préparation et la séparation de cellules avec le système CliniMACS Plus : PBS (solution saline tamponnée au phosphate), complémenté avec 1 mM EDTA, pH 7,2. Avant son utilisation, le CliniMACS PBS/EDTA Buffer doit être complémenté avec de l'HSA (sérum-albumine humaine) de qualité pharmaceutique jusqu'à une concentration finale de 0,5 % (poids/volume, soit 5 g de l'HSA par litre de tampon).
CliniMACS Plus Instrument	Instrument de séparation magnétique de cellules, fondé sur la technologie MACS
CliniMACS TCRα/β-Biotin	Anticorps biotinylé pour le marquage de cellules humaines exprimant l'antigène TCRα/β avant le marquage magnétique avec le CliniMACS Anti-Biotin Reagent
CliniMACS Tubing Set, CliniMACS Tubing Set LS	Jeu de tubulures, raccords, colonnes et poches permettant le traitement de la suspension de cellules marquées magnétiquement, et dans lequel s'effectue la séparation magnétique des cellules
EDTA	Ethylene-diamine-tetra-acetic acid
Ethylene-diamine-tetra-acetic acid	Acide éthylènediaminetétraacétique
×g	Multiple de l'accélération gravitationnelle terrestre

Soudeuse	Dispositif chauffant permettant de sceller stérilement les tubulures en PVC
Cellules progénitrices hématopoïétiques	Cellules progénitrices des lignées lymphoïde, myéloïde et érythroïde
HSA	Human serum albumin
Human serum albumin	Sérum-albumine humaine
Sérum-albumine humaine	HSA de qualité pharmaceutique approuvée dans votre pays, nécessaire pour complémenter le tampon en cas d'utilisation avec le système CliniMACS Plus
IgG	Immunoglobuline G
Procédure en poche	Traitement et transfert stériles des cellules dans le milieu fermé des poches de transfert
Marquage	Réaction des cellules avec un réactif de marquage magnétique, tel que le CliniMACS CD34 Reagent avec les cellules CD34 positives
Leucaphérèse	Aphérèse collectant les leucocytes
Détecteur de liquide	Composant du CliniMACS Plus Instrument détectant la présence de liquide dans la tubulure
Raccord Luer	Raccord à vis, pièce du jeu de tubulures
Luer/Spike Interconnector	Set de transfert avec pointe de perforation (spike) et adaptateur de seringue (luer femelle) pour le plasma ou les fluides
Anticorps magnétisé	Anticorps marqué par des particules super-paramagnétiques
MDC	Myeloid dendritic cells
Myeloid dendritic cells	Cellules dendritiques myéloïdes
Anticorps monoclonaux	Type d'anticorps issu d'une seule lignée qui est dirigé contre un épitope spécifique (antigène, déterminant antigénique) et qui est produit à partir d'un clone unique de lymphocytes B ou à partir d'un hybridome unique obtenu par la fusion d'un lymphocyte avec une cellule de myélome. Certaines cellules de myélome synthétisent des anticorps monoclonaux naturellement.
Negative Fraction Bag	Poche du CliniMACS Tubing Set et CliniMACS Tubing Set LS contenant la fraction de cellules non cibles

Non-Target Cell Bag	Poche du CliniMACS Depletion Tubing Set contenant la fraction de cellules non cibles.
Agitateur orbital	Dispositif utilisé pour mélanger le produit cellulaire pendant la réaction avec les réactifs CliniMACS
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
Peripheral Blood Mononuclear Cell	Cellule mononucléée de sang périphérique
Pompe péristaltique	Pompe sur la tubulure utilisée dans le CliniMACS Plus Instrument pour contrôler le flux de liquide dans le jeu de tubulures
Extracteur de plasma	Dispositif utilisé pour évacuer le liquide de la Cell Preparation Bag après le lavage des cellules
Set de transfert de plasma	Set de transfert avec deux pointes de perforation (spikes) pour le plasma ou les fluides
Plasma Waste Bag	Poche à déchets pour collecter l'excédent de plasma avant la procédure de marquage
Précolonne	La première colonne du CliniMACS Tubing Set et du CliniMACS Tubing Set LS qui sert de filtre pour piéger des cellules ayant des interactions non spécifiques avec la matrice de la colonne
Support de précolonne	Support monté sur le CliniMACS Plus Instrument pour maintenir la précolonne en place
Préfiltre	Filtre ayant des pores de 40 µm, placé entre la Cell Preparation Bag et la précolonne, utilisé pour retenir les agrégats et débris cellulaire
Amorçage	Étape précédant la séparation cellulaire pendant laquelle le tampon s'écoule à travers le jeu de tubulures pour le rincer
Priming Waste Bag	Poche dans laquelle est collecté le tampon de l'étape d'amorçage
Sécurité de la pompe	Détecteur qui bloque le fonctionnement de la pompe en cas d'ouverture de la porte de la pompe
Reapplication Bag	Poche du CliniMACS Depletion Tubing Set dans laquelle les cellules non marquées sont temporairement recueillies pendant la séparation. Les cellules non marquées de la Reapplication Bag sont passées deux fois dans la colonne de séparation, pour assurer une grande pureté des cellules cibles.
Bague de maintien	Pièce du jeu de tubulures permettant au jeu de tubulures de la pompe de rester correctement dans son emplacement

tr/min	Tours par minute
Coupleur de site de prélèvement	Port d'injection, par ex. pour prélever des échantillons ou ajouter des réactifs CliniMACS dans la Cell Preparation Bag
Tampon de sélection	Voir CliniMACS PBS/EDTA Buffer
Colonne de sélection	Voir colonne de séparation
Support de colonne de sélection	Voir support de colonne de séparation
Colonne de séparation	Colonne dans laquelle les cellules marquées magnétiquement sont séparées lorsqu'elles sont soumises à un champ magnétique
Support de colonne de séparation	Guides moulés dans l'enveloppe magnétique qui maintiennent la colonne de séparation en place
Programme de séparation	Logiciel conçu pour l'enrichissement ou la déplétion de sous-ensembles de cellules marquées magnétiquement à partir d'une population cellulaire mixte. Élément du menu de sélection d'un programme de séparation en fonction de la séparation prévue.
Réactif de séparation	Réactif pour le marquage magnétique des cellules, par ex. CliniMACS CD34 Reagent
Adaptateur en T	Adaptateur en forme de T sur le jeu de tubulures raccordant trois tuyaux
Antigène TCRα/β	Le TCRα/β est l'hétérodimère du récepteur des lymphocytes T composés de deux chaînes glycoprotéiniques transmembranaires, α et β. Les deux chaînes appartiennent à la grande famille des Ig et comportent une région constante et une région variable polymorphe. La région variable du TCRα/β intervient dans la reconnaissance des peptides antigéniques présentés par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) des cellules présentatrices d'antigène. L'antigène TCRα/β est exprimé sur la majorité des lymphocytes T du sang périphérique.
Poche de transfert	Poche munie d'une tubulure et d'une pointe à son extrémité
Wash Waste Bag	Poche de recueil dans laquelle le surnageant retiré lors des lavages est recueilli par séparation de la suspension cellulaire sédimentée après les étapes de centrifugation lors de la préparation de l'échantillon.
WBC	White blood cells
White blood cells	Globules blancs

3 Avertissements et précautions d'emploi

Ce chapitre explique les risques potentiels liés à l'utilisation du système CliniMACS Plus. Les consignes de sécurité sur le lieu de travail et les législations locales ainsi que les normes telles que les bonnes pratiques de fabrication (Good Manufacturing Practice), normes de santé, sécurité et prévention des accidents doivent être respectées. Se reporter aux paragraphes correspondants du manuel d'utilisation de l'élément respectif pour obtenir les instructions d'utilisation, par ex. les avertissements et les précautions d'emploi concernant la manipulation de matières biologiques dangereuses et de produits cellulaires de départ ainsi que des éléments du système CliniMACS Plus. Le mode d'emploi du CliniMACS Plus Instrument est décrit en détails dans le manuel d'utilisation du CliniMACS Plus Instrument.

Tout incident grave survenu en relation avec ce produit doit être signalé à Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG - en utilisant les coordonnées fournies - et à l'autorité nationale compétente du pays dans lequel se trouve l'utilisateur de ce produit.

3.1 Processus

⚠ AVERTISSEMENT

Risque d'échec du processus ou d'endommagement de l'instrument. Risque d'échec du processus ou d'endommagement de l'instrument si les procédures sont exécutées par des opérateurs non formés. Toutes les procédures de traitement doivent être exécutées par des opérateurs formés. La formation des opérateurs sera effectuée par un représentant Miltenyi Biotec qualifié.

⚠ ATTENTION

Risque de réduction des performances du processus. Des températures inférieures ou supérieures à la température ambiante peuvent entraîner une diminution de la viabilité, de la pureté et du rendement des cellules cibles. Effectuer la préparation des échantillons et la séparation des cellules à température ambiante (+19 °C à +25 °C [+66 °F à +77 °F]).

⚠ ATTENTION

La sécurité de l'équipement peut être compromise. La sécurité de l'équipement peut être compromise si l'instrument n'est pas utilisé conformément aux instructions du fabricant. Lire attentivement et comprendre les consignes de sécurité, les avertissements, les précautions d'emploi et les instructions relatives au bon fonctionnement du système CliniMACS Plus figurant dans les manuels d'utilisation des éléments CliniMACS Plus et dans toute recommandation de sécurité émise par Miltenyi Biotec.

- Pour la production et l'utilisation de cellules cibles chez l'homme, la législation et les règlementations nationales doivent être respectées, par exemple, pour l'UE, la Directive 2004/23/CE (Tissus et cellules humaines) ou la Directive 2002/98/CE (Sang humain et composants sanguins). Ainsi, chaque utilisation clinique des cellules cibles se fera sous l'unique responsabilité de l'utilisateur d'un système CliniMACS Plus.
- Tout matériel qui a été en contact avec du sang et des produits sanguins doit être traité comme du matériel infectieux. Toutes les normes relatives au traitement de matériel infectieux doivent être respectées.
- Toute la tubulure, tous les raccords, toutes les valves, la précolonne et la colonne de séparation doivent être inspectés minitieusement lors de l'étape d'amorçage, afin de détecter toute fuite éventuelle.
- Toutes les poches, y compris celles utilisées pour la préparation de l'échantillon, doivent être conservées jusqu'à ce que l'analyse finale des cellules collectées soit terminée et que la réussite du traitement des cellules cibles ait été confirmée.

3.2 Les réactifs CliniMACS et les conjugués de biotine

- Les patients peuvent recevoir des traces d'anticorps murins et de fer-dextran avec la perfusion ou l'injection des cellules cibles.
- Les billes de fer-dextran et/ou les anticorps murins peuvent causer des allergies ou des réactions anaphylactiques chez les patients. Équipements et médications de soins intensifs doivent être disponibles.
- La séparation des cellules à l'aide des réactifs CliniMACS et des conjugués de biotine doit être effectuée uniquement par des opérateurs formés.
- Il est recommandé que les opérateurs utilisant les réactifs CliniMACS et des conjugués de biotine aient une expérience dans la séparation de cellules provenant de moelle osseuse ou de sang périphérique.
- Les cellules non cibles ne sont pas destinées à l'usage thérapeutique et ne doivent pas être réinjectées aux patients.
- Les réactifs CliniMACS et les conjugués de biotine sont destinés uniquement à l'usage *in vitro* et non pour une utilisation thérapeutique ou en injection directe chez le patient.
- Il est déconseillé d'utiliser les réactifs CliniMACS et les conjugués de biotine pour des patients présentant ou susceptibles de présenter une sensibilité contre l'immunoglobuline murine ou le fer-dextran.
- Les patients pourraient développer des anticorps humains anti-souris (HAMA).
- Ne pas utiliser après la date de péremption indiquée sur l'étiquette du flacon.
- Ne pas utiliser si l'emballage est endommagé. Utiliser uniquement si le flacon est intact et scellé.

3.3 Manipulation de matériels biologiques dangereux

⚠ AVERTISSEMENT

Risque de blessure grave ou de mort. Selon le matériel biologique utilisé, le contact peut entraîner des blessures graves ou la mort. Toujours porter un équipement de protection individuelle conformément aux avertissements et aux précautions d'emploi, en particulier si du matériel biologique dangereux est ou a été utilisé.

- Pour éviter la contamination du produit cellulaire de départ, toutes les étapes de préparation doivent être effectuées dans des conditions stériles en utilisant des techniques aseptiques (par ex., sous une hotte à flux laminaire).
- L'opérateur effectuant la séparation cellulaire doit être formé à l'utilisation correcte de l'équipement et à la manipulation des produits sanguins et de la ponction de moelle osseuse.
- Lors de procédures avec des échantillons de prélèvements humains et lors de la manipulation de substances potentiellement dangereuses, l'opérateur effectuant la séparation cellulaire doit porter un équipement approprié (par. ex. blouse de laboratoire, gants et lunettes de protection).
- samples and handling potentially biohazardous material.Tous les produits sanguins doivent être considérés comme des produits présentant un danger biologique potentiel. Les produits de leucaphérèse, sanguin et de la ponction de moelle osseuse, les cellules collectées, le tampon et le jeu de tubulures utilisés et les autres matériels en contact avec ces fluides doivent être traités comme du matériel biologique dangereux conformément aux exigences standard des hôpitaux ou autres établissements de santé.
- Le CliniMACS Plus Instrument doit être considéré comme un risque biologique potentiel après chaque cycle de séparation et il faut le nettoyer avec un détergent aqueux biocide (p. ex. Bacillol® plus ou Meliseptol®, voir aussi le paragraphe « Nettoyage et entretien » du manuel d'utilisation du CliniMACS Plus Instrument) conformément aux exigences standard des hôpitaux ou autres établissements de santé.
- Les matériaux jetables doivent être traités comme des matériaux biologiques dangereux conformément aux exigences standard des hôpitaux ou autres établissements de santé.

3.4 Produit cellulaire de départ

IMPORTANT

Une fois le produit cellulaire de départ collecté, commencer le marquage et la séparation des cellules dès que possible. Au moment de démarrer la procédure de marquage et de séparation des cellules, le produit ne doit pas dater de plus de 24 heures.

- Le produit cellulaire de départ (p. ex. produit de leucaphérèse) doit être collecté dans des poches de collecte standard conformément aux exigences standards des hôpitaux ou autres établissements de santé.
- Le récipient contenant le produit cellulaire de départ doit être étiqueté avec l'identification du patient, l'heure, la date et le lieu de la collecte, conformément aux procédures spécifiées dans le protocole clinique.
- Pour le transport, le produit cellulaire de départ doit être emballé dans des conteneurs isothermes et doit être conservé à température ambiante contrôlée (+19 °C à +25 °C [+66 °F à +77 °F]), conformément aux procédures standard de collecte de sang des hôpitaux ou autres établissements de santé, approuvés pour l'utilisation selon le protocole clinique. Ne pas réfrigérer. Pendant le transport, la concentration cellulaire ne doit pas dépasser $0{,}2\times10^9$ de cellules par mL.
- Éviter de mélanger le produit cellulaire de départ trop fortement.
- Si le produit cellulaire de départ doit être conservé, p. ex. pendant la nuit, il doit être maintenu à température ambiante contrôlée (+19 °C à +25 °C [+66 °F à +77 °F]). Pendant la conservation, la concentration de leucocytes ne doit jamais dépasser $0{,}2\times10^9$ de cellules par mL.
- Les cellules doivent être conservées dans du plasma autologue. Si la concentration de cellules est supérieure à $0{,}2\times10^9$ de cellules par mL, il convient de diluer le produit cellulaire de départ avec du plasma autologue.

4 Le système CliniMACS Plus

Le système CliniMACS Plus, composé des éléments CliniMACS Plus Instrument, réactif(s) CliniMACS, CliniMACS Tubing Set, CliniMACS PBS/EDTA Buffer et d'autres accessoires – à utiliser ensemble – est destiné à la séparation *in vitro* de cellules humaines spécifiques pour des applications cliniques.

IMPORTANT
Pour toute instructions d'utilisation, p. ex. les avertissements et précautions d'emploi concernant les éléments spécifiques du système CliniMACS Plus, se référer au manuel d'utilisation fourni avec l'élément respectif.

4.1 CliniMACS Plus Instrument

Le CliniMACS Plus Instrument est un dispositif électromécanique comprenant un aimant permanent, une pompe péristaltique, des valves à pincement, des composants électroniques et un logiciel.

4.2 Les réactifs CliniMACS et les conjugués de biotine

Les réactifs CliniMACS sont des solutions colloïdales non visqueuses de couleur foncée, contenant les conjugués d'anticorps spécifiques à certaines cellules dans un tampon. Les réactifs sont constitués de l'anticorps couplé chimiquement à des particules super-paramagnétiques.

Les conjugués de biotine CliniMACS sont des solutions claires et incolores contenant des anticorps liés de manière covalente à la biotine dans le tampon. Les anticorps sont hautement spécifiques et permettent ainsi le marquage *in vitro* de cellules cibles rares.

4.3 Les jeux de tubulures CliniMACS

Les jeux de tubulures CliniMACS sont des produits stériles à usage unique conçus pour être utilisés en combinaison avec le CliniMACS Plus Instrument pour l'enrichissement ou la déplétion *in vitro* de cellules humaines provenant de populations de cellules hématologiques hétérogènes.

4.4 CliniMACS PBS/EDTA Buffer

Le CliniMACS PBS/EDTA Buffer est un fluide de lavage et de transport pour permettre la séparation *in vitro* de cellules humaines.

4.5 Accessoires CliniMACS

- **set de transfert de plasma :**
  set de transfert avec deux pointes pour le plasma ou les fluides, Transfer Set Coupler/Coupler (REF 200-073-902) ou équivalent
- **Luer/Spike Interconnector :**
  set de transfert avec pointe et adaptateur de seringue (luer femelle) pour le plasma ou les fluides, Luer/Spike Interconnector (REF 200-073-903) ou équivalent

4.6 Matériels supplémentaires requis

En plus des produits CliniMACS, du matériel supplémentaire peut être requis pour une séparation CliniMACS Plus.

- **poches de transfert, convenant à la centrifugation**
  Poche de transfert 150 mL, Terumo ou équivalent
  Poche de transfert 600 mL, Terumo ou équivalent
  Poche de transfert 1000 mL, Terumo ou équivalent
- **poches de culture cellulaire, perméables aux gaz**
  MACS GMP Cell Differentiation Bag – 100 mL ou équivalent
- **coupleur de site de prélèvement :**
  Coupleur de site de prélèvement, Terumo ou équivalent
- **préfiltre :**
  Blood Transfusion Filter, Haemonetics® ou équivalent
- **seringues et aiguilles :**
  seringues appropriées (5 mL, 10 mL, 20 mL, 50 mL) et aiguilles hypodermiques 20G
- **pince à clamper**
- **tubes à échantillon**
- **sérum-albumine humaine (HSA) :**
  Utiliser exclusivement de l'HSA de qualité pharmaceutique disponible en tant que produit approuvé dans le pays de l'utilisateur.
- **immunoglobuline G de qualité pharmaceutique :**
  Utiliser uniquement de l'IgG de qualité pharmaceutique, disponible en tant que médicament approuvé dans le pays de l'utilisateur, par ex. pour l'Allemagne : Gamunex® 10% ou équivalent.
- **milieu de culture cellulaire :**
  par ex. RPMI 1640 ou équivalent
- **matériel spécifique à l'application :**
  anticorps ou ligand spécifique d'une cellule biotinylée individuelle; du sérum AB ou, alternativement, du sérum autologue.

4.7 Équipement requis

- **source d'alimentation sans interruption :**
  ASI recommandée : APC Smart-UPS 1500VA USB & Serial 230 V, fabriqué par APC (American Power Conversion) ou équivalent
- **hotte à flux laminaire**
- **raccord de tubulure stérile :**
  Terumo Sterile Connection Device (TSCD®) ou équivalent
- **agitateur orbital :**
  Agitateurs de plate-forme, Heidolph Instruments ou équivalent
- **centrifugeuse :**
  Centrifugeuse, Sorvall ou équivalent, et les godets de centrifugation avec bouchons hermétiques aux aérosols
- **extracteur de plasma :**
  Plasma Separation Stand, Équipement Terumo ou équivalent
- **balance :**
  Balance de laboratoire, Mettler Toledo ou équivalent, avec une capacité de 1 kg; résolution jusqu'à 0,1 g
- **soudeuse pour tubulures :**
  Soudeuse à main, Hematron III, Baxter ou équivalent
- **décapant de tube :**
  Décapant de tube, Baxter ou équivalent
- **poubelles pour les déchets biologiques dangereux**

Équipement supplémentaire requis pour le CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma) :

- Plaque de culture à 24 puits, Corning™ Costar™ plaque de culture à 24 puits, Sigma Aldrich, ou équivalent
- MiniMACS™ Separation Unit, Miltenyi Biotec (REF 130-042-102)
- MS Columns, Miltenyi Biotec (REF 130-042-201)
- Pre-Separation Filter, Miltenyi Biotec (REF 130-041-407)
- MACSmix™ Tube Rotator, Miltenyi Biotec (REF 130-090-753)

5 Aperçu des applications

5.1 Vos cellules cibles en quatre ÉTAPES

Le chapitre suivant présente un aperçu de la procédure de séparation CliniMACS Plus. La séparation CliniMACS Plus se déroule en quatre ÉTAPES. Dans la première étape, les cellules sont préparées et marquées magnétiquement. Dans la deuxième étape, un programme de séparation approprié est sélectionné. Dans la troisième étape, le jeu de tubulures est installé sur le CliniMACS Plus Instrument et dans la quatrième étape, les cellules sont séparées automatiquement.

L'enregistrement des données de processus relatives à l'application peut être nécessaire. Pour recevoir des feuilles de calcul comme support, contacter Miltenyi Biotec Technical Support.

Le manuel d'utilisation des applications CliniMACS Plus comprend des options différentes pour chaque étape (réactifs, jeux de tubulures et programmes différents). Avant de commencer une application, il faut choisir les chapitres spécifiques à l'application (chapitre 6) et l'explication détaillée des ÉTAPES 1-4 (chapitre 7) selon le tableau synoptique commençant à la page suivante. Le tableau synoptique contient des informations sur les paragraphes applicables du manuel d'utilisation. Le tableau synoptique est basé sur le type et le nombre de réactifs, le nombre de cellules, le type de jeu de tubulures et le programme de séparation nécessaires à la séparation.

ÉTAPE 1 : Préparation cellulaire et marquage magnétique

L'ÉTAPE 1 décrit la préparation du produit cellulaire et le marquage magnétique des cellules spécifiques, exprimant l'antigène respectif. Suivre les instructions du paragraphe correspondant. Puis passer à l'ÉTAPE 2.

ÉTAPE 2 : Sélection du programme de séparation

L'ÉTAPE 2 décrit la sélection d'un programme de séparation du CliniMACS Plus Instrument. En fonction du type de cellules et du nombre de cellules à séparer, il est nécessaire de sélectionner parmi différents programmes. Pour déterminer le programme adapté, se référer au tableau synoptique à la page suivante. Lire le paragraphe correspondant au programme de séparation sélectionné. Suivre les instructions qui y sont décrites. Puis passer à l'ÉTAPE 3.

ÉTAPE 3 : Installation des jeux de tubulures CliniMACS

L'ÉTAPE 3 explique comment installer le jeu de tubulures sur le CliniMACS Plus Instrument. Suivre les instructions du paragraphe correspondant. Puis passer à l'ÉTAPE 4.

ÉTAPE 4 : Séparation CliniMACS Plus

L'ÉTAPE 4 décrit la séparation CliniMACS automatisée. Le CliniMACS Plus Instrument exécute la procédure de séparation cellulaire automatisée (sélectionnée à l'ÉTAPE 2). Suivre les instructions du paragraphe correspondant.

IMPORTANT

Le tableau synoptique des pages suivantes résume les informations sur les applications typiques des réactifs CliniMACS. Lorsque la séparation d'un nombre différent de cellules cibles doit être effectuée, se reporter aux instructions du tableau synoptique spécifique à l'application pour obtenir des informations sur la capacité maximale de l'application respective. Suivre les instructions des paragraphes spécifiques à l'application et les explications détaillées des ÉTAPES 1-4. Voir tableau synoptique.

5.2 Tableau synoptique

Performances de l'application	Flacon(s) de réactif	Jeu de tubulures	Programme de séparation	Section spécifique à l'application	Explication détaillée des ÉTAPES 1-4			
					ÉTAPE 1	ÉTAPE 2	ÉTAPE 3	ÉTAPE 4
Anti-Biotin (REF 173-01) – Enrichissement								
≤40×10^9 de cellules au total	1× Anti-Biotin Reagent	1× CliniMACS Tubing Set (REF 161-01)	ENRICHMENT 1.1	6.3	7.1	7.2.3	7.3.1	7.4.2
Anti-Biotin (REF 173-01) – Déplétion (application à échelle normale)								
≤40×10^9 de cellules au total	1× Anti-Biotin Reagent	1× CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01)	DEPLETION 2.1	6.3	7.1	7.2.5	7.3.1	7.4.4
Anti-Biotin (REF 173-01) – Déplétion (application à grande échelle)								
>40–80×10^9 de cellules au total	2× Anti-Biotin Reagent	1× CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01)	DEPLETION 2.1	6.3	7.1	7.2.5	7.3.1	7.4.4
CCS (REF 279-01) – Enrichissement								
Cellules sécrétant l'IFN pour ≤1×10^9 de cellules au total	1 kit (2 flacons de réactif)	1× CliniMACS Tubing Set (REF 161-01)	ENRICHMENT 3.2	6.17	7.1	7.2.4	7.3.1	7.4.3
CD1c (BDCA-1)-Biotin (REF 277-01) – Déplétion - Partie 1 de 2								
≤5×10^9 de cellules CD19 positives sur un total de ≤40×10^9 de cellules (WBC)	1× CD19 Reagent et 1× CD1c (BDCA-1)-Biotin	1× CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01)	DEPLETION 2.1	6.12	7.1	7.2.5	7.3.1	7.4.4
CD1c (BDCA-1)-Biotin (REF 277-01) – Enrichissement - Partie 2 de 2								
≤0,2×10^9 de cellules CD1c (BDCA-1) positives sur un total de ≤40×10^9 de cellules (WBC)	1× Anti-Biotin Reagent	1× CliniMACS Tubing Set (REF 161-01)	ENRICHMENT 3.2	6.13	7.1	7.2.4	7.3.1	7.4.3
CD3 (REF 273-01) – Déplétion (application à échelle normale)								
≤15×10^9 de cellules CD3 positives sur un total de ≤40×10^9 de cellules	1× CD3 Reagent	1× CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01)	DEPLETION 2.1	6.5	7.1	7.2.5	7.3.1	7.4.4
CD3 (REF 273-01) – Déplétion (application à grande échelle)								
>15–20×10^9 cellules CD3 positives sur un total de >40–80×10^9 de cellules	2× CD3 Reagent	1× CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01)	DEPLETION 2.1	6.5	7.1	7.2.5	7.3.1	7.4.4

Performances de l'application	Flacon(s) de réactif	Jeu de tubulures	Programme de séparation	Section spécifique à l'application	Explication détaillée des ÉTAPES 1-4			
					ÉTAPE 1	ÉTAPE 2	ÉTAPE 3	ÉTAPE 4
CD3 (REF 273-01) – Déplétion (application à échelle normale)								
≤15×10^9 cellules CD3 positives sur un total de ≤40×10^9 de cellules	1× CD3 Reagent	1× CliniMACS Depletion Tubing Set (REF 261-01)	DEPLETION 3.1	6.5	7.1	7.2.6	7.3.3	7.4.5
CD3 (REF 273-01) – Déplétion (application à grande échelle)								
>15–30×10^9 de cellules CD3 positives sur un total de >40–80×10^9 de cellules	2× CD3 Reagent	1× CliniMACS Depletion Tubing Set (REF 261-01)	DEPLETION 3.1	6.5	7.1	7.2.6	7.3.3	7.4.5
CD4 (REF 276-01) – Enrichissement								
≤5×10^9 de cellules CD4 positives sur un total de ≤40×10^9 de cellules	1× CD4 Reagent	1× CliniMACS Tubing Set (REF 161-01)	ENRICHMENT 1.1	6.10	7.1	7.2.3	7.3.1	7.4.2
CD4 (REF 276-01) – Déplétion								
≤12×10^9 de cellules CD4 positives sur un total de ≤40×10^9 de cellules	1× CD4 Reagent	1× CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01)	DEPLETION 2.1	6.10	7.1	7.2.5	7.3.1	7.4.4
CD8 (REF 275-01) – Enrichissement								
≤4×10^9 de cellules CD8 positives sur un total de ≤40×10^9 de cellules	1× CD8 Reagent	1× CliniMACS Tubing Set (REF 161-01)	ENRICHMENT 1.1	6.8	7.1	7.2.3	7.3.1	7.4.2
CD8 (REF 275-01) – Déplétion								
≤4×10^9 de cellules CD8 positives sur un total de ≤40×10^9 de cellules	1× CD8 Reagent	1× CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01)	DEPLETION 2.1	6.8	7.1	7.2.5	7.3.1	7.4.4
Combinaison CD4/CD8 (REF 276-01/REF 275-01) – Déplétion								
≤12×10^9 de cellules CD4 positives et ≤4×10^9 de cellules CD8 positives sur un total de ≤40×10^9 de cellules	1× CD4 Reagent et 1× CD8 Reagent	1× CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01)	DEPLETION 2.1	6.11	7.1	7.2.5	7.3.1	7.4.4
CD14 (REF 272-01) – Enrichissement								
≤4×10^9 de cellules CD14 positives sur un total de ≤20×10^9 de cellules	1× CD14 Reagent	1× CliniMACS Tubing Set (REF 161-01)	ENRICHMENT 1.1	6.2	7.1	7.2.3	7.3.1	7.4.2
CD19 (REF 179-01) – Déplétion								
≤5×10^9 de cellules CD19 positives sur un total de ≤40×10^9 de cellules	1× CD19 Reagent	1× CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01)	DEPLETION 2.1	6.6	7.1	7.2.5	7.3.1	7.4.4

Performances de l'application	Flacon(s) de réactif	Jeu de tubulures	Programme de séparation	Section spécifique à l'application	Explication détaillée des ÉTAPES 1-4			
					ÉTAPE 1	ÉTAPE 2	ÉTAPE 3	ÉTAPE 4
Combinaison CD3/CD19 (REF 273-01/REF 179-01) – Déplétion								
≤15×10^9 de cellules CD3 positives et ≤5×10^9 de cellules CD19 positives sur un total de ≤40×10^9 de cellules	1× CD3 Reagent et 1× CD19 Reagent	1× CliniMACS Depletion Tubing Set (REF 261-01)	DEPLETION 3.1	6.7	7.1	7.2.6	7.3.3	7.4.5
CD25 (REF 274-01) – Enrichissement								
≤0,6×10^9 de cellules CD25 positives sur un total de ≤40×10^9 de cellules (WBC)	1× CD25 Reagent	1× CliniMACS Tubing Set (REF 161-01)	ENRICHMENT 3.2	6.9	7.1	7.2.4	7.3.1	7.4.3
CD25 (REF 274-01) – Enrichissement								
≤0,6×10^9 de cellules à forte expression de CD25 sur un total de ≤40×10^9 de cellules (WBC)	1× CD25 Reagent	1× CliniMACS Tubing Set (REF 161-01)	ENRICHMENT 3.2	6.9	7.1	7.2.4	7.3.1	7.4.3
CD25 (REF 274-01) – Déplétion (application à échelle normale)								
≤6×10^9 de cellules CD25 positives sur un total de ≤40×10^9 de cellules (WBC)	1× CD25 Reagent	1× CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01)	DEPLETION 2.1	6.9	7.1	7.2.5	7.3.1	7.4.4
CD25 (REF 274-01) – Déplétion (application à grande échelle)								
>6–12×10^9 de cellules CD25 positives sur un total de >40–80×10^9 de cellules (WBC)	2× CD25 Reagent	1× CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01)	DEPLETION 2.1	6.9	7.1	7.2.5	7.3.1	7.4.4
CD34 (REF 171-01) – Enrichissement (application à échelle normale)								
≤0,6×10^9 de cellules CD34 positives sur un total de ≤60×10^9 de cellules	1× CD34 Reagent	1× CliniMACS Tubing Set (REF 161-01)	CD34 SELECTION 1	6.1	7.1	7.2.2	7.3.1	7.4.1
CD34 (REF 171-01) – Enrichissement (application à grande échelle)								
>0,6–1,2×10^9 de cellules CD34 positives sur un total de >60–120×10^9 de cellules	2× CD34 Reagent	1× CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01)	CD34 SELECTION 2	6.1	7.1	7.2.2	7.3.1	7.4.1

Performances de l'application	Flacon(s) de réactif	Jeu de tubulures	Programme de séparation	Section spécifique à l'application	Explication détaillée des ÉTAPES 1-4			
					ÉTAPE 1	ÉTAPE 2	ÉTAPE 3	ÉTAPE 4
CD45RA (REF 275-01) – Déplétion								
≤20×10^9 de cellules CD45RA positives sur un total de ≤50×10^9 de cellules	1× CD45 Reagent	1× CliniMACS Depletion Tubing Set (REF 261-01)	DEPLETION 3.1	6.16	7.1	7.2.6	7.3.3	7.4.5
CD56 (REF 275-01) – Enrichissement								
≤5×10^9 de cellules CD56 positives sur un total de ≤40×10^9 de cellules	1× CD56 Reagent	1× CliniMACS Tubing Set (REF 161-01)	ENRICHMENT 1.1	6.4	7.1	7.2.3	7.3.1	7.4.2
CD304 (BDCA-4) (REF 278-01) – Enrichissement								
≤0,2×10^9 de cellules CD304 (BDCA-4) positives sur un total de ≤40×10^9 de cellules	1× CD304 (BDCA-4) Reagent	1× CliniMACS Tubing Set (REF 161-01)	ENRICHMENT 3.2	6.14	7.1	7.2.4	7.3.1	7.4.3
TCRα/β-Biotin (REF 701-48/REF 173-01) – Déplétion								
≤24×10^9 de cellules TCRα/β positives sur un total de ≤60×10^9 de cellules	1× TCRα/β-Biotin et 2× Anti-Biotin Reagent	1× CliniMACS Depletion Tubing Set (REF 261-01)	DEPLETION 3.1	6.15	7.1	7.2.6	7.3.3	7.4.5

Tableau 5.1 : Aperçu des applications disponibles avec les jeux de tubulures et les programmes de séparation correspondants.

6 Aperçu des ÉTAPES 1-4 en fonction de l'application

6.1 Enrichissement de cellules CD34 positives

Le CliniMACS Plus CD34 System, incluant le CliniMACS Plus Instrument, le CliniMACS CD34 Reagent, le CliniMACS Tubing Set ou le CliniMACS Tubing Set LS et le CliniMACS PBS/EDTA Buffer, est destiné à l'enrichissement *in vitro* de cellules progénitrices hématopoïétiques humaines CD34 positives, à partir de populations cellulaires hématologiques hétérogènes.

6.1.1 ÉTAPE 1 : Préparation cellulaire et marquage magnétique

Premières actions requises

Performances de l'application

- Application à échelle normale : jusqu'à $0{,}6\times10^9$ de cellules CD34 positives sur un nombre total maximal de 60×10^9 de cellules (WBC)
- Application à grande échelle : entre $0{,}6\times10^9$ et $1{,}2\times10^9$ de cellules CD34 positives sur un nombre total maximal de 120×10^9 de cellules (WBC)

⚠ ATTENTION

Risque de performances insuffisantes du processus de séparation des cellules marquées. Si les capacités de l'application sont dépassées, il existe un risque de marquage spécifique insuffisant. Utiliser les quantités requises de cellules et de réactif comme décrit pour l'application respective.

Matériels CliniMACS requis

Matériels	Référence catalogue	Quantité	Programme de séparation
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1	–
CliniMACS CD34 Reagent	171-01	• 1 flacon (échelle normale) • 2 flacons (grande échelle)	–
CliniMACS Tubing Set	161-01	1 jeu de tubulures	CD34 SELECTION 1
CliniMACS Tubing Set LS	162-01	1 jeu de tubulures	CD34 SELECTION 2
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	3 poches de 1000 mL[1]	–

1 Avant de l'utiliser, complémenter le CliniMACS PBS/EDTA Buffer avec de l'HSA à une concentration finale de 0,5% (p/v).

Tableau 6.1 : Matériels complémentaires requis

Matériels supplémentaires requis

- **Cell Preparation Bag :**
  Une poche de transfert de 600 mL, adaptée à la centrifugation, ainsi qu'un coupleur de site de prélèvement et deux sets de transfert de plasma, à utiliser pendant la procédure de préparation des cellules
- **Plasma Waste Bag et Wash Waste Bags :**
  trois poches de transfert de 600 mL, adaptées à la centrifugation
- **Cell Collection Bag :**
  une poche de transfert de 150 mL en combinaison avec un Luer/Spike Interconnector pour raccorder la Cell Collection Bag au jeu de tubulures
- un préfiltre
- pince à clamper
- seringues appropriées (de différentes tailles) et aiguilles hypodermiques 20G
- sérum-albumine humaine (HSA) à ajouter au CliniMACS PBS/EDTA Buffer à une concentration finale de 0,5% (p/v)
- tubes à échantillon

▶ Préparation des poches

Déterminer le poids de la Cell Collection Bag et de la Cell Preparation Bag vides comme décrit dans le paragraphe 7.1.1 à la page 125.

Marquage magnétique des cellules

Se référer au paragraphe 7.1 « ÉTAPE 1 : Préparation cellulaire et marquage magnétique » à la page 125 pour une description détaillée des étapes suivantes.

▶ Analyse du produit cellulaire de départ

▶ Transfert du produit cellulaire de départ dans la Cell Preparation Bag

Si le poids du produit cellulaire de départ excède 200 g mais le nombre total de cellules est inférieur à 120×10^9 et le nombre de cellules CD34 positives est inférieur à $1,2\times10^9$, il est nécessaire de centrifuger l'échantillon pour le réduire à un volume de 200 g maximum et de procéder ensuite aux étapes suivantes.

▶ Dilution Transfert du produit cellulaire de départ dans la Cell Preparation Bag

Ajouter le tampon : Poids du tampon à ajouter = Poids du produit cellulaire de départ×2.

▶ Centrifugation

Centrifuger à 200 ×g, sans frein, 15 minutes, à température ambiante (TA : +19° C à +25 °C [+66 °F à +77 °F]).

▶ Ajustement du volume: volume de marquage 95 g (±5 g) (application à échelle normale) ou 190 g (±5 g) (application à grande échelle)

1. Retirer le surnageant pour ajuster l'échantillon selon l'équation suivante : Poids de surnageant à retirer = Poids du produit cellulaire dilué – Volume de marquage.
2. Resuspendre le culot cellulaire.

▶ Incubation avec le CliniMACS CD34 Reagent

1. Ajouter 1 ou 2 flacon(s) de CliniMACS CD34 Reagent (voir Tableau 6.1). Mélanger minutieusement.
2. Incuber sur l'agitateur orbital (25 tr/min) pendant 30 minutes à TA.

▶ Retrait de l'excédent de réactif

1. Remplir la Cell Preparation Bag de tampon.
2. Centrifuger (200 ×g, sans frein, 15 minutes, TA).
3. Retirer autant de surnageant que possible. **Remarque :** Retirer au moins 500 g de surnageant. Si la quantité de surnageant retiré est inférieur aux valeurs indiquées, il est recommandé de réaliser un total de trois étapes de lavage (au lieu de deux). Autrement, le retrait de réactif non lié risque d'être insuffisant.
4. Resuspendre le culot cellulaire.
5 Remplir la Cell Preparation Bag de tampon.
6. Centrifuger (200 ×g, sans frein, 15 minutes, TA).
7. Retirer autant de surnageant que possible.
8. Resuspendre le culot cellulaire.
9. Ajuster le volume de chargement de l'échantillon à 150 g (application à échelle normale) ou à 275 g (application à grande échelle).

Remarque : Prélever un échantillon après avoir retiré l'excédent de réactif pour une analyse ultérieure (facultatif).

6.1.2 ÉTAPE 2 : Sélection du programme de séparation

▶ Allumer le CliniMACS Plus Instrument

▶ Sélectionner le programme de séparation CD34 SELECTION 1/2

(usage d'un flacon : CD34 SELECTION 1, ou de deux flacons : CD34 SELECTION 2)

Voir paragraphe 7.2.2 à la page 139.

6.1.3 ÉTAPE 3 : Installation des jeux de tubulures CliniMACS

- **CliniMACS Tubing Set et CliniMACS Tubing Set LS**

Voir paragraphe 7.3.1 à la page 160.

6.1.4 ÉTAPE 4 : Séparation CliniMACS Plus

- **Procédure de séparation**
- **Débrancher les poches et noter le code du processus**
- **Démonter le jeu de tubulures et éteindre**
- **Analyse des cellules**

Voir paragraphe 7.4.1 à la page 196.

6.2 Enrichissement de cellules CD14 positives

Le CliniMACS Plus CD14 System, incluant le CliniMACS Plus Instrument, le CliniMACS CD14 Reagent, le CliniMACS Tubing Set et le CliniMACS PBS/EDTA Buffer, est destiné à l'enrichissement *in vitro* de cellules humaines CD14 positives, à partir de populations cellulaires hématologiques hétérogènes.

6.2.1 ÉTAPE 1 : Préparation cellulaire et marquage magnétique

Premières actions requises

Performances de l'application

Jusqu'à 4×10^9 de cellules CD14 positives sur un nombre total maximal de 20×10^9 de cellules (WBC)

⚠ ATTENTION

Risque de performances insuffisantes du processus de séparation des cellules marquées. Si les capacités de l'application sont dépassées, il existe un risque de marquage spécifique insuffisant. Utiliser les quantités requises de cellules et de réactif comme décrit pour l'application respective.

Matériels CliniMACS requis

Matériels	Référence catalogue	Quantité
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS CD14 Reagent	272-01	1 flacon
CliniMACS Tubing Set	161-01	1 jeu de tubulures
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	3 poches de 1000 mL[1]

1 Voir Tableau 6.3 et Tableau 6.4. Avant de l'utiliser, complémenter le CliniMACS PBS/EDTA Buffer avec de l'HSA à une concentration finale de 0,5% (p/v).

Tableau 6.2 : Matériels CliniMACS requis pour l'enrichissement de cellules CD14 positives

Matériels supplémentaires requis

- **Cell Preparation Bag :**
  une poche de transfert de 600 mL, adaptée à la centrifugation, ainsi qu'un coupleur de site de prélèvement et un set de transfert de plasma, à utiliser pendant la procédure de préparation des cellules
- **Plasma Waste Bag et Wash Waste Bag :**
  deux poches de transfert de 600 mL, adaptées à la centrifugation
- **Cell Collection Bag :**
  une poche de transfert de 150 mL ou de 600 mL en combinaison avec un Luer/Spike Interconnector pour raccorder la Cell Collection Bag au jeu de tubulures (voir Tableau 6.4)
- **Si le remplacement de la Negative Fraction Bag et de la Buffer Waste Bag est nécessaire :**
  deux poches de transfert de 1000 mL en combinaison avec deux Luer/Spike Interconnectors pour raccorder les poches au jeu de tubulures (voir Tableau 6.4)
- **S'il faut plus d'un litre de tampon pour effectuer la séparation :**
  un set de transfert de plasma pour raccorder les poches de tampon (voir Tableau 6.4)
- un préfiltre
- pince à clamper
- seringues appropriées (de différentes tailles) et aiguilles hypodermiques 20G

Aperçu des matériels requis

Préparation cellulaire	
Total de cellules (WBC)	≤20×10^9
Cellules marquées	≤4×10^9
Nombre de flacons de réactif	1–2
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 mL
Set de transfert de plasma	1

Tableau 6.3 : Matériels requis pour la préparation des cellules CD14 positives

Séparation		
Cellules marquées	≤2×10^9	>2–4×10^9
Negative Fraction Bag	–	Remplacer les poches d'origine du jeu de tubulures par des poches de transfert de 1000 mL.
Buffer Waste Bag	–	
Priming Waste Bag	–	–
Cell Collection Bag	150 mL	600 mL
Luer/Spike Interconnector	1	3
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 mL	2000 mL
Set de transfert de plasma	–	1

Tableau 6.4 : Matériels requis pour l'enrichissement de cellules CD14 positives

▶ Préparation des poches

Déterminer le poids de la Cell Collection Bag et de la Cell Preparation Bag vides comme décrit dans le paragraphe 7.1.1 à la page 125.

Marquage magnétique des cellules

Se référer au paragraphe 7.1 « ÉTAPE 1 : Préparation cellulaire et marquage magnétique » à la page 125 pour une description détaillée des étapes suivantes.

▶ Analyse du produit cellulaire de départ

▶ Transfert du produit cellulaire de départ dans la Cell Preparation Bag

▶ Dilution Transfert du produit cellulaire de départ dans la Cell Preparation Bag

Ajouter le tampon : Poids du tampon à ajouter = 600 g – Poids du produit cellulaire de départ.

▶ Centrifugation

Centrifuger à 300 ×g, sans frein, 15 minutes, à température ambiante (TA : +19° C à +25 °C [+66 °F à +77 °F]).

▶ **Ajustement du volume: volume de marquage 50 g (±5 g)**

1. Retirer le surnageant pour ajuster l'échantillon selon l'équation suivante : Poids de surnageant à retirer = Poids du produit cellulaire de départ dilué – Volume de marquage.
2. Resuspendre le culot cellulaire.

▶ **Incubation avec le CliniMACS CD14 Reagent**

1. Ajouter 1 flacon de CliniMACS CD14 Reagent. Mélanger minutieusement.
2. Incuber sur l'agitateur orbital (25 tr/min) pendant 15 minutes à TA.

▶ **Retrait de l'excédent de réactif**

1. Remplir la Cell Preparation Bag de tampon.
2. Centrifuger (300 ×g, sans frein, 15 minutes, TA).
3. Retirer autant de surnageant que possible. **Remarque :** Retirer au moins 500 g de surnageant. Si le poids du surnageant retiré est inférieur à 500 g, il est recommandé de réaliser un total de deux étapes de lavage (au lieu d'une seule). Autrement, le retrait de réactif non lié risque d'être insuffisant.
4. Resuspendre le culot cellulaire.
5. Ajuster le volume de chargement de l'échantillon à 100 g.

Remarque : Prélever un échantillon après avoir retiré l'excédent de réactif pour une analyse ultérieure (facultatif).

6.2.2 ÉTAPE 2 : Sélection du programme de séparation

▶ **Allumer le CliniMACS Plus Instrument**

▶ **Sélectionner le programme de séparation ENRICHMENT 1.1**

▶

Voir paragraphe 7.2.3 à la page 141.

6.2.3 ÉTAPE 3 : Installation des jeux de tubulures CliniMACS

▶ **CliniMACS Tubing Set et CliniMACS Tubing Set LS**

Voir paragraphe 7.3.1 à la page 160.

6.2.4 ÉTAPE 4 : Séparation CliniMACS Plus

- **Procédure de séparation**
- **Débrancher les poches et noter le code du processus**
- **Démonter le jeu de tubulures et éteindre**
- **Analyse des cellules**

Voir paragraphe 7.4.2 à la page 200.

6.3 Enrichissement/déplétion avec le CliniMACS Anti-Biotin Reagent

Le CliniMACS Plus Anti-Biotin System, incluant le CliniMACS Plus Instrument, le CliniMACS Anti-Biotin Reagent, le CliniMACS Tubing Set ou le CliniMACS Tubing Set LS et le CliniMACS PBS/EDTA Buffer est destiné à l'enrichissement ou à la déplétion *in vitro* de cellules humaines préalablement marquées avec un anticorps biotinylé.

6.3.1 ÉTAPE 1 : Préparation cellulaire et marquage magnétique

Premières actions requises

Performances de l'application

- **Enrichissement :** jusqu'à 40×10^9 de cellules au total (WBC)
- **Déplétion :**
  Application à échelle normale : jusqu'à 40×10^9 de cellules au total (WBC)
  Application à grande échelle : entre 40×10^9 et 80×10^9 de cellules au total (WBC)

⚠ ATTENTION

Risque de performances insuffisantes du processus de séparation des cellules marquées. Si les capacités de l'application sont dépassées, il existe un risque de marquage spécifique insuffisant. Utiliser les quantités requises de cellules et de réactif comme décrit pour l'application respective.

Matériels CliniMACS requis

Matériels	Référence catalogue	Quantité	Programme de séparation
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1	–
CliniMACS Anti-Biotin Reagent	173-01	• 1 flacon (échelle normale) • 2 flacons (grande échelle)	–
CliniMACS Tubing Set	161-01	1 jeu de tubulures	ENRICHMENT 1.1
CliniMACS Tubing Set LS	162-01	1 jeu de tubulures	DEPLETION 2.1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	• 3 poches de 1000 mL[1] (échelle normale) • 4 poches de 1000 mL[1] (grande échelle)	–

1 La quantité de tampon varie en fonction du programme de séparation sélectionné et du nombre de cellules marquées (voir Tableau 6.6 à Tableau 6.9). Avant de l'utiliser, complémenter le CliniMACS PBS/EDTA Buffer avec de l'HSA à une concentration finale de 0,5% (p/v).

Tableau 6.5 : Matériels CliniMACS requis pour l'enrichissement/la déplétion avec le CliniMACS Anti-Biotin Reagent

Matériels supplémentaires requis

- **Cell Preparation Bag :**
  une poche de transfert de 600 mL, adaptée à la centrifugation, ainsi qu'un coupleur de site de prélèvement et deux sets de transfert de plasma, à utiliser pendant la procédure de préparation des cellules
- **Plasma Waste Bag et Wash Waste Bag :**
  deux poches de transfert de 600 mL, adaptées à la centrifugation
- **Cell Collection Bag :**
  une poche de transfert de 600 mL ou de 1000 mL en combinaison avec un Luer/Spike Interconnector pour raccorder la Cell Collection Bag au jeu de tubulures (voir Tableau 6.7 et Tableau 6.9)
- **Si le remplacement de la Negative Fraction Bag, de la Buffer Waste Bag et/ou de la Priming Waste Bag est nécessaire :**
  deux à trois poches de transfert de 1000 mL en combinaison avec deux Luer/Spike Interconnectors pour raccorder les poches au jeu de tubulures (voir Tableau 6.7 et Tableau 6.9). Remplacer la Priming Waste Bag à l'aide du raccord de tubulure stérile.
- **S'il faut plus d'un litre de tampon pour effectuer la séparation :**
  un à deux sets de transfert de plasma pour raccorder les poches de tampon (voir Tableau 6.7 et Tableau 6.9)
- un préfiltre
- pince à clamper
- seringues appropriées (de différentes tailles) et aiguilles hypodermiques 20G
- sérum-albumine humaine (HSA) à ajouter au CliniMACS PBS/EDTA Buffer à une concentration finale de 0,5% (p/v)

- tubes à échantillon
- Anticorps ou ligand spécifique d'une cellule biotinylée individuelle

Aperçu des matériels requis

Préparation cellulaire (ENRICHMENT 1.1)	
Total de cellules (WBC)	≤40×10^9
Nombre de flacons de réactif	1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	2000 mL
Set de transfert de plasma	2

Tableau 6.6 : Matériels requis pour la préparation cellulaire (ENRICHMENT 1.1)

Séparation (ENRICHMENT 1.1)		
Cellules marquées	≤2×10^9	>2–5×10^9
Negative Fraction Bag	–	Remplacer les poches d'origine du jeu de tubulures par des poches de transfert de 1000 mL.
Buffer Waste Bag	–	
Priming Waste Bag	–	–
Cell Collection Bag	600 mL	600 mL
Luer/Spike Interconnector	1	3
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 mL	2000 mL
Set de transfert de plasma	–	1

Tableau 6.7 : Matériels requis pour l'enrichissement (ENRICHMENT 1.1)

Préparation cellulaire (DEPLETION 2.1)		
Total de cellules (WBC)	≤40×10^9	>40–80×10^9
Nombre de flacons de réactif	1	2
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	2000 mL	2000 mL
Set de transfert de plasma	2	2

Tableau 6.8 : Matériels requis pour la préparation cellulaire (DEPLETION 2.1)

Séparation (DEPLETION 2.1)			
Cellules marquées	<5×10^9	5–13×10^9	>13–20×10^9
Negative Fraction Bag	–	Remplacer les poches d'origine du jeu de tubulures par des poches de transfert de 1000 mL.	Remplacer les poches d'origine du jeu de tubulures par des poches de transfert de 1000 mL.
Buffer Waste Bag	–		
Priming Waste Bag	–	–	
Cell Collection Bag	600 mL	1000 mL	1000 mL
Luer/Spike Interconnector	1	3	4
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 mL	2000 mL	3000 mL
Set de transfert de plasma	–	1	2

Tableau 6.9 : Matériels requis pour la déplétion (DEPLETION 2.1)

▶ Préparation des poches

Déterminer le poids de la Cell Collection Bag et de la Cell Preparation Bag vides comme décrit dans le paragraphe 7.1.1 à la page 125.

Marquage magnétique des cellules

Se référer au paragraphe 7.1 « ÉTAPE 1 : Préparation cellulaire et marquage magnétique » à la page 125 pour une description détaillée des étapes suivantes.

▶ Analyse du produit cellulaire de départ

▶ Transfert du produit cellulaire de départ dans la Cell Preparation Bag

▶ Dilution Transfert du produit cellulaire de départ dans la Cell Preparation Bag

Ajouter le tampon : Poids du tampon à ajouter = Poids du produit cellulaire de départ×2.

▶ Centrifugation

1. Centrifuger à 300 ×g, sans frein, 15 minutes, à température ambiante (TA : +19 °C à +25 °C [+66 °F à +77 °F]).
2. Retirer le surnageant pour ajuster le volume pour le marquage d'anticorps primaire, selon les recommandations du fabricant de l'anticorps primaire.
3. Resuspendre le culot cellulaire.

▶ Marquage des cellules : incubation avec l'anticorps primaire

Suivre la notice d'utilisation fournie par le fabricant de l'anticorps primaire.

Retrait de l'excédent de conjugué (1er lavage)

1. Ajouter le tampon : Poids du tampon à ajouter = 600 g – Poids du produit cellulaire.
2. Centrifuger à 300 ×g, sans frein, 15 minutes, à température ambiante (TA : +19 °C à +25 °C [+66 °F à +77 °F]).

Ajustement du volume: volume de marquage 95 g (±5 g) (application à échelle normale) ou 190 g (±5 g) (application à grande échelle)

1. Retirer le surnageant pour ajuster l'échantillon selon l'équation suivante : Poids de surnageant à retirer = Poids du produit cellulaire dilué – Volume de marquage.
   Remarque : Retirer au moins 500 g de surnageant. Si le poids du surnageant retiré est inférieur à 500 g, il est recommandé de réaliser un total de deux étapes de lavage (au lieu d'une seule). Autrement, le retrait de réactif non lié risque d'être insuffisant.
2. Resuspendre le culot cellulaire.

Marquage magnétique des cellules : incubation avec le CliniMACS Anti-Biotin Reagent

1. Ajouter 1 ou 2 flacon(s) de CliniMACS Anti-Biotin Reagent (voir Tableau 6.6 et Tableau 6.8). Mélanger minutieusement.
2. Incuber sur l'agitateur orbital (25 tr/min) pendant 30 minutes à TA.

Retrait de l'excédent de réactif (2ème lavage)

1. Remplir la Cell Preparation Bag de tampon.
2. Centrifuger (300 ×g, sans frein, 15 minutes, TA).
3. Retirer autant de surnageant que possible. **Remarque :** Retirer au moins 500 g de surnageant. Si la quantité de surnageant retiré est inférieur aux valeurs indiquées ci-dessus, il est recommandé de réaliser deux étapes de lavage (au lieu de d'une). Autrement, le retrait de réactif non lié risque d'être insuffisant.
4. Resuspendre le culot cellulaire.
5. Ajuster le volume de chargement de l'échantillon à 100 g (application à échelle normale) ou à 200 g (application à grande échelle).

Remarque : Prélever un échantillon après avoir retiré l'excédent de réactif pour une analyse ultérieure (facultatif).

6.3.2 ÉTAPE 2 : Sélection du programme de séparation

- **Allumer le CliniMACS Plus Instrument**
- **Sélectionner le programme de séparation ENRICHMENT 1.1 ou DEPLETION 2.1**
-

Voir paragraphe 7.2.3 à la page 141 ou 7.2.5 à la page 148.

6.3.3 ÉTAPE 3 : Installation des jeux de tubulures CliniMACS

- **CliniMACS Tubing Set et CliniMACS Tubing Set LS**

Voir paragraphe 7.3.1 à la page 160.

6.3.4 ÉTAPE 4 : Séparation CliniMACS Plus

- **Procédure de séparation**
- **Débrancher les poches et noter le code du processus**
- **Démonter le jeu de tubulures et éteindre**
- **Analyse des cellules**

Voir paragraphe 7.4.2 à la page 200 et 7.4.4 à la page 208.

6.4 Enrichissement de cellules CD56 positives

Le CliniMACS Plus CD56 System, incluant le CliniMACS Plus Instrument, le CliniMACS CD56 Reagent, le CliniMACS Tubing Set et le CliniMACS PBS/EDTA Buffer, est destiné à l'enrichissement *in vitro* de cellules humaines CD56 positives, à partir de populations cellulaires hématologiques hétérogènes.

6.4.1 ÉTAPE 1 : Préparation cellulaire et marquage magnétique

Premières actions requises

Performances de l'application

Jusqu'à 5×10^9 de cellules CD56 positives sur un nombre total maximal de 40×10^9 de cellules (WBC)

⚠ ATTENTION

Risque de performances insuffisantes du processus de séparation des cellules marquées. Si les capacités de l'application sont dépassées, il existe un risque de marquage spécifique insuffisant. Utiliser les quantités requises de cellules et de réactif comme décrit pour l'application respective.

Matériels CliniMACS requis

Matériels	Référence catalogue	Quantité
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS CD56 Reagent	271-01	1 flacon
CliniMACS Tubing Set	161-01	1 jeu de tubulures
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	3 poches de 1000 mL[1]

1 Voir Tableau 6.11 et Tableau 6.12. Avant de l'utiliser, complémenter le CliniMACS PBS/EDTA Buffer avec de l'HSA à une concentration finale de 0,5% (p/v).

Tableau 6.10 : Matériels CliniMACS requis pour l'enrichissement de cellules CD56 positives

Matériels supplémentaires requis

- **Cell Preparation Bag :**
  une poche de transfert de 600 mL, adaptée à la centrifugation, ainsi qu'un coupleur de site de prélèvement et un set de transfert de plasma, à utiliser pendant la procédure de préparation des cellules
- **Plasma Waste Bag et Wash Waste Bag :**
  deux poches de transfert de 600 mL, adaptées à la centrifugation
- **Cell Collection Bag :**
  une poche de transfert de 150 mL ou de 600 mL en combinaison avec un Luer/Spike Interconnector pour raccorder la Cell Collection Bag au jeu de tubulures (voir Tableau 6.12)

- **Si le remplacement de la Negative Fraction Bag et de la Buffer Waste Bag est nécessaire :**
  deux poches de transfert de 1000 mL en combinaison avec deux Luer/Spike Interconnectors pour raccorder les poches au jeu de tubulures (voir Tableau 6.12)
- **S'il faut plus d'un litre de tampon pour effectuer la séparation :**
  un set de transfert de plasma pour raccorder les poches de tampon (voir Tableau 6.12)
- un préfiltre
- pince à clamper
- seringues (différentes tailles) et aiguilles hypodermiques 20G
- sérum-albumine humaine (HSA) à ajouter au CliniMACS PBS/EDTA Buffer à une concentration finale de 0,5% (p/v)
- tubes à échantillon

Aperçu des matériels requis

Préparation cellulaire	
Total de cellules (WBC)	≤40×10^9
Nombre de flacons de réactif	1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 mL
Set de transfert de plasma	1

Tableau 6.11 : Matériels requis pour la préparation des cellules CD56 positives

Séparation		
Cellules marquées	≤2×10^9	>2–5×10^9
Negative Fraction Bag	–	Remplacer les poches d'origine du jeu de tubulures par des poches de transfert de 1000 mL.
Buffer Waste Bag	–	
Priming Waste Bag	–	–
Cell Collection Bag	150 mL	600 mL
Luer/Spike Interconnector	1	3
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 mL	2000 mL
Set de transfert de plasma	–	1

Tableau 6.12 : Matériels requis pour l'enrichissement de cellules CD56 positives

▶ Préparation des poches

Déterminer le poids de la Cell Collection Bag et de la Cell Preparation Bag vides comme décrit dans le paragraphe 7.1.1 à la page 125.

Marquage magnétique des cellules

Se référer au paragraphe 7.1 « ÉTAPE 1 : Préparation cellulaire et marquage magnétique » à la page 125 pour une description détaillée des étapes suivantes.

▶ Analyse du produit cellulaire de départ

▶ Transfert du produit cellulaire de départ dans la Cell Preparation Bag

▶ Dilution Transfert du produit cellulaire de départ dans la Cell Preparation Bag

Ajouter le tampon : Poids du tampon à ajouter = 600 g – Poids du produit cellulaire de départ.

▶ Centrifugation

Centrifuger à 200 ×g, sans frein, 15 minutes, à température ambiante (TA : +19° C à +25 °C [+66 °F à +77 °F]).

▶ Ajustement du volume: volume de marquage 95 g (±5 g)

1. Retirer complètement le surnageant en prenant soin de ne pas resuspendre le culot cellulaire.
2. Après avoir retiré le surnageant, resuspendre doucement le culot cellulaire.
3. Ajuster le poids de la Cell Preparation Bag (CPB) en ajoutant le tampon selon l'équation suivante : Poids cible de la CPB pleine = 95 g + Poids de la CPB vide.
4. Resuspendre les cellules.

▶ Incubation avec le CliniMACS CD56 Reagent

1. Ajouter 1 flacon de CliniMACS CD56 Reagent. Mélanger minutieusement.
2. Incuber sur l'agitateur orbital (25 tr/min) pendant 30 minutes à TA.

▶ Retrait de l'excédent de réactif

1. Remplir la Cell Preparation Bag de tampon.
2. Centrifuger (300 ×g, sans frein, 15 minutes, TA).
3. Retirer autant de surnageant que possible. **Remarque :** Retirer au moins 500 g de surnageant. Si le poids du surnageant retiré est inférieur à 500 g, il est recommandé de réaliser un total de deux étapes de lavage (au lieu d'une seule). Autrement, le retrait de réactif non lié risque d'être insuffisant.
4. Après avoir retiré le surnageant, resuspendre doucement le culot cellulaire.
5. Ajuster le volume de chargement de l'échantillon à 150 g.

Remarque : Prélever un échantillon après avoir retiré l'excédent de réactif pour une analyse ultérieure (facultatif).

6.4.2 ÉTAPE 2 : Sélection du programme de séparation

- **Allumer le CliniMACS Plus Instrument**
- **Sélectionner le programme de séparation ENRICHMENT 1.1**
-

Voir paragraphe 7.2.3 à la page 141.

6.4.3 ÉTAPE 3 : Installation des jeux de tubulures CliniMACS

- **CliniMACS Tubing Set et CliniMACS Tubing Set LS**

Voir paragraphe 7.3.1 à la page 160.

6.4.4 ÉTAPE 4 : Séparation CliniMACS Plus

- **Procédure de séparation**
- **Débrancher les poches et noter le code du processus**
- **Démonter le jeu de tubulures et éteindre**
- **Analyse des cellules**

Voir paragraphe 7.4.2 à la page 200.

6.5 Déplétion de cellules CD3 positives

Le CliniMACS Plus CD3 System, incluant le CliniMACS Plus Instrument, le CliniMACS CD3 Reagent, le CliniMACS Tubing Set LS ou le CliniMACS Depletion Tubing Set et le CliniMACS PBS/EDTA Buffer, est destiné à la déplétion *in vitro* de cellules humaines CD3 positives, à partir de populations cellulaires hématologiques hétérogènes.

6.5.1 ÉTAPE 1 : Préparation cellulaire et marquage magnétique

Premières actions requises

Performances de l'application

- Application à échelle normale : jusqu'à 15×10^9 de cellules CD3 positives sur un nombre total maximal de 40×10^9 de cellules (WBC) en utilisant le CliniMACS Tubing Set LS ou le CliniMACS Depletion Tubing Set
- Application à grande échelle : entre 15×10^9 et 20×10^9 de cellules CD3 positives sur un total de cellules (WBC) entre 40×10^9 et 80×10^9 en utilisant le CliniMACS Tubing Set LS ou entre 15×10^9 et 30×10^9 de cellules CD3 positives sur un total de cellules (WBC) entre 40×10^9 et 80×10^9 en utilisant le CliniMACS Depletion Tubing Set

⚠ ATTENTION

Risque de performances insuffisantes du processus de séparation des cellules marquées. Si les capacités de l'application sont dépassées, il existe un risque de marquage spécifique insuffisant. Utiliser les quantités requises de cellules et de réactif comme décrit pour l'application respective.

Matériels CliniMACS requis

Matériels	Référence catalogue	Quantité	Programme de séparation
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1	
CliniMACS CD3 Reagent	273-01	• 1 flacon (échelle normale) • 2 flacons (grande échelle)	
CliniMACS Tubing Set LS	162-01	1 jeu de tubulures	DEPLETION 2.1
CliniMACS Depletion Tubing Set	261-01	1 jeu de tubulures	DEPLETION 3.1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	Jusqu'à 5 poches de 1000 mL[1]	

1 Voir Tableau 6.14 à Tableau 6.16. Avant de l'utiliser, complémenter le CliniMACS PBS/EDTA Buffer avec de l'HSA à une concentration finale de 0,5% (p/v).

2 **Remarque :** Pour un grand nombre de cellules marquées, il est recommandé d'utiliser un CliniMACS Depletion Tubing Set, afin de gagner du temps (par exemple, 20×10^9 de cellules marquées seront traitées en cinq heures avec le CliniMACS Tubing Set LS contre deux heures avec un CliniMACS Depletion Tubing Set).

Tableau 6.13 : Matériels CliniMACS requis pour la déplétion de cellules CD3 positives

Matériels supplémentaires requis

- **Cell Preparation Bag :**
  une poche de transfert de 600 mL, adaptée à la centrifugation, ainsi qu'un coupleur de site de prélèvement et deux sets de transfert de plasma, à utiliser pendant la procédure de préparation des cellules
- **Plasma Waste Bag et Wash Waste Bag :**
  deux poches de transfert de 600 mL, adaptées à la centrifugation
- **Cell Collection Bag :**
  une à deux poches de transfert de 600 mL en combinaison avec un Luer/Spike Interconnector pour raccorder la Cell Collection Bag au jeu de tubulures

  Si deux Cell Collection Bags sont nécessaires pour la séparation, utiliser un set de transfert de plasma pour raccorder les deux poches. Une poche de transfert de 600 mL est déjà pré-assemblée au CliniMACS Depletion Tubing Set (voir Tableau 6.15 et Tableau 6.16).
- **Si le remplacement de la Negative Fraction Bag, de la Buffer Waste Bag et/ou de la Priming Waste Bag est nécessaire :**
  deux à trois poches de transfert de 1000 mL en combinaison avec deux Luer/Spike Interconnectors pour raccorder les poches au jeu de tubulures (voir Tableau 6.15 et Tableau 6.16)

  Remplacer la Priming Waste Bag à l'aide du raccord de tubulure stérile.
- **S'il faut plus d'un litre de tampon pour effectuer la séparation :**
  un à deux sets de transfert de plasma pour raccorder les poches de tampon (voir Tableau 6.15 et Tableau 6.16)
- un préfiltre
- pince à clamper
- seringues (différentes tailles) et aiguilles hypodermiques 20G
- sérum-albumine humaine (HSA) à ajouter au CliniMACS PBS/EDTA Buffer à une concentration finale de 0,5% (p/v)
- immunoglobuline G de qualité pharmaceutique
- tubes à échantillon

IMPORTANT

Après la saisie des paramètres de l'échantillon (ÉTAPE 2), le logiciel CliniMACS Plus calcule les volumes qui seront collectés dans la Reapplication Bag, la Cell Collection Bag, la Non-Target Cell Bag et la Buffer Waste Bag. Si le volume du liquide calculé dépasse le volume standard de 500 mL, il est nécessaire de remplacer les poches.

Aperçu des matériels requis

Préparation cellulaire		
Total de cellules (WBC)	≤40×10^9	>40–80×10^9
Cellules marquées	≤15×10^9	>15–30×10^9
Nombre de flacons de réactif	1	2
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	2000 mL	2000 mL
Set de transfert de plasma	2	2
Volume de chargement de l'échantillon	150 mL	250–300 mL

Tableau 6.14 : Matériels requis pour la préparation des cellules CD3 positives

Séparation (DEPLETION 2.1)			
Cellules marquées	≤5×10^9	>5–13×10^9	>13–20×10^9
Negative Fraction Bag	–	Remplacer les poches d'origine du jeu de tubulures par des poches de transfert de 1000 mL.	Remplacer les poches d'origine du jeu de tubulures par des poches de transfert de 1000 mL.
Buffer Waste Bag	–		
Priming Waste Bag	–	–	
Cell Collection Bag	600 mL	1–2×600 mL	2×600 mL
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 mL	2000 mL	3000 mL
Luer/Spike Interconnector	1	3	3
Set de transfert de plasma	–	1–2	3

Tableau 6.15 : Matériels requis pour la déplétion de cellules CD3 positives (DEPLETION 2.1)

Séparation (DEPLETION 3.1)		
Cellules marquées	≤29×10^9	>29–30×10^9
Non-Target Cell Bag	Le remplacement de la poche n'est pas nécessaire	
Buffer Waste Bag		
Reapplication Bag		
Cell Collection Bag	–	1×600 mL (en supplément)
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 mL	
Set de transfert de plasma	–	1

Tableau 6.16 : Matériels requis pour la déplétion de cellules CD3 positives (DEPLETION 3.1)

Remarque : Les matériels requis pour la séparation peuvent également être déterminés en allumant le CliniMACS Plus Instrument, en sélectionnant le programme de séparation à utiliser (DEPLETION 2.1 pour le CliniMACS Tubing Set LS et DEPLETION 3.1 pour le CliniMACS Depletion Tubing Set) et en saisissant les paramètres de l'échantillon. Le logiciel CliniMACS Plus calcule la taille appropriée des poches à raccorder au jeu de tubulures et le volume de tampon requis.

▶ Préparation des poches

Déterminer le poids de la Cell Collection Bag et de la Cell Preparation Bag vides comme décrit au paragraphe 7.1.1 à la page 125.

Marquage magnétique des cellules

Se référer au paragraphe 7.1 « ÉTAPE 1 : Préparation cellulaire et marquage magnétique » à la page 125 pour une description détaillée des étapes suivantes.

▶ Analyse du produit cellulaire de départ

Déterminer le nombre de toutes les cellules marquées au CD3 (y compris les liaisons non spécifiques au CD3 et non uniquement les cellules réellement lymphocytes T). Prendre en compte ce nombre pour les spécifications de l'application et la saisie des paramètres de l'échantillon (voir ÉTAPE 2).

▶ Transfert du produit cellulaire de départ dans la Cell Preparation Bag

▶ Dilution du produit cellulaire de départ

Ajouter le tampon : Poids du tampon à ajouter = 600 g – Poids du produit cellulaire de départ.

▶ Centrifugation

Centrifuger à 200 ×g, sans frein, 15 minutes, à température ambiante (TA : +19° C à +25 °C [+66 °F à +77 °F]).

▶ Ajustement du volume: volume de marquage 95 g (±5 g) (application à échelle normale) ou 190 g (±5 g) (application à grande échelle)

1. Retirer complètement le surnageant en prenant soin de ne pas resuspendre le culot cellulaire.
2. Après avoir retiré le surnageant, resuspendre doucement le culot cellulaire.
3. Ajuster le poids de la Cell Preparation Bag (CPB) en ajoutant le tampon selon l'équation suivante (tenir compte du poids de l'IgG) : Poids cible de la CPB pleine = Volume de marquage – Poids de l'IgG + Poids de la CPB vide.
4. Resuspendre le culot cellulaire.

▶ Incubation avec de l'immunoglobuline de qualité pharmaceutique

1. Ajouter IgG (1,5 mg/mL).
2. Incuber sur l'agitateur orbital (25 tr/min) pendant 5 minutes à TA.

▶ **Incubation avec le CliniMACS CD3 Reagent**

1. Ajouter 1 ou 2 flacon(s) de CliniMACS CD3 Reagent (voir Tableau 6.14). Mélanger minutieusement.
2. Incuber sur l'agitateur orbital (25 tr/min) pendant 30 minutes à TA.

▶ **Retrait de l'excédent de réactif**

1. Remplir la Cell Preparation Bag de tampon.
2. Centrifuger (300 ×g, sans frein, 15 minutes, TA).
3. Retirer autant de surnageant que possible. **Remarque :** Retirer au moins 500 g de surnageant. Si le poids du surnageant retiré est inférieur à 500 g, il est recommandé de réaliser un total de deux étapes de lavage (au lieu d'une seule). Autrement, le retrait de réactif non lié risque d'être insuffisant.
4. Resuspendre le culot cellulaire.
5. Ajuster le volume de chargement de l'échantillon à 150 g (application à échelle normale) ou à 250–300 g (application à grande échelle).

6.5.2 ÉTAPE 2 : Sélection du programme de séparation

▶ **Allumer le CliniMACS Plus Instrument**

▶ **Sélectionner le programme de séparation DEPLETION 2.1 ou DEPLETION 3.1**
(en utilisant respectivement le CliniMACS Tubing Set LS ou le CliniMACS Depletion Tubing Set)

▶ **Saisir les paramètres de l'échantillon**
(selon l'analyse du produit cellulaire de départ (voir ÉTAPE 1))

Voir paragraphe 7.2.5 à la page 148 ou 7.2.6 à la page 153.

6.5.3 ÉTAPE 3 : Installation des jeux de tubulures CliniMACS

▶ **CliniMACS Tubing Set et CliniMACS Tubing Set LS**

▶ **CliniMACS Depletion Tubing Set**

Voir paragraphe 7.3.1 à la page 160 ou 7.3.3 à la page 180.

6.5.4 ÉTAPE 4 : Séparation CliniMACS Plus

- **Procédure de séparation**
- **Débrancher les poches et noter le code du processus**
- **Démonter le jeu de tubulures et éteindre**
- **Analyse des cellules**

Voir paragraphe 7.4.4 à la page 208 et 7.4.5 à la page 212.

6.6 Déplétion de cellules CD19 positives

Le CliniMACS Plus CD19 System, incluant le CliniMACS Plus Instrument, le CliniMACS CD19 Reagent, le CliniMACS Tubing Set LS et le CliniMACS PBS/EDTA Buffer, est destiné à la déplétion *in vitro* de cellules humaines CD19 positives, à partir de populations cellulaires hématologiques hétérogènes.

6.6.1 ÉTAPE 1 : Préparation cellulaire et marquage magnétique

Premières actions requises

Performances de l'application

Jusqu'à 5×10^9 de cellules CD19 positives sur un nombre total maximal de 40×10^9 de cellules (WBC)

⚠ ATTENTION

Risque de performances insuffisantes du processus de séparation des cellules marquées. Si les capacités de l'application sont dépassées, il existe un risque de marquage spécifique insuffisant. Utiliser les quantités requises de cellules et de réactif comme décrit pour l'application respective.

Matériels CliniMACS requis

Matériels	Référence catalogue	Quantité
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS CD19 Reagent	179-01	1 flacon
CliniMACS Tubing Set LS	162-01	1 jeu de tubulures
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	2 poches de 1000 mL[1]

1 Avant de l'utiliser, complémenter le CliniMACS PBS/EDTA Buffer avec de l'HSA à une concentration finale de 0,5% (p/v).

Tableau 6.17 : Matériels CliniMACS requis pour la déplétion de cellules CD19 positives

Matériels supplémentaires requis

- **Cell Preparation Bag :**
  une poche de transfert de 600 mL, adaptée à la centrifugation, ainsi qu'un coupleur de site de prélèvement et un set de transfert de plasma, à utiliser pendant la procédure de préparation des cellules
- **Plasma Waste Bag et Wash Waste Bag :**
  deux poches de transfert de 600 mL, adaptées à la centrifugation
- **Cell Collection Bag :**
  une poche de transfert de 600 mL en combinaison avec un Luer/Spike Interconnector pour raccorder la Cell Collection Bag au jeu de tubulures

- un préfiltre
- pince à clamper
- seringues (différentes tailles) et aiguilles hypodermiques 20G
- sérum-albumine humaine (HSA) à ajouter au CliniMACS PBS/EDTA Buffer à une concentration finale de 0,5% (p/v)
- tubes à échantillon

▶ Préparation des poches

Déterminer le poids de la Cell Collection Bag et de la Cell Preparation Bag vides comme décrit dans le paragraphe 7.1.1 à la page 125.

Marquage magnétique des cellules

Se référer au paragraphe 7.1 « ÉTAPE 1 : Préparation cellulaire et marquage magnétique » à la page 125 pour une description détaillée des étapes suivantes.

▶ Analyse du produit cellulaire de départ

▶ Transfert du produit cellulaire de départ dans la Cell Preparation Bag

▶ Dilution du produit cellulaire de départ

Ajouter le tampon : Poids du tampon à ajouter = 600 g – Poids du produit cellulaire de départ.

▶ Centrifugation

Centrifuger à 200 ×g, sans frein, 15 minutes, à température ambiante (TA : +19° C à +25 °C [+66 °F à +77 °F]).

▶ Ajustement du volume : volume de marquage 95 g (±5 g)

1. Retirer complètement le surnageant en prenant soin de ne pas resuspendre le culot cellulaire.
2. Après avoir retiré le surnageant, resuspendre doucement le culot cellulaire.
3. Ajuster le poids de la Cell Preparation Bag (CPB) en ajoutant le tampon selon l'équation suivante : Poids cible de la CPB pleine = 95 g + Poids de la CPB vide.
4. Resuspendre le culot cellulaire.

▶ Incubation avec le CliniMACS CD19 Reagent

1. Ajouter 1 flacon de CliniMACS CD19 Reagent. Mélanger minutieusement.
2. Incuber sur l'agitateur orbital (25 tr/min) pendant 30 minutes à TA.

▶ **Retrait de l'excédent de réactif**

1. Remplir la Cell Preparation Bag de tampon.
2. Centrifuger (300 ×g, sans frein, 15 minutes, TA).
3. Retirer autant de surnageant que possible. **Remarque :** Retirer au moins 500 g de surnageant. Si le poids du surnageant retiré est inférieur à 500 g, il est recommandé de réaliser un total de deux étapes de lavage (au lieu d'une seule). Autrement, le retrait de réactif non lié risque d'être insuffisant.
4. Resuspendre le culot cellulaire.
5. Ajuster le volume de chargement de l'échantillon à 100 g.

6.6.2 ÉTAPE 2 : Sélection du programme de séparation

▶ **Allumer le CliniMACS Plus Instrument**

▶ **Sélectionner le programme de séparation DEPLETION 2.1**

▶ **Saisir les paramètres de l'échantillon**

Voir paragraphe 7.2.5 à la page 148.

6.6.3 ÉTAPE 3 : Installation des jeux de tubulures CliniMACS

▶ **CliniMACS Tubing Set et CliniMACS Tubing Set LS**

Voir paragraphe 7.3.1 à la page 160.

6.6.4 ÉTAPE 4 : Séparation CliniMACS Plus

▶ **Procédure de séparation**

▶ **Débrancher les poches et noter le code du processus**

▶ **Démonter le jeu de tubulures et éteindre**

▶ **Analyse des cellules**

Voir paragraphe 7.4.4 à la page 208.

6.7 Déplétion de cellules CD3 positives et de cellules CD19 positives

Le CliniMACS Plus CD3/CD19 System, incluant le CliniMACS Plus Instrument, le CliniMACS CD3 Reagent, le CliniMACS CD19 Reagent, le CliniMACS Depletion Tubing Set et le CliniMACS PBS/EDTA Buffer, est destiné à la déplétion simultanée *in vitro* de cellules humaines CD3 positives et de cellules humaines CD19 positives, à partir de populations cellulaires hématologiques hétérogènes.

6.7.1 ÉTAPE 1 : Préparation cellulaire et marquage magnétique

Premières actions requises

Performances de l'application

Jusqu'à 15×10^9 de cellules CD3 positives et jusqu'à 5×10^9 de cellules CD19 positives sur un nombre total maximal de 40×10^9 de cellules (WBC)

⚠ ATTENTION

Risque de performances insuffisantes du processus de séparation des cellules marquées. Si les capacités de l'application sont dépassées, il existe un risque de marquage spécifique insuffisant. Utiliser les quantités requises de cellules et de réactif comme décrit pour l'application respective.

Matériels CliniMACS requis

Matériels	Référence catalogue	Quantité
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS CD3 Reagent	273-01	1 flacon
CliniMACS CD19 Reagent	179-01	1 flacon
CliniMACS Depletion Tubing Set	261-01	1 jeu de tubulures
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	4 poches de 1000 mL[1]

1 Avant de l'utiliser, complémenter le CliniMACS PBS/EDTA Buffer avec de l'HSA à une concentration finale de 0,5% (p/v).

Tableau 6.18 : Matériels CliniMACS requis pour la déplétion de cellules CD3 positives et de cellules CD19 positives

Matériels supplémentaires requis

- **Cell Preparation Bag :**
  une poche de transfert de 600 mL, adaptée à la centrifugation, ainsi qu'un coupleur de site de prélèvement et deux sets de transfert de plasma, à utiliser pendant la procédure de préparation des cellules
- **Plasma Waste Bag et Wash Waste Bag :**
  deux poches de transfert de 600 mL, adaptées à la centrifugation
- **Cell Collection Bag :**
  une à deux poches de transfert de 600 mL en combinaison avec un Luer/Spike Interconnector pour raccorder la Cell Collection Bag au jeu de tubulures
- un préfiltre
- pince à clamper
- seringues (différentes tailles) et aiguilles hypodermiques 20G
- sérum-albumine humaine (HSA) à ajouter au CliniMACS PBS/EDTA Buffer à une concentration finale de 0,5% (p/v)
- immunoglobuline G de qualité pharmaceutique
- tubes à échantillon

IMPORTANT
Après la saisie des paramètres de l'échantillon (ÉTAPE 2), le logiciel CliniMACS Plus calcule les volumes qui seront collectés dans la Reapplication Bag, la Cell Collection Bag, la Non-Target Cell Bag et la Buffer Waste Bag. Si le volume du liquide calculé dépasse le volume standard de 500 mL, il est nécessaire de remplacer les poches.

▶ Préparation des poches

Déterminer le poids de la Cell Collection Bag et de la Cell Preparation Bag vides comme décrit dans le paragraphe 7.1.1 à la page 125.

Marquage magnétique des cellules

Se référer au paragraphe 7.1 « ÉTAPE 1 : Préparation cellulaire et marquage magnétique » à la page 125 pour une description détaillée des étapes suivantes.

▶ Analyse du produit cellulaire de départ

Déterminer le nombre de toutes les cellules marquées aux CD3 et CD19 (y compris les liaisons non spécifiques aux CD3 et CD19, et non uniquement les cellules réellement lymphocytes T et B). Prendre en compte ce nombre pour les spécifications de l'application et la saisie des paramètres de l'échantillon (voir ÉTAPE 2).

Transfert du produit cellulaire de départ dans la Cell Preparation Bag

Dilution du produit cellulaire de départ

Ajouter le tampon : Poids du tampon à ajouter = 600 g – Poids du produit cellulaire de départ.

Centrifugation

Centrifuger à 200 ×g, sans frein, 15 minutes, à température ambiante (TA : +19° C à +25 °C [+66 °F à +77 °F]).

Ajustement du volume: volume de marquage 87.5 g (±5 g)

1. Retirer complètement le surnageant en prenant soin de ne pas resuspendre le culot cellulaire.
2. Après avoir retiré le surnageant, resuspendre doucement le culot cellulaire.
3. Ajuster le poids de la Cell Preparation Bag (CPB) en ajoutant le tampon selon l'équation suivante (tenir compte du poids de l'IgG) : Poids cible de la CPB pleine = 87,5 g – Poids de l'IgG + Poids de la CPB vide.
4. Resuspendre le culot cellulaire.

Incubation avec de l'immunoglobuline de qualité pharmaceutique

1. Ajouter de l'IgG (1,5 mg/mL).
2. Incuber sur l'agitateur orbital (25 tr/min) pendant 5 minutes à TA.

Incubation avec le CliniMACS CD3 Reagent et le CliniMACS CD19 Reagent

1. Ajouter 1 flacon de CliniMACS CD3 Reagent et 1 flacon de CliniMACS CD19 Reagent. Mélanger minutieusement.
2. Incuber sur l'agitateur orbital (25 tr/min) pendant 30 minutes à TA.

Retrait de l'excédent de réactif

1. Remplir la Cell Preparation Bag de tampon.
2. Centrifuger (300 ×g, sans frein, 15 minutes, TA).
3. Retirer autant de surnageant que possible. **Remarque :** Retirer au moins 500 g de surnageant. Si le poids du surnageant retiré est inférieur à 500 g, il est recommandé de réaliser un total de deux étapes de lavage (au lieu d'une seule). Autrement, le retrait de réactif non lié risque d'être insuffisant.
4. Resuspendre le culot cellulaire.
5. Ajuster le volume de chargement de l'échantillon à 150 g.

6.7.2 ÉTAPE 2 : Sélection du programme de séparation

- **Allumer le CliniMACS Plus Instrument**
- **Sélectionner le programme de séparation DEPLETION 3.1**
- **Saisir les paramètres de l'échantillon**
  (selon l'analyse du produit cellulaire de départ (voir ÉTAPE 1))

Voir paragraphe 7.2.6 à la page 153.

6.7.3 ÉTAPE 3 : Installation des jeux de tubulures CliniMACS

- **CliniMACS Depletion Tubing Set**

Voir paragraphe 7.3.3 à la page 180.

6.7.4 ÉTAPE 4 : Séparation CliniMACS Plus

- **Procédure de séparation**
- **Débrancher les poches et noter le code du processus**
- **Démonter le jeu de tubulures et éteindre**
- **Analyse des cellules**

Voir paragraphe 7.4.5 à la page 212.

6.8 Enrichissement/déplétion de cellules CD8 positives

Le CliniMACS Plus CD8 System, incluant le CliniMACS Plus Instrument, le CliniMACS CD8 Reagent, le CliniMACS Tubing Set ou le CliniMACS Tubing Set LS et le CliniMACS PBS/EDTA Buffer, est destiné à l'enrichissement ou la déplétion *in vitro* de cellules humaines CD8 positives, à partir de populations cellulaires hématologiques hétérogènes.

6.8.1 ÉTAPE 1 : Préparation cellulaire et marquage magnétique

Premières actions requises

Performances de l'application

- **Enrichissement :** jusqu'à 4×10^9 de cellules marquées sur un nombre total maximal de 40×10^9 de cellules (WBC) en utilisant le CliniMACS Tubing Set
- **Déplétion :** jusqu'à 4×10^9 de cellules marquées sur un nombre total maximal de 40×10^9 de cellules (WBC) en utilisant le CliniMACS Tubing Set LS

⚠ ATTENTION

Risque de performances insuffisantes du processus de séparation des cellules marquées. Si les capacités de l'application sont dépassées, il existe un risque de marquage spécifique insuffisant. Utiliser les quantités requises de cellules et de réactif comme décrit pour l'application respective.

Matériels CliniMACS requis

Matériels	Référence catalogue	Quantité	Programme de séparation
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1	–
CliniMACS CD8 Reagent	275-01	1 flacon	–
CliniMACS Tubing Set	161-01	1 jeu de tubulures	ENRICHMENT 1.1
CliniMACS Tubing Set LS	162-01	1 jeu de tubulures	DEPLETION 2.1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	Jusqu'à 3 poches de 1000 mL[1]	–

1 Voir Tableau 6.20 à Tableau 6.22. Avant de l'utiliser, complémenter le CliniMACS PBS/EDTA Buffer avec de l'HSA à une concentration finale de 0,5% (p/v).

Tableau 6.19 : Matériels CliniMACS requis pour l'enrichissement/la déplétion de cellules CD8 positives

Matériels supplémentaires requis

- **Cell Preparation Bag :**
  une poche de transfert de 600 mL, adaptée à la centrifugation, ainsi qu'un coupleur de site de prélèvement et un set de transfert de plasma, à utiliser pendant la procédure de préparation des cellules
- **Plasma Waste Bag et Wash Waste Bag :**
  deux poches de transfert de 600 mL, adaptées à la centrifugation
- **Cell Collection Bag :**
  une poche de transfert de 600 mL en combinaison avec un Luer/Spike Interconnector pour raccorder les poches au jeu de tubulures (voir Tableau 6.21 et Tableau 6.22)
- **Si le remplacement de la Negative Fraction Bag et de la Buffer Waste Bag est nécessaire :**
  deux poches de transfert de 1000 mL en combinaison avec deux Luer/Spike Interconnectors pour raccorder les poches au jeu de tubulures (voir Tableau 6.21 et Tableau 6.22)
- **S'il faut plus d'un litre de tampon pour effectuer la séparation :**
  un set de transfert de plasma pour raccorder les poches de tampon (voir Tableau 6.21 et Tableau 6.22)
- un préfiltre
- pince à clamper
- seringues (différentes tailles) et aiguilles hypodermiques 20G
- sérum-albumine humaine (HSA) à ajouter au CliniMACS PBS/EDTA Buffer à une concentration finale de 0,5% (p/v)
- tubes à échantillon

IMPORTANT

Après la saisie des paramètres de l'échantillon (ÉTAPE 2), le logiciel CliniMACS Plus calcule les volumes qui seront collectés dans la Priming Waste Bag, la Cell Collection Bag, la Negative Fraction Bag et la Buffer Waste Bag. Si le volume du liquide calculé dépasse le volume standard de 500 mL, il faut remplacer les poches selon l'aperçu des matériels requis suivant.

Aperçu des matériels requis

Préparation cellulaire	
Total de cellules	≤40×10^9
Cellules marquées	≤4×10^9
Nombre de flacons de réactif	1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 mL
Set de transfert de plasma	1
Volume de chargement de l'échantillon	100 mL

Tableau 6.20 : Matériels requis pour la préparation des cellules CD8 positives

Séparation (ENRICHMENT 1.1)		
Cellules marquées	<2×10^9	2–4×10^9
Negative Fraction Bag	–	Remplacer les poches d'origine du jeu de tubulures par des poches de transfert de 1000 mL.
Buffer Waste Bag	–	
Priming Waste Bag	–	–
Cell Collection Bag	600 mL	600 mL
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 mL	2000 mL
Luer/Spike Interconnector	1	3
Set de transfert de plasma	–	1

Tableau 6.21 : Matériels requis pour l'enrichissement de cellules CD8 positives

Séparation (DEPLETION 2.1)	
Cellules marquées	≤4×10^9
Negative Fraction Bag	Le remplacement de la poche n'est pas nécessaire.
Buffer Waste Bag	
Priming Waste Bag	
Cell Collection Bag	600 mL
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 mL
Luer/Spike Interconnector	1

Tableau 6.22 : Matériels requis pour la déplétion de cellules CD8 positives

▶ Préparation des poches

Déterminer le poids de la Cell Collection Bag et de la Cell Preparation Bag vides comme décrit dans le paragraphe 7.1.1 à la page 125.

Marquage magnétique des cellules

Se référer au paragraphe 7.1 « ÉTAPE 1 : Préparation cellulaire et marquage magnétique » à la page 125 pour une description détaillée des étapes suivantes.

▶ Analyse du produit cellulaire de départ

▶ Transfert du produit cellulaire de départ dans la Cell Preparation Bag

▶ Dilution du produit cellulaire de départ

Ajouter le tampon : Poids du tampon à ajouter = Poids du produit cellulaire de départ × 2.

▶ Centrifugation

Centrifuger à 300 ×g, sans frein, 15 minutes, à température ambiante (TA : +19° C à +25 °C [+66 °F à +77 °F]).

▶ Ajustement du volume: volume de marquage 95 g (±5 g)

1. Retirer complètement le surnageant en prenant soin de ne pas resuspendre le culot cellulaire.
2. Après avoir retiré le surnageant, resuspendre doucement le culot cellulaire.
3. Ajuster le poids de la Cell Preparation Bag (CPB) en ajoutant le tampon. Calculer le poids cible de la CPB pleine de produit cellulaire dilué en utilisant l'équation suivante : Poids cible de la CPB pleine = 95 g – poids de la CPB vide.
4. Resuspendre le culot cellulaire.

▶ Incubation avec le CliniMACS CD8 Reagent

1. Ajouter 1 flacon de CliniMACS CD8 Reagent. Mélanger minutieusement.
2. Incuber sur l'agitateur orbital (25 tr/min) pendant 30 minutes à TA.

▶ Retrait de l'excédent de réactif

1. Remplir la Cell Preparation Bag de tampon.
2. Centrifuger (300 ×g, sans frein, 15 minutes, TA).
3. Retirer autant de surnageant que possible. **Remarque :** Retirer au moins 500 g de surnageant. Si le poids du surnageant retiré est inférieur à 500 g, il est recommandé de réaliser un total de deux étapes de lavage (au lieu d'une seule). Autrement, le retrait de réactif non lié risque d'être insuffisant.
4. Resuspendre le culot cellulaire.
5. Ajuster le volume de chargement de l'échantillon à 100 g.

6.8.2 ÉTAPE 2 : Sélection du programme de séparation

- **Allumer le CliniMACS Plus Instrument**
- **Sélectionner le programme de séparation ENRICHMENT 1.1 ou DEPLETION 2.1**
-

Voir paragraphe 7.2.3 à la page 141 ou 7.2.5 à la page 148.

6.8.3 ÉTAPE 3 : Installation des jeux de tubulures CliniMACS

- **CliniMACS Tubing Set et CliniMACS Tubing Set LS**

Voir paragraphe 7.3.1 à la page 160.

6.8.4 ÉTAPE 4 : Séparation CliniMACS Plus

- **Procédure de séparation**
- **Débrancher les poches et noter le code du processus**
- **Démonter le jeu de tubulures et éteindre**
- **Analyse des cellules**

Voir paragraphe 7.4.2 à la page 200 ou 7.4.4 à la page 208.

6.9 Enrichissement/déplétion de cellules CD25 positives

Le CliniMACS Plus CD25 System, incluant le CliniMACS Plus Instrument, le CliniMACS CD25 Reagent, le CliniMACS Tubing Set ou le CliniMACS Tubing Set LS et le CliniMACS PBS/EDTA Buffer, est destiné à l'enrichissement ou la déplétion *in vitro* de cellules humaines CD25 positives – de préférence de cellules à forte expression de CD 25 – à partir de populations cellulaires hématologiques hétérogènes.

6.9.1 ÉTAPE 1 : Préparation cellulaire et marquage magnétique

Premières actions requises

Performances de l'application

- **Enrichissement :** Cellules à expression normale à forte de CD25 : jusqu'à 0.6×10^9 de cellules marquées sur un nombre total maximal de $40{\times}10^9$ de cellules (WBC) en utilisant le CliniMACS Tubing Set
- **Déplétion :**
  Application à échelle normale : jusqu'à $6{\times}10^9$ de cellules CD25 positives sur un nombre total maximal de $40{\times}10^9$ de cellules (WBC) en utilisant le CliniMACS Tubing Set LS
  Application à grande échelle : entre $6{\times}10^9$ et $12{\times}10^9$ de cellules CD25 positives sur un total de cellules (WBC) entre $40{\times}10^9$ et $80{\times}10^9$ en utilisant le CliniMACS Tubing Set LS

⚠ ATTENTION

Risque de performances insuffisantes du processus de séparation des cellules marquées. Si les capacités de l'application sont dépassées, il existe un risque de marquage spécifique insuffisant. Utiliser les quantités requises de cellules et de réactif comme décrit pour l'application respective.

Matériels CliniMACS requis

Matériels	Référence catalogue	Quantité	Programme de séparation
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1	–
CliniMACS CD25 Reagent	274-01	• 1 flacon (échelle normale) • 2 flacons (grande échelle)	–
CliniMACS Tubing Set	161-01	1 jeu de tubulures	ENRICHMENT 3.2
CliniMACS Tubing Set LS	162-01	1 jeu de tubulures	DEPLETION 2.1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	Jusqu'à 4 poches de 1000 mL[1]	–

1 Voir Tableau 6.24 à Tableau 6.27. Avant de l'utiliser, complémenter le CliniMACS PBS/EDTA Buffer avec de l'HSA à une concentration finale de 0,5% (p/v).

Tableau 6.23 : Matériels CliniMACS requis pour l'enrichissement/la déplétion de cellules CD25 positives

Matériels supplémentaires requis

- **Cell Preparation Bag :**
  une poche de transfert de 600 mL, adaptée à la centrifugation, ainsi qu'un coupleur de site de prélèvement et un à deux sets de transfert de plasma, à utiliser pendant la procédure de préparation des cellules
- **Plasma Waste Bag et Wash Waste Bag :**
  deux poches de transfert de 600 mL (ou deux de 1000 mL), adaptées à la centrifugation
- **Cell Collection Bag :**
  une poche de transfert de 150 mL ou une à deux poches de 600 mL en combinaison avec un Luer/Spike Interconnector pour raccorder la Cell Collection Bag au jeu de tubulures

  Si deux Cell Collection Bags sont nécessaires pour la séparation, utiliser un set de transfert de plasma pour raccorder les deux poches (voir Tableau 6.25 et Tableau 6.27).
- **Si le remplacement de la Negative Fraction Bag et de la Buffer Waste Bag est nécessaire :**
  deux poches de transfert de 1000 mL en combinaison avec deux Luer/Spike Interconnectors pour raccorder les poches au jeu de tubulures (voir Tableau 6.25 et Tableau 6.27)
- **S'il faut plus d'un litre de tampon pour effectuer la séparation :**
  un set de transfert de plasma pour raccorder les poches de tampon (voir Tableau 6.25 et Tableau 6.27)
- un préfiltre
- pince à clamper
- seringues (différentes tailles) et aiguilles hypodermiques 20G
- sérum-albumine humaine (HSA) à ajouter au CliniMACS PBS/EDTA Buffer à une concentration finale de 0,5% (p/v)
- tubes à échantillon

IMPORTANT

Après la saisie des paramètres de l'échantillon (ÉTAPE 2), le logiciel CliniMACS Plus calcule les volumes qui seront collectés dans la Priming Waste Bag, la Cell Collection Bag, la Negative Fraction Bag et la Buffer Waste Bag. Si le volume du liquide calculé dépasse le volume standard de 500 mL, il faut remplacer les poches selon l'aperçu des matériels requis suivant.

Aperçu des matériels requis

Préparation cellulaire (ENRICHMENT 3.2)		
Application	**Enrichissement de cellules CD25 positives**	**Enrichissement de cellules à forte expression de CD25**
Total de cellules (WBC)	≤40×10^9	≤40×10^9
Cellules marquées	≤0,6×10^9	≤0,6×10^9
Nombre de flacons de réactif	1	1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000–2000 mL	2000 mL
Set de transfert de plasma	1–2	2
Volume de marquage	190 mL	380 mL
Température de marquage	Température ambiante	+4 °C à +8 °C (+39 °F à +46 °F)

Tableau 6.24 : Matériels requis pour la préparation des cellules à expression normale à forte de CD25 (ENRICHMENT 3.2)

Séparation (ENRICHMENT 3.2)		
Application	**Enrichissement de cellules CD25 positives**	**Enrichissement de cellules à forte expression de CD25**
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 mL	1000 mL
Negative Fraction Bag	Le remplacement de la poche n'est pas nécessaire	
Buffer Waste Bag		
Priming Waste Bag		
Cell Collection Bag	150 mL	150 mL
Luer/Spike Interconnector	1	1

Tableau 6.25 : Matériels requis pour l'enrichissement des cellules à expression normale à forte de CD25 (ENRICHMENT 3.2)

Préparation cellulaire (DEPLETION 2.1)		
Total de cellules (WBC)	≤40×10^9	>40–80×10^9
Cellules marquées	≤6×10^9	>6–12×10^9
Nombre de flacons de réactif	1	2
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000–2000 mL	1000–2000 mL
Set de transfert de plasma	1–2	1–2
Volume de marquage	95 mL	190 mL
Température de marquage	Température ambiante	Température ambiante

Tableau 6.26 : Matériels requis pour la préparation des cellules CD25 positives (DEPLETION 2.1)

Séparation (DEPLETION 2.1)		
Total de cellules (WBC)	≤40×10^9	>40–80×10^9
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 mL pour < 5 × 10^9 de cellules marquées	2000 mL pour 5–12×10^9 de cellules marquées
Negative Fraction Bag	–	Remplacer les poches d'origine du jeu de tubulures par des poches de transfert de 1000 mL.
Buffer Waste Bag	–	
Priming Waste Bag	–	–
Cell Collection Bag	600 mL	2×600 mL
Luer/Spike Interconnector	1	3
Set de transfert de plasma	–	2

Tableau 6.27 : Matériels requis pour la déplétion des cellules CD25 positives (DEPLETION 2.1)

▶ Préparation des poches

Déterminer le poids de la Cell Collection Bag et de la Cell Preparation Bag vides comme décrit dans le paragraphe 7.1.1 à la page 125.

Marquage magnétique des cellules

Se référer au paragraphe 7.1 « ÉTAPE 1 : Préparation cellulaire et marquage magnétique » à la page 125 pour une description détaillée des étapes suivantes.

IMPORTANT

- *Conserver le tampon de préparation cellulaire pour l'enrichissement ou la déplétion de cellules CD25 positives entre +19 °C et +25 °C (66 °F et 77 °F).*
- *Le marquage magnétique lors de la préparation pour l'enrichissement de cellules à forte expression de CD25 doit être effectué à l'aide d'un tampon froid (+4 °C to +8 °C [+39 °F to+46 °F]). Une température plus basse ou plus élevée peut provoquer une réduction de la pureté et du rendement des cellules cibles.*

▶ Analyse du produit cellulaire de départ

▶ Transfert du produit cellulaire de départ dans la Cell Preparation Bag

▶ Dilution du produit cellulaire de départ

Ajouter le tampon : Poids du tampon à ajouter = Poids du produit cellulaire de départ×2.

▶ Centrifugation

Centrifuger à 300 ×g, sans frein, 15 minutes, à température ambiante (TA : +19° C à +25 °C [+66 °F à +77 °F]).

Ajustement du volume: volume de marquage pour

enrichissement de cellules CD25 positives : 190 g (±5 g)
enrichissement de cellules à forte expression de CD25 : 380 g (±5 g)[1]
déplétion de cellules CD25 positives (application à échelle normale) : 95 g
déplétion de cellules CD25 positives (application à grande échelle) : 190 g

1. Retirer complètement le surnageant en prenant soin de ne pas resuspendre le culot cellulaire.
2. Après avoir retiré le surnageant, resuspendre doucement le culot cellulaire.
3. Ajuster le poids de la Cell Preparation Bag (CPB) en ajoutant le tampon selon l'équation suivante : Poids cible de la CPB pleine = volume de marquage + Poids de la CPB vide.
4. Resuspendre le culot cellulaire.

Incubation avec le CliniMACS CD25 Reagent

1. Ajouter 1 ou 2 flacon(s) de CliniMACS CD25 Reagent (voir Tableau 6.24 et Tableau 6.26). Mélanger minutieusement.
2. Incuber sur l'agitateur orbital (25 tr/min) :
   a) enrichissement ou déplétion des cellules CD25 positives : 30 minutes à TA.
   b) enrichissement des cellules à forte expression de CD25 : 15 minutes entre +4 °C et +8 °C (de +39 °F à+46 °F).

Retrait de l'excédent de réactif

1. Remplir la Cell Preparation Bag de tampon.
2. Centrifuger (300 ×g, sans frein, 15 minutes, TA).
3. Retirer autant de surnageant que possible. **Remarque :** Retirer au moins 500 g de surnageant. Si le poids du surnageant retiré est inférieur à 500 g, il est recommandé de réaliser un total de deux étapes de lavage (au lieu d'une seule). Autrement, le retrait de réactif non lié risque d'être insuffisant.
4. Resuspendre le culot cellulaire.
5. Ajuster le volume de chargement de l'échantillon à 100 g (application à échelle normale) ou à 200 g (application à grande échelle).

1 Le marquage magnétique pour l'enrichissement de cellules à forte expression de CD25 doit être effectué à l'aide d'un tampon froid (+4 °C à +8 °C [+39 °F à +46 °F]).

6.9.2 ÉTAPE 2 : Sélection du programme de séparation

- **Allumer le CliniMACS Plus Instrument**
- **Sélectionner le programme de séparation ENRICHMENT 3.2 ou DEPLETION 2.1**
- **Saisir les paramètres de l'échantillon**
  (sauf pour ENRICHMENT 3.2)

Voir paragraphe 7.2.4 à la page 146 ou 7.2.5 à la page 148.

6.9.3 ÉTAPE 3 : Installation des jeux de tubulures CliniMACS

- **CliniMACS Tubing Set et CliniMACS Tubing Set LS**

Voir paragraphe 7.3.1 à la page 160.

6.9.4 ÉTAPE 4 : Séparation CliniMACS Plus

- **Procédure de séparation**
- **Débrancher les poches et noter le code du processus**
- **Démonter le jeu de tubulures et éteindre**
- **Analyse des cellules**

Voir paragraphe 7.4.3 à la page 204 ou 7.4.4 à la page 208.

6.10 Enrichissement/déplétion de cellules CD4 positives

Le CliniMACS Plus CD4 System, incluant le CliniMACS Plus Instrument, le CliniMACS CD4 Reagent, le CliniMACS Tubing Set ou le CliniMACS Tubing Set LS et le CliniMACS PBS/EDTA Buffer, est destiné à l'enrichissement ou la déplétion *in vitro* de cellules humaines CD4 positives, à partir de populations cellulaires hématologiques hétérogènes.

6.10.1 ÉTAPE 1 : Préparation cellulaire et marquage magnétique

Premières actions requises

Performances de l'application

- **Enrichissement :** jusqu'à 5×10^9 de cellules marquées sur un nombre total maximal de 40×10^9 de cellules (WBC) en utilisant le CliniMACS Tubing Set
- **Déplétion :** jusqu'à 12×10^9 de cellules marquées sur un nombre total maximal de 40×10^9 de cellules (WBC) en utilisant le CliniMACS Tubing Set LS

Remarque : Si le nombre de cellules calculés dépasse la capacité de l'application, diviser l'échantillon et poursuivre séparément avec chaque partie de l'échantillon en utilisant un nouveau jeu de tubulures pour chaque cycle avec le CliniMACS Plus.

⚠ ATTENTION

Risque de performances insuffisantes du processus de séparation des cellules marquées. Si les capacités de l'application sont dépassées, il existe un risque de marquage spécifique insuffisant. Utiliser les quantités requises de cellules et de réactif comme décrit pour l'application respective.

Matériels CliniMACS requis

Matériels	Référence catalogue	Quantité	Programme de séparation
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1	–
CliniMACS CD4 Reagent	276-01	1 flacon	–
CliniMACS Tubing Set	161-01	1 jeu de tubulures	ENRICHMENT 1.1
CliniMACS Tubing Set LS	162-01	1 jeu de tubulures	DEPLETION 2.1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	Jusqu'à 4 poches de 1000 mL[1]	–

1 Voir Tableau 6.29 à Tableau 6.32. Avant de l'utiliser, complémenter le CliniMACS PBS/EDTA Buffer avec de l'HSA à une concentration finale de 0,5% (p/v).

Tableau 6.28 : Matériels CliniMACS requis pour l'enrichissement/la déplétion de cellules CD4 positives

Matériels supplémentaires requis

- **Cell Preparation Bag :**
  une poche de transfert de 600 mL, adaptée à la centrifugation, ainsi qu'un coupleur de site de prélèvement et un set de transfert de plasma, à utiliser pendant la procédure de préparation des cellules
- **Plasma Waste Bag et Wash Waste Bag :**
  deux poches de transfert de 600 mL (ou deux de 1000 mL), adaptées à la centrifugation
- **Cell Collection Bag :**
  une poche de transfert de 150 mL ou une à deux poches de 600 mL en combinaison avec un Luer/Spike Interconnector pour raccorder la Cell Collection Bag au jeu de tubulures

  Si deux Cell Collection Bags sont nécessaires pour la séparation, utiliser un set de transfert de plasma pour raccorder les deux poches (voir Tableau 6.30 et Tableau 6.32).
- **Si le remplacement de la Negative Fraction Bag, de la Buffer Waste Bag et/ou de la Priming Waste Bag est nécessaire :**
  jusqu'à trois poches de transfert de 1000 mL en combinaison avec deux Luer/Spike Interconnectors pour raccorder les poches au jeu de tubulures (voir Tableau 6.30 et Tableau 6.32)

  Remplacer la Priming Waste Bag à l'aide du raccord de tubulure stérile.
- **S'il faut plus d'un litre de tampon pour effectuer la séparation :**
  un à deux sets de transfert de plasma pour raccorder les poches de tampon (voir Tableau 6.30 et Tableau 6.32)
- un préfiltre
- pince à clamper
- seringues (différentes tailles) et aiguilles hypodermiques 20G
- sérum-albumine humaine (HSA) à ajouter au CliniMACS PBS/EDTA Buffer à une concentration finale de 0,5% (p/v)
- tubes à échantillon

IMPORTANT

Après la saisie des paramètres de l'échantillon (ÉTAPE 2), le logiciel CliniMACS Plus calcule les volumes qui seront collectés dans la Priming Waste Bag, la Cell Collection Bag, la Negative Fraction Bag et la Buffer Waste Bag. Si le volume du liquide calculé dépasse le volume standard de 500 mL, il faut remplacer les poches selon l'aperçu des matériels requis suivant.

Aperçu des matériels requis

Préparation cellulaire (ENRICHMENT 1.1)	
Total de cellules (WBC)	≤40×10^9
Cellules marquées	≤5×10^9
Nombre de flacons de réactif	1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 mL
Set de transfert de plasma	1

Tableau 6.29 : Matériels requis pour la préparation des cellules CD4 positives (ENRICHMENT 1.1)

Séparation (ENRICHMENT 1.1)		
Cellules marquées	≤2×10^9	>2–5×10^9
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 mL	2000 mL
Negative Fraction Bag	–	Remplacer les poches d'origine du jeu de tubulures par des poches de transfert de 1000 mL.
Buffer Waste Bag	–	
Priming Waste Bag	–	–
Cell Collection Bag	150 mL	600 mL
Luer/Spike Interconnector	1	3
Set de transfert de plasma	–	1

Tableau 6.30 : Matériels requis pour l'enrichissement de cellules CD4 positives (ENRICHMENT 1.1)

Préparation cellulaire (DEPLETION 2.1)	
Total de cellules (WBC)	≤40×10^9
Cellules marquées	≤12×10^9
Nombre de flacons de réactif	1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 mL
Set de transfert de plasma	1

Tableau 6.31 : Matériels requis pour la préparation des cellules CD4 positives (DEPLETION 2.1)

Séparation (DEPLETION 2.1)		
Cellules marquées	$<5\times10^9$	$5–12\times10^9$
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 mL	2000 mL
Negative Fraction Bag	–	Remplacer les poches d'origine du jeu de tubulures par des poches de transfert de 1000 mL.
Buffer Waste Bag	–	
Priming Waste Bag	–	–
Cell Collection Bag	1×600 mL	1–2×600 mL
Luer/Spike Interconnector	1	3
Set de transfert de plasma	–	1–2

Tableau 6.32 : Matériels requis pour la déplétion de cellules CD4 positives (DEPLETION 2.1)

▶ Préparation des poches

Déterminer le poids de la Cell Collection Bag et de la Cell Preparation Bag vides comme décrit dans le paragraphe 7.1.1 à la page 125.

Marquage magnétique des cellules

Se référer au paragraphe 7.1 « ÉTAPE 1 : Préparation cellulaire et marquage magnétique » à la page 125 pour une description détaillée des étapes suivantes.

▶ Analyse du produit cellulaire de départ

▶ Transfert du produit cellulaire de départ dans la Cell Preparation Bag

▶ Dilution du produit cellulaire de départ

Ajouter le tampon : Poids du tampon à ajouter = Poids du produit cellulaire de départ×2.

▶ Centrifugation

Centrifuger à 300 ×g, sans frein, 15 minutes, à température ambiante (TA : +19° C à +25 °C [+66 °F à +77 °F]).

▶ Ajustement du volume: volume de marquage 95 g (±5 g)

1. Retirer le surnageant pour ajuster l'échantillon selon l'équation suivante : Poids de surnageant à retirer = Poids du produit cellulaire dilué – 95 g.
2. Resuspendre le culot cellulaire.

▶ Incubation avec le CliniMACS CD4 Reagent

1. Ajouter 1 flacon de CliniMACS CD4 Reagent. Mélanger minutieusement.
2. Incuber sur l'agitateur orbital (25 tr/min) pendant 30 minutes à TA.

▶ **Retrait de l'excédent de réactif**

1. Remplir la Cell Preparation Bag de tampon.
2. Centrifuger (300 ×g, sans frein, 15 minutes, TA).
3. Retirer autant de surnageant que possible. **Remarque :** Retirer au moins 500 g de surnageant. Si le poids du surnageant retiré est inférieur à 500 g, il est recommandé de réaliser un total de deux étapes de lavage (au lieu d'une seule). Autrement, le retrait de réactif non lié risque d'être insuffisant.
4. Resuspendre le culot cellulaire.
5. Ajuster le volume de chargement de l'échantillon à 100 g.

6.10.2 ÉTAPE 2 : Sélection du programme de séparation

▶ **Allumer le CliniMACS Plus Instrument**

▶ **Sélectionner le programme de séparation ENRICHMENT 1.1 ou DEPLETION 2.1**

▶

Voir paragraphe 7.2.3 à la page 141 et 7.2.5 à la page 148.

6.10.3 ÉTAPE 3 : Installation des jeux de tubulures CliniMACS

▶ **CliniMACS Tubing Set et CliniMACS Tubing Set LS**

Voir paragraphe 7.3.1 à la page 160.

6.10.4 ÉTAPE 4 : Séparation CliniMACS Plus

▶ **Procédure de séparation**

▶ **Débrancher les poches et noter le code du processus**

▶ **Démonter le jeu de tubulures et éteindre**

▶ **Analyse des cellules**

Voir paragraphe 7.4.2 à la page 200 ou 7.4.4 à la page 208.

6.11 Déplétion simultanée de cellules CD4 positives et de cellules CD8 positives

Le CliniMACS Plus CD4/CD8 System, incluant le CliniMACS Plus Instrument, le CliniMACS CD4 Reagent, le CliniMACS CD8 Reagent, le CliniMACS Tubing Set LS et le CliniMACS PBS/EDTA Buffer, est destiné à la déplétion simultanée *in vitro* de cellules humaines CD4 positives et de cellules humaines CD8 positives, à partir de populations cellulaires hématologiques hétérogènes.

6.11.1 ÉTAPE 1 : Préparation cellulaire et marquage magnétique

Premières actions requises

Performances de l'application

Jusqu'à 12×10^9 de cellules CD4 positives et jusqu'à 4×10^9 de cellules CD8 positives sur un nombre total maximal de 40×10^9 de cellules (WBC)

Remarque : Si le nombre de cellules calculées dépasse la capacité de l'application, diviser l'échantillon et poursuivre séparément avec chaque partie de l'échantillon en utilisant un nouveau jeu de tubulures pour chaque cycle avec le CliniMACS Plus.

⚠ ATTENTION

Risque de performances insuffisantes du processus de séparation des cellules marquées. Si les capacités de l'application sont dépassées, il existe un risque de marquage spécifique insuffisant. Utiliser les quantités requises de cellules et de réactif comme décrit pour l'application respective.

Matériels CliniMACS requis

Matériels	Référence catalogue	Quantité
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS CD4 Reagent	276-01	1 flacon
CliniMACS CD8 Reagent	275-01	1 flacon
CliniMACS Tubing Set LS	162-01	1 jeu de tubulures
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	Jusqu'à 4 poches de 1000 mL[1]

1 Voir Tableau 6.34 et Tableau 6.35. Avant de l'utiliser, complémenter le CliniMACS PBS/EDTA Buffer avec de l'HSA à une concentration finale de 0,5% (p/v).

Tableau 6.33 : Matériels CliniMACS requis pour la déplétion simultanée de cellules CD4 positives et de cellules CD8 positives

Matériels supplémentaires requis

- **Cell Preparation Bag :**
  une poche de transfert de 600 mL, adaptée à la centrifugation, ainsi qu'un coupleur de site de prélèvement et un set de transfert de plasma, à utiliser pendant la procédure de préparation des cellules
- **Plasma Waste Bag et Wash Waste Bag :**
  deux poches de transfert de 600 mL (ou deux de 1000 mL), adaptées à la centrifugation
- **Cell Collection Bag :**
  une à deux poches de transfert de 600 mL en combinaison avec un Luer/Spike Interconnector pour raccorder la Cell Collection Bag au jeu de tubulures

  Si deux Cell Collection Bags sont nécessaires pour la séparation, utiliser un set de transfert de plasma pour raccorder les deux poches (voir Tableau 6.35).
- **Si le remplacement de la Negative Fraction Bag, de la Buffer Waste Bag et/ou de la Priming Waste Bag est nécessaire :**
  jusqu'à trois poches de transfert de 1000 mL en combinaison avec deux Luer/Spike Interconnectors pour raccorder les poches au jeu de tubulures (voir Tableau 6.35)

  Remplacer la Priming Waste Bag à l'aide du raccord de tubulure stérile.
- **S'il faut plus d'un litre de tampon pour effectuer la séparation :**
  un à deux sets de transfert de plasma pour raccorder les poches de tampon (voir Tableau 6.35)
- un préfiltre
- pince à clamper
- seringues (différentes tailles) et aiguilles hypodermiques 20G
- sérum-albumine humaine (HSA) à ajouter au CliniMACS PBS/EDTA Buffer à une concentration finale de 0,5% (p/v)
- tubes à échantillon

IMPORTANT

Après la saisie des paramètres de l'échantillon (ÉTAPE 2), le logiciel CliniMACS Plus calcule les volumes qui seront collectés dans la Priming Waste Bag, la Cell Collection Bag, la Negative Fraction Bag et la Buffer Waste Bag. Si le volume du liquide calculé dépasse le volume standard de 500 mL, il faut remplacer les poches selon l'aperçu des matériels requis suivant.

Aperçu des matériels requis

Préparation cellulaire	
Total de cellules (WBC)	≤40×10^9
Cellules marquées	≤12×10^9 de cellules CD4 positives et ≤4×10^9 de cellules CD8 positives
Nombre de flacons de réactif	1 flacon de CliniMACS CD4 Reagent et 1 flacon de CliniMACS CD8 Reagent
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 mL
Set de transfert de plasma	1

Tableau 6.34 : Matériels requis pour la préparation des cellules CD4 positives et des cellules CD8 positives

Séparation			
Cellules marquées	<5×10^9	5–13×10^9	>13–16×10^9
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 mL	2000 mL	3000 mL
Negative Fraction Bag	–	Remplacer les poches d'origine du jeu de tubulures par des poches de transfert de 1000 mL.	Remplacer les poches d'origine du jeu de tubulures par des poches de transfert de 1000 mL.
Buffer Waste Bag	–		
Priming Waste Bag	–	–	
Cell Collection Bag	1×600 mL	1–2×600 mL	2×600 mL
Luer/Spike Interconnector	1	3	3
Set de transfert de plasma	–	1–2	3

Tableau 6.35 : Matériels requis pour la déplétion simultanée de cellules CD4 positives et de cellules CD8 positives

▶ Préparation des poches

Déterminer le poids de la Cell Collection Bag et de la Cell Preparation Bag vides comme décrit dans le paragraphe 7.1.1 à la page 125.

Marquage magnétique des cellules

Se référer au paragraphe 7.1 « ÉTAPE 1 : Préparation cellulaire et marquage magnétique » à la page 125 pour une description détaillée des étapes suivantes.

▶ Analyse du produit cellulaire de départ

▶ Transfert du produit cellulaire de départ dans la Cell Preparation Bag

▶ Dilution du produit cellulaire de départ

Ajouter le tampon : Poids du tampon à ajouter = Poids du produit cellulaire de départ×2.

▶ Centrifugation

Centrifuger à 300 ×g, sans frein, 15 minutes, à température ambiante (TA : +19° C à +25 °C [+66 °F à +77 °F]).

▶ Ajustement du volume: volume de marquage 88 g (±5 g)

1. Retirer le surnageant pour ajuster l'échantillon selon l'équation suivante : Poids de surnageant à retirer = Poids du produit cellulaire dilué – Volume de marquage.
2. Resuspendre le culot cellulaire.

▶ Incubation avec le CliniMACS CD4 Reagent et le CliniMACS CD8 Reagent

1. Ajouter 1 flacon de CliniMACS CD4 Reagent et 1 flacon de CliniMACS CD8 Reagent. Mélanger minutieusement.
2. Incuber sur l'agitateur orbital (25 tr/min) pendant 30 minutes à TA.

▶ Retrait de l'excédent de réactif

1. Remplir la Cell Preparation Bag de tampon.
2. Centrifuger (300 ×g, sans frein, 15 minutes, TA).
3. Retirer autant de surnageant que possible. **Remarque :** Retirer au moins 500 g de surnageant. Si le poids du surnageant retiré est inférieur à 500 g, il est recommandé de réaliser un total de deux étapes de lavage (au lieu d'une seule). Autrement, le retrait de réactif non lié risque d'être insuffisant.
4. Resuspendre le culot cellulaire.
5. Ajuster le volume de chargement de l'échantillon à 100 g.

6.11.2 ÉTAPE 2 : Sélection du programme de séparation

▶ Allumer le CliniMACS Plus Instrument

▶ Sélectionner le programme de séparation DEPLETION 2.1

▶ Saisir les paramètres de l'échantillon

Voir paragraphe 7.2.5 à la page 148.

6.11.3 ÉTAPE 3 : Installation des jeux de tubulures CliniMACS

- **CliniMACS Tubing Set et CliniMACS Tubing Set LS**

Voir paragraphe 7.3.1 à la page 160.

6.11.4 ÉTAPE 4 : Séparation CliniMACS Plus

- **Procédure de séparation**
- **Débrancher les poches et noter le code du processus**
- **Démonter le jeu de tubulures et éteindre**
- **Analyse des cellules**

Voir paragraphe 7.4.4 à la page 208.

6.12 Enrichissement de cellules CD1c (BDCA-1) positives – Partie 1 : Déplétion de cellules CD19 positives et marquage de cellules CD1c (BDCA-1) positives

Le CliniMACS Plus CD1c (BDCA-1)-Biotin System, incluant le CliniMACS Plus Instrument, le CliniMACS CD1c (BDCA-1)-Biotin, le CliniMACS CD19 Reagent, le CliniMACS Anti-Biotin Reagent, le CliniMACS Tubing Set LS, le CliniMACS Tubing Set et le CliniMACS PBS/EDTA Buffer, est destiné à l'enrichissement *in vitro* de cellules humaines CD1c (BDCA-1) positives, à partir de populations cellulaires hématologiques hétérogènes, après la déplétion des cellules CD19 positives.

6.12.1 ÉTAPE 1 : Préparation cellulaire et marquage magnétique

Premières actions requises

Performances de l'application

Déplétion de cellules CD19 positives jusqu'à 5×10^9 et marquage de cellules CD1c (BDCA-1) positives jusqu'à $0{,}2\times10^9$ sur un nombre total maximal de 40×10^9 de cellules (WBC)

⚠ ATTENTION

Risque de performances insuffisantes du processus de séparation des cellules marquées. Si les capacités de l'application sont dépassées, il existe un risque de marquage spécifique insuffisant. Utiliser les quantités requises de cellules et de réactif comme décrit pour l'application respective.

Matériels CliniMACS requis

Matériels	Référence catalogue	Quantité
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS CD1c (BDCA-1)-Biotin	277-01	1 flacon
CliniMACS CD19 Reagent	179-01	1 flacon
CliniMACS Tubing Set LS	162-01	1 jeu de tubulures
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	2 poches de 1000 mL[1]

1 Avant de l'utiliser, complémenter le tampon avec de l'HSA à une concentration finale de 0,5% (p/v).

Tableau 6.36 : Matériels CliniMACS requis pour l'enrichissement de cellules CD1c (BDCA-1) positives (Partie 1)

Matériels supplémentaires requis (pour Partie 1 et Partie 2)

- **Cell Preparation Bag :**
  deux poches de transfert de 600 mL, adaptées à la centrifugation, ainsi que deux coupleurs de site de prélèvement et trois sets de transfert de plasma, à utiliser pendant la procédure de préparation des cellules
- **Plasma Waste Bags et Wash Waste Bags :**
  cinq poches de transfert de 600 mL, adaptées à la centrifugation
- **Cell Collection Bag (Partie 1) :**
  une poche de transfert de 600 mL adaptée à la centrifugation en combinaison avec un Luer/Spike Interconnector pour raccorder la Cell Collection Bag au jeu de tubulures
- **Cell Collection Bag (Partie 2) :**
  une poche de transfert de 150 mL adaptée à la centrifugation en combinaison avec un Luer/Spike Interconnector pour raccorder la poche de transfert au jeu de tubulures
- deux préfiltres
- pince à clamper
- seringues (différentes tailles) et aiguilles hypodermiques 20G
- sérum-albumine humaine (HSA) à ajouter au CliniMACS PBS/EDTA Buffer à une concentration finale de 0,5% (p/v)
- tubes à échantillon

Marquage magnétique des cellules (Partie 1)

Se référer au paragraphe 7.1 « ÉTAPE 1 : Préparation cellulaire et marquage magnétique » à la page 125 pour une description détaillée des étapes suivantes.

▶ Analyse du produit cellulaire de départ

▶ Transfert du produit cellulaire de départ dans la Cell Preparation Bag

▶ Dilution du produit cellulaire de départ

Ajouter le tampon : Poids du tampon à ajouter = Poids du produit cellulaire de départ×2.

▶ Centrifugation

Centrifuger à 200 ×g, sans frein, 15 minutes, à température ambiante (TA : +19° C à +25 °C [+66 °F à +77 °F]).

▶ Ajustement du volume: volume de marquage 90 g (±5 g)

1. Après avoir retiré le surnageant, resuspendre doucement le culot cellulaire.
2. Ajuster le poids de la Cell Preparation Bag (CPB) en ajoutant le tampon selon l'équation suivante : Poids cible de la CPB pleine = 90 g + Poids de la CPB vide.
3. Resuspendre le culot cellulaire.

▶ Incubation avec le CliniMACS CD19 Reagent et le CliniMACS CD1c (BDCA-1)-Biotin

1. Ajouter 1 flacon de CliniMACS CD19 Reagent et 1 flacon de CliniMACS CD1c (BDCA-1)-Biotin. Mélanger minutieusement.
2. Incuber sur l'agitateur orbital (25 tr/min) pendant 30 minutes à TA.

▶ Retrait de l'excédent de réactif

1. Remplir la Cell Preparation Bag Partie 1 de tampon.
2. Centrifuger (300 × g, sans frein, 15 minutes, TA).
3. Retirer autant de surnageant que possible. **Remarque :** Retirer au moins 500 g de surnageant. Si le poids du surnageant retiré est inférieur à 500 g, il est recommandé de réaliser un total de deux étapes de lavage (au lieu d'une seule). Autrement, le retrait de réactif non lié risque d'être insuffisant.
4. Resuspendre le culot cellulaire.
5. Ajuster le volume de chargement de l'échantillon à 100 g.

6.12.2 ÉTAPE 2 : Sélection du programme de séparation

- **Allumer le CliniMACS Plus Instrument**
- **Sélectionner le programme de séparation DEPLETION 2.1**
- **Saisir les paramètres de l'échantillon**

Voir paragraphe 7.2.5 à la page 148.

6.12.3 ÉTAPE 3 : Installation des jeux de tubulures CliniMACS

- **CliniMACS Tubing Set et CliniMACS Tubing Set LS**

Voir paragraphe 7.3.1 à la page 160.

6.12.4 ÉTAPE 4 : Séparation CliniMACS Plus

- **Procédure de séparation**
- **Débrancher les poches et noter le code du processus**
- **Démonter le jeu de tubulures et éteindre**
- **Analyse des cellules**

Voir paragraphe 7.4.4 à la page 208.

6.13 Enrichissement de cellules CD1c (BDCA-1) positives – Partie 2 : Flexible Labeling System

Le CliniMACS Plus CD1c (BDCA-1)-Biotin System, incluant le CliniMACS Plus Instrument, le CliniMACS CD1c (BDCA-1)-Biotin, le CliniMACS CD19 Reagent, le CliniMACS Anti-Biotin Reagent, le CliniMACS Tubing Set LS, le CliniMACS Tubing Set et le CliniMACS PBS/EDTA Buffer, est destiné à l'enrichissement *in vitro* de cellules humaines CD1c (BDCA-1) positives, à partir de populations cellulaires hématologiques hétérogènes, après la déplétion des cellules CD19 positives.

6.13.1 ÉTAPE 1 : Préparation cellulaire et marquage magnétique

Premières actions requises

Performances de l'application

Jusqu'à $0{,}2\times10^9$ de cellules CD1c (BDCA-1) positives sur un nombre total maximal de 40×10^9 de cellules (WBC)

⚠ ATTENTION

Risque de performances insuffisantes du processus de séparation des cellules marquées. Si les capacités de l'application sont dépassées, il existe un risque de marquage spécifique insuffisant. Utiliser les quantités requises de cellules et de réactif comme décrit pour l'application respective.

Matériels CliniMACS requis

Matériels	Référence catalogue	Quantité
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS Anti-Biotin Reagent	173-01	1 flacon
CliniMACS Tubing Set	161-01	1 jeu de tubulures
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	3 poches de 1000 mL[1]

1 Avant de l'utiliser, complémenter le tampon avec de l'HSA à une concentration finale de 0,5% (p/v).

Tableau 6.37 : Matériels CliniMACS requis pour l'enrichissement de cellules CD1c (BDCA-1) positives (Partie 2)

Matériels supplémentaires requis

Se référer à la partie 1 pour les matériels supplémentaires requis.

▶ Préparation des poches

Déterminer le poids de la Cell Collection Bag et de la Cell Preparation Bag vides comme décrit dans le paragraphe 7.1.1 à la page 125.

Marquage magnétique des cellules (produit de leucaphérèse déplété en CD19 (Partie 2))

Se référer au paragraphe 7.1 « ÉTAPE 1 : Préparation cellulaire et marquage magnétique » à la page 125 pour une description détaillée des étapes suivantes.

▶ Transfert du produit cellulaire de départ déplété en CD19 dans la Cell Preparation Bag Partie 2

▶ Dilution du produit cellulaire de départ déplété en CD19

Ajouter le tampon : Poids du tampon à ajouter = 600 g – Poids du produit cellulaire de départ déplété en CD19.

▶ Centrifugation

Centrifuger à 300 ×g, sans frein, 15 minutes, à température ambiante (TA : +19° C à +25 °C [+66 °F à +77 °F]).

▶ Ajustement du volume: volume de marquage 95 g (±5 g)

1. Retirer le surnageant pour ajuster l'échantillon selon l'équation suivante : Poids de surnageant à retirer = Poids du produit cellulaire dilué – Volume de marquage.
2. Resuspendre le culot cellulaire.

▶ Incubation avec le CliniMACS Anti-Biotin Reagent

1. Ajouter 1 flacon de CliniMACS Anti-Biotin Reagent. Mélanger minutieusement.
2. Incuber sur l'agitateur orbital (25 tr/min) pendant 30 minutes à TA.

▶ Retrait de l'excédent de réactif

1. Remplir la Cell Preparation Bag Partie 2 de tampon.
2. Centrifuger (300 ×g, sans frein, 15 minutes, TA).
3. Retirer autant de surnageant que possible.
4. Resuspendre le culot cellulaire.
5. Remplir la Cell Preparation Bag Partie 2 de tampon.
6. Centrifuger (300 ×g, sans frein, 15 minutes, TA).
7. Retirer autant de surnageant que possible.
8. Resuspendre le culot cellulaire.
9. Ajuster le volume de chargement de l'échantillon à 100 g.

6.13.2 ÉTAPE 2 : Sélection du programme de séparation

- **Allumer le CliniMACS Plus Instrument**
- **Sélectionner le programme de séparation ENRICHMENT 3.2**

Voir paragraphe 7.2.4 à la page 146.

6.13.3 ÉTAPE 3 : Installation des jeux de tubulures CliniMACS

- **CliniMACS Tubing Set et CliniMACS Tubing Set LS**

Voir paragraphe 7.3.1 à la page 160.

6.13.4 ÉTAPE 4 : Séparation CliniMACS Plus

- **Procédure de séparation**
- **Débrancher les poches et noter le code du processus**
- **Démonter le jeu de tubulures et éteindre**
- **Analyse des cellules**

Voir paragraphe 7.4.3 à la page 204.

6.14 Enrichissement de cellules CD304 (BDCA-4) positives

Le CliniMACS Plus CD304 (BDCA-4) System, incluant le CliniMACS Plus Instrument, le CliniMACS CD304 (BDCA-4) Reagent, le CliniMACS Tubing Set et le CliniMACS PBS/EDTA Buffer est destiné à l'enrichissement *in vitro* de cellules humaines CD304 (BDCA-4) positives, à partir de populations cellulaires hématologiques hétérogènes.

6.14.1 ÉTAPE 1 : Préparation cellulaire et marquage magnétique

Premières actions requises

Performances de l'application

Jusqu'à $0{,}2\times10^9$ de cellules CD304 (BDCA-4) positives sur un nombre total maximal de 40×10^9 de cellules (WBC)

⚠ ATTENTION

Risque de performances insuffisantes du processus de séparation des cellules marquées. Si les capacités de l'application sont dépassées, il existe un risque de marquage spécifique insuffisant. Utiliser les quantités requises de cellules et de réactif comme décrit pour l'application respective.

Matériels CliniMACS requis

Matériels	Référence catalogue	Quantité
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS CD304 (BDCA-4) Reagent	278-01	1 flacon
CliniMACS Tubing Set	161-01	1 jeu de tubulures
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	4 poches de 1000 mL[1]

1 Avant de l'utiliser, complémenter le CliniMACS PBS/EDTA Buffer avec de l'HSA à une concentration finale de 0,5% (p/v).

Tableau 6.38 : Matériels CliniMACS requis pour l'enrichissement de cellules CD304 (BDCA-4) positives

Matériels supplémentaires requis

- **Cell Preparation Bag :**
  une poche de transfert de 600 mL, adaptées à la centrifugation, ainsi qu'un coupleur de site de prélèvement et trois sets de transfert de plasma, à utiliser pendant la procédure de préparation des cellules
- **Plasma Waste Bags et Wash Waste Bags :**
  cinq poches de transfert de 600 mL, adaptées à la centrifugation

- **Cell Collection Bag :**
  une poche de transfert de 150 mL en combinaison avec un Luer/Spike Interconnector pour raccorder la Cell Collection Bag au jeu de tubulures
- un préfiltre
- pince à clamper
- seringues (différentes tailles) et aiguilles hypodermiques 20G
- sérum-albumine humaine (HSA) à ajouter au CliniMACS PBS/EDTA Buffer à une concentration finale de 0,5% (p/v)
- tubes à échantillon

▶ Préparation des poches

Déterminer le poids de la Cell Collection Bag et de la Cell Preparation Bag vides comme décrit dans le paragraphe 7.1.1 à la page 125.

Marquage magnétique des cellules

Se référer au paragraphe 7.1 « ÉTAPE 1 : Préparation cellulaire et marquage magnétique » à la page 125 pour une description détaillée des étapes suivantes.

▶ Analyse du produit cellulaire de départ

▶ Transfert du produit cellulaire de départ dans la Cell Preparation Bag

▶ Dilution du produit cellulaire de départ déplété

Ajouter le tampon : Poids du tampon à ajouter = 600 g – Poids du produit cellulaire de départ.

▶ Centrifugation

Centrifuger à 200 ×g, sans frein, 15 minutes, à température ambiante (TA : +19° C à +25 °C [+66 °F à +77 °F]).

▶ Répéter les étapes “Dilution du produit cellulaire de départ” et “Centrifugation” deux fois

1. Remplir une poche de transfert à 600 g.
2. Centrifuger à 300 ×g, sans frein, 15 minutes, à température ambiante (TA : +19 °C à +25 °C [+66 °F à +77 °F]).
3. Retirer le surnageant.

▶ Ajustement du volume: volume de marquage 95 g (±5 g)

1. Retirer complètement le surnageant en prenant soin de ne pas resuspendre le culot cellulaire.
2. Après avoir retiré le surnageant, resuspendre doucement le culot cellulaire.

3. Ajuster le poids de la Cell Preparation Bag (CPB) en ajoutant le tampon selon l'équation suivante : Poids cible de la CPB pleine = 95 g + Poids de la CPB vide.
4. Resuspendre le culot cellulaire.

▶ **Incubation avec le CliniMACS CD304 (BDCA-4) Reagent**

1. Ajouter 1 flacon de CliniMACS CD304 (BDCA-4) Reagent. Mélanger minutieusement.
2. Incuber sur l'agitateur orbital (25 tr/min) pendant 30 minutes à TA.

▶ **Retrait de l'excédent de réactif**

1. Remplir la Cell Preparation Bag de tampon.
2. Centrifuger (300 ×g, sans frein, 15 minutes, TA).
3. Retirer autant de surnageant que possible.
4. Resuspendre le culot cellulaire.
5. Ajuster le volume de chargement de l'échantillon à 100 g.

6.14.2 ÉTAPE 2 : Sélection du programme de séparation

▶ **Allumer le CliniMACS Plus Instrument**

▶ **Sélectionner le programme de séparation ENRICHMENT 3.2**

Voir paragraphe 7.2.4 à la page 146.

6.14.3 ÉTAPE 3 : Installation des jeux de tubulures CliniMACS

▶ **CliniMACS Tubing Set et CliniMACS Tubing Set LS**

Voir paragraphe 7.3.1 à la page 160.

6.14.4 ÉTAPE 4 : Séparation CliniMACS Plus

▶ **Procédure de séparation**

▶ **Débrancher les poches et noter le code du processus**

▶ **Démonter le jeu de tubulures et éteindre**

▶ Analyse des cellules

Voir paragraphe 7.4.3 à la page 204.

6.15 Déplétion de cellules TCRα/β positives

Le CliniMACS Plus TCRα/β-Biotin System, incluant le CliniMACS Plus Instrument, la CliniMACS TCRα/β-Biotin, le CliniMACS Anti-Biotin Reagent, le CliniMACS Depletion Tubing Set et le CliniMACS PBS/EDTA Buffer, est destiné à la déplétion *in vitro* de cellules humaines TCRα/β positives, à partir de populations cellulaires hématologiques hétérogènes.

6.15.1 ÉTAPE 1 : Préparation cellulaire et marquage magnétique

Premières actions requises

Performances de l'application

Jusqu'à 24×10^9 de cellules TCRα/β positives sur un nombre total maximal de 60×10^9 de cellules (WBC)

⚠ ATTENTION

Risque de performances insuffisantes du processus de séparation des cellules marquées. Si les capacités de l'application sont dépassées, il existe un risque de marquage spécifique insuffisant. Utiliser les quantités requises de cellules et de réactif comme décrit pour l'application respective.

Matériels CliniMACS requis

Matériels	Référence catalogue	Quantité
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS TCRα/β-Biotin	701-48	1 flacon
CliniMACS Anti-Biotin Reagent	173-01	2 flacons
CliniMACS Depletion Tubing Set	261-01	1 jeu de tubulures
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	Jusqu'à 4 poches de 1000 mL[1]

1 Avant de l'utiliser, complémenter le CliniMACS PBS/EDTA Buffer avec de l'HSA à une concentration finale de 0,5% (p/v).

Tableau 6.39 : Matériels CliniMACS requis pour la déplétion de cellules TCRα/β positives

Matériels supplémentaires requis

- **Cell Preparation Bag :**
  une poche de transfert de 600 mL, adaptée à la centrifugation, ainsi qu'un coupleur de site de prélèvement et deux sets de transfert de plasma, à utiliser pendant la procédure de préparation des cellules
- **Plasma Waste Bags et Wash Waste Bags :**
  quatre poches de transfert de 600 mL (ou de 1000 mL), adaptées à la centrifugation
- **Cell Collection Bag :**
  une Cell Collection Bag de 600 mL est déjà pré-assemblée au CliniMACS Depletion Tubing Set
- un préfiltre
- pince à clamper
- seringues (différentes tailles) et aiguilles hypodermiques 20G
- sérum-albumine humaine (HSA) à ajouter au CliniMACS PBS/EDTA Buffer à une concentration finale de 0,5% (p/v)
- tubes à échantillon

▶ Préparation des poches

Déterminer le poids de la Cell Collection Bag et de la Cell Preparation Bag vides comme décrit dans le paragraphe 7.1.1 à la page 125.

Marquage magnétique des cellules

Se référer au paragraphe 7.1 « ÉTAPE 1 : Préparation cellulaire et marquage magnétique » à la page 125 pour une description détaillée des étapes suivantes.

▶ Analyse du produit cellulaire de départ

Déterminer le pourcentage/nombre total de toutes les cellules marquées au TCRα/β (y compris les liaisons non spécifiques au TCRα/β, et non uniquement les cellules réellement TCRα/β positives). Considérer ce nombre pour les spécifications de l'application et la saisie des paramètres de l'échantillon (voir ÉTAPE 2).

▶ Transfert du produit cellulaire de départ dans la Cell Preparation Bag

▶ Dilution du produit cellulaire de départ

Ajouter le tampon : Poids du tampon à ajouter = Poids du produit cellulaire de départ×2.

Centrifugation

1. Centrifuger à 200 ×g, sans frein, 15 minutes, à température ambiante (TA : +19 °C à +25 °C [+66 °F à +77 °F]).
2. Retirer le surnageant.

Ajustement du volume: volume de marquage 95 g (±5 g)

1. Retirer complètement le surnageant en prenant soin de ne pas resuspendre le culot cellulaire.
2. Après avoir retiré le surnageant, resuspendre doucement le culot cellulaire.
3. Ajuster le poids de la Cell Preparation Bag (CPB) en ajoutant le tampon selon l'équation suivante : Poids cible de la CPB pleine = 95 g + Poids de la CPB vide.
4. Resuspendre le culot cellulaire.

Marquage des cellules : incubation avec la CliniMACS TCRα/β-Biotin

1. Ajouter 1 flacon de CliniMACS TCRα/β-Biotin. Mélanger minutieusement.
2. Incuber sur l'agitateur orbital (25 tr/min) pendant 30 minutes à TA.

Retrait de l'excédent de conjugué : Répéter cette étape

1. Remplir la Cell Preparation Bag de tampon.
2. Centrifuger (300 ×g, sans frein, 15 minutes, TA).
3. Retirer autant de surnageant que possible.
4. Resuspendre le culot cellulaire et ajuster le poids à 190 g après le deuxième lavage.

Marquage magnétique des cellules: incubation avec le CliniMACS Anti-Biotin Reagent

1. Ajouter 2 flacons de CliniMACS Anti-Biotin Reagent. Mélanger minutieusement.
2. Incuber sur l'agitateur orbital (25 tr/min) pendant 30 minutes à TA.

Retrait de l'excédent de réactif

1. Remplir la Cell Preparation Bag de tampon.
2. Centrifuger (300 ×g, sans frein, 15 minutes, TA).
3. Retirer autant de surnageant que possible. **Remarque :** Retirer au moins 500 g de surnageant. Si le poids du surnageant retiré est inférieur à 500 g, il est recommandé de réaliser un total de deux étapes de lavage (au lieu d'une seule). Autrement, le retrait de réactif non lié risque d'être insuffisant.

4. Resuspendre le culot cellulaire.
5. Ajuster le volume de chargement de l'échantillon à 150 g. Une concentration de WBC maximale de $0,4\times10^9$ WBC/mL est recommandée.

6.15.2 ÉTAPE 2 : Sélection du programme de séparation

- **Allumer le CliniMACS Plus Instrument**
- **Sélectionner le programme de séparation DEPLETION 3.1**
- **Saisir les paramètres de l'échantillon**

Voir paragraphe 7.2.6 à la page 153.

6.15.3 ÉTAPE 3 : Installation des jeux de tubulures CliniMACS

- **CliniMACS Depletion Tubing Set**

Voir paragraphe 7.3.3 à la page 180.

6.15.4 ÉTAPE 4 : Séparation CliniMACS Plus

- **Procédure de séparation**
- **Débrancher les poches et noter le code du processus**
- **Démonter le jeu de tubulures et éteindre**
- **Analyse des cellules**

Voir paragraphe 7.4.5 à la page 212.

6.16 Déplétion de cellules CD45RA positives

Le CliniMACS Plus CD45RA System, incluant le CliniMACS Plus Instrument, le CliniMACS CD45RA Reagent, le CliniMACS Depletion Tubing Set et le CliniMACS PBS/EDTA Buffer, est destiné à la déplétion *in vitro* de cellules humaines CD45RA positives, à partir de populations cellulaires hématologiques hétérogènes.

6.16.1 ÉTAPE 1 : Préparation cellulaire et marquage magnétique

Premières actions requises

Performances de l'application

Jusqu'à 20×10^9 de cellules CD45RA positives sur un nombre total maximal de 50×10^9 de cellules (WBC)

⚠ ATTENTION

Risque de performances insuffisantes du processus de séparation des cellules marquées. Si les capacités de l'application sont dépassées, il existe un risque de marquage spécifique insuffisant. Utiliser les quantités requises de cellules et de réactif comme décrit pour l'application respective.

Matériels CliniMACS requis

Matériels	Référence catalogue	Quantité
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS CD45RA Reagent	701-46	1 flacon
CliniMACS Depletion Tubing Set	261-01	1 jeu de tubulures
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	3 poches de 1000 mL[1]

1 Avant de l'utiliser, complémenter le CliniMACS PBS/EDTA Buffer avec de l'HSA à une concentration finale de 0,5% (p/v).

Tableau 6.40 : Matériels CliniMACS requis pour la déplétion de cellules CD45RA positives

Matériels supplémentaires requis

- **Cell Preparation Bags :**
  une poches de transfert de 600 mL, adaptée à la centrifugation, ainsi qu'un coupleur de site de prélèvement et deux sets de transfert de plasma, à utiliser pendant la procédure de préparation des cellules
- **Plasma Waste Bags et Wash Waste Bags :**
  deux poches de transfert de 600 mL, adaptées à la centrifugation
- **Cell Collection Bag :**
  une Cell Collection Bag de 600 mL est déjà pré-assemblée au CliniMACS Depletion Tubing Set
- un préfiltre

- pince à clamper
- seringues (différentes tailles) et aiguilles hypodermiques 20G
- sérum-albumine humaine (HSA) à ajouter au CliniMACS PBS/EDTA Buffer à une concentration finale de 0,5% (p/v)
- tubes à échantillon

IMPORTANT

La fraction de cellules non cibles d'une séparation CliniMACS Plus CD34 peut être une source alternative de cellules de départ. L'utilisation du CliniMACS CD45RA Reagent est uniquement recommandée pour les produits cellulaires de départ contenant des cellules CD45RA positives dans les limites de la fréquence normale (jusqu'à 80%). Des fréquences plus élevées ont été observées chez quelques donneurs où le CD45RA est exprimé par presque toutes les PBMC en raison d'une mutation rare au sein du gène CD45. Dans de tels cas, l'efficacité et/ou la récupération de la déplétion peuvent être inadéquates.

▶ Préparation des poches

Déterminer le poids de la Cell Collection Bag et de la Cell Preparation Bag vides comme décrit dans le paragraphe 7.1.1 à la page 125.

Marquage magnétique des cellules

Se référer au paragraphe 7.1 « ÉTAPE 1 : Préparation cellulaire et marquage magnétique » à la page 125 pour une description détaillée des étapes suivantes.

▶ Analyse du produit cellulaire de départ

Déterminer le pourcentage/nombre total de toutes les cellules marquées au CD45RA (y compris les liaisons non spécifiques au CD45RA, et non uniquement les cellules réllement CD45RA positives). Prendre en compte ce nombre pour les spécifications de l'application et la saisie des paramètres de l'échantillon (voir ÉTAPE 2).

▶ Transfert du produit cellulaire de départ dans la Cell Preparation Bag

▶ Dilution du produit cellulaire de départ déplété

Ajouter le tampon : Poids du tampon à ajouter = Poids du produit cellulaire de départ×2.

▶ Centrifugation

Centrifuger à 200 ×g, sans frein, 15 minutes, à température ambiante (TA : +19° C à +25 °C [+66 °F à +77 °F]).

Si la fraction de cellules non cibles d'une séparation CliniMACS CD34 est utilisée comme source alternative de cellules de départ, il n'est pas nécessaire de procéder à l'étape de dilution. Continuer avec l'étape de centrifugation et centrifuger les cellules à 300 ×g (sans frein) pendant 15 minutes à température ambiante.

Ajustement du volume: volume de marquage 95 g (±5 g)

1. Retirer complètement le surnageant en prenant soin de ne pas resuspendre le culot cellulaire.
2. Après avoir retiré le surnageant, resuspendre doucement le culot cellulaire.
3. Ajuster le poids de la Cell Preparation Bag (CPB) en ajoutant le tampon selon l'équation suivante : Poids cible de la CPB pleine = 95 g + Poids de la CPB vide.
4. Resuspendre le culot cellulaire.

Incubation avec le CliniMACS CD45RA Reagent

1. Ajouter 1 flacon de CliniMACS CD45RA Reagent. Mélanger minutieusement.
2. Incuber sur l'agitateur orbital (25 tr/min) pendant 30 minutes à TA.

Retrait de l'excédent de réactif

1. Remplir la Cell Preparation Bag de tampon.
2. Centrifuger (300 ×g, sans frein, 15 minutes, TA).
3. Retirer autant de surnageant que possible. **Remarque :** Retirer au moins 500 g de surnageant. Si le poids du surnageant retiré est inférieur à 500 g, il est recommandé de réaliser un total de deux étapes de lavage (au lieu d'une seule). Autrement, le retrait de réactif non lié risque d'être insuffisant.
4. Resuspendre le culot cellulaire.
5. Ajuster le volume de chargement de l'échantillon. Calculer le poids du tampon nécessaire pour ajuster le poids de la suspension cellulaire à environ 125 g. La concentration cellulaire ne doit pas dépasser $0{,}4\times10^9$ WBC/mL : Poids du tampon à ajouter (g) = 125 g – Poids du produit cellulaire après le lavage (g).

6.16.2 ÉTAPE 2 : Sélection du programme de séparation

- **Allumer le CliniMACS Plus Instrument**
- **Sélectionner le programme de séparation DEPLETION 3.1**
- **Saisir les paramètres de l'échantillon**

Voir paragraphe 7.2.6 à la page 153.

6.16.3 ÉTAPE 3 : Installation des jeux de tubulures CliniMACS

- **CliniMACS Depletion Tubing Set**

Voir paragraphe 7.3.3 à la page 180.

6.16.4 ÉTAPE 4 : Séparation CliniMACS Plus

- **Procédure de séparation**
- **Débrancher les poches et noter le code du processus**
- **Démonter le jeu de tubulures et éteindre**
- **Analyse des cellules**

Voir paragraphe 7.4.5 à la page 212.

6.17 Enrichissement de cellules humaines avec le CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma)

Le CliniMACS Plus CCS (IFN-gamma) System, incluant le CliniMACS Plus Instrument, le CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma), le CliniMACS Tubing Set et CliniMACS PBS/EDTA Buffer, est destiné à l'enrichissement *in vitro* de cellules humaines sécrétant de l'IFN-gamma, à partir de populations cellulaires hématologiques hétérogènes.

6.17.1 ÉTAPE 1 : Préparation cellulaire et marquage magnétique

Premières actions requises

Performances de l'application

Cellules sécrétant de l'IFN-gamma sur un nombre total maximal de 1×10^9 de cellules (WBC)

⚠ ATTENTION

Risque de performances insuffisantes du processus de séparation des cellules marquées. Si les capacités de l'application sont dépassées, il existe un risque de marquage spécifique insuffisant. Utiliser les quantités requises de cellules et de réactif comme décrit pour l'application respective.

Matériels CliniMACS requis

Matériels	Référence catalogue	Quantité
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma)	279-01	1 set
CliniMACS Tubing Set	161-01	1 jeu de tubulures
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	3 poches de 1000 mL[1]

1 Avant de l'utiliser, complémenter le CliniMACS PBS/EDTA Buffer avec de l'HSA à une concentration finale de 0,5% (p/v).

Tableau 6.41 : Matériels CliniMACS requis pour l'enrichissement de cellules humaines sécrétant de l'IFN-gamma

IMPORTANT

Conserver le tampon de préparation cellulaire au froid entre +2 °C et +8 °C (entre +36 °F et +46 °F). Une température ambiante plus basse ou plus élevée peut provoquer une réduction de la pureté et du rendement des cellules cibles.

Matériels supplémentaires requis

- **Cell Preparation Bags :**
  deux poches de transfert de 600 mL, adaptées à la centrifugation, ainsi que deux coupleurs de site de prélèvement et deux sets de transfert de plasma, à utiliser pendant la procédure de préparation des cellules
- **Plasma Waste Bags et Wash Waste Bags :**
  neuf poches de transfert de 600 mL, adaptées à la centrifugation
- **Poche de milieu de culture :**
  huit poches de transfert de 600 mL, adaptées à la centrifugation
- **Cell Collection Bag (Partie 2) :**
  une poche de transfert de 150 mL adaptée à la centrifugation en combinaison avec un Luer/Spike Interconnector pour raccorder la poche de transfert au jeu de tubulures
- une poche de culture cellulaire de 100 mL, perméable aux gaz
- un préfiltre
- pince à clamper
- seringues (différentes tailles) et aiguilles hypodermiques 20G
- sérum-albumine humaine (HSA) à ajouter au CliniMACS PBS/EDTA Buffer à une concentration finale de 0,5% (p/v)
- tubes à échantillon
- 120 mL de sérum AB ou, alternativement, de sérum autologue, en complément des milieux utilisés
- 1000 mL de milieu de culture cellulaire (RPMI 1640), +4 °C (+39 °F)
- 1100 mL de milieu de culture cellulaire (RPMI 1640), +37 °C (+99 °F), complémenté avec 10% (v/v) de sérum AB ou, alternativement, de sérum autologue
- 500 mL de milieu de culture cellulaire (RPMI 1640), +4 °C (+39 °F), complémenté avec 2% (v/v) de sérum AB ou, alternativement, de sérum autologue

▶ Équipement requis

Pour obtenir des informations sur l'équipement requis pour une séparation CliniMACS Plus, se référer au paragraphe 4.77.

Équipement supplémentaire requis pour une application utilisant le CliniMACS Plus CCS (IFN-gamma) System :

- plaque de culture à 24 puits
- MiniMACS Separation Unit
- MS Columns
- filtre de pré-séparation (pour MS Columns seulement)
- MACSmix Tube Rotator

▶ Préparation des poches

Déterminer le poids de la Cell Collection Bag et de la Cell Preparation Bag vides comme décrit dans le paragraphe 7.1.1 à la page 125.

Remarque : Pré-refroidir la centrifugeuse à +4 °C (+39 °F). Après la phase de sécrétion, une troisième Cell Preparation Bag est nécessaire pour recombiner les suspensions cellulaires. Pour cette raison, étiqueter l'une des quatre poches de transfert de 600 mL (préparée avec 125 mL de milieu (RPMI) complémenté avec 10% de sérum AB) « **Préparation cellulaire n° 3 (séparation)** ».

Préparation du produit cellulaire de départ

Les paragraphes suivants décrivent la procédure en poche recommandée pour la préparation du produit cellulaire de départ en utilisant le raccord de tubulure stérile.

- L'opérateur doit être familiarisé avec le fonctionnement et l'utilisation du raccord stérile pour tubulure.
- Avant de démarrer les procédures de marquage et de séparation des cellules, s'assurer que tous les matériels et équipements nécessaires sont à disposition.

Transfert du produit cellulaire de départ dans la Cell Preparation Bag n° 1

1. Noter la date et l'heure de début de la procédure avant de préparer le produit cellulaire de départ.
2. Déterminer le volume du produit cellulaire de départ en estimant que 1 mL de produit cellulaire d'origine est équivalent à 1 g (1 g $\triangleq$ 1 mL).
3. En tenant la poche contenant le produit cellulaire de départ avec les deux mains, mélanger minutieusement le contenu par rotations lentes.
4. Utiliser le raccord de tubulure stérile pour raccorder la Cell Preparation Bag n° 1 à la poche contenant le produit cellulaire de départ.
5. Ouvrir la pince pour transférer le poids approprié de produit cellulaire de départ (contenant un maximum de 1×10^9 de cellules, en fonction de la fréquence des leucocytes déterminés auparavant) dans la Cell Preparation Bag n° 1. Contrôler visuellement (en surveillant l'affichage de la balance) que le poids approprié a bien été transféré. Fermer la pince près de la Cell Preparation Bag.

6. Sceller la tubulure et débrancher les poches, en laissant au moins 15 cm de la tubulure sur la Cell Preparation Bag n° 1 pour permettre d'autres branchements (voir Figure 6.1). Utiliser la soudeuse pour faire trois soudures adjacentes sur la tubulure. Vérifier que les soudures sont correctes. Couper au niveau de la soudure du milieu. Garder la poche d'origine du produit cellulaire de départ jusqu'à ce que la séparation et l'analyse finale des cellules ont été effectuées.

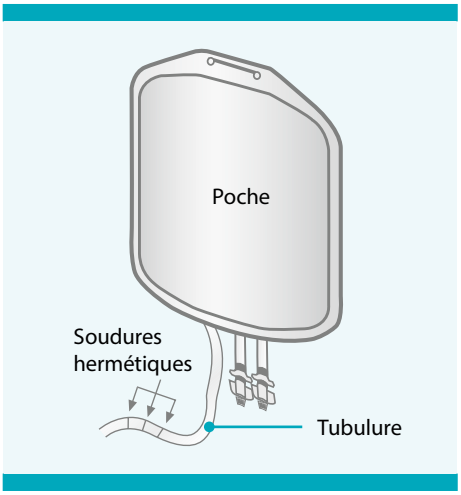


Figure 6.1 : Sceller une poche

7. Tarer la balance. Placer la Cell Preparation Bag n° 1 pleine sur la balance et le tube sur la table. Noter le poids de la Cell Preparation Bag n° 1.

8. Déterminer le poids du produit cellulaire de départ en soustrayant le poids de la Cell Preparation Bag n° 1 vide du poids de la Cell Preparation Bag n° 1 remplie de produit cellulaire de départ d'origine. Noter le poids calculé.

Poids du produit cellulaire de départ (g) :	=	Poids de la Cell Preparation Bag n° 1 remplie (g)	–	Poids de la Cell Preparation Bag n° 1 vide (g)

Dilution du produit cellulaire de départ

Le produit cellulaire de départ doit être dilué avec du milieu de culture. Diluer le produit avec du milieu froid (+2 °C à +8 °C [+36 °F à +46 °F]) jusqu'à un volume total de 500 mL. Calculer le poids du milieu à ajouter selon l'équation suivante et le noter.

Poids du milieu à ajouter (g)	=	500 g	–	Poids du produit cellulaire de départ dilué (g)

1. Prendre une des poches de milieu et la raccorder à la Cell Preparation Cell n° 1 en utilisant le raccord de tubulure stérile.

2. Placer la Cell Preparation Bag n° 1 sur la balance et tarer la balance. Accrocher la poche de milieu à un support de poche.

3. Ouvrir la pince près de la Cell Preparation Bag n° 1. En surveillant visuellement l'affichage sur la balance, transférer le poids calculé de milieu vers la Cell Preparation Bag n° 1.

4. Une fois le poids approprié de milieu transféré, fermer la pince près de la Cell Preparation Bag n° 1 pour stopper le flux de liquide.

5. Sceller la tubulure à l'aide de la soudeuse, en laissant au moins 15 cm de tubulure sur la Cell Preparation Bag n° 1 pour permettre d'autres branchements. Débrancher la poche de milieu.

6. En tenant la Cell Preparation Bag n° 1 à deux mains, mélanger minutieusement le contenu par un léger mouvement de rotation. Éviter de mélanger les cellules trop fortement.
7. Tarer la balance et peser la Cell Preparation Bag n° 1 pleine. Noter le poids.
8. Déterminer le poids du produit cellulaire de départ dilué en soustrayant le poids de la Cell Preparation Bag n° 1 vide du poids de la Cell Preparation Bag n° 1 pleine. Noter le poids calculé.

Poids du produit cellulaire de départ dilué (g) :	=	Poids de la Cell Preparation Bag n° 1 pleine (g)	–	Poids de la Cell Preparation Bag n° 1 vide (g)

⚠ AVERTISSEMENT

Risque de contamination. Si les poches ne sont pas adaptées à la préparation de cellules ou si elles ne sont pas placées correctement dans le godet de la centrifugeuse, il existe un risque de contamination dû à des poches endommagées. Utiliser des poches appropriées, plier vers le bas toute partie dépassant des poches ou de la tubulure, en veillant à ne pas endommager les poches et à les placer correctement dans le godet de la centrifugeuse.

⚠ ATTENTION

Risque de performances réduites du processus de séparation des cellules. Si les poches ne sont pas placées correctement dans le seau de la centrifugeuse, il y a un risque de perte de cellules lors du retrait de surnageant. Plier vers le bas toute partie dépassant des poches ou de la tubulure et à les placer correctement dans le godet de la centrifugeuse.

Centrifugation

1. Utiliser le raccord de tubulure stérile pour raccorder la Plasma Waste Bag n° 1 vide à la Cell Prepartion Bag n° 1.
2. Plier vers le bas toute partie dépassant de la Cell Preparation Bag n° 1 ou des tubes. Placer les deux poches correctement dans le godet de la centrifugeuse.
3. Équilibrer le godet avec les poches par un godet chargé d'un poids approprié. Il est essentiel que la centrifugeuse soit équilibrée avec précision.
4. Centrifuger les cellules à 200 ×g (sans frein) pendant 10 minutes à température ambiante (+19 °C à +25 °C [+66 °F à +77 °F]).
5. Sortir les poches de la centrifugeuse en prenant soin de ne pas resuspendre le culot cellulaire. Charger la Cell Preparation Bag n° 1 sur l'extracteur de plasma.
6. Ouvrir la pince près de la Cell Preparation Bag n° 1. Retirer complètement le surnageant en prenant soin de ne pas resuspendre le culot cellulaire. Une fois le surnageant retiré, fermer la pince près de la Cell Preparation Bag n° 1 pour stopper le flux de liquide.

7. Sceller la tubulure à l'aide de la soudeuse, en laissant au moins 15 cm de tubulure sur la Cell Preparation Bag n° 1 pour permettre d'autres branchements. Débrancher la Plasma Waste Bag n° 1.

8. Répéter dilution et centrifugation en utilisant une deuxième poche remplie de milieu froid et la Plasma Waste Bag n° 2.

9. Garder les Plasma Waste Bags jusqu'à ce que la séparation et l'analyse finale des cellules ont été effectuées.

Ajustement du volume

1. Pour une restimulation *in vitro* des cellules, le volume de l'échantillon de cellules doit être ajusté à 100 mL. Une fois le surnageant retiré, resuspendre le culot avec précaution.

2. Ajuster le poids de la Cell Preparation Bag n° 1 en ajoutant du milieu de culture. Calculer le poids du milieu à ajouter selon l'équation suivante :

Poids de la Cell Preparation Bag n° 1 pleine après ajustement du volume (g)	=	100 g	+	Poids de la Cell Preparation Bag n° 1 vide (g)

3. Utiliser le raccord de tubulure stérile pour raccorder la Cell Preparation Bag n° 1 à la poche de milieu 10% (contenant 600 mL de milieu de culture préchauffé et complémenté avec 10% de sérum AB). Accrocher la poche de milieu 10% à un support de poche.

4. Tarer la balance. Placer la Cell Preparation Bag n° 1 avec le culot cellulaire sur la balance.

5. Ouvrir la pince près de la Cell Preparation Bag n° 1. Remplir la Cell Preparation Bag n° 1 avec du milieu jusqu'à atteindre le « Poids de la Cell Preparation Bag n° 1 pleine après ajustement du volume » calculé. Fermer la pince près de la Cell Preparation Bag n° 1 pour stopper le flux de liquide.

6. Sceller la tubulure à l'aide de la soudeuse, en laissant au moins 15 cm de tubulure sur la Cell Preparation Bag pour permettre d'autres branchements. Débrancher la poche de milieu 10%.

7. Utiliser le raccord de tubulure stérile pour raccorder la Cell Preparation Bag n° 1 pleine à une poche de culture de 100 mL perméable au gaz. Ouvrir la pince près de la Cell Preparation Bag n° 1 et transférer complètement le contenu.

⚠ ATTENTION

Risque de performances réduites. Si les poches ne sont pas adaptées à la préparation de cellule, il existe un risque de contamination dû à des poches endommagées. Utiliser des poches de culture perméables aux gaz et adaptées à la préparation de cellule.

Marquage des cellules

Un CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma), composé de deux flacons (7,5 mL chacun), est prêt à l'emploi et suffisant pour une application telle que décrite ci-dessous. Les réactifs ne sont pas destinés à une administration parentérale.

Échantillon cible et échantillon de contrôle

Le protocole décrit la procédure de marquage de l'« échantillon cible » et de l'« échantillon de contrôle ». Les deux échantillons sont traités en parallèle, l'échantillon de contrôle étant traité exactement de la même façon que l'échantillon cible, mais sans addition d'antigène. Ainsi, l'analyse de l'échantillon de contrôle livre des informations sur la sécrétion spontanée de cytokine.

Restimulation *in vitro*

IMPORTANT

- *Un petit échantillon de contrôle négatif (échantillon de contrôle), traité exactement de la même façon que l'échantillon cible stimulé par l'antigène, mais sans addition d'antigène, doit être inclut comme une mesure de sécrétion spontanée de cytokine.*
- *Pour la restimulation in vitro, la densité cellulaire optimale est de 0,5–1×10^9 de cellules/cm^2 et de 1×10^9 de cellules/mL.*

1. Utiliser une seringue stérile (1 mL) avec une aiguille 20G pour prélever une fraction aliquote (par ex., 1 mL = env. 1×10^9 de cellules) des cellules qui serviront d'**échantillon de contrôle (non stimulé)**.
2. Mettre en culture l'aliquot de cellules dans des conditions optimales dans un puit d'une plaque à 24 puits.
3. Injecter l'antigène aux cellules dans la poche de culture cellulaire perméable aux gaz **(échantillon cible)** à une concentration prédéterminée par l'un des ports en utilisant une seringue.
4. Incuber les deux échantillons à +37 °C (+99 °F) et 5–7.5% CO^2 pour une durée appropriée dans l'incubateur. Si des protéines ou des lysats cellulaires sont utilisés comme antigènes, le temps d'incubation est de 4 à 16 heures. Pour les peptides, le temps d'incubation est de 3 à 6 heures. Étant donné que la durée de stimulation optimale dépend des caractéristiques spécifiques de l'antigène, Miltenyi Biotec recommande d'effectuer des procédures de validation adaptées afin d'obtenir les meilleurs résultats possibles.

Marquage avec le CliniMACS IFN-gamma Catchmatrix Reagent

Noter le numéro de lot et la date de péremption du CliniMACS IFN-gamma Catchmatrix Reagent.

Échantillon cible

IMPORTANT

Pour la phase de sécrétion, le récipient choisi doit être de taille suffisante pour permettre d'ajouter au moins 1 volume de tampon froid à la fin de la phase de sécrétion. La densité cellulaire ne doit pas excéder 1×10^6 de cellules/mL. Par conséquent, 1×10^9 de cellules doivent être mises en incubation pour sécrétion dans un volume 1000 mL de milieu de culture.

1. Utiliser le raccord de tubulure stérile pour raccorder la poche de culture à la Cell Preparation Bag n° 2 (sécrétion) et transférer les cellules. S'assurer du transfert complet des cellules vers la Cell Preparation Bag n° 2. Fermer la pince près de la Cell Preparation Bag n° 2 pour stopper le flux de liquide.
2. Sceller la tubulure à l'aide de la soudeuse, en laissant au moins 15 cm de tubulure sur la Cell Preparation Bag n° 2 pour permettre d'autres branchements. Débrancher la poche de culture vide.
3. Utiliser le raccord de tubulure stérile pour raccorder la poche de milieu 2% (contenant 500 mL de milieu de culture froid (+2 à +8 °C [+36 °F à +46 °F]) supplémenté avec 2% de sérum AB) à la Cell Preparation Bag n° 2.
4. Ouvrir la pince près de la Cell Preparation Bag n° 2. Remplir la Cell Preparation Bag n° 2 jusqu'à 600 mL. Une fois le poids approprié de milieu transféré, fermer la pince près de la Cell Preparation Bag n° 2 pour stopper le flux de liquide.
5. Sceller la tubulure à l'aide de la soudeuse, en laissant au moins 15 cm de tubulure sur la Cell Preparation Bag n° 2 pour permettre d'autres branchements. Débrancher la poche de milieu 2%.
6. Utiliser la soudeuse pour raccorder la Wash Waste Bag n° 1 vide à la Cell Preparation Bag n° 2.
7. Plier vers le bas toute partie dépassant de la poche ou de la tubulure. Placer les deux poches correctement dans le godet de la centrifugeuse.
8. Équilibrer le godet avec les deux poches par un godet chargé d'un poids approprié. Il est essentiel que la centrifugeuse soit équilibrée avec précision.
9. Centrifuger les cellules à 300 ×g (sans frein) pendant 10 minutes à une température de +4 °C à +8 °C (+39 °F à +46 °F).
10. Placer la Cell Preparation Bag n° 2 sur l'extracteur de plasma. Ouvrir la pince près de la Cell Preparation Bag n° 2. Retirer complètement le surnageant en prenant soin de ne pas resuspendre le culot cellulaire. Fermer la pince près de la Cell Preparation Bag n° 2 pour stopper le flux de liquide.
11. Sceller la tubulure à l'aide de la soudeuse, en laissant au moins 15 cm de tubulure sur la Cell Preparation Bag n° 2 pour permettre d'autres branchements. Débrancher la Wash Waste Bag n° 1.
12. Resuspendre le culot cellulaire dans le volume résiduel après le retrait du surnageant.

13. Raccorder un coupleur de site de prélèvement à la Cell Preparation Bag n° 2 et désinfecter le septum. Utiliser une seringue et une aiguille stériles appropriées pour prélever 7,425 mL du flacon de CliniMACS IFN-gamma Catchmatrix Reagent. Une seringue de 10 mL est suffisante pour prélever le contenu d'un flacon de réactif. La seringue doit être équipée d'une aiguille de 20G.
14. En tenant la Cell Preparation Bag n° 2 à deux mains, mélanger minutieusement le contenu par un léger mouvement de rotation.
15. Utiliser le port d'injection sur le coupleur de site de prélèvement pour injecter la totalité du volume de réactif dans la Cell Preparation Bag n° 2. Veiller à ne par percer la poche.
16. Resuspendre les cellules et les incuber pendant 5 minutes sur de la glace. Noter l'heure d'incubation.

Échantillon de contrôle (non stimulé)

1. Transférer les cellules dans un tube de 15 mL fermable.
2. Ajouter du milieu de culture froid (+2 °C à +8 °C [+36 °F à +46 °F]) et complémenté avec 2% de sérum AB jusqu'à 15 mL.
3. Centrifuger les cellules à 300 ×g (sans frein) pendant 10 minutes à une température de +4 °C à +8 °C (+39 °F à +46 °F) et retirer complètement le surnageant avec précaution.
4. Resuspendre le culot cellulaire dans 100 µL de milieu de culture froid (+2 °C à +8 °C [+36 °F à +46 °F]) et complémenté avec 2% de sérum AB.
5. Ajouter 75 µL du CliniMACS IFN-gamma Catchmatrix Reagent restant et incuber la suspension sur de la glace pendant 5 minutes.

Phase de sécrétion

Échantillon cible

1. Prendre les quatre poches de transfert pré-remplies (incluant la Cell Preparation Bag n° 3) contenant 125 mL de milieu de culture préchauffé (+37 °C [+99 °F]) et complémenté avec 10% de sérum AB.
2. Utiliser le raccord de tubulure stérile pour raccorder la Cell Preparation Bag n° 2 à la poche de milieu 10% préalablement préparée (contenant le milieu de culture préchauffé (+37 °C [+99 °F]) et complémenté avec 10% de sérum AB).
3. Ajouter 500 mL de milieu de culture préchauffé à l'echantillon cellulaire dans la Cell Preparation Bag n° 2. Commencer immédiatement la période d'incubation de 45 minutes.
4. Distribuer 125 mL de la suspension cellulaire obtenue dans chacune des quatre poches de transfert en attachant en série les poches de transfert à la Cell Preparation Bag n° 2 et en utilisant le raccord de tubule stérile. En surveillant visuellement l'affichage sur la balance, transférer le poids approprié de suspension cellulaire. Cette procédure permet d'obtenir un total de 250 g

de suspension cellulaire dans chacune des quatre poches de transfert. Après le transfert, sceller la tubulure pour débrancher les poches de transfert à l'aide de la soudeuse.

5. Incuber les cellules à +37 °C (+99 °F) pendant le reste des 45 minutes, avec une rotation lente continue (max. 50 tr/min), jusqu'à la fin du temps d'incubation. Noter l'heure d'incubation.
6. Prendre un set de transfert de plasma et s'assurer que la pince est en position fermée. Insérer la pointe du set de transfert de plasma dans un port de la poche de tampon.
7. Après 45 minutes, raccorder la poche de tampon à la Cell Preparation Bag n° 3 en utilisant le raccord de tubule stérile. Ajouter du tampon froid (+2 °C à +8° C [+36 °F à +46 °F]) à chacune des quatre poches de transfert (au moins un certain volume, par ex. 250 mL à chacune) en attachant en série les poches de transfert à la poche de tampon. Laisser refroidir les cellules en les plaçant sur de la glace pendant 10 minutes.
8. Utiliser le raccord de tubulure stérile pour raccorder une Wash Waste Bag (Wash Waste Bags n^{os} 2 à 5) à chacune des poches de transfert.
9. Centrifuger les cellules à 300 ×g (sans frein) pendant 10 minutes à +4 °C (+39 °F). Retirer complètement le surnageant de toutes les poches à l'aide de l'extracteur de plasma.
10. Sceller la tubulure de chaque poche à l'aide de la soudeuse. Débrancher les Wash Waste Bags.
11. Prendre un set de transfert de plasma et s'assurer que la pince est en position fermée. Insérer la pointe du set de transfert de plasma dans un port de la poche de tampon.
12. Utiliser le raccord de tubulure stérile pour raccorder la poche de tampon à la Cell Preparation Bag n° 3.
13. Ouvrir la pince sur le set de transfert de plasma et remplir la Cell Preparation Bag n° 3 avec 200 mL de tampon.
14. Une fois le poids approprié de tampon transféré, mettre la pince du set de transfert de plasma en position fermée pour stopper le flux de liquide.
15. Sceller la tubulure à l'aide de la soudeuse, en laissant au moins 15 cm de tubulure sur la Cell Preparation Bag n° 3. Débrancher la poche de tampon.
16. Utiliser le raccord de tubulure stérile pour raccorder une des trois autres poches de transfert contenant les cellules à la Cell Preparation Bag n° 3 et recombiner les deux suspensions.

    IMPORTANT
    Les échantillons divisés doivent être recombinés dans la Cell Preparation Bag n° 3 avant la centrifugation.
17. Répéter cette procédure jusqu'à ce que les suspensions cellulaires des quatre poches de transfert ont été recombinées dans la Cell Preparation Bag n° 3.

18. Après avoir recombiné les cellules, raccorder la poche de tampon à la Cell Preparation Bag n° 3 en utilisant le raccord de tubule stérile.
19. Mettre la pince sur le set de transfert de plasma en position ouverte. Remplir la Cell Preparation Bag avec du tampon jusqu'à 500 mL.
20. Une fois le poids approprié de tampon transféré, mettre la pince sur le set de transfert de plasma en position fermée pour arrêter le flux de liquide. Fermer la pince près de la Cell Preparation Bag n° 3.
21. Sceller la tubulure entre les deux pinces à l'aide de la soudeuse, en laissant au moins 15 cm de tubulure sur la Cell Preparation Bag n° 3 pour permettre d'autres branchements. Débrancher la poche de tampon.
22. Utiliser le raccord de tubulure stérile pour raccorder la Wash Waste Bag n° 6 à la Cell Preparation Bag n° 3.
23. Plier vers le bas toute partie dépassant de la Cell Preparation Bag n° 3 ou des tubes. Placer les deux poches correctement dans le godet de la centrifugeuse.
24. Équilibrer le godet avec les deux poches par un godet chargé d'un poids approprié. Il est essentiel que la centrifugeuse soit équilibrée avec précision.
25. Centrifuger les cellules à 300 ×g (sans frein) pendant 10 minutes à +4 °C (+39° F).

Échantillon de contrôle (non stimulé)

1. Ajouter du milieu de culture préchauffé (+37 °C [+99 °F]) complémenté avec 10% de sérum AB pour diluer l'échantillon jusqu'à un maximum de 1×10^6 de cellules/mL, par ex. un volume total de 10 mL est nécessaire pour 1×10^9 cellules.
2. Incuber les cellules dans un tube fermé pendant 45 minutes à +37 °C (+99 °F) sous une rotation lente et continuer en utilisant le MACSmix Tube Rotator (max. 50 tr/min.).
3. Après 45 minutes, remplir le tube de tampon froid (+4 °C [+39 °F]) et le placer sur de la glace pendant 5-10 minutes.
4. Centrifuger les cellules à 300 ×g (sans frein) pendant 10 minutes à une température de +4 °C à +8 °C (+39 °F à +46 °F).

Marquage magnétique des cellules avec le CliniMACS IFN-gamma Enrichment Reagent

Noter le numéro de lot et la date de péremption du CliniMACS IFN-gamma Enrichment Reagent.

Échantillon cible

1. Après l'étape de centrifugation, retirer avec précaution le surnageant à l'aide de l'extracteur de plasma, comme décrit ci-dessus, et le resuspendre dans le volume résiduel. Fermer la pince près de la Cell Preparation Bag n° 3 après le retrait de surnageant.
2. Sceller la tubulure à l'aide de la soudeuse, en laissant au moins 15 cm de tubulure sur la Cell Preparation Bag n° 3 pour permettre d'autres branchements. Débrancher la Wash Waste Bag n° 6.
3. Raccorder un coupleur de site de prélèvement à la Cell Preparation Bag n° 3 et désinfecter le septum. Utiliser une seringue et une aiguille stériles appropriées pour prélever 7,425 mL du flacon de CliniMACS IFN-gamma Catchmatrix Reagent. Une seringue de 10 mL est suffisante pour prélever le contenu d'un flacon de réactif. La seringue doit être équipée d'une aiguille de 20G.
4. Utiliser le port d'injection sur le coupleur de site de prélèvement pour injecter le réactif dans la Cell Preparation Bag n° 3. Veiller à ne pas percer la poche. Commencer immédiatement à compter le temps d'incubation de 15 minutes. Noter l'heure du début de l'incubation.
5. En tenant la Cell Preparation Bag avec les deux mains, mélanger minutieusement le contenu par un léger mouvement de rotation.
6. Incuber les cellules pendant 15 minutes sur de la glace. Noter l'heure de la fin de l'incubation.
7. Utiliser le raccord de tubulure stérile pour raccorder la poche de tampon à la Cell Preparation Bag n° 3.
8. Ouvrir la pince près de la Cell Preparation Bag n° 3. Mettre la pince sur le set de transfert de plasma en position ouverte. Remplir la Cell Preparation Bag n° 3 à 500 mL avec du tampon froid (+2 °C à +8 °C [+36 °F à +46 °F]).
9. Une fois le poids approprié de tampon transféré, mettre la pince du set de transfert de plasma en position fermée. Fermer la pince près de la Cell Preparation Bag n° 3. Sceller la tubulure entre les deux pinces à l'aide de la soudeuse. Débrancher la poche de tampon.
10. Utiliser le raccord de tubulure stérile pour raccorder la Wash Waste Bag n° 7 à la Cell Preparation Bag n° 3.
11. Plier vers le bas toute partie dépassant de la poche ou de la tubulure. Placer les deux poches correctement dans le godet de la centrifugeuse.
12. Équilibrer le godet avec les deux poches par un godet chargé d'un poids approprié. Il est essentiel que la centrifugeuse soit équilibrée avec précision.
13. Centrifuger à 300 ×g (sans frein) pendant 10 minutes à +4 °C (+39 °F).
14. Retirer avec précaution le surnageant comme décrit ci-dessus et resuspendre les cellules dans 100 mL de tampon froid (+2 °C à +8 °C [+36 °F à +46 °F]).
15. Désinfecter le septum du coupleur du site de prélèvement. Insérer une aiguille avec une seringue appropriée dans le coupleur du site de prélèvement de la Cell Preparation Bag et prélever un volume de 0,5 mL du produit marqué.

Prendre soin de ne pas percer la poche. Transférer le prélèvement dans un tube à échantillon. Étiqueter le tube « ÉCHANTILLON CIBLE ORIGINAL » (inclure l'identification du patient).

IMPORTANT

S'assurer que les cellules sont bien mélangées avant de prélever l'échantillon. Afin d'obtenir un échantillon représentatif, utiliser une seringue d'une capacité minimum de 5 mL.

16. Conserver l'échantillon de cellules au froid (+2 °C à +8 °C [+36 °F à +46 °F]) pour analyse cellulaire.

Échantillon de contrôle (non stimulé)

1. Retirer avec précaution le surnageant après la centrifugation.
2. Resuspendre les cellules dans 100 µL de tampon froid (+2 °C à +8 °C [+36° F à +46 °F]).
3. Ajouter 75 µL du CliniMACS IFN-gamma Enrichment Reagent restant.
4. Incuber les cellules pendant 15 minutes sur de la glace.
5. Remplir le récipient de tampon froid (+2 °C à +8 °C [+36 °F à +46 °F]) et centrifuger à 300 ×g (sans frein) pendant 10 minutes à +4 °C (+39 °F).
6. Retirer avec précaution le surnageant et resuspendre les cellules dans 1 mL de tampon froid (+2 °C à +8 °C [+36 °F à +46 °F]).
7. Prélever un échantillon de la suspension cellulaire (environ 100 µL) et le transférer dans un tube, étiqueté « ÉCHANTILLON DE CONTRÔLE ORIGINAL, fraction avant séparation ». Le conserver au froid jusqu'à l'analyse.

Séparation magnétique

Échantillon cible

La séparation magnétique de l'échantillon cible s'effectue sur le CliniMACS Plus Instrument. Après la procédure de séparation, traiter l'échantillon de contrôle comme décrit ci-dessous.

Échantillon de contrôle (non stimulé)

1. Préparer deux MS Columns en les rinçant avec 500 µL de tampon froid (+2° C à +8 °C [+36 °F à +46 °F]) et éliminer l'effluent.
2. Placer la première colonne dans le champ magnétique du MiniMACS Separator.
3. Passer les cellules à travers un filtre de pré-séparation pour éliminer les agrégats.
4. Appliquer la suspension cellulaire sur la colonne.

5. Recueillir l'effluent total (contenant la fraction cellulaire non marquée). Laver la colonne en ajoutant 500 µL de tampon froid sur la colonne. Effectuer un total de trois étapes de lavage en appliquant successivement 500 µL de tampon sur la colonne dès que le réservoir de la colonne est vide.
6. Retirer la colonne du séparateur, placer la deuxième colonne dans le séparateur, et placer la première colonne sur la deuxième.
7. Pipeter 1 mL de tampon froid sur la première colonne. Rincer immédiatement la fraction contenant les cellules marquées magnétiquement en appliquant fermement le piston, fourni avec la colonne, directement sur la deuxième colonne.
8. Recueillir les cellules non marquées qui passent à travers et laver la colonne avec 500 µL de tampon froid. Effectuer un total de trois étapes de lavage en appliquant successivement 500 µL de tampon sur la colonne dès que le réservoir de la colonne est vide.
9. Retirer la deuxième colonne du séparateur et placer la colonne sur un tube de collecte approprié étiqueté « fraction positive ».
10. Pipeter 0,5 mL de tampon froid sur la colonne. Rincer immédiatement la fraction contenant les cellules marquées magnétiquement en appliquant fermement le piston fourni avec la colonne.
11. Conserver la fraction cellulaire cible au froid jusqu'à l'analyse.

6.17.2 ÉTAPE 2 : Sélection du programme de séparation

▶ **Sélectionner le programme de séparation ENRICHMENT 3.2**

Voir paragraphe 7.2.4 à la page 146.

6.17.3 ÉTAPE 3 : Installation des jeux de tubulures CliniMACS

▶ **CliniMACS Tubing Set et CliniMACS Tubing Set LS**

Voir paragraphe 7.3.1 à la page 160.

6.17.4 ÉTAPE 4 : Séparation CliniMACS Plus

- **Procédure de séparation**
- **Débrancher les poches et noter le code du processus**
- **Démonter le jeu de tubulures et éteindre**
- **Analyse des cellules**

Voir paragraphe 7.4.3 à la page 204.

7 Explication détaillée des ÉTAPES 1-4

7.1 ÉTAPE 1 : Préparation cellulaire et marquage magnétique

Ce chapitre livre des explications détaillées sur les procédures nécessaires à la séparation des cellules à l'aide du système CliniMACS Plus.

7.1.1 Premières actions requises

Pour connaître les matériels requis pour une application particulière, se reporter au paragraphe spécifique à l'application (voir paragraphe 5.2 à la page 37).

Préparation du CliniMACS PBS/EDTA Buffer

Complémenter le CliniMACS PBS/EDTA Buffer avec de l'HSA à une concentration finale de 0,5% (p/v).

Préparation des poches

Se référer au paragraphe spécifique à l'application pour connaître les poches requises :

- **Cell Preparation Bag :** Insérer un coupleur de site de prélèvement (ou équivalent) dans le port externe de la Cell Preparation Bag. Placer une pince à clamper sur la tubulure près de la poche et fermer la pince. Peser la Cell Preparation Bag vide avec la pince à clamper positionnée près de la poche et la tubulure placée sur la table près de la balance. Noter le poids.

  IMPORTANT
  Étant donné que la longueur de la tubulure peut varier au cours de la procédure de préparation, faire attention en déterminant le poids de la Cell Preparation Bag. Pour obtenir une mesure précise, vérifier que les pinces à clamper sont toujours positionnées près de la poche et sont placées sur la balance et que le reste de la tubulure est placé sur la table près de la balance.

- **Cell Collection Bag :**
  - CliniMACS Tubing Set/CliniMACS Tubing Set LS: Insérer un Luer/Spike Interconnector (ou équivalent) dans le port externe de la Cell Collection Bag. Placer une pince à clamper sur la tubulure près de la poche et fermer la pince. Peser la Cell Collection Bag vide avec la pince à clamper positionnée près de la poche et la tubulure placée sur la table près de la balance. Noter le poids.

- CliniMACS Depletion Tubing Set: Une Cell Collection Bag est déjà pré-assemblée au jeu de tubulures. Insérer un Luer/Spike Interconnector (ou équivalent) dans le port externe de la Cell Preparation Bag. Placer une pince à clamper sur la tubulure près de la poche et fermer la pince. Peser la Cell Collection Bag vide avec la pince à clamper positionnée près de la poche et la tubulure placée sur la table près de la balance. Noter le poids.

7.1.2 Marquage magnétique des cellules

Les paragraphes suivants décrivent la procédure en poche recommandée pour la préparation du produit cellulaire de départ en utilisant le raccord de tubulure stérile.

- L'opérateur doit être familiarisé avec le fonctionnement et l'utilisation du raccord stérile pour tubulure.
- Avant de commencer le marquage et le processus de séparation des cellules, s'assurer que toutes les fournitures et tous les équipements nécessaires sont à disposition.

IMPORTANT

- *Toute manipulation des poches doit être effectuée dans un environnement stérile en utilisant des techniques aseptiques (par ex. hotte à flux laminaire). Le branchement des tubes à l'aide du raccord de tubulure stérile peut être effectué en dehors de la hotte à flux laminaire.*
- *Effectuer la préparation des échantillons et la séparation des cellules dans les conditions de température définies dans le paragraphe spécifique à l'application. Une température ambiante plus basse ou plus élevée provoquera une réduction de la pureté et du rendement des cellules cibles.*

En bref, le marquage magnétique du produit cellulaire s'effectue selon les étapes suivantes :

1. analyse du produit cellulaire de départ
2. transfert du produit cellulaire de départ dans la Cell Preparation Bag
3. dilution du produit cellulaire de départ :
4. centrifugation
5. pour le CliniMACS Plus Anti-Biotin System et le CliniMACS Plus TCRα/β-Biotin System uniquement : marquage des cellules (incubation avec l'anticorps primaire/la CliniMACS TCRα/β-Biotin) et retrait de l'excédent du conjugué (1er lavage)
6. ajustement du volume
7. Pour les systèmes CliniMACS Plus CD3 et CD3/CD19 uniquement : Incubation avec de l'immunoglobuline de qualité pharmaceutique.

8. marquage magnétique des cellules (incubation avec le réactif CliniMACS)
9. retrait de l'excédent de réactif
10. ajustement du volume pour la séparation des cellules

Analyse du produit cellulaire de départ

Avant de commencer la préparation du produit cellulaire de départ, déterminer les paramètres suivants :

- nombre total de leucocytes
- pourcentage de cellules à marquer
- nombre total de leucocytes à marquer
- viabilité

Veiller à travailler selon les spécifications de l'application.

Vérifier à nouveau ces paramètres après la procédure de marquage. Ceci est nécessaire pour les programmes de chargement par étapes (ENRICHMENT 1.1 / DEPLETION 2.1 / DEPLETION 3.1), car il faut saisir les trois paramètres de l'échantillon suivants dans le logiciel lors de la configuration du CliniMACS Plus Instrument avant de monter le jeu de tubulures sur l'instrument :

- concentration de leucocytes par mL
- pourcentage de cellules à marquer
- volume final de l'échantillon cellulaire (volume de chargement de l'échantillon)

D'autres tests peuvent être nécessaires en fonction de l'utilisation prévue des cellules (par ex. nombre de cellules T, phénotype). Noter toutes les données.

Transfert du produit cellulaire de départ dans la Cell Preparation Bag

1. Noter la date et l'heure de début de la procédure avant de préparer le produit cellulaire de départ.
2. Déterminer le volume du produit cellulaire d'origine en estimant que 1 mL de produit cellulaire de départ est équivalent à 1 g (1 g ≙ 1 mL).
3. En tenant la poche de produit cellulaire de départ avec les deux mains, mélanger minutieusement le contenu par un léger mouvement de rotation.
4. Utiliser le raccord de tubulure stérile pour raccorder la Cell Preparation Bag à la poche d'origine du produit cellulaire de départ.

5. Ouvrir la pince pour transférer le produit cellulaire de départ dans la Cell Preparation Bag. Utiliser un décapant de tube pour vider la tubulure de tout résidu de sang. Fermer la pince sur la tubulure aussi près que possible de la poche.

6. Sceller la tubulure et débrancher les poches, en laissant au moins 15 cm de la tubulure sur la Cell Preparation Bag pour permettre d'autres branchements (voir Figure 7.1). Utiliser la soudeuse pour faire trois soudures adjacentes sur la tubulure. Vérifier que les soudures sont correctes. Couper au niveau de la soudure du milieu. Conserver la poche d'origine contenant le produit de leucaphérèse/cellulaire de départ jusqu'à ce que la séparation et l'analyse finale de toutes les cellules aient été accomplies.

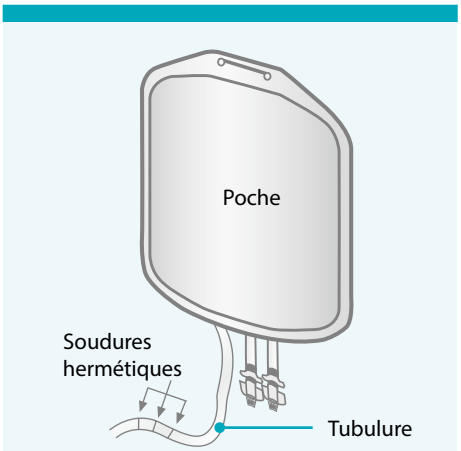


Figure 7.1 : Sceller une poche.

7. Pour prélever un échantillon, désinfecter le septum du coupleur du site de prélèvement. Mélanger le contenu de la poche. Insérer une aiguille avec une seringue appropriée dans le coupleur du site de prélèvement de la Cell Preparation Bag et prélever un volume de 0,5 mL. Transférer le prélèvement dans un tube à échantillon. Étiqueter le tube « LEUKAPHÉRÈSE/PRODUIT CELLULAIRE DE DÉPART » (inclure l'identification du patient) et le conserver pour l'analyse cellulaire.

   IMPORTANT
   Vérifier que le produit cellulaire de départ est bien mélangé avant de prélever l'échantillon. Afin d'obtenir un échantillon représentatif, utiliser une seringue d'une capacité minimum de 5 mL.

8. Tarer la balance. Placer la Cell Preparation Bag pleine sur la balance, laisser la tubulure placée sur la table. Noter le poids.

9. Déterminer le poids du produit cellulaire de départ en soustrayant le poids de la Cell Preparation Bag vide du poids de la Cell Preparation Bag remplie avec le produit cellulaire de départ. Noter le poids calculé.

Poids du produit cellulaire de départ (g)	=	Poids de la Cell Preparation Bag remplie (g)	–	Poids de la Cell Preparation Bag vide (g)

Dilution du produit cellulaire de départ

Se référer au paragraphe spécifique à l'application pour connaître le rapport de dilution nécessaire.

Le produit cellulaire de départ doit être dilué avec du CliniMACS PBS/EDTA Buffer (complémenté avec de l'HSA à une concentration finale de 0,5% (p/v)) avant le marquage magnétique. Calculer le poids du tampon à ajouter selon l'une des équations suivantes (1 ou 2) en fonction de l'application et le noter.

(1) Poids du tampon à ajouter (g)	=	600 g	−	Poids du produit cellulaire de départ (g) :	
(2) Poids du tampon à ajouter (g)	=	Poids du produit cellulaire de départ (g)	×	2	

1. Prendre un set de transfert de plasma et s'assurer que la pince est en position fermée. Insérer la pointe du set de transfert de plasma dans un port de la poche de tampon.
2. Utiliser le raccord de tubulure stérile pour raccorder la poche de tampon à la Cell Preparation Bag. Accrocher la poche de tampon à un support de poche.
3. Placer la Cell Preparation Bag sur la balance et la tarer la balance.
4. Ouvrir la pince près de la Cell Preparation Bag. Mettre la pince sur le set de transfert de plasma en position ouverte. En surveillant visuellement l'affichage sur la balance, transférer le poids calculé de tampon vers la Cell Preparation Bag.
5. Une fois le poids approprié de tampon transféré, mettre la pince sur le set de transfert de plasma en position fermée pour arrêter le flux de liquide. Fermer la pince sur la tubulure aussi près de la poche que possible.
6. Sceller la tubulure entre les deux pinces à l'aide de la soudeuse, en laissant au moins 15 cm de tubulure sur la Cell Preparation Bag pour permettre d'autres branchements. Débrancher la poche de tampon.
7. En tenant la Cell Preparation Bag à deux mains, mélanger minutieusement le contenu par un léger mouvement de rotation. Éviter de mélanger les cellules trop fortement.
8. Tarer la balance et peser la Cell Preparation Bag pleine. Noter le poids.
9. Déterminer le poids du produit cellulaire de départ dilué en soustrayant le poids de la Cell Preparation Bag vide du poids de la Cell Preparation Bag pleine. Noter le poids calculé.

Poids du produit cellulaire de départ dilué (g)	=	Poids de la Cell Preparation Bag pleine (g)	−	Poids de la Cell Preparation Bag vide (g)

Centrifugation

⚠ AVERTISSEMENT

Risque de contamination. Si les poches ne sont pas adaptées à la préparation de cellules ou si elles ne sont pas placées correctement dans le godet de la centrifugeuse, il existe un risque de contamination dû à des poches endommagées. Utiliser des poches appropriées, plier vers le bas toute partie dépassant des poches ou de la tubulure, en veillant à ne pas endommager les poches et à les placer correctement dans le godet de la centrifugeuse.

⚠ ATTENTION

Risque de performances réduites du processus de séparation des cellules. Si les poches ne sont pas placées correctement dans le seau de la centrifugeuse, il y a un risque de perte de cellules lors du retrait de surnageant. Plier vers le bas toute partie dépassant des poches ou de la tubulure et à les placer correctement dans le godet de la centrifugeuse.

1. Utiliser le raccord de tubulure stérile pour raccorder la Plasma Waste Bag vide à la Cell Preparation Bag.
2. Plier vers le bas toute partie dépassant de la Cell Preparation Bag ou de la tubulure. Placer les deux poches correctement dans le godet de la centrifugeuse.
3. Équilibrer le godet avec les deux poches par un godet chargé d'un poids approprié. Il est essentiel que la centrifugeuse soit équilibrée avec précision.
4. Centrifuger les cellules dans les conditions définies dans le paragraphe spécifique à l'application. Noter les conditions de centrifugation.
5. Sortir les poches de la centrifugeuse en prenant soin de ne pas resuspendre le culot cellulaire. Placer la Cell Preparation Bag sur l'extracteur de plasma et la Waste Bag qui lui est reliée sur la balance.

Ajustement du volume

Pour le marquage magnétique des cellules, le poids optimal du produit cellulaire varie en fonction de l'application. Se référer au volume de marquage dans le paragraphe spécifique à l'application.

En fonction de l'application, il peut s'avérer nécessaire soit de retirer seulement une partie du surnageant pour atteindre le volume de marquage (retrait sur mesure du surnageant), soit de retirer complètement le surnageant et d'ajouter du tampon pour atteindre le volume de marquage (retrait complet du surnageant). Se référer au paragraphe spécifique à l'application pour l'option applicable et continuer en conséquence.

IMPORTANT

- *En utilisant l'extracteur de plasma, maintenir un contrôle constant de la poignée de relâchement de l'extracteur et s'assurer que la pince à clamper près de la Cell Preparation Bag est ouverte avant de commencer le transfert. Relâcher lentement la poignée de l'extracteur.*
- *Pendant le retrait du surnageant, veiller à ne pas perdre de cellules.*

Retrait sur mesure du surnageant

Calculer le poids du surnageant à retirer pour ajuster l'échantillon au volume de marquage selon l'équation suivante :

Poids de surnageant à retirer (g)	=	Poids du produit cellulaire après le lavage (g)	–	Volume de marquage (g)

Noter le poids de surnageant à retirer.

1. Placer la Plasma Waste Bag ou la Wash Waste Bag n° 1 sur la balance et tarer la balance.
2. Ouvrir la pince près de la Cell Preparation Bag. En surveillant visuellement l'affichage de la balance, retirer le surnageant à l'aide de l'extracteur de plasma. Appuyer avec précaution pour faire sortir l'excès de surnageant jusqu'à ce que le « poids de surnageant à retirer » calculé soit atteint.
3. Une fois le poids approprié de surnageant retiré, fermer la pince près de la Cell Preparation Bag pour arrêter le flux de liquide. Noter le poids du surnageant retiré.
4. Sceller la tubulure à l'aide de la soudeuse, en laissant au moins 15 cm de tubulure sur la Cell Preparation Bag pour permettre d'autres branchements. Débrancher la Plasma Waste Bag ou la Wash Waste Bag n° 1.
5. Resuspendre avec précaution les cellules dans la Cell Preparation Bag. Éviter de mélanger les cellules trop fortement. S'assurer que toutes les cellules sont bien resuspendues.
6. Tarer la balance et peser la Cell Preparation Bag pleine. Noter le poids.
7. Déterminer le poids du produit cellulaire après ajustement du volume en soustrayant le poids de la Cell Preparation Bag vide du poids de la Cell Preparation Bag pleine. Noter le poids calculé.

Poids du produit cellulaire après ajustement du volume (g)	=	Poids de la Cell Preparation Bag pleine (g)	–	Poids de la Cell Preparation Bag vide (g)

8. Conserver la Plasma Waste Bag ou la Wash Waste Bag jusqu'à ce que la séparation et l'analyse finales de toutes les cellules aient été effectuées.

Retrait complet du surnageant

Retirer complètement le surnageant, en prenant soin de ne pas resuspendre le culot cellulaire pendant la procédure. Une fois le surnageant retiré, fermer la pince près de la Cell Preparation Bag pour arrêter le flux de liquide. Sceller la tubulure à l'aide de la soudeuse, en laissant au moins 15 cm de tubulure sur la Cell Preparation Bag pour permettre d'autres branchements. Débrancher la Plasma Waste Bag. Resuspendre le culot avec précaution.

Ajuster le poids de la Cell Preparation Bag en ajoutant du tampon. Calculer le poids cible de la Cell Preparation Bag (CPB) remplie avec le produit cellulaire dilué selon l'équation suivante :

Poids cible de la CPB remplie de produit cellulaire lavé (g)	=	Volume de marquage (g)	+	Poids de la CPB vide (g)

1. Insérer la pointe d'un set de transfert de plasma dans un port d'une poche de tampon. Vérifier que la pince du set de transfert de plasma est en position fermée.
2. Utiliser le raccord de tubulure stérile pour raccorder la poche de tampon à la Cell Preparation Bag. Accrocher la poche de tampon à un support de poche.
3. Tarer la balance. Placer la Cell Preparation Bag avec le culot cellulaire sur la balance.
4. Ouvrir la pince près de la Cell Preparation Bag. Mettre la pince sur le set de transfert de plasma en position ouverte. Remplir la Cell Preparation Bag avec du tampon jusqu'à atteindre le « Poids cible de la Cell Preparation Bag remplie avec le produit cellulaire lavé » préalablement calculé. Mettre la pince sur le set de transfert de plasma en position fermée pour arrêter le flux de liquide. Fermer la pince près de la Cell Preparation Bag.
5. Sceller la tubulure à l'aide de la soudeuse, en laissant au moins 15 cm de tubulure sur la Cell Preparation Bag pour permettre d'autres branchements. Débrancher la poche de tampon.
6. Resuspendre avec précaution les cellules dans la Cell Preparation Bag. Éviter de mélanger les cellules trop fortement. S'assurer que toutes les cellules sont bien resuspendues.
7. Tarer la balance et peser la Cell Preparation Bag pleine. Noter le poids.
8. Déterminer le poids du produit cellulaire après ajustement du volume en soustrayant le poids de la Cell Preparation Bag vide du poids de la Cell Preparation Bag pleine. Noter le poids calculé.

Poids du produit cellulaire après ajustement du volume (g)	=	Poids de la Cell Preparation Bag pleine (g)	–	Poids de la Cell Preparation Bag vide (g)

9. Conserver la Wash Waste Bag jusqu'à ce que la séparation et l'analyse finale de toutes les cellules aient été accomplies.

Marquage des cellules (pour le CliniMACS Plus Anti-Biotin System et CliniMACS Plus TCRα/β-Biotin System uniquement)

Incubation avec la CliniMACS TCRα/β-Biotin

Le flacon de la CliniMACS TCRα/β-Biotin est prêt à être utilisé et suffit pour l'application décrite ci-dessous. Le conjugué n'est pas destiné à une administration parentérale.

Conserver le conjugué à une température entre +2 °C et +8 °C (+36 °F et +46 °F). NE PAS congeler. Le conjugué est à utiliser à froid, directement à sa sortie du réfrigérateur. NE PAS le réchauffer avant utilisation. Le numéro de lot et la date de péremption du conjugué sont imprimés sur l'étiquette du flacon. NE PAS utiliser de conjugué ayant dépassé la date de péremption.

1. Noter le numéro de lot et la date de péremption de la CliniMACS TCRα/β-Biotin.
2. Désinfecter le septum du coupleur du site de prélèvement. Utiliser une seringue et une aiguille stériles appropriées pour prélever le volume total d'un flacon (7,5 mL). Une seringue de 10 mL est suffisante pour prélever le contenu d'un flacon. La seringue doit être équipée d'une aiguille de 20G.
3. Utiliser le port d'injection sur le coupleur du site de prélèvement pour injecter la totalité du volume de conjugué dans la Cell Preparation Bag (facultatif: transférer le contenu de la Cell Preparation Bag dans une nouvelle poche de transfert pour garantir une grande efficacité de déplétion). Commencer immédiatement la période d'incubation de 30 minutes.
4. En tenant la Cell Preparation Bag à deux mains, mélanger minutieusement le contenu par un léger mouvement de rotation. Noter l'heure du début de l'incubation.
5. Placer la Cell Preparation Bag à plat sur l'agitateur orbital, le faire tourner à une vitesse d'environ 25 tr/min et s'assurer que la poche n'est ni pliée ni tordue. Incuber la poche pendant 30 minutes au total à température ambiante contrôlée (+19 °C à +25 °C [+66 °F à +77 °F]). Noter l'heure de la fin de l'incubation.

Incubation avec l'anticorps primaire (anticorps biotinylé d'un autre fabricant)

1. Resuspendre le culot cellulaire et marquer les cellules avec l'anticorps primaire biotinylé en respectant le temps et la titration recommandés par le fabricant de l'anticorps. S'assurer que toutes les cellules sont bien resuspendues. (L'anticorps primaire doit être titré et utilisé dans des conditions optimales, c'est-à-dire avec une intensité de coloration optimale et sans coloration de fond. Suivre la notice d'utilisation fournie par le fabricant de l'anticorps primaire).
2. Incuber la Cell Preparation Bag sur un agitateur orbital à 25 tr/min. Suivre la notice d'utilisation fournie par le fabricant de l'anticorps primaire.

Retrait de l'excédent de conjugué (1er lavage) (pour CliniMACS Plus Anti-Biotin System et CliniMACS Plus TCRα/β-Biotin System uniquement)

Diluer le produit cellulaire avec du tampon jusqu'à un poids total de 600 g. Calculer le poids du tampon à ajouter selon l'équation suivante et le noter.

Poids du tampon à ajouter (g)	=	600 g	−	Poids du produit cellulaire marqué (g)

1. Diluer le produit cellulaire en suivant les instructions décrites dans l'étape « Dilution du produit cellulaire de départ » (points 1-8) jusqu'à un poids total de 600 g.
2. Déterminer le poids du produit cellulaire après le retrait de l'excédant de conjugué (1er lavage) en soustrayant le poids de la Cell Preparation Bag vide du poids de la Cell Preparation Bag pleine. Noter le poids calculé.

Poids du produit cellulaire après retrait de l'excédent du conjugué (1er lavage)	=	Poids de la Cell Preparation Bag pleine (g)	−	Poids de la Cell Preparation Bag vide (g)

3. Utiliser le raccord de tubulure stérile pour raccorder la Wash Waste Bag vide à la Cell Preparation Bag.
4. Plier vers le bas toute partie dépassant de la Cell Preparation Bag ou de la tubulure. Placer les deux poches correctement dans le godet de la centrifugeuse.
5. Équilibrer le godet avec les deux poches par un godet chargé d'un poids approprié. Il est essentiel que la centrifugeuse soit équilibrée avec précision.
6. Centrifuger les cellules dans les conditions définies dans le paragraphe spécifique à l'application.
7. Sortir les poches de la centrifugeuse en prenant soin de ne pas resuspendre le culot cellulaire. Placer la Cell Preparation Bag sur l'extracteur de plasma et la Waste Bag qui lui est reliée sur la balance.

8. Se référer au paragraphe spécifique à l'application pour connaître le nombre de lavages requis.
9. Ajuster le poids de la suspension cellulaire comme décrit dans le paragraphe « Ajustement du volume » à environ 190 g, pour le marquage magnétique des cellules avec le CliniMACS Anti-Biotin Reagent.

Incubation avec de l'immunoglobuline de qualité pharmaceutique (uniquement pour les systèmes CliniMACS Plus CD3 ou CD3/CD19)

IMPORTANT

Tenir compte du fait que l'IgG humaine n'est pas un éléments du système CliniMACS. Utiliser uniquement de l'IgG humaine de qualité pharmaceutique approuvée dans votre pays. Lire attentivement la notice, en particulier le paragraphe relatif aux réactions d'hypersensibilité et au risque d'infection que l'IgG humaine, en tant que produit dérivé du sang, peut engendrer chez tous les patients. Tous les risques associés à ces produits doivent être évalués par l'utilisateur.

Désinfecter le septum du coupleur du site de prélèvement de la Cell Preparation Bag. Utiliser une seringue et une aiguille stériles appropriées pour ajouter 1,5 mg d'IgG humaine par mL de produit cellulaire (par ex. 1,6 mL de Gamunex 10% pour 95 mL de produit cellulaire). Mélanger minutieusement le contenu. Incuber pendant 5 minutes à température ambiante contrôlée en appliquant un léger mouvement de rotation (par ex. 25 tr/min sur un agitateur orbital).

Marquage magnétique des cellules : incubation avec le réactif CliniMACS

Les flacons de réactif CliniMACS sont prêts à être utilisés et suffisent pour l'application décrite ci-dessous. Les réactifs ne sont pas destinés à une administration parentérale.

Conserver les réactifs à une température entre +2 °C et +8 °C (+36 °F et +46 °F). NE PAS congeler. Les réactifs sont à utiliser à froid, directement à leur sortie du réfrigérateur. NE PAS les réchauffer avant utilisation. Le numéro de lot et la date de péremption des réactifs sont imprimés sur l'étiquette du flacon. NE PAS utiliser de réactifs ayant dépassé la date de péremption.

1. Noter le numéro de lot et la date de péremption du/des réactif(s) CliniMACS.
2. Désinfecter le septum du coupleur du site de prélèvement. Utiliser une seringue et une aiguille stériles appropriées pour prélever le volume total a) d'un flacon ou b) de deux flacons de réactif (7,5 mL chacun). Une seringue de 10 mL est suffisante pour prélever le contenu d'un flacon, ou respectivement, une seringue de 20 mL est suffisante pour prélever le contenu de deux flacons de réactif. La seringue doit être équipée d'une aiguille de 20G.

3. Utiliser le port d'injection sur le coupleur du site de prélèvement pour injecter la totalité du volume de réactif dans la Cell Preparation Bag (facultatif: dans les applications de déplétion, transférer le contenu de la Cell Preparation Bag dans une nouvelle poche de transfert pour garantir une grande efficacité de déplétion). Le temps d'incubation commence à ce stade.
4. En tenant la Cell Preparation Bag avec les deux mains, mélanger minutieusement le contenu par un léger mouvement de rotation.
5. Placer la Cell Preparation Bag à plat sur l'agitateur orbital, le faire tourner à une vitesse d'environ 25 tr/min et s'assurer que la poche n'est ni pliée ni tordue. Incuber la poche dans les conditions et pour la durée définies dans le paragraphe spécifique à l'application.

Retrait de l'excédent de réactif

Pour prélever le réactif non lié une fois l'incubation terminée, il est nécessaire de laver les cellules. Se référer au paragraphe spécifique à l'application pour connaître le nombre de lavages requis.

1. Insérer la pointe d'un set de transfert de plasma dans un port d'une poche de tampon contenant au moins 500 mL de tampon. Vérifier que la pince du set de transfert de plasma est en position fermée.
2. Utiliser le raccord de tubulure stérile pour raccorder la poche de tampon à la Cell Preparation Bag. Accrocher la poche de tampon à un support de poche.
3. Placer la Cell Preparation Bag sur la balance et tarer la balance.
4. Ouvrir la pince près de la Cell Preparation Bag. Mettre la pince sur le set de transfert de plasma en position ouverte. Remplir la Cell Preparation Bag de tampon jusquà 600 mL. Mettre la pince sur le set de transfert de plasma en position fermée pour arrêter le flux de liquide. Fermer la pince près de la Cell Preparation Bag. Noter le poids de la Cell Preparation Bag pleine.
5. Sceller la tubulure entre les deux pinces, en laissant au moins 15 cm de la tubulure sur la Cell Preparation Bag pour permettre d'autres branchements. Débrancher la poche de tampon.
6. En tenant la Cell Preparation Bag avec les deux mains, mélanger minutieusement le contenu par un léger mouvement de rotation.
7. Utiliser le raccord de tubulure stérile pour raccorder la Wash Waste Bag vide à la Cell Preparation Bag.
8. Plier vers le bas toute partie dépassant des poches ou de la tubulure. Placer avec précaution la Cell Preparation Bag et la Wash Waste Bag dans le godet de centrifugation.
9. Centrifuger les cellules dans les conditions et pour la durée définies dans le paragraphe spécifique à l'application.
10. Sortir les poches de la centrifugeuse en prenant soin de ne pas resuspendre le culot cellulaire.

11. Placer avec précaution la Cell Preparation Bag sur l'extracteur de plasma.
12. Placer la Wash Waste Bag sur la balance et tarer la balance.
13. Ouvrir la pince près de la Cell Preparation Bag. Utiliser l'extracteur de plasma pour retirer autant de surnageant que possible de la Cell Preparation Bag. Fermer la pince près de la Cell Preparation Bag pour arrêter le flux de liquide.
14. Sceller la tubulure à l'aide de la soudeuse, en laissant au moins 15 cm de tubulure sur la Cell Preparation Bag pour permettre d'autres branchements. Débrancher la Wash Waste Bag.
15. Conserver la Wash Waste Bag jusqu'à ce que la séparation et l'analyse finale de toutes les cellules aient été accomplies.
16. Resuspendre les cellules dans la Cell Preparation Bag. Éviter de mélanger les cellules trop fortement. S'assurer que toutes les cellules sont bien resuspendues.
17. Si d'autres lavages sont nécessaires (par ex. pour l'enrichissement de cellules CD34 positives), répéter les points 1 à 16.
18. Tarer la balance et peser la Cell Preparation Bag pleine. Noter le poids.
19. Déterminer le poids du produit cellulaire après le lavage en soustrayant le poids de la Cell Preparation Bag vide du poids de la Cell Preparation Bag pleine. Noter le poids calculé.

Poids produit cellulaire après lavage (g)	=	Poids Cell Preparation Bag pleine (g)	–	Poids Cell Preparation Bag vide (g)

20. Ajuster le volume de chargement de l'échantillon : Calculer selon l'équation suivante le poids du tampon nécessaire afin d'ajuster le poids de la suspension cellulaire au volume de chargement de l'échantillon requis pour l'application. Pour charger les cellules marquées et lavées sur le jeu de tubulures, une concentration maximale de $0{,}4\times10^9$ de cellules par mL est recommandée.

Poids tampon à ajouter (g)	=	Volume de chargement échantillon (selon application)	–	Poids produit cellulaire après lavage (g)

21. Utiliser le raccord de tubulure stérile pour raccorder la poche de tampon à la Cell Preparation Bag. Accrocher la poche de tampon à un support de poche.
22. Placer la Cell Preparation Bag sur la balance et tarer la balance.
23. Ouvrir la pince près de la Cell Preparation Bag. Mettre la pince sur le set de transfert de plasma en position ouverte. En surveillant visuellement l'affichage sur la balance, transférer le poids calculé de tampon vers la Cell Preparation Bag.
24. Une fois le poids approprié de tampon transféré, mettre la pince sur le set de transfert de plasma en position fermée pour arrêter le flux de liquide. Fermer la pince près de la Cell Preparation Bag.
25. Sceller la tubulure entre les deux pinces à l'aide de la soudeuse. Débrancher la poche de tampon.

26. Resuspendre les cellules dans la Cell Preparation Bag. Éviter de mélanger les cellules trop fortement. S'assurer que toutes les cellules sont bien resuspendues.
27. Désinfecter le septum du coupleur du site de prélèvement. Insérer une aiguille avec une seringue appropriée dans le coupleur du site de prélèvement de la Cell Preparation Bag et prélever un volume de 0,5 mL du produit marqué. Transférer le prélèvement dans un tube à échantillon. Étiqueter le tube « ORIGINAL » (inclure l'identification du patient) et le conserver pour analyse.
28. Tarer la balance et peser la Cell Preparation Bag pleine. Noter le poids.
29. Déterminer le poids du produit cellulaire après avoir ajouté le tampon (volume de chargement de l'échantillon) en soustrayant le poids de la Cell Preparation Bag vide du poids de la Cell Preparation Bag pleine. Noter le poids calculé.

Poids produit cellulaire après ajout de tampon (g)	=	Poids Cell Preparation Bag pleine (g)	–	Poids Cell Preparation Bag vide (g)

▶ Passer à l'ÉTAPE 2.

NE PAS raccorder la Cell Preparation Bag à la tubulure avant que l'affichage de l'instrument ne l'indique.

7.2 ÉTAPE 2 : Sélection du programme de séparation

7.2.1 Allumer le CliniMACS Plus Instrument

Allumer le CliniMACS Plus Instrument à l'aide de l'interrupteur ON/OFF situé sur le panneau arrière de l'instrument. Noter l'heure de début du cycle de l'instrument.

La page de démarrage s'affiche à l'écran, voir le paragraphe « Installation » du manuel d'utilisation du CliniMACS Plus Instrument.

Pour passer au menu des programmes, appuyer sur **ENT**.

7.2.2 CD34 SELECTION 1/2

IMPORTANT

- *CD34 SELECTION 1 doit être utilisé uniquement en combinaison avec le CliniMACS Tubing Set (REF 161-01), tandis que CD34 SELECTION 2 doit être utilisé uniquement en combinaison avec le CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01). Vérifier minitieusement le jeu de tubulures avant l'installation.*
- *L'écran affiche des instructions et diagrammes qui serviront de guide pour les procédures. Effectuer et vérifier chaque étape selon les instructions du manuel d'utilisation avant de passer à l'étape suivante. Pour corriger une erreur lors de la saisie des données, appuyer sur « Annuler » (voir le paragraphe « Description » du manuel d'utilisation du CliniMACS Plus Instrument).*

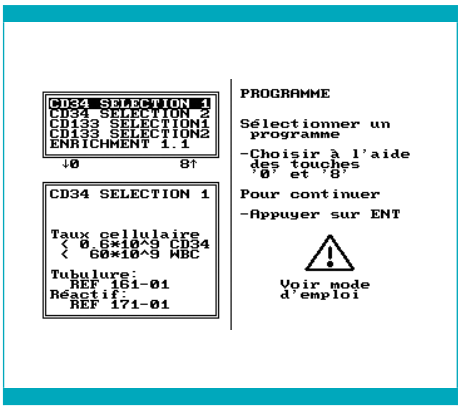
Sélectionner le programme de séparation CD34 SELECTION 1/2

L'Écran 7.1 s'affiche.

Selon l'application, sélectionner CD34 SELECTION 1 ou CD34 SELECTION 2.

Sélectionner le programme de séparation en surlignant le nom du programme avec la barre noire. Déplacer la barre vers le haut et vers le bas en utilisant les touches **8** et **0**.

Pour continuer avec le programme surligné, appuyer sur **ENT**.

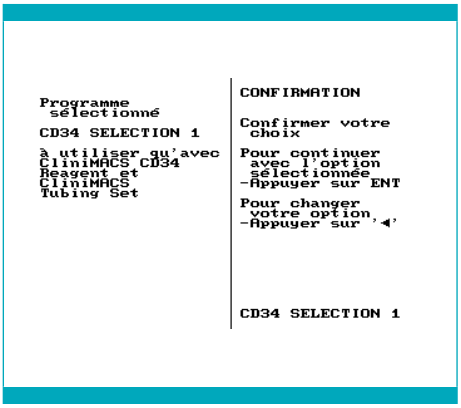


Écran 7.1 : Sélection du programme de séparation

Confirmation
L'Écran 7.2 s'affiche.

Pour confirmer le programme de séparation et pour continuer, appuyer sur ENT.

Pour annuler, appuyer sur ◄ pour retourner à l'étape précédente afin de modifier la sélection faite.



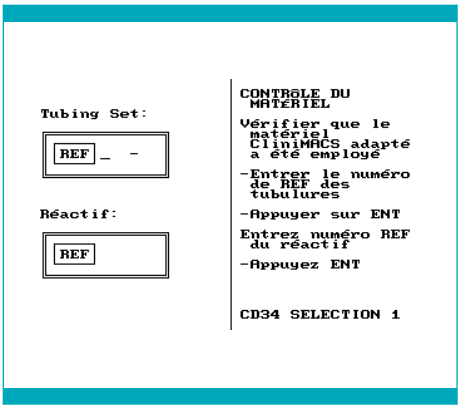
Écran 7.2 : Confirmation

Contrôle du matériel

L'Écran 7.3 s'affiche.

Les programmes CD34 SELECTION 1 et CD34 SELECTION 2 sont optimisés pour l'enrichissement de cellules CD34 positives.

Pour confirmer que le jeu de tubulures approprié est disponible et que le réactif adéquat a été utilisé pour le marquage des cellules, saisir les références catalogue (REF) dans les champs correspondants. Le logiciel de l'instrument vérifiera si l'utilisation des matériels est possible en combinaison avec le programme sélectionné.



Écran 7.3 : Contrôle du matériel

1. Saisir la référence catalogue du jeu de tubulures à utiliser pour la séparation automatisée des cellules. Pour confirmer et continuer, appuyer sur ENT.
2. Saisir la référence catalogue du réactif qui à été utilisé pour le marquage des cellules. Pour confirmer et continuer, appuyer sur ENT.

Si la référence catalogue d'un jeu de tubulures ou d'un réactif non spécifié pour le programme de séparation sélectionné a été saisie, un message apparaît. Appuyer sur ENT pour le confirmer et saisir à nouveau la référence catalogue correcte. Si la référence catalogue saisie est toujours incorrecte, le message apparaît une deuxième fois. Après avoir appuyé sur ENT le programme retourne au menu du programme (voir Écran 7.1).

IMPORTANT

- *CD34 SELECTION 1 doit être utilisé uniquement en combinaison avec le CliniMACS Tubing Set (REF 161-01), tandis que CD34 SELECTION 2 doit être utilisé uniquement en combinaison avec le CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01). Vérifier minitieusement le jeu de tubulures avant l'installation.*
- *Pour corriger une erreur lors de la saisie des données, appuyer sur « Annuler » (voir le paragraphe « Description » du manuel d'utilisation du CliniMACS Plus Instrument).*

Si le contrôle du matériel a été effectué avec succès, le programme continue automatiquement avec les instructions pour installer le jeu de tubulures.

▶ **Passer à l'ÉTAPE 3.**

7.2.3 ENRICHMENT 1.1

IMPORTANT

- *Le programme de séparation ENRICHMENT 1.1 doit être utilisé uniquement avec le CliniMACS Tubing Set (REF 161-01).*
- *L'écran affiche des instructions et diagrammes qui serviront de guide pour les procédures. Effectuer et vérifier chaque étape selon les instructions du manuel d'utilisation avant de passer à l'étape suivante. Pour corriger une erreur lors de la saisie des données, appuyer sur « Annuler » (voir le paragraphe « Description » du manuel d'utilisation du CliniMACS Plus Instrument).*

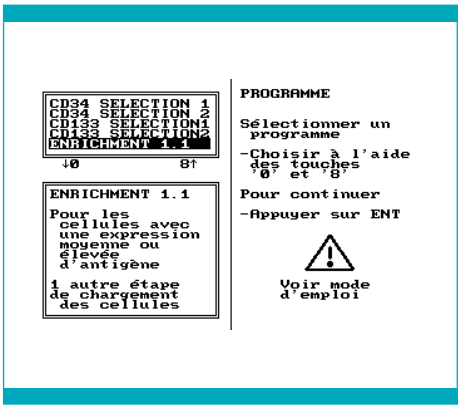
Sélectionner le programme de séparation ENRICHMENT 1.1

L'Écran 7.4 s'affiche.

Sélectionner ENRICHMENT 1.1.

Sélectionner le programme de séparation en surlignant le nom du programme avec la barre noire. Déplacer la barre vers le haut et vers le bas en utilisant les touches **8** et **0**.

Pour continuer avec le programme surligné, appuyer sur **ENT**.



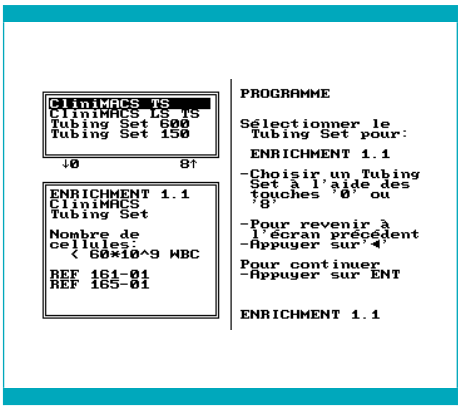
Écran 7.4 : Sélection du programme de séparation

Sélectionner le jeu de tubulures

L'Écran 7.5 s'affiche.

Confirmer que le bon programme a été sélectionné. Pour annuler, appuyer sur ◄ pour retourner à l'étape précédente afin de modifier la sélection faite.

Sélectionner le jeu de tubulures en le surlignant avec la barre noire dans le cadre en haut à gauche. Déplacer la barre vers le haut et vers le bas en utilisant les touches **8** et **0**.



Écran 7.5 : Sélection du jeu de tubulures

La fenêtre en bas à gauche affiche les données correspondantes, telles que la capacité et la référence catalogue (REF) du jeu de tubulures sélectionné.

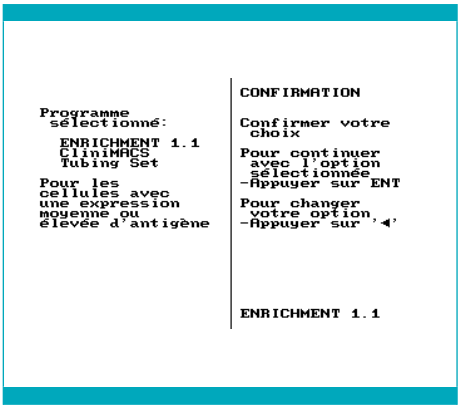
Pour continuer avec la combinaison sélectionnée de programme de séparation et de jeu de tubulures, appuyer sur **ENT**.

Confirmation

L'Écran 7.6 s'affiche.

Pour confirmer la combinaison de programme de séparation et de jeu de tubulures, appuyer sur **ENT**.

Pour annuler, appuyer sur ◄ pour retourner à l'étape précédente afin de modifier la sélection faite.



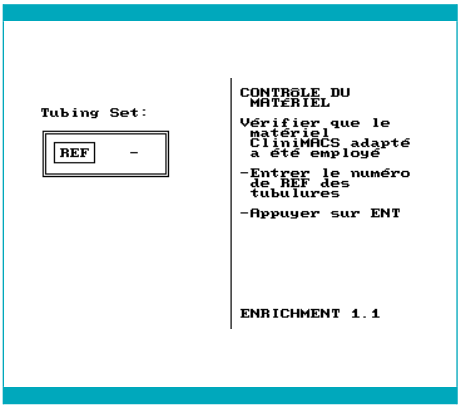
Écran 7.6 : Confirmation

Contrôle du matériel

L'Écran 7.7 s'affiche.

La demande de saisie de la référence catalogue (REF) du jeu de tubulures sert de contrôle de sécurité pour garantir que le jeu de tubulures sélectionné peut être utilisé avec le programme préalablement choisi.

Saisir la référence catalogue du jeu de tubulures sélectionné et appuyer sur **ENT** pour continuer.



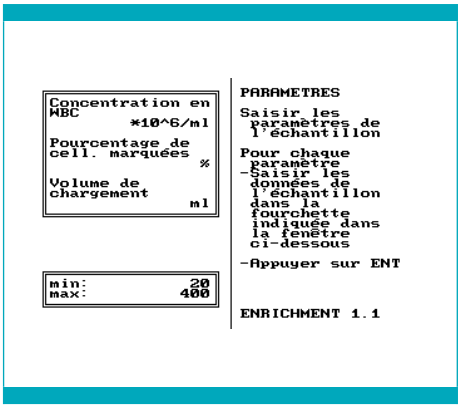
Écran 7.7 : Contrôle du matériel

Si une référence catalogue incorrecte a été saisie, un message apparaît. Pour confirmer, appuyer sur **ENT** et saisir la référence catalogue correcte. Si la référence saisie est toujours incorrecte, le message apparaît une deuxième fois. Après avoir appuyé sur **ENT**, l'écran retourne au menu des programmes (voir Écran 7.4).

Saisir les paramètres de l'échantillon

Si le contrôle du matériel a été effectué avec succès, le programme continue automatiquement avec la demande des paramètres de l'échantillon qui sont nécessaires pour ajuster la séparation à chaque échantillon individuel et pour fournir à l'opérateur d'importantes informations sur les volumes de tampon et de poche nécessaires.

L'Écran 7.8 s'affiche.



Écran 7.8 : Saisir les paramètres de l'échantillon

1. Commencer par saisir la concentration en globules blancs (WBC) de l'échantillon. La plage de valeurs autorisées est indiquée dans la boîte en bas à gauche. Appuyer sur ◀ pour corriger une saisie incorrecte.

   S'assurer que la valeur saisie correspond à la valeur de l'échantillon. Sinon, le traitement de l'échantillon risque de ne pas être optimal. Pour continuer avec la saisie suivante, appuyer sur **ENT**.

IMPORTANT

Tous les paramètres de l'échantillon requis se réfèrent à la procédure de postmarquage et de lavage des cellules. La plage de valeurs autorisées indiquée dans le cadre en bas à gauche prend toujours en compte la saisie précédente. Après chaque saisie, le logiciel calcule et ajuste la plage de valeurs acceptées pour le champ suivant.

⚠ ATTENTION

La saisie de mauvais paramètres peut entraîner un traitement de l'échantillon non optimal et donc augmenter le risque de perte de cellules cibles. Des valeurs de concentration de WBC et/ou de pourcentage de cellules marquées inférieures aux valeurs réelles de l'échantillon peuvent provoquer la perte de cellules due à une surcharge du système. La saisie d'un volume d'échantillon inférieur peut provoquer une perte de cellules due à une surcharge ou même un traitement incomplet de l'échantillon. Une valeur trop élevée de l'un des trois paramètres provoque une augmentation du temps de traitement et du volume de la fraction de cellules cibles. Veiller à toujours saisir les bons paramètres.

2. Saisir le pourcentage des cellules marquées. S'assurer que la valeur saisie correspond à la valeur de l'échantillon. Sinon, le traitement de l'échantillon risque de ne pas être optimal (voir « Important »). Pour continuer avec la saisie suivante, appuyer sur **ENT**.

3. Saisir le volume final de l'échantillon de cellules. S'assurer que la valeur saisie correspond à la valeur de l'échantillon. Sinon, le traitement de l'échantillon risque de ne pas être optimal (voir « Important »).

Pour continuer, appuyer sur **ENT**.

Calcul

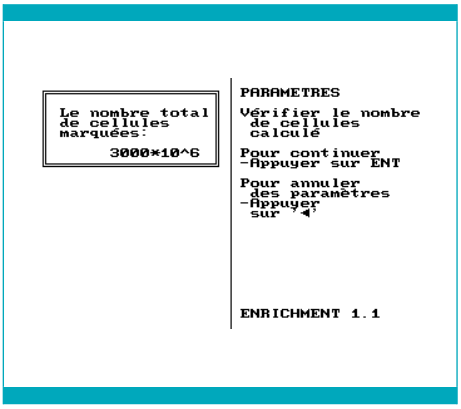
Le logiciel CliniMACS Plus calcule le nombre total de cellules marquées afin de vérifier si la capacité du processus de séparation est suffisante.

Le résultat est indiqué sur l'un des deux écrans possibles :

- Le résultat du calcul apparaît sur un écran semblable à l'Écran 7.9. S'assurer que le nombre calculé de cellules marquées est correct.

  Pour continuer, appuyer sur **ENT**.

  Une correction des données est possible. Appuyer sur ◄ pour retourner à l'écran précédent afin de faire la correction.

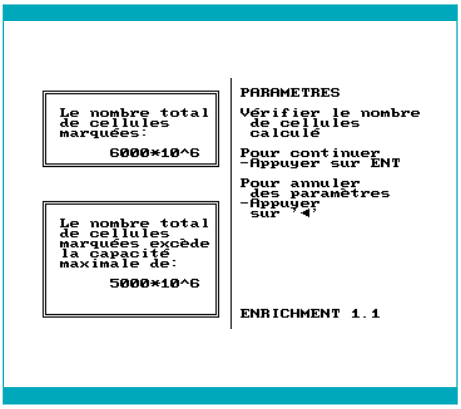


Écran 7.9 : Calcul

- Si le nombre calculé de cellules marquées dépasse la capacité de séparation du système CliniMACS Plus, un écran semblable à l'Écran 7.10 s'affiche. S'assurer que les paramètres de l'échantillon saisis et le nombre de cellules calculé sont corrects. Appuyer sur ◄ pour retourner à l'Écran 7.8 et pour corriger les paramètres de l'échantillon.

  Pour éviter de surcharger le système, diviser l'échantillon et déterminer le volume de chaque fraction. Appuyer sur ◄ pour retourner à l'Écran 7.8. Saisir les paramètres de l'échantillon pour la première aliquote et continuer avec la séparation de cette fraction. Une fois la séparation terminée, commencer une deuxième séparation avec la deuxième aliquote en utilisant un nouveau jeu de tubulures.

  Pour continuer, appuyer sur **ENT**.



Écran 7.10 : Calcul : Le nombre de cellules dépasse la capacité de séparation

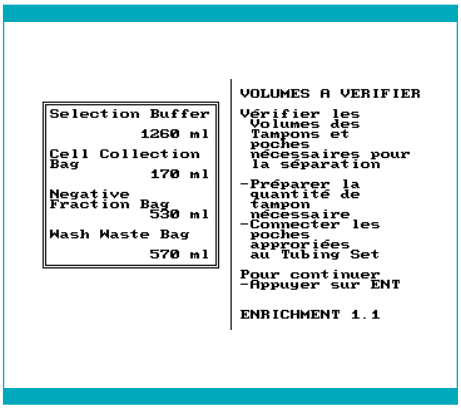
Informations sur le volume

Sur la base du nombre total de cellules marquées (voir le paragraphe « Calculation »), le logiciel calcule le nombre de processus de séparation et la quantité totale de tampon nécessaires ainsi que les volumes de fluides qui seront collectés dans la Negative Fraction Bag, la Buffer Waste Bag et la Cell Collection Bag.

Les valeurs standard sont les suivantes :

- CliniMACS PBS/EDTA Buffer : 1000 mL
- Negative Fraction Bag : 500 mL
- Buffer Waste Bag : 500 mL
- Cell Collection Bag : 150 mL

Si l'une des valeurs calculées excède ces valeurs standard, l'Écran 7.11 s'affiche,indiquant la quantité de liquide qui sera nécessaire et accumulée pendant le processus de séparation. Remplacer les poches fournies avec le jeu de tubulures (capacité d'environ 500 mL) par d'autres poches de taille appropriée, si nécessaire. Les poches d'origine sur le jeu de tubulures sont branchées par des raccords Luer. Les poches qui remplacent les poches d'origine doivent posséder un raccord Luer femelle. Les poches standard peuvent être raccordées par un Luer/Spike Interconnector.



Écran 7.11 : Vérifier les volumes

1. Vérifier que la quantité de tampon nécessaire est disponible. Ne pas accrocher plus de trois litres de tampon au support de poche.

   AVIS

   Risque d'endommagement de l'instrument. La surcharge des supports de poche risque d'endommager l'instrument. La capacité de charge d'un seul support de poche est de 3 kg. Ne pas surcharger les supports de poche.

2. Ouvrir l'emballage du jeu de tubulures dans des conditions stériles et remplacer les poches d'origine par des poches plus grandes si nécessaire. Vérifier le bon écoulement vers les poches.
3. Raccorder une Cell Collection Bag de taille suffisante au raccord Luer libre. Si cela n'est pas spécifié sur Écran 7.11, le volume maximal d'élution de la fraction cellulaire cible est de 150 mL. S'assurer que l'écoulement vers la Cell Collection Bag est possible sans restriction.

IMPORTANT

- *S'assurer que la quantité de tampon nécessaire est disponible et que le volume des poches affiché sur l'Écran 7.11 est suffisant. Autrement, les performances de la séparation seront compromises.*
- *Toute modification sur les jeux de tubulures CliniMACS doit être effectuée dans des conditions stériles, par ex. sous hotte à flux laminaire.*
- *Pour une analyse ou un traitement cellulaire complémentaire, noter que les volumes indiqués sur l'Écran 7.11 ne sont pas les volumes exacts mais des volumes répondant aux conditions de sécurité.*

4. Vérifier les raccords Luer Lock au niveau des colonnes. Les raccords Luer Lock doivent être fermés hermétiquement.

Pour continuer, appuyer sur **ENT**.

Le programme continue automatiquement avec les instructions pour installer le jeu de tubulures sur l'instrument.

▶ **Passer à l'ÉTAPE 3.**

7.2.4 ENRICHMENT 3.2

IMPORTANT

- *Le programme de séparation ENRICHMENT 3.2 doit être utilisé uniquement avec le CliniMACS Tubing Set (REF 161-01).*
- *L'écran affiche des instructions et diagrammes qui serviront de guide pour les procédures. Effectuer et vérifier chaque étape selon les instructions du manuel d'utilisation avant de passer à l'étape suivante. Pour corriger une erreur lors de la saisie des données, appuyer sur « Annuler » (voir le paragraphe « Description » du manuel d'utilisation du CliniMACS Plus Instrument).*

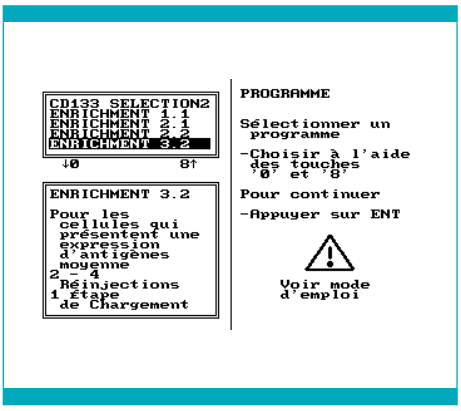
Sélectionner le programme de séparation ENRICHMENT 3.2

L'Écran 7.12 s'affiche.

Sélectionner ENRICHMENT 3.2.

Sélectionner le programme de séparation en surlignant le nom du programme avec la barre noire. Déplacer la barre vers le haut et vers le bas en utilisant les touches **8** et **0**.

Pour continuer avec le programme surligné, appuyer sur **ENT**.



Écran 7.12 : Sélection du programme de séparation

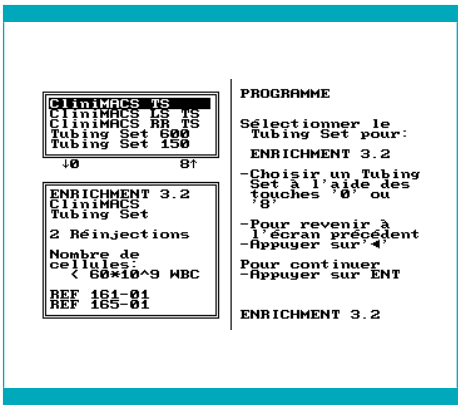
Sélectionner le jeu de tubulures

L'Écran 7.13 s'affiche.

Confirmer que le bon programme a été sélectionné. Pour annuler, appuyer sur ◄ pour retourner à l'étape précédente afin de modifier la sélection faite.

Sélectionner le jeu de tubulures en le surlignant avec la barre noire dans le cadre en haut à gauche. Déplacer la barre vers le haut et vers le bas en utilisant les touches **8** et **0**.

La fenêtre ci-dessous affiche les données correspondantes, telles que la capacité et la référence catalogue (REF) du jeu de tubulures sélectionné.



Écran 7.13 : Sélection du jeu de tubulures

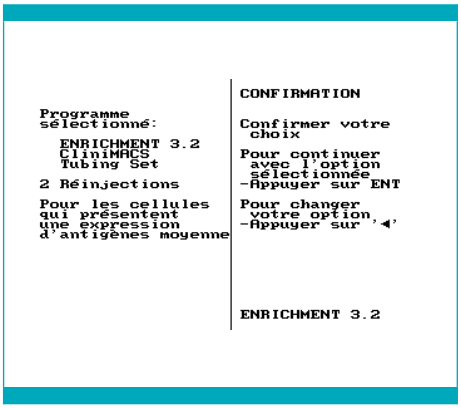
Pour continuer avec la combinaison sélectionnée de programme de séparation et de jeu de tubulures, appuyer sur **ENT**.

Confirmation

L'Écran 7.14 s'affiche.

Pour confirmer la combinaison de programme de séparation et de jeu de tubulures, appuyer sur **ENT**.

Pour annuler, appuyer sur ◄ pour retourner à l'étape précédente afin de modifier la sélection faite.



Écran 7.14 : Confirmation

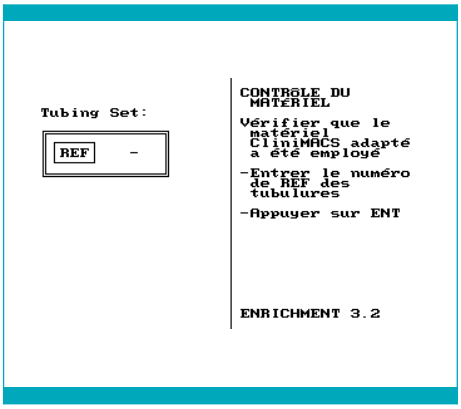
Contrôle du matériel

L'Écran 7.15 s'affiche.

La demande de saisie de la référence catalogue (REF) du jeu de tubulures sert de contrôle de sécurité pour garantir que le jeu de tubulures sélectionné peut être utilisé avec le programme préalablement choisi.

Saisir la référence catalogue du jeu de tubulures sélectionné et appuyer sur **ENT** pour continuer.

Si une référence de catalogue incorrecte a été saisie, un message apparaît.



Écran 7.15 : Contrôle du matériel

Pour confirmer, appuyer sur **ENT** et saisir la référence catalogue correcte. Si la référence saisie est toujours incorrecte, le message apparaît une deuxième fois. Après avoir appuyé sur **ENT**, l'écran retourne au menu des programmes (voir Écran 7.12).

Si le contrôle du matériel a été effectué avec succès, le programme continue automatiquement avec les instructions pour installer le jeu de tubulures.

▶ **Passer à l'ÉTAPE 3.**

7.2.5 DEPLETION 2.1

IMPORTANT

- *Le programme de séparation DEPLETION 2.1 doit être utilisé uniquement avec le CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01).*
- *L'écran affiche des instructions et diagrammes qui serviront de guide pour les procédures. Effectuer et vérifier chaque étape selon les instructions du manuel d'utilisation avant de passer à l'étape suivante. Pour corriger une erreur lors de la saisie des données, appuyer sur « Annuler » (voir le paragraphe « Description » du manuel d'utilisation du CliniMACS Plus Instrument).*

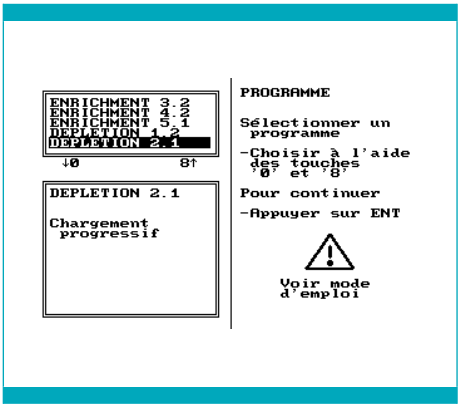
Sélectionner le programme de séparation DEPLETION 2.1

L'Écran 7.16 s'affiche.

Sélectionner DEPLETION 2.1.

Sélectionner le programme de séparation en surlignant le nom du programme avec la barre noire. Déplacer la barre vers le haut et vers le bas en utilisant les touches **8** et **0**.

Pour continuer avec le programme surligné, appuyer sur **ENT**.



Écran 7.16 : Sélection du programme de séparation

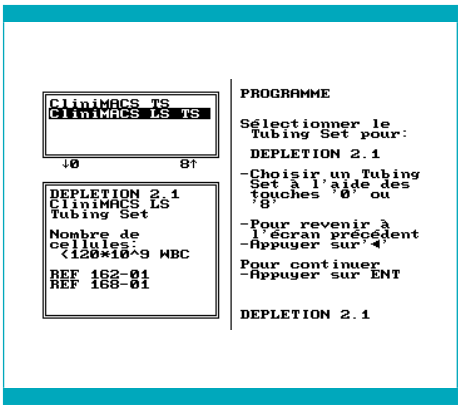
Sélectionner le jeu de tubulures

L'Écran 7.17 s'affiche.

Confirmer que le bon programme a été sélectionné.

Pour annuler, appuyer sur ◄ pour retourner à l'étape précédente afin de modifier la sélection faite.

Sélectionner le jeu de tubulures en le surlignant avec la barre noire dans le cadre en haut à gauche. Déplacer la barre vers le haut et vers le bas en utilisant les touches **8** et **0**.



Écran 7.17 : Sélection du jeu de tubulures

La fenêtre ci-dessous affiche les données correspondantes, telles que la capacité et la référence catalogue (REF) du jeu de tubulures sélectionné.

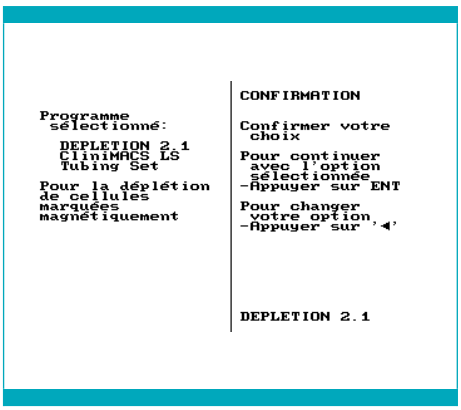
Pour continuer avec la combinaison sélectionnée de programme de séparation et de jeu de tubulures, appuyer sur **ENT**.

Confirmation

L'Écran 7.18 s'affiche.

Pour confirmer la combinaison de programme de séparation et de jeu de tubulures, appuyer sur **ENT**.

Pour annuler, appuyer sur ◄ pour retourner à l'étape précédente afin de modifier la sélection faite.



Écran 7.18 : Confirmation

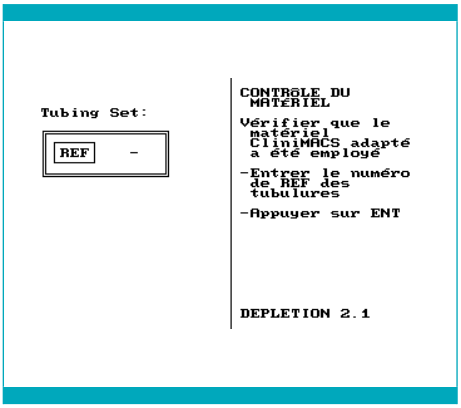
Contrôle du matériel

L'Écran 7.19 s'affiche.

La demande de saisie de la référence catalogue (REF) du jeu de tubulures sert de contrôle de sécurité pour garantir que le jeu de tubulures sélectionné par l'opérateur peut être utilisé.

Saisir la référence catalogue du jeu de tubulures sélectionné et appuyer sur ENT pour continuer.

Si une référence catalogue incorrecte a été saisie, un message apparaît.



Écran 7.19 : Contrôle du matériel

Pour confirmer, appuyer sur ENT et saisir la référence catalogue correcte. Si la référence saisie est toujours incorrecte, le message apparaît une deuxième fois. Après avoir appuyé sur ENT, l'écran retourne au menu du programme (voir ÉcÉcran 7.16).

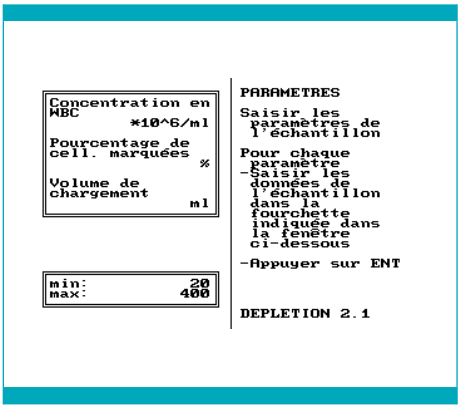
Saisir les paramètres de l'échantillon

Si le contrôle du matériel a été effectué avec succès, le programme continue automatiquement avec la demande des paramètres de l'échantillon qui sont nécessaires pour ajuster la séparation à chaque échantillon individuel et pour fournir à l'opérateur d'importantes informations sur les volumes de tampon et de poche nécessaires.

L'Écran 7.20 s'affiche.

1. Commencer par saisir la concentration en globules blancs (WBC) de l'échantillon. La plage de valeurs autorisées est indiquée dans le cadre en bas à gauche. Appuyer sur ◀ pour corriger une saisie incorrecte.

   S'assurer que la valeur saisie correspond à la valeur de l'échantillon. Sinon, le traitement de l'échantillon risque de ne pas être optimal.



Écran 7.20 : Saisir les paramètres de l'échantillon

IMPORTANT

Tous les paramètres de l'échantillon requis se réfèrent à la procédure de postmarquage et de lavage des cellules. La plage de valeurs autorisées indiquée dans le cadre en bas à gauche prend toujours en compte la saisie précédente. Après chaque saisie, le logiciel calcule et ajuste la plage de valeurs acceptées pour la saisie suivante.

⚠ ATTENTION

La saisie de mauvais paramètres peut entraîner un traitement de l'échantillon non optimal et donc augmenter le risque de perte de cellules cibles. Des valeurs de concentration de WBC et/ou de pourcentage de cellules marquées inférieures aux valeurs réelles de l'échantillon peuvent provoquer la perte de cellules due à une surcharge du système. La saisie d'un volume d'échantillon inférieur peut provoquer une perte de cellules due à une surcharge ou même un traitement incomplet de l'échantillon. Une valeur trop élevée de l'un des trois paramètres provoque une augmentation du temps de traitement et du volume de la fraction de cellules cibles. Veiller à toujours saisir les bons paramètres.

Pour continuer avec la saisie suivante, appuyer sur **ENT**.

2. Saisir le pourcentage des cellules marquées. S'assurer que la valeur saisie correspond à la valeur de l'échantillon. Sinon, le traitement de l'échantillon risque de ne pas être optimal (voir « Important »).

   Pour passer à la saisie suivante, appuyer sur **ENT**

.3. Saisir le volume final de l'échantillon de cellules. S'assurer que la valeur saisie correspond à la valeur de l'échantillon. Sinon, le traitement de l'échantillon risque de ne pas être optimal (voir « Important »).

Pour continuer, appuyer sur **ENT**.

Calcul

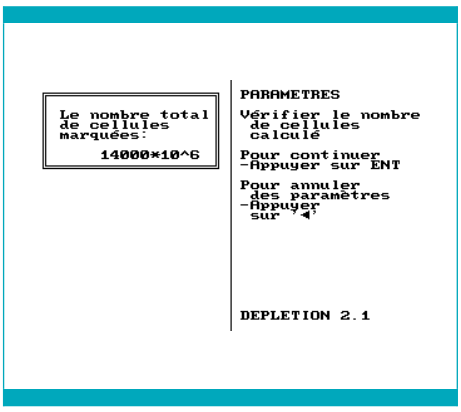
Le logiciel CliniMACS Plus calcule le nombre total de cellules marquées afin de vérifier si la capacité du processus de séparation est suffisante.

Le résultat est indiqué sur l'un des deux écrans possibles :

- Le résultat du calcul apparaît sur un écran semblable à l'Écran 7.21. S'assurer que le nombre calculé de cellules marquées est correct.

  Pour continuer, appuyer sur **ENT**.

  Une correction des données est possible. Appuyer sur ◄ pour retourner à l'écran précédent afin de faire la correction.

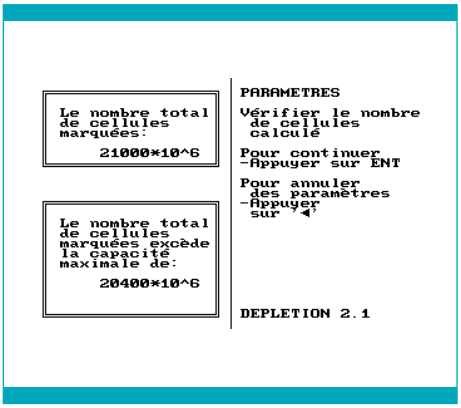


Écran 7.21 : Calcul

- Si le nombre calculé de cellules marquées dépasse la capacité de séparation du système CliniMACS Plus, un écran semblable à l'Écran 7.22 s'affiche. S'assurer que les paramètres de l'échantillon saisis et le nombre de cellules calculé sont corrects. Appuyer sur ◄ pour retourner à l'écran précédent pour corriger les paramètres de l'échantillon.

  Pour éviter de surcharger le système, diviser l'échantillon et déterminer le volume de chaque fraction. Appuyer sur ◄ pour retourner à l'Écran 7.20. Saisir les paramètres de l'échantillon pour la première aliquote et continuer avec la séparation de cette fraction. Une fois la séparation terminée, commencer une deuxième séparation avec la deuxième aliquote en utilisant un nouveau jeu de tubulures.

  Pour continuer, appuyer sur **ENT**.



Écran 7.22 : Calcul : Le nombre de cellules dépasse la capacité de séparation

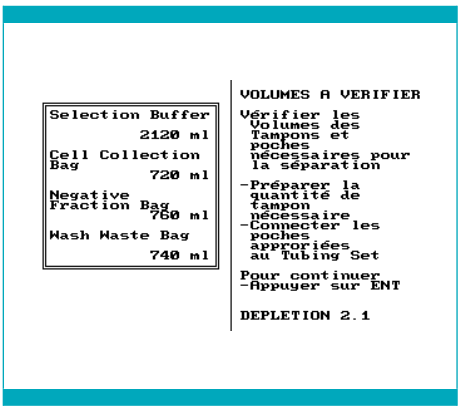
Informations sur le volume

Sur la base du nombre total de cellules marquées (voir le paragraphe « Calculation »), le logiciel calcule le nombre de processus de séparation et la quantité totale de tampon nécessaires ainsi que les volumes de fluides qui seront collectés dans la Negative Fraction Bag, la Buffer Waste Bag et la Cell Collection Bag.

Les valeurs standard sont les suivantes :

- CliniMACS PBS/EDTA Buffer 1000 mL
- Negative Fraction Bag 500 mL
- Buffer Waste Bag 500 mL
- Cell Collection Bag 150 mL

Si l'une des valeurs calculées excède ces valeurs standard, l'Écran 7.23 s'affiche, indiquant la quantité de liquide qui sera nécessaire et accumulée pendant le processus de séparation. Remplacer les poches fournies avec le jeu de tubulures (capacité d'environ 500 mL) par d'autres poches de taille appropriée, si nécessaire. Les poches d'origine sur le jeu de tubulures sont branchées avec des raccords Luer. Les poches qui remplacent les poches d'origine doivent posséder un raccord Luer femelle. Les poches standard peuvent être raccordées par un Luer/Spike Interconnector.



Écran 7.23 : Vérifier les volumes

1. Vérifier que la quantité de tampon nécessaire est disponible. Ne pas accrocher plus de trois litres de tampon au support de poche.

   AVIS

   Risque d'endommagement de l'instrument. La surcharge des supports de poche risque d'endommager l'instrument. La capacité de charge d'un seul support de poche est de 3 kg. Ne pas surcharger les supports de poche.

2. Ouvrir l'emballage du jeu de tubulures dans des conditions stériles et remplacer les poches d'origine par des poches plus grandes si nécessaire. Vérifier le bon écoulement vers les poches.

3. Raccorder une Cell Collection Bag de taille suffisante au raccord Luer libre. Si cela n'est pas spécifié sur l'Écran 7.23, le volume maximal d'élution de la fraction cellulaire cible est de 150 mL. S'assurer que l'écoulement vers la Cell Collection Bag est possible sans restriction.

IMPORTANT

- *S'assurer que la quantité de tampon nécessaire est disponible et que le volume des poches affiché sur l'Écran 7.23 est suffisant. Autrement, les performances de la séparation seront compromises.*
- *Toute modification sur les jeux de tubulures CliniMACS doit être effectuée dans des conditions stériles, par ex. sous hotte à flux laminaire.*
- *Pour une analyse ou un traitement cellulaire complémentaire, noter que les volumes indiqués sur l'Écran 7.23 ne sont pas les volumes exacts mais des volumes répondant aux conditions de sécurité.*

4. Vérifier les raccords Luer Lock au niveau des colonnes. Les raccords Luer Lock doivent être fermés hermétiquement.

Pour continuer, appuyer sur **ENT**.

Le programme continue automatiquement avec les instructions pour installer le jeu de tubulures sur l'instrument.

▶ **Passer à l'ÉTAPE 3.**

7.2.6 DEPLETION 3.1

IMPORTANT

- *Le programme de séparation DEPLETION 3.1 doit être utilisé uniquement avec le CliniMACS Depletion Tubing Set (REF 261-01).*
- *L'écran affiche des instructions et diagrammes qui serviront de guide pour les procédures. Effectuer et vérifier chaque étape selon les instructions du manuel d'utilisation avant de passer à l'étape suivante. Pour corriger une erreur lors de la saisie des données, appuyer sur « Annuler » (voir le paragraphe « Description » du manuel d'utilisation du CliniMACS Plus Instrument).*

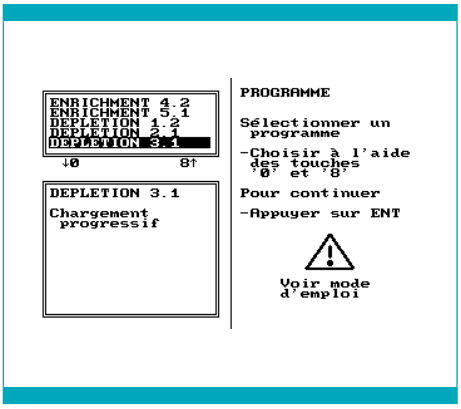
Sélectionner le programme de séparation DEPLETION 3.1

L'Écran 7.24 s'affiche.

Sélectionner DEPLETION 3.1.

Sélectionner le programme de séparation en surlignant le nom du programme avec la barre noire. Déplacer la barre vers le haut et vers le bas en utilisant les touches **8** et **0**.

Pour continuer avec le programme surligné, appuyer sur **ENT**.



Écran 7.24 : Sélection du programme de séparation

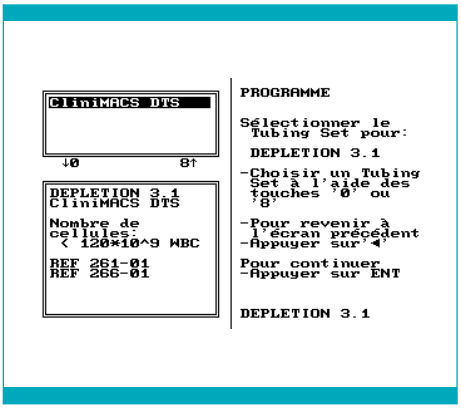
Sélectionner le jeu de tubulures

L'Écran 7.25 s'affiche.

Confirmer que le bon programme a été sélectionné. Pour annuler, appuyer sur ◄ pour retourner à l'étape précédente afin de modifier la sélection faite.

Sélectionner le jeu de tubulures en le surlignant avec la barre noire dans le cadre en haut à gauche. Déplacer la barre vers le haut et vers le bas en utilisant les touches **8** et **0**.

La fenêtre ci-contre affiche les données correspondantes, telles que la capacité et la référence catalogue (REF) du jeu de tubulures sélectionné.



Écran 7.25 : Sélection du jeu de tubulures

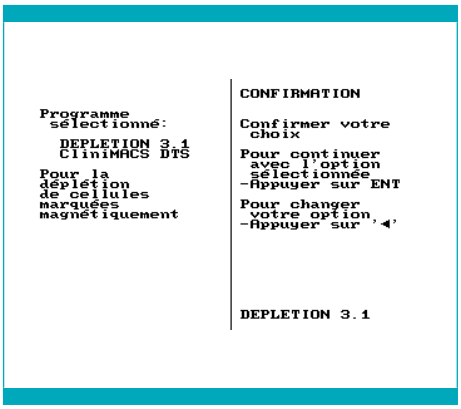
Pour continuer avec la combinaison sélectionnée de programme de séparation et de jeu de tubulures, appuyer sur **ENT**.

Confirmation

L'Écran 7.26 s'affiche.

Pour confirmer la combinaison de programme de séparation et de jeu de tubulures, appuyer sur ENT.

Pour annuler, appuyer sur ◄ pour retourner à l'étape précédente afin de modifier la sélection faite.



Écran 7.26 : Confirmation

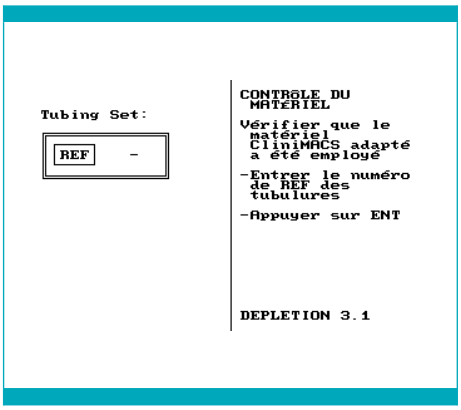
Contrôle du matériel

L'Écran 7.27 s'affiche.

La demande de saisie de la référence catalogue (REF) du jeu de tubulures sert de contrôle de sécurité pour garantir que le jeu de tubulures sélectionné par l'opérateur peut être utilisé.

Saisir la référence catalogue (REF) du jeu de tubulures sélectionné et appuyer sur ENT pour continuer.

Si une référence de catalogue incorrecte a été saisie, un message apparaît.



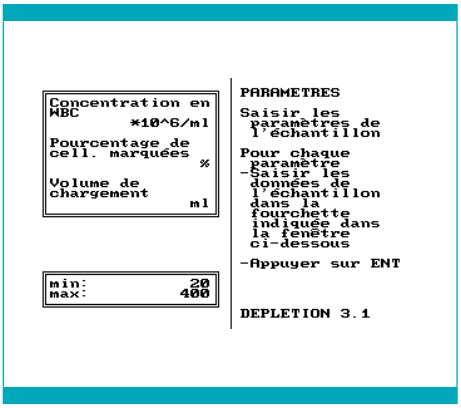
Écran 7.27 : Contrôle du matériel

Pour confirmer, appuyer sur ENT et saisir la référence catalogue correcte. Si la référence saisie est toujours incorrecte, le message apparaît une deuxième fois. Après avoir appuyé sur ENT le programme retourne au menu du programme (voir ÉcÉcran 7.25).

Saisir les paramètres de l'échantillon

Si le contrôle du matériel a été effectué avec succès, le programme continue automatiquement avec la demande des paramètres de l'échantillon qui sont nécessaires pour ajuster la séparation à chaque échantillon individuel et pour fournir à l'opérateur d'importantes informations sur les volumes de tampon et de poche nécessaires.

L'Écran 7.28 s'affiche.



Écran 7.28 : Saisir les paramètres de l'échantillon

1. Commencer par saisir la concentration en globules blancs (WBC) de l'échantillon. La plage de valeurs autorisées est indiquée dans le cadre en bas à gauche. Appuyer sur ◀ pour corriger une saisie incorrecte.

   S'assurer que la valeur saisie correspond à la valeur de l'échantillon. Sinon, le traitement de l'échantillon risque de ne pas être optimal.

   IMPORTANT
   Tous les paramètres de l'échantillon requis se réfèrent à la procédure de postmarquage et de lavage des cellules. La plage de valeurs autorisées indiquée dans le cadre en bas à gauche prend toujours en compte la saisie précédente. Après chaque saisie, le logiciel calcule et ajuste la plage de valeurs acceptées pour la saisie suivante.

   ⚠ ATTENTION

   La saisie de mauvais paramètres peut entraîner un traitement de l'échantillon non optimal et donc augmenter le risque de perte de cellules cibles. Des valeurs de concentration de WBC et/ou de pourcentage de cellules marquées inférieures aux valeurs réelles de l'échantillon peuvent provoquer la perte de cellules due à une surcharge du système. La saisie d'un volume d'échantillon inférieur peut provoquer une perte de cellules due à une surcharge ou même un traitement incomplet de l'échantillon. Une valeur trop élevée de l'un des trois paramètres provoque une augmentation du temps de traitement et du volume de la fraction de cellules cibles. Veiller à toujours saisir les bons paramètres.

   Pour continuer avec la saisie suivante, appuyer sur **ENT**.

2. Saisir le pourcentage des cellules marquées. S'assurer que la valeur saisie correspond à la valeur de l'échantillon. Sinon, le traitement de l'échantillon risque de ne pas être optimal (voir « Important »).

   Pour passer à la saisie suivante, appuyer sur **ENT**.

3. Saisir le volume final de l'échantillon de cellules. S'assurer que la valeur saisie correspond à la valeur de l'échantillon. Sinon, le traitement de l'échantillon risque de ne pas être optimal (voir « Important »).

Pour continuer, appuyer sur **ENT**.

Calcul

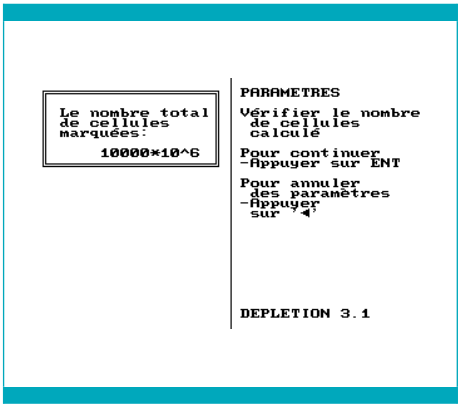
Le logiciel CliniMACS Plus calcule le nombre total de cellules marquées afin de vérifier si la capacité du processus de séparation est suffisante.

Le résultat est indiqué sur l'un de ces deux écrans possibles :

- Le résultat du calcul apparaît sur un écran semblable à l'Écran 7.29. S'assurer que le nombre calculé de cellules marquées est correct.

  Pour continuer, appuyer sur **ENT**.

  Une correction des données est possible. Appuyer sur ◄ pour retourner à l'écran précédent afin de faire la correction.

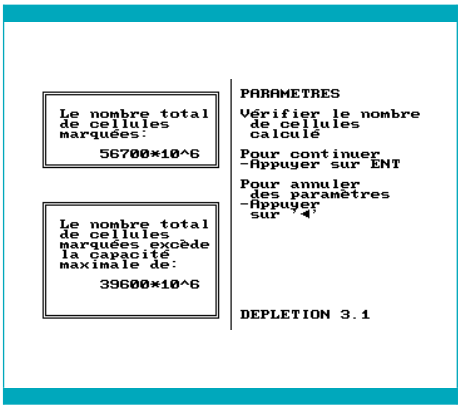


Écran 7.29 : Sélection du jeu de tubulures

- Si le nombre calculé de cellules marquées dépasse la capacité de séparation du système CliniMACS Plus, un écran semblable à l'Écran 7.29 s'affiche. S'assurer que les paramètres de l'échantillon saisis et le nombre de cellules calculé sont corrects. Appuyer sur ◄ pour retourner à l'écran précédent pour corriger les paramètres de l'échantillon.

  Pour éviter de surcharger le système, diviser l'échantillon et déterminer le volume de chaque fraction. Appuyer sur ◄ pour retourner à l'Écran 7.28. Saisir les paramètres de l'échantillon pour la première aliquote et continuer avec la séparation de cette fraction. Une fois la séparation terminée, commencer une deuxième séparation avec la deuxième aliquote en utilisant un nouveau jeu de tubulures.

  Pour continuer, appuyer sur **ENT**.



Écran 7.30 : Calcul : Le nombre de cellules dépasse la capacité de séparation

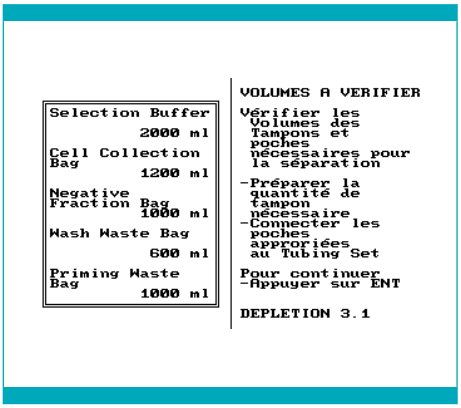
Informations sur le volume

Sur la base du nombre total de cellules marquées (voir le paragraphe « Calculation »), le logiciel calcule le nombre de cycles de séparation et la quantité totale de tampon nécessaires au processus de déplétion ainsi que les volumes des fluides qui seront collectés dans la Cell Collection Bag, la Non-Target Cell Bag et la Reapplication Bag.

IMPORTANT

- *La Negative Fraction Bag correspond à la Non-Target Cell Bag.*
- *La Priming Waste Bag correspond à la Reapplication Bag.*

Si l'une de ces valeurs calculées excède les valeurs standard, un écran semblable à l'Écran 7.31 s'affiche, indiquant la quantité de liquide qui sera nécessaire et accumulée pendant le processus de séparation. Remplacer les poches fournies avec le jeu de tubulures par d'autres poches de taille appropriée, si nécessaire. Les poches d'origine sur le jeu de tubulures sont branchées avec des raccords Luer. Les poches qui remplacent les poches d'origine doivent posséder un raccord Luer femelle. Les poches standard peuvent être raccordées par un Luer/Spike Interconnector.



Écran 7.31 : Vérifier les volumes

1. Vérifier que la quantité de tampon nécessaire est disponible. Ne pas accrocher plus de trois litres de tampon au support de poche.

   AVIS

   Risque d'endommagement de l'instrument. La surcharge des supports de poche risque d'endommager l'instrument. La capacité de charge d'un seul support de poche est de 3 kg. Ne pas surcharger les supports de poche.

2. Ouvrir l'emballage du jeu de tubulures dans des conditions stériles et remplacer les poches d'origine par des poches plus grandes si nécessaire. Vérifier le bon écoulement vers les poches.

3. Si un remplacement est nécessaire, remplacer la Cell Collection Bag du jeu de tubulures par une poche de transfert de taille suffisante. Déterminer le poids de la nouvelle Cell Collection Bag vide et le noter. S'assurer que l'écoulement vers la Cell Collection Bag est possible sans restriction. Alternativement, raccorder une poche de transfert supplémentaire de 600 mL à la première Cell Collection Bag, par ex. en utilisant un set de transfert de plasma.

IMPORTANT

- *S'assurer que la quantité de tampon nécessaire est disponible et que le volume des poches affiché sur l'Écran 7.31 est suffisant. Autrement, les performances de la séparation seront compromises.*
- *Toute modification sur les jeux de tubulures CliniMACS doit être effectuée dans des conditions stériles, par ex. sous hotte à flux laminaire.*
- *Pour une analyse ou un traitement cellulaire complémentaire, noter que les volumes indiqués sur l'Écran 7.31 ne sont pas les volumes exacts mais des volumes répondant aux conditions de sécurité.*

4. Vérifier les raccords Luer Lock au niveau des colonnes. Les raccords Luer Lock doivent être fermés hermétiquement.

Pour continuer, appuyer sur **ENT**.

Le programme continue automatiquement avec les instructions d'installation du jeu de tubulures sur l'instrument.

▶ **Passer à l'ÉTAPE 3.**

7.3 ÉTAPE 3 : Installation des jeux de tubulures CliniMACS

7.3.1 CliniMACS Tubing Set et CliniMACS Tubing Set LS

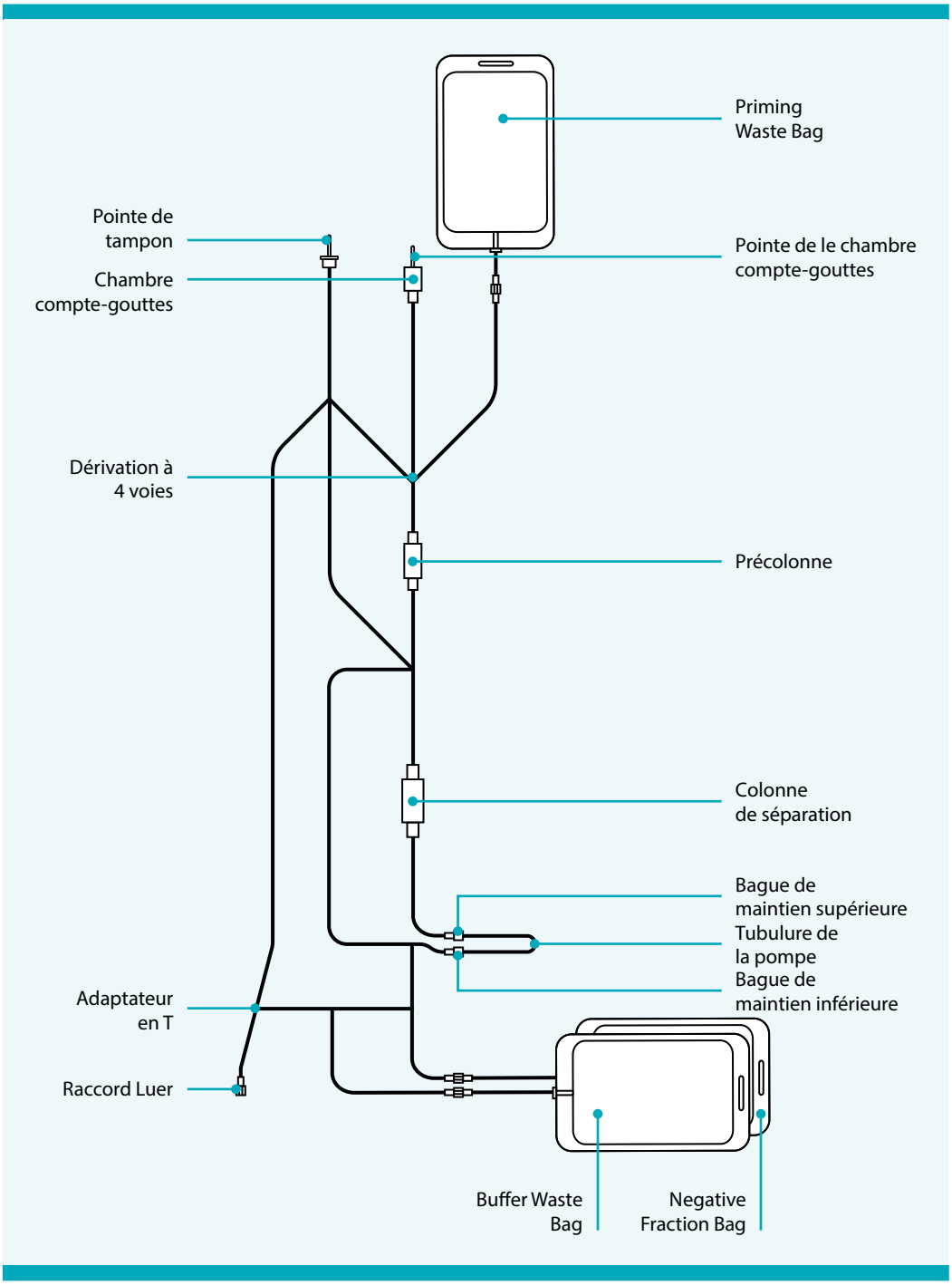
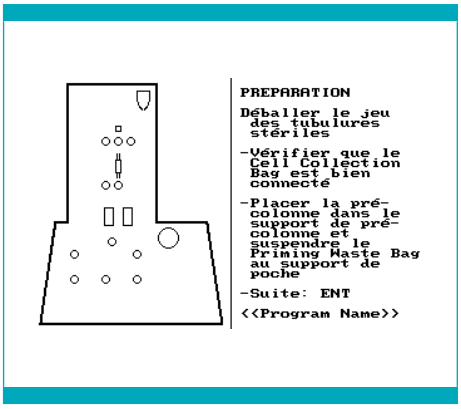


Figure 7.2 : Construction générale d'un jeu de tubulures CliniMACS (par ex., CliniMACS Tubing Set)

Préparation pour l'installation du jeu de tubulures

L'Écran 7.32 s'affiche.



Écran 7.32 : Déballer le jeu de tubulures

Les instructions se trouvent sur la droite et un diagramme correspondant aux instructions s'affiche sur la gauche. Les éléments clignotants sur l'écran indiquent les zones d'attention.

Le CliniMACS Tubing Set et le CliniMACS Tubing Set LS sont tous deux fournis dans des emballages scellés et stérilisés. Chaque jeu de tubulures contient une tubulure et des colonnes pré-assemblés pour une seule séparation cellulaire (voir Figure 7.2). Un emballage intact assure un flux de fluide stérile.

⚠ AVERTISSEMENT

Risque de contamination. Un emballage endommagé signifie que le jeu de tubulures peut ne plus être stérile et ne doit donc pas être utilisé. Inspecter attentivement l'emballage pour vérifier qu'il n'est pas endommagé, percé ou déchiré. Utiliser le jeu de tubulures uniquement si l'emballage est intact et scellé.

Remarque : Le CliniMACS Plus Instrument affiche le nom du programme sélectionné, par ex. CD34 SELECTION 1, sur la ligne inférieure de l'écran de l'instrument. Pendant l'installation du jeu de tubulures, l'opérateur peut à tout moment appuyer sur « Annuler » (voir le paragraphe « Description » du manuel d'utilisation du CliniMACS Plus Instrument) pour revenir à l'étape précédente.

1. Noter le numéro de lot et la date de péremption du jeu de tubulures.

   Déballer le jeu de tubulures stérile dans des conditions stériles (par ex. sous hotte à flux laminaire). Retirer la pince utilisée pour fixer le CliniMACS Tubing Set LS sur l'emballage avant d'utiliser le jeu de tubulures. La pince est pourvue d'une étiquette libellée « Remove before assembly to CliniMACS Plus Instrument ».

2. Vérifier les raccords Luer Lock au niveau des poches. Les raccords Luer Lock doivent être fermés hermétiquement.

Raccorder la Cell Collection Bag

1. Noter le poids de la Cell Collection Bag vide.
2. Dans un environnement aseptique, retirer les capuchons et raccorder la Cell Collection Bag stérile, équipée d'un Luer/Spike Interconnector, au jeu de tubulures avant de monter le jeu de tubulures sur le CliniMACS Plus Instrument. S'assurer que la tubulure d'origine de la Cell Collection Bag est clampée ou scellée.

   S'il faut plus d'une Cell Collection Bag pour effectuer une séparation, raccorder les poches à l'aide d'un set de transfert de plasma. S'assurer que tous les raccords sont bien fermés.
3. S'assurer que l'écoulement vers la Cell Collection Bag est possible sans restriction.
4. Continuer avec l'installation du jeu de tubulures en utilisant soit la procédure décrite ci-dessous, soit l'« Installation alternative pour jeux de tubulures CliniMACS ».

Accrocher la Priming Waste Bag et insérer la précolonne

L'Écran 7.32 s'affiche.

1. Accrocher la Priming Waste Bag au support de poche de droite de l'instrument (voir Figure 7.3).
2. Ajuster la hauteur du support de poche. Soulever ou abaisser le support pour adapter la hauteur à la taille de la Priming Waste Bag. S'assurer qu'il est positionné suffisamment haut pour éviter toute pliure importante de la tubulure qui pourrait restreindre le flux, et qu'il est suffisamment bas pour éviter toute tension importante de la tubulure et des raccords.
3. Placer la précolonne dans le support (voir Figure 7.43).

Pour continuer, appuyer sur **ENT**.

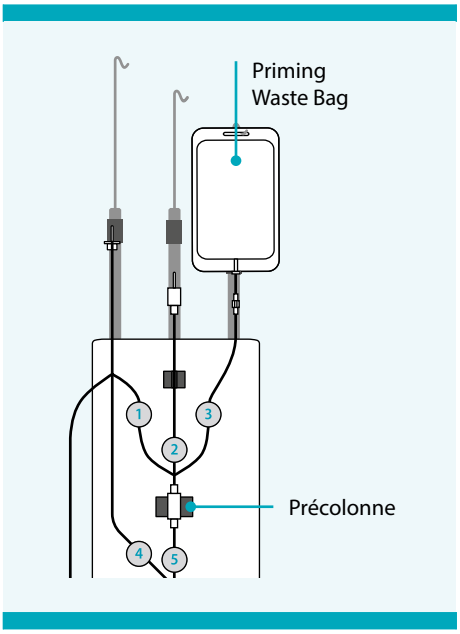


Figure 7.3 : Accrocher la Priming Waste Bag au support de poche

Insérer la colonne de séparation et la tubulure sur la valve n° 5

L'Écran 7.33 s'affiche.

Les valves indiquées en noir sur l'écran s'ouvrent automatiquement pour faciliter l'insertion de la tubulure.

1. Insérer la colonne de séparation dans le support de la colonne de séparation (voir Figure 7.4).

   ⚠ AVERTISSEMENT

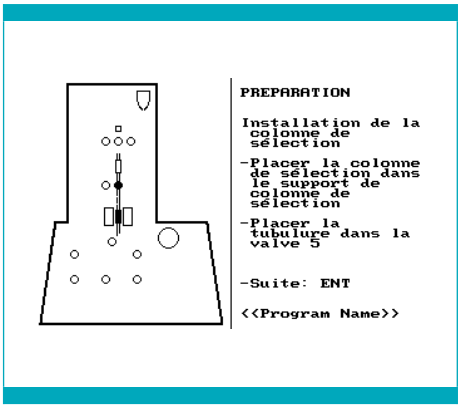
   Risque de blessures. Si la colonne de séparation est insérée ou retirée alors que l'unité magnétique est allumée, il existe un risque de blessures corporelles. Ne pas insérer ou retirer la colonne de séparation avant que l'unité magnétique ne soit éteinte.

2. Insérer la tubulure dans la valve n° 5.

IMPORTANT

- *Lors de l'exécution de chaque étape, vérifier que la tubulure et les éléments raccordés ne présentent pas de plis ou de torsions importantes qui pourraient restreindre le débit du liquide dans la tubulure. Vérifier toutes les valves pour s'assurer que la tubulure est bien ajustée.*
- *Insérer le jeu de tubulures uniquement dans les valves ouvertes (lorsque le bouton est poussé vers l'intérieur). Il n'est pas possible d'ajuster correctement la tubulure dans une valve fermée.*
- *S'il est nécessaire d'ajuster la tubulure après avoir fermé une valve, ne pas tirer sur la tubulure sans appuyer sur le bouton pour ouvrir la valve correspondante (voir Figure 7.5).*

Pour continuer, appuyer sur **ENT**.



Écran 7.33 : Insérer la colonne de séparation et charger la valve n° 5

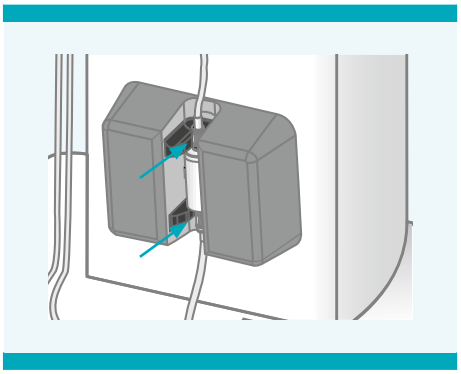


Figure 7.4 : Colonne de séparation dans le support de colonne de séparation

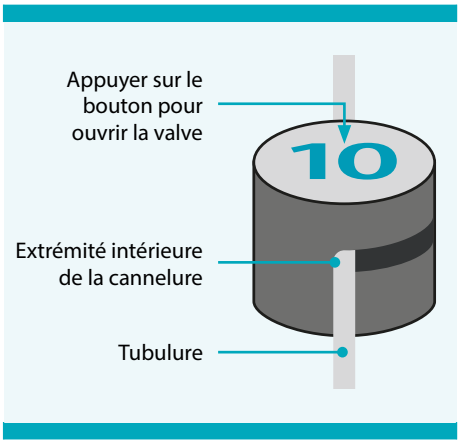
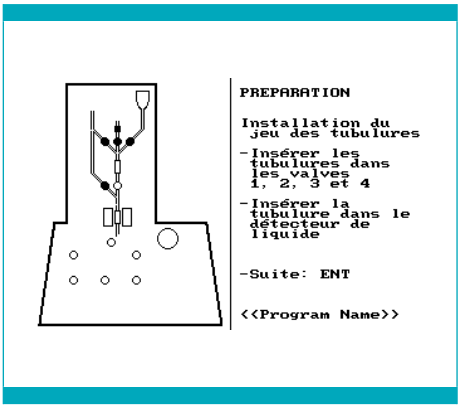


Figure 7.5 : Tubulure correctement insérée

Monter la tubulure sur les valves nos 1, 2, 3 et 4

L'Écran 7.34 s'affiche..



Écran 7.34 : Charger les valves nos 1, 2, 3, 4 et détecteur de liquide

1. Insérer la tubulure dans la valve n° 4. S'assurer que la tubulure est bien placée dans l'ouverture de la valve (voir Figure 7.5). Accorder une attention particulière à la zone située entre les valves nos 4 et 5 (voir Figure 7.6) et maintenir la dérivation à quatre voies en position verticale.
2. Insérer la tubulure dans la valve n° 1.
3. Positionner la dérivation à quatre voies sous la valve n° 2. Accorder une attention particulière à la zone située sous la valve n° 2.
4. Insérer la tubulure dans les valve nos 2 et 3.
5. Installer la tubulure entre la valve n° 2 et la chambre compte-gouttes dans le détecteur de liquide. S'assurer que la tubulure est placée correctement dans le support au niveau du détecteur de liquide.

IMPORTANT

Pour garantir un bon fonctionnement, le détecteur de liquide et la tubulure insérée doivent être secs. Inspecter les deux avec précaution. En cas de présence de liquide, sécher la zone avec un chiffon doux et non pelucheux.

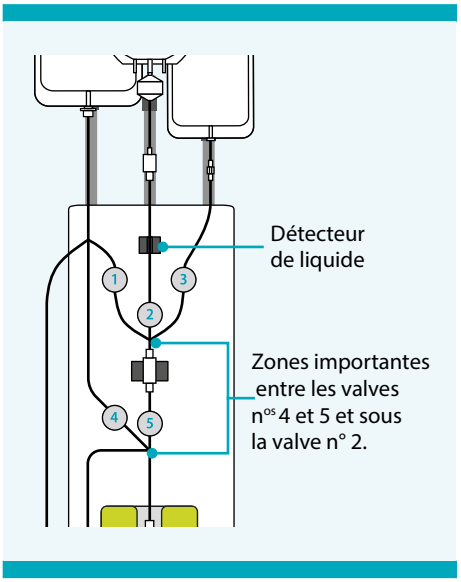
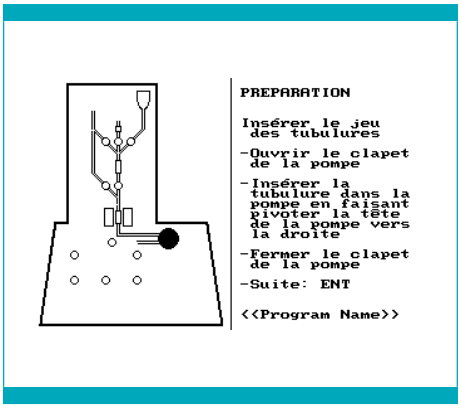


Figure 7.6 : Tubulure dans les valves

Pour continuer, appuyer sur **ENT**.

Insérer la tubulure dans la pompe

L'Écran 7.35 s'affiche.



Écran 7.35 : Insérer la tubulure dans la pompe

1. Ouvrir la porte de la pompe en la soulevant par le bord gauche.
2. Insérer la bague de maintien supérieure de la tubulure de la pompe dans la rainure de la bague de maintien située sur le cadre de la pompe (voir Figure 7.7).
3. Faire tourner la tête de la pompe dans le sens des aiguilles d'une montre jusqu'à ce que la tubulure soit enfilée entre les deux broches de guidage et que la tubulure soit bien ajustée autour de la tête de la pompe. Veiller à ce que la tubulure ne soit pas pincée à l'extrémité des broches de guidage. S'il est nécessaire d'ajuster la tubulure à l'intérieur de la pompe, la tubulure peut être retirée en soulevant l'extrémité inférieure et en tournant la tête de pompe dans le sens inverse des aiguilles d'une montre.
4. Insérer la bague de maintien inférieure de la tubulure dans la rainure de maintien située sur le cadre de la pompe.
5. Faire tourner la tête de la pompe dans le s deux sens pour vérifier que la rotation de la tête de la pompe n'est pas bloquée.
6. Fermer la porte de la pompe.

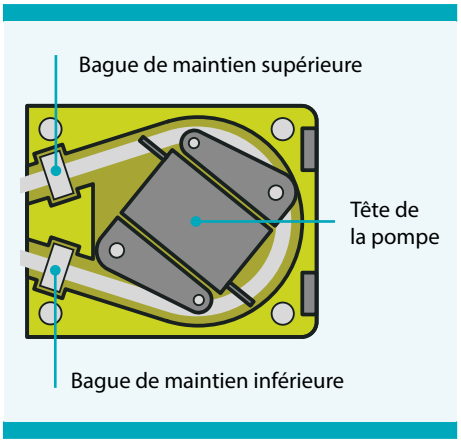


Figure 7.7 : Insérer la tubulure dans la pompe

IMPORTANT

Pendant le programme de séparation cellulaire, la pompe et avec elle, le cycle s'arrête immédiatement dès que la porte de la pompe est ouverte. Si elle reste ouverte pendant plus de 600 secondes, l'instrument abandonne le cycle en cours.

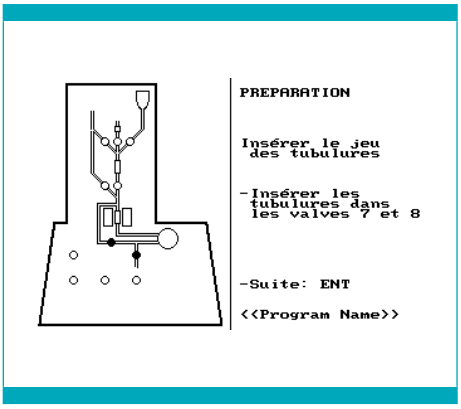
Pour continuer, appuyer sur **ENT**.

Monter la tubulure sur les valves nos 7 et 8

L'Écran 7.36 s'affiche.

1. Insérer la tubulure dans la valve n° 7.
2. Insérer la tubulure dans la valve n° 8.

Pour continuer, appuyer sur **ENT**.



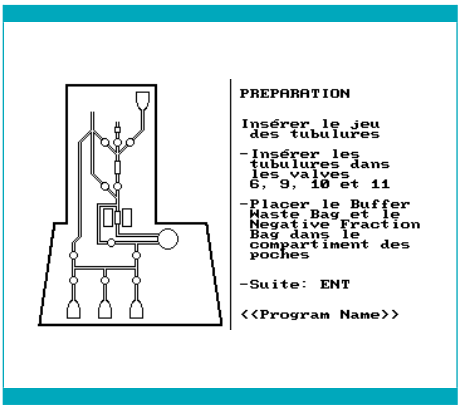
Écran 7.36 : Charger les valves nos 7 et 8

Monter la tubulure sur les valves nos 6, 9, 10 et 11

L'Écran 7.37 s'affiche.

1. Insérer la tubulure dans les valves nos 6, 9, 10 et 11.
2. Placer la Negative Fraction Bag et la Buffer Waste Bag dans le compartiment des poches. S'assurer que la tubulure n'est pas comprimée sous le couvercle du compartiment des poches.

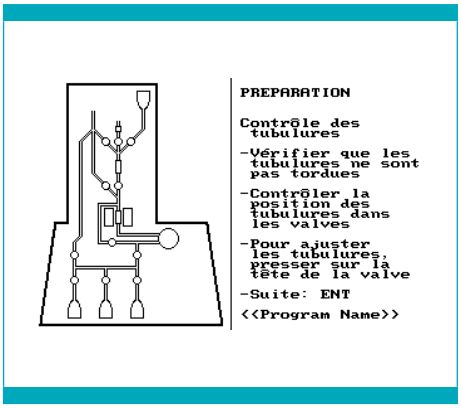
Pour continuer, appuyer sur **ENT**.



Écran 7.37 : Charger les valves nos 6, 9, 10 et 11

Vérifier à nouveau toute la tubulure et tous les éléments raccordés

L'Écran 7.38 s'affiche.



Écran 7.38 : Vérifier à nouveau toute la tubulure et tous les éléments raccordés.

Avant de commencer la séparation des cellules, vérifier à nouveau toute la tubulure et tous les éléments raccordés.

Remarque : Vérifier que toutes les tubulures sont insérées correctement dans les valves. S'assurer que le jeu de tubulures est bien réparti et qu'il n'y a pas de plis ou de zones étirées. Accorder une attention particulière au niveau de la précolonne, ainsi qu'à la zone située entre la pompe et les valves n^{os} 7 et 8 (voir Figure 7.8) et entre les valves n^{os} 4 et 5 (voir Figure 7.6). S'il est nécessaire d'ajuster la tubulure après avoir fermé une valve, ne pas tirer sur la tubulure sans appuyer sur le bouton pour ouvrir la valve correspondante. Après avoir ajusté la tubulure, il est absolument nécessaire d'appuyer fermement sur les valves à deux reprises.

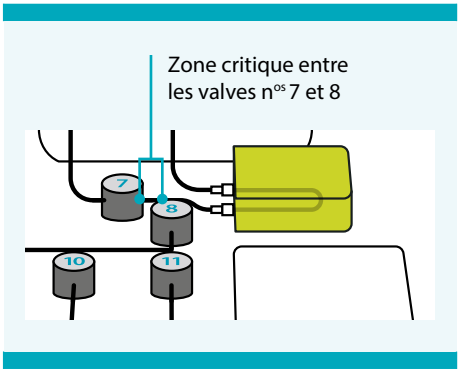
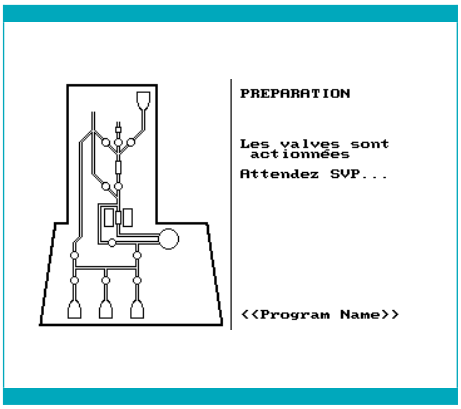


Figure 7.8 : Tubulure dans les valves

Pour continuer, appuyer sur **ENT**.

Réglage des valves

L'Écran 7.39 s'affiche.



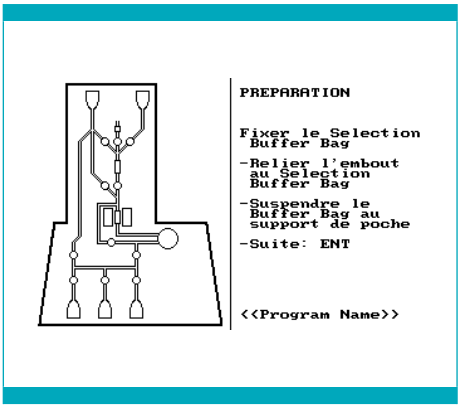
Écran 7.39 : Réglage des valves

Afin de s'assurer que la tubulure est bien placée dans les valves, l'instrument fait fonctionner toutes les valves et répète la séquence de test une deuxième fois. Observer et écouter pour s'assurer que toutes les valves fonctionnent correctement. Si l'une des valves ne fonctionne pas correctement, se référer au chapitre 8 « Guide de dépannage » à la page 217. Cette étape peut être répétée en utilisant la touche ◄ suivie de la touche **ENT** (voir le paragraphe « Description » du manuel d'utilisation du CliniMACS Plus Instrument).

Le moteur de l'aimant sera également testé pendant cette séquence de vérification.

Raccorder le CliniMACS PBS/EDTA Buffer

L'Écran 7.40 s'affiche.



Écran 7.40 : Accrocher la poche de tampon

Le tampon prescrit pour les séparations CliniMACS Plus est le CliniMACS PBS/EDTA Buffer complémenté avec de l'HSA à une concentration finale de 0,5% (p/v).

1. En utilisant des techniques aseptiques, retirer le bouchon de la pointe du tampon sur le jeu de tubulures (voir Figure 7.2 à la page 160) et raccorder la pointe à la poche de tampon. S'assurer que le septum est percé, permettant l'écoulement libre du liquide. Presser doucement la poche pour vérifier que la pointe est bien placée dans la poche.

   S'il faut plus d'un litre de tampon pour effectuer la séparation, raccorder deux poches de tampon avec un set de transfert de plasma.

2. Accrocher la poche de tampon au crochet réservé à cet effet sur le support de poche (voir Figure 7.9).

3. Ajuster la hauteur du support de la poche du tampon. Soulever ou abaisser le support pour adapter la hauteur à la taille de la poche de tampon. S'assurer qu'il est positionné suffisamment haut pour éviter toute pliure importante de la tubulure qui pourrait restreindre le flux, et qu'il est suffisamment bas pour éviter toute tension importante sur la tubulure et les raccords.

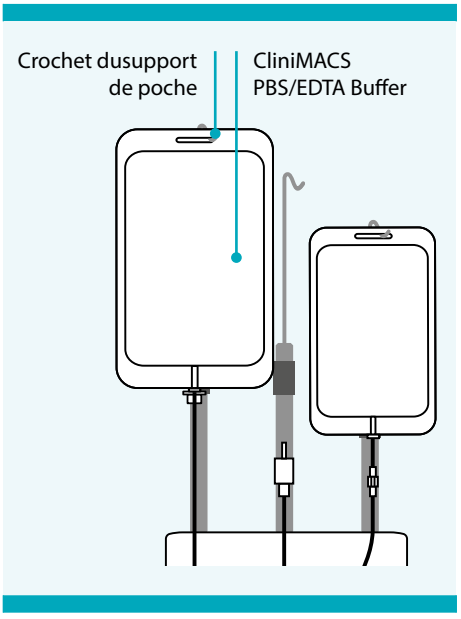


Figure 7.9 : Accrocher la poche de tampon

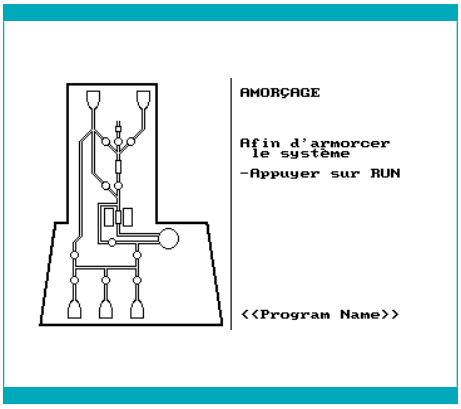
AVIS

Risque d'endommagement de l'instrument. La surcharge des supports de poche risque d'endommager l'instrument. La capacité de charge d'un seul support de poche est de 3 kg. Ne pas surcharger les supports de poche.

Pour continuer, appuyer sur **ENT**.

Démarrer l'amorçage

L'Écran 7.41 s'affiche.



Écran 7.41 : Démarrer l'amorçage

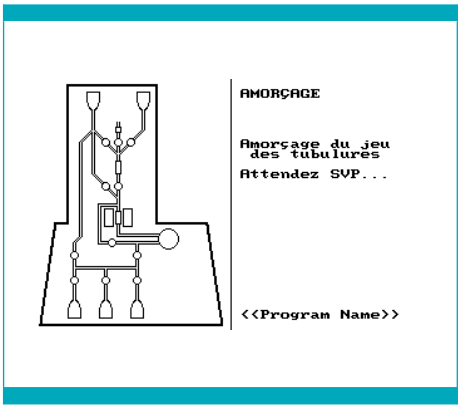
Pour démarrer l'amorçage, appuyer sur **RUN**.

L'Écran 7.42 s'affiche.

Pendant la phase d'amorçage, le jeu de tubulures se remplit de tampon. Le tampon circule dans tout le jeu de tubulures, y compris dans la précolonne et la colonne de séparation. Les déchets d'amorçage sont recueillis dans la Priming Waste Bag et la Buffer Waste Bag (voir Figure 7.2 à la page 160). Les cycles d'amorçage se poursuivront, en répétant une série d'étapes. La phase d'amorçage dure environ 1 minute. Le statut du processus d'amorçage se met à jour sur l'écran.

Vérification pendant l'amorçage

Pendant la phase d'amorçage, vérifier toute la tubulure, tous les raccords, toutes les valves et colonnes pour détecter la présence de fuites ou de plis qui pourraient bloquer le passage du fluide.



Écran 7.42 : Amorçage en cours

En cas de fuites ou de mauvais fonctionnement, appuyer sur **STOP** pour arrêter le cycle.

L'opérateur disposera de 600 secondes pour résoudre le problème.

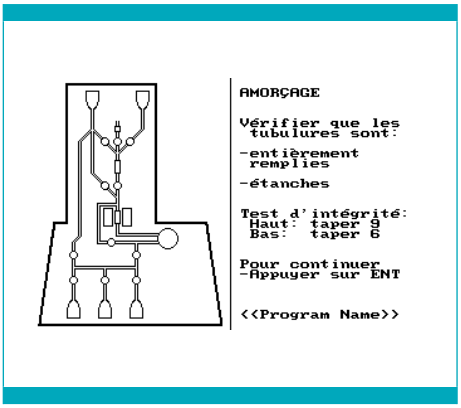
Redémarrer le processus en appuyant sur **RUN**.

Après 600 secondes, la séparation sera arrêtée.
Si l'opérateur ne peut pas résoudre le problème ou si le jeu de tubulures est défectueux, retirer le jeu de tubulures et le remplacer par un nouveau.

Remarque : Une fois l'amorçage démarré, il n'est pas possible de retourner à la procédure de configuration de l'instrument.

Vérification finale de toute la tubulure et de tous les éléments raccordés

L'Écran 7.43 s'affiche.



Écran 7.43 : Vérification finale de la tubulure

Avant de continuer avec le programme, vérifier les points suivants :

- présence de liquide dans toutes les parties du jeu de tubulures (sauf dans le préfiltre)
- absence d'air en excès dans le jeu de tubulures
- présence de liquide dans la Priming Waste Bag et la Buffer Waste Bag
- absence de liquide dans la Negative Fraction Bag ou la Cell Collection Bag

Ne pas encore appuyer sur **ENT**.

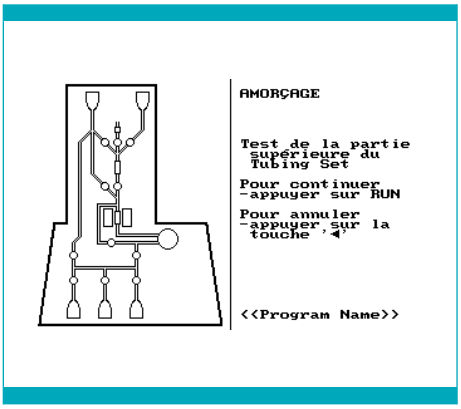
Test d'intégrité

Pour plus de sécurité, il est nécessaire d'exécuter un test d'intégrité pour vérifier l'étanchéité du jeu de tubulures. La séquence de test consiste en deux sous-séquences automatisées, qui permettent de mettre le jeu de tubulures sous pression et d'observer séparément les parties supérieure et inférieure.

Test d'intégrité pour la partie supérieure du jeu de tubulures

1. Lorsque l'opérateur effectue la « Vérification finale de toute la tubulure et de tous les éléments raccordés », la fenêtre affiche l'Écran 7.43.
2. Après avoir effectué la « Vérification finale de toute la tubulure et de tous les éléments raccordés », continuer avec l'exécution du test d'intégrité. **Ne pas encore** appuyer sur **ENT**.
3. Pour exécuter le test d'intégrité de la partie supérieure, appuyer sur **9**.

   L'Écran 7.44 s'affiche.



Écran 7.44 : Démarrage du test d'intégrité pour la partie supérieure

4. Pour démarrer la séquence de test, appuyer sur **RUN**.

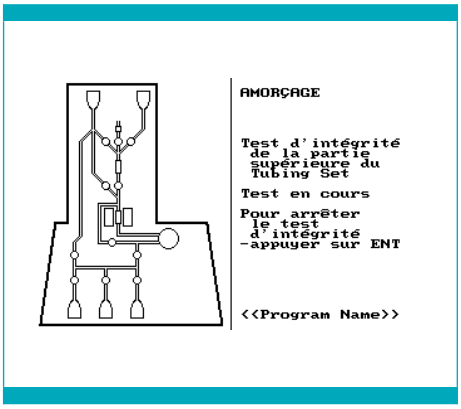
   Pour retourner à l'Écran 7.43, appuyer sur ◄.

5. Une fois la touche RUN appuyée, l'instrument lance la séquence de test automatique de la partie supérieure du jeu de tubulures.

   L'Écran 7.45 s'affiche.

   Une surpression sera créée et maintenue pendant deux minutes. Pendant ce temps, l'opérateur doit surveiller tous les raccords au-dessus du raccord supérieur de la tubulure de la pompe.

   La séquence de test peut être terminée à tout moment en appuyant sur ENT.



Écran 7.45 : Test d'intégrité pour la partie supérieure en cours

6. Après deux minutes, la pression est automatiquement libérée et l'Écran 7.43 s'affiche.

   Vérifier si des fuites se sont produites pendant la séquence de test. Si une fuite est observée au niveau de l'un des raccords du jeu de tubulures, le jeu de tubulures doit être retiré et remplacé par un nouveau jeu. Contacter Miltenyi Biotec Technical Support pour les instructions concernant le retour du jeu de tubulures défectueux.

7. Si aucune fuite n'est observée, poursuivre avec le test d'intégrité de la partie inférieure du jeu de tubulures.

Test d'intégrité pour la partie inférieure du jeu de tubulures

L'Écran 7.46 s'affiche.

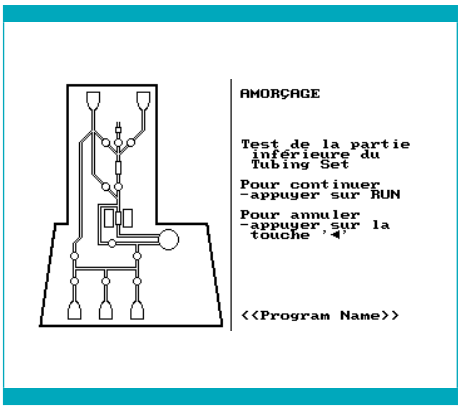
1. Pour passer au test d'intégrité de la partie inférieure, appuyer sur 6.
   Ne pas encore appuyer sur ENT.

   L'Écran 7.46 s'affiche.

2. Pour démarrer la séquence de test, appuyer sur RUN.

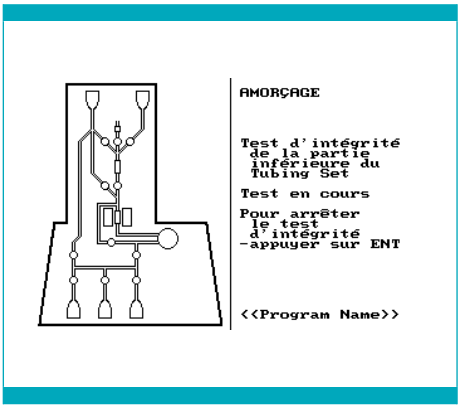
   Pour retourner à l'Écran 7.43, appuyer sur ◄.

3. Une fois la touche RUN appuyée, l'instrument lance la séquence de test automatique de la partie inférieure du jeu de tubulures.



Écran 7.46 : Démarrage du test d'intégrité pour la partie inférieure

L'Écran 7.47 s'affiche.



Écran 7.47 : Test d'intégrité pour la partie inférieure en cours

Une surpression sera créée et maintenue pendant 30 secondes. Pendant ce temps, l'opérateur doit surveiller le raccord de la tubulure inférieure de la pompe et les raccords en T entre les valves n^{os} 6, 8, 9, 10 et 11.

La séquence de test peut être terminée à tout moment en appuyant sur **ENT**.

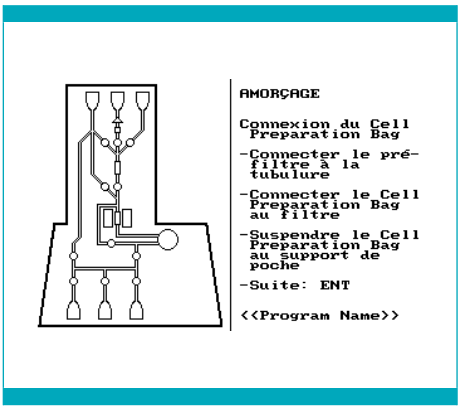
4. Après 30 secondes, la pression est automatiquement libérée et l'Écran 7.43 s'affiche.

   Vérifier si des fuites se sont produites pendant la séquence de test. Si une fuite est observée au niveau de l'un des raccords du jeu de tubulures, le jeu de tubulures doit être retiré et remplacé par un nouveau jeu. Contacter Miltenyi Biotec Technical Support pour les instructions concernant le retour du jeu de tubulures défectueux.

5. Si aucune fuite n'est observée, l'opérateur peut maintenant passer à l'étape suivante en appuyant sur **ENT**.

Raccorder la Cell Preparation Bag

L'Écran 7.48 s'affiche.



Écran 7.48 : Raccorder la Cell Preparation Bag

Raccordement de la Cell Preparation Bag contenant le produit cellulaire déjà marqué :

1. Retirer le bouchon de la pointe de la chambre compte-gouttes (voir Figure 7.2).
2. Retirer le bouchon de l'extrémité émoussée du préfiltre (voir Figure 7.10). Insérer fermement la pointe dans le préfiltre.
3. Retirer le bouchon de la pointe du préfiltre.
4. Percer le préfiltre dans un port non utilisé de la Cell Preparation Bag en s'assurant que le septum est bien percé, permettant ainsi l'écoulement libre du liquide. Presser doucement la poche pour vérifier que la pointe est bien placée dans la poche.
5. Vérifier avec précaution le raccord entre le préfiltre et le jeu de tubulures pour s'assurer qu'il est correct.
6. Accrocher la Cell Preparation Bag au support de poche du milieu.

7. Ajuster le support de poche à la hauteur de la Cell Preparation Bag pour que celle-ci se trouve en position verticale.

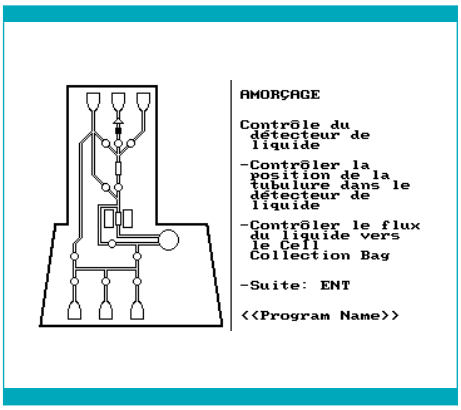
Pour continuer, appuyer sur **ENT**.

Vérification finale du détecteur de liquide

L'Écran 7.49 s'affiche.

1. Vérifier la tubulure au niveau du détecteur de liquide. S'assurer que la tubulure est correctement insérée, qu'elle n'a pas été déplacée pendant la procédure de chargement et de l'absence de liquide à l'exterieur de celle-ci.
2. Assurer un flux libre vers la Cell Collection Bag (p. ex., ouvrir la pince sous la valve 9).

Pour continuer, appuyer sur **ENT**.



Écran 7.49 : Vérification finale du détecteur de liquide

▶ **Passer à l'ÉTAPE 4.**

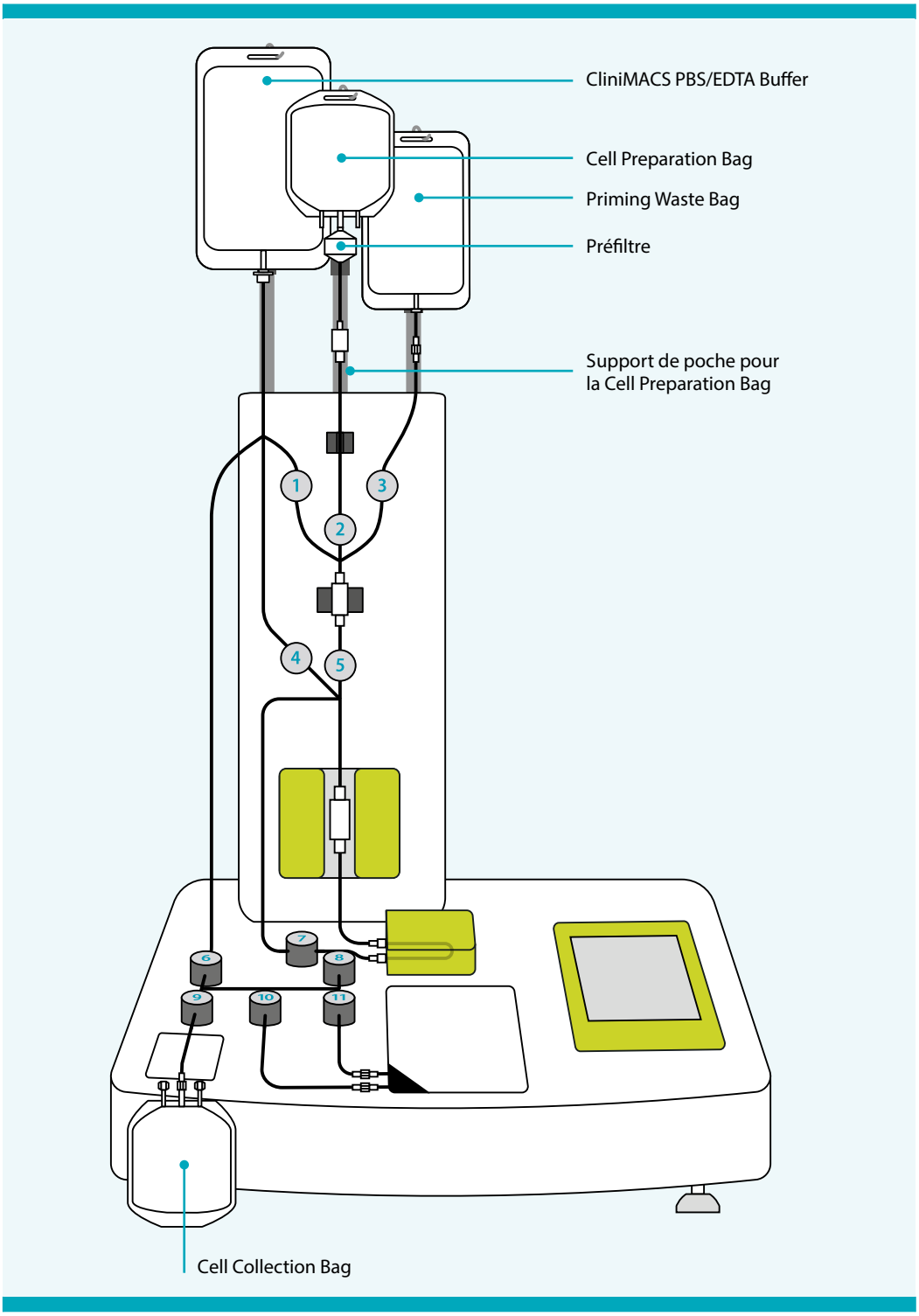


Figure 7.10 : Le CliniMACS Plus Instrument avec CliniMACS Tubing Set, CliniMACS PBS/EDTA Buffer, Cell Preparation Bag et Cell Collection Bag

7.3.2 Installation alternative pour jeux de tubulures CliniMACS

Les instructions de l'Étape 3 dans ce manuel et affichées l' écran du CliniMACS Plus Instrument décrivent l'installation des jeux de tubulures CliniMACS dans des conditions stériles (salle blanche).

Le système CliniMACS Plus lui-même est un système clos qui ne doit pas nécessairement être exploité dans une salle blanche. Cependant, s'il est utilisé en dehors d'une salle blanche, la procédure d'installation du jeu de tubulures doit être adaptée afin de garantir la stérilité du processus de séparation cellulaire.

La stérilité du processus de séparation cellulaire peut être compromise lors du branchement de la Cell Collection Bag, du CliniMACS PBS/EDTA Buffer, du préfiltre et de la Cell Preparation Bag. Pour que le système reste stérile, il est nécessaire de raccorder ces éléments au jeu de tubulures dans des conditions stériles (par ex. sous hotte à flux laminaire). Une fois les éléments raccordés au jeu de tubulures avant son montage sur le CliniMACS Plus Instrument, il est nécessaire de modifier l'ordre des instructions fournies par l'instrument et des instructions de l'Étape 3 ainsi que de prendre d'autres mesures.

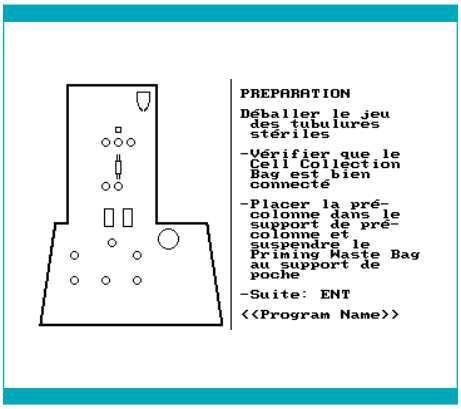
Pour utiliser le CliniMACS Plus Instrument en dehors d'une salle blanche, suivre les instructions compplémentaires suivantes, en modifiant les instructions de l'ÉTAPE 3.

Préparation pour l'installation du jeu de tubulures

L'Écran 7.50 s'affiche.

Comme décrit, la Cell Collection Bag, le CliniMACS PBS/EDTA Buffer, le préfiltre et la Cell Preparation Bag doivent être raccordés au jeu de tubulures dans des conditions stériles avant d'installer le jeu de tubulures sur l'instrument.

Déballer le jeu de tubulures et raccorder les éléments suivants dans des conditions stériles :



Écran 7.50 : Déballer le jeu de tubulures

- **Raccorder la Cell Collection Bag**

  Voir page 162.

Raccorder le CliniMACS PBS/EDTA Buffer

IMPORTANT

Avant de raccorder le CliniMACS PBS/EDTA Buffer au jeu de tubulures, fermer la tubulure sous la pointe du tampon avec une pince à clamper afin d'empêcher le tampon de s'écouler dans le jeu de tubulures avant l'installation (voir pince 1 ,Figure 7.11 à la page 179).

En utilisant des techniques aseptiques, retirer le bouchon de la pointe du tampon sur le jeu de tubulures et raccorder la pointe à la poche de tampon. S'assurer que le septum est percé, permettant l'écoulement libre du liquide. Presser doucement la poche pour s'assurer que la pointe est bien placée dans la poche.

Raccorder le préfiltre

Retirer le bouchon de la pointe de la chambre compte-gouttes. Retirer le bouchon de l'ouverture inférieure du préfiltre.

Insérer fermement la pointe dans le préfiltre. NE PAS retirer le bouchon supérieur du préfiltre. Fermer la tubulure juste en dessous de la chambre compte-gouttes à l'aide d'une pince à clamper (voir pince 2, Figure 7.11 à la page 179). Ceci empêche la suspension cellulaire préparée dans la Cell Preparation Bag de pénétrer dans le préfiltre et le jeu de tubulures.

Raccorder la Cell Preparation Bag

Raccorder la Cell Preparation Bag, contenant les cellules marquées magnétiquement et lavées, au jeu de tubulures. Raccorder la Cell Preparation Bag avec le préfiltre en s'assurant que le septum est percé, permettant ainsi l'écoulement libre du liquide. Presser doucement la poche pour s'assurer que la pointe est bien placée dans la poche.

Installation sur le CliniMACS Plus Instrument

Accrocher la poche de tampon au support de poche gauche, la Cell Preparation Bag au support de poche du milieu et la Priming Waste Bag au support de poche droit de l'instrument.

Pour continuer, appuyer sur **ENT**.

- **Accrocher la Priming Waste Bag et insérer la précolonne**

  Voir page 162.

- **Insérer la colonne de séparation et la tubulure sur la valve n° 5**

  Voir page 163.

- **Monter la tubulure sur les valves nos 1, 2, 3 et 4**

  Voir page 164.

- **Insérer la tubulure dans la pompe**

  Voir page 165.

- **Monter la tubulure sur les valves nos 7 et 8**

  Voir page 166.

- **Monter la tubulure sur les valves nos 6, 9, 10 et 11**

  Voir page 166.

- **Vérifier à nouveau toute la tubulure et tous les éléments raccordés**

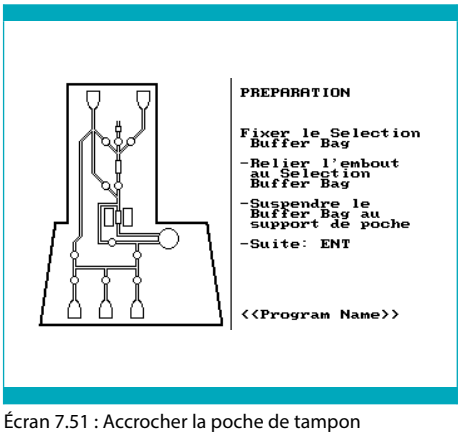
  Voir page 167.

- **Réglage des valves**

  Voir page 167.

Raccorder le CliniMACS PBS/EDTA Buffer

L'Écran 7.51 s'affiche.



Écran 7.51 : Accrocher la poche de tampon

1. La poche de tampon a été raccordée pendant la « Préparation pour l'installation du jeu de tubulures ». Par conséquent, seule la hauteur du support de la poche de tampon doit être ajustée. Relever ou abaisser le support pour l'adapter à la taille de la poche de tampon, en veillant à ce que la hauteur soit suffisamment élevée pour éviter toute pliure importante de la tubulure qui pourrait restreindre le flux du liquide, et suffisamment basse pour éviter toute tension importante de la tubulure et des branchements.
2. Retirer la pince à clamper du jeu de tubulures juste en dessous de la pointe du tampon.

Pour continuer, appuyer sur **ENT**

- **Démarrer l'amorçage**

  Voir page 169.

- **Vérification pendant l'amorçage**

  Voir page 169.

- **Vérification finale de toute la tubulure et de tous les éléments raccordés**

  Voir page 170.

- **Test d'intégrité**

  Voir page 170.

Raccorder la Cell Preparation Bag (et le préfiltre)

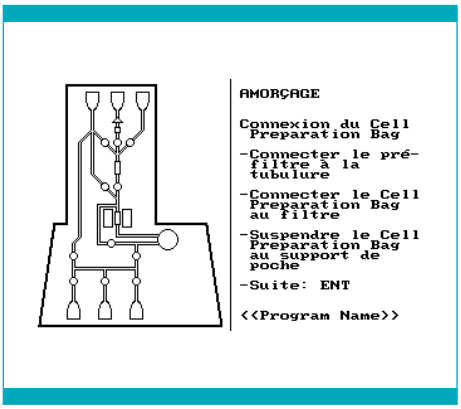
L'Écran 7.52 s'affiche.

1. La Cell Preparation Bag et le préfiltre ont été raccordés pendant la « Préparation pour l'installation du jeu de tubulures ».
2. Retirer la pince à clamper au-dessous de la chambre compte-gouttes.

Pour continuer, appuyer sur **ENT**.

- **Vérification finale du détecteur de liquide**

  Voir page 173.



Écran 7.52 : Raccorder la Cell Preparation Bag

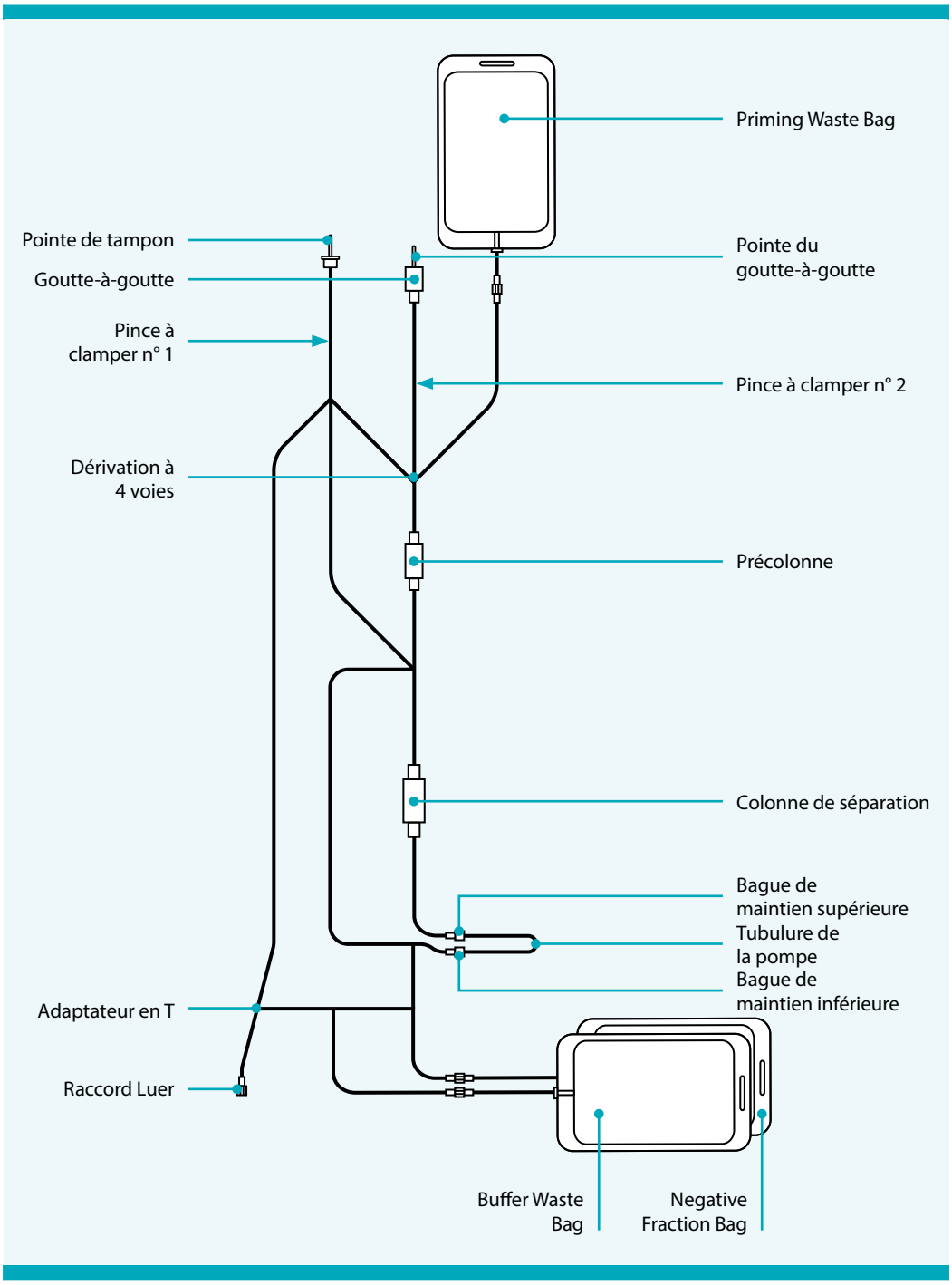


Figure 7.11 : Construction générale d'un CliniMACS Tubing Set (par ex., CliniMACS Tubing Set) avec les positions à clamper (1) et (2).

7.3.3 CliniMACS Depletion Tubing Set

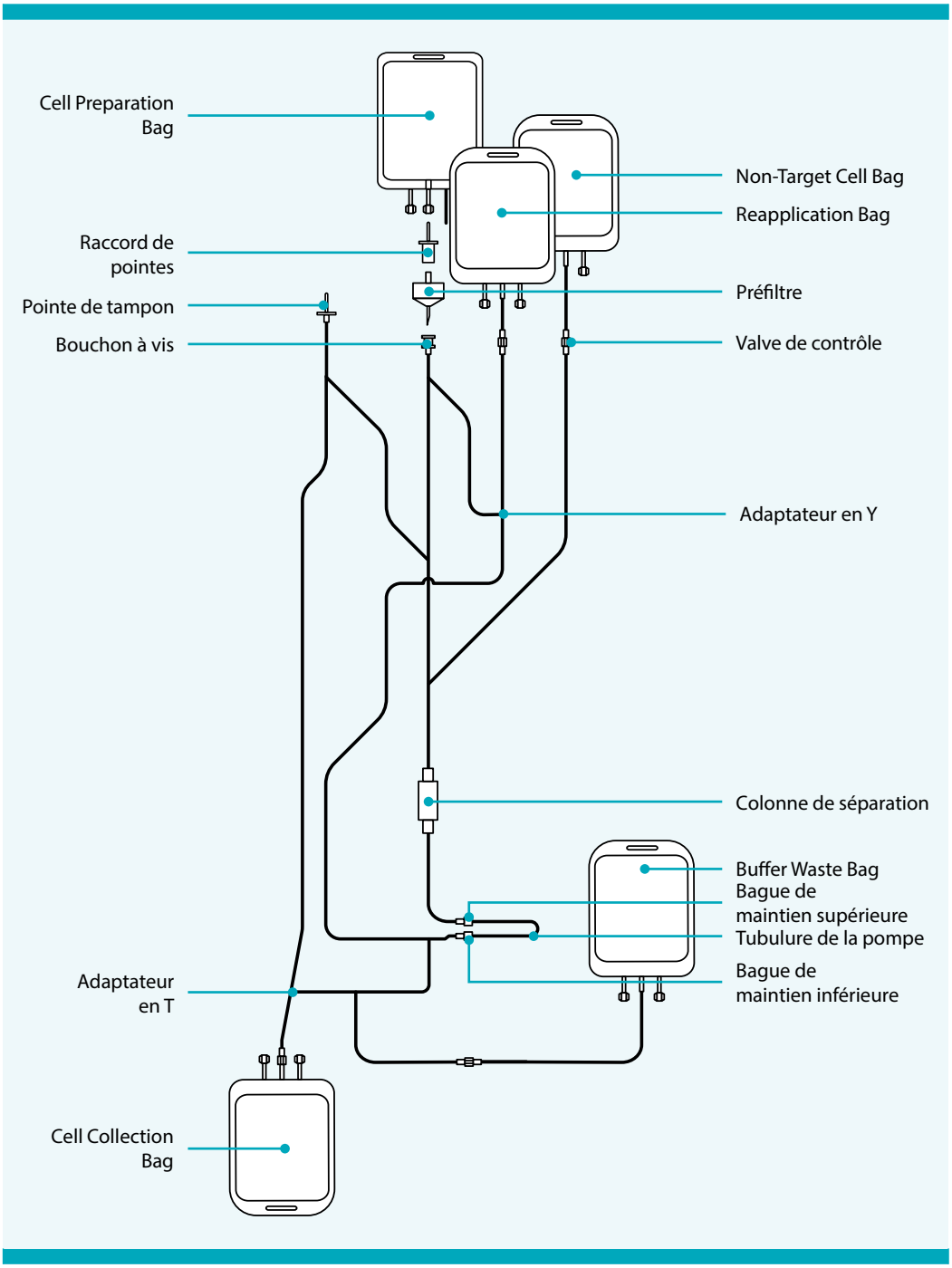
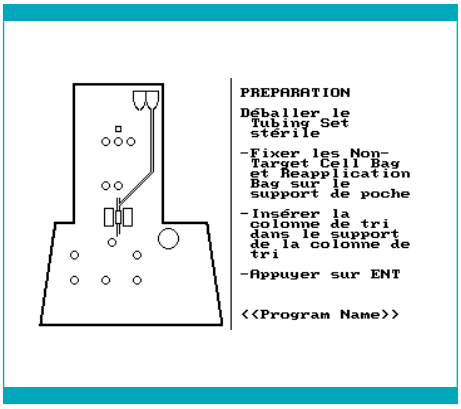


Figure 7.12 : Construction générale d'un CliniMACS Depletion Tubing Set

Préparation pour l'installation du jeu de tubulures

L'Écran 7.53 s'affiche.

Les instructions se trouvent à droite et un schéma correspondant aux instructionx s'affiche à gauche. Les éléments clignotants sur l'écran indiquent les zones d'attention.



Écran 7.53 : Déballer le jeu de tubulures

Le CliniMACS Depletion Tubing Set est fourni dans un emballage scellé et stérilisé. Chaque jeu de tubulures contient des tubulures, une colonne et des poches pré-assemblées pour une séparation cellulaire (voir Figure 7.12). Un emballage intact assure un flux de fluide stérile.

Remarque : Le CliniMACS Plus Instrument affiche le nom du programme sélectionné, par ex. DEPLETION 3.1, sur la ligne inférieure. Pendant l'installation du jeu de tubulures, l'opérateur peut à tout moment appuyer sur « Annuler » (voir le paragraphe « Description » du manuel d'utilisation du CliniMACS Plus Instrument) pour revenir à l'étape précédente.

1. Noter le numéro de lot et la date de péremption du jeu de tubulures.

   Déballer le jeu de tubulures stérile dans des conditions stériles (par ex. sous hotte à flux laminaire). Retirer la pince utilisée pour fixer le CliniMACS Tubing Set LS sur l'emballage avant d'utiliser le jeu de tubulures. La pince est pourvue d'une étiquette libellée « Remove before assembly to CliniMACS Plus Instrument » (Retirer avant le montage sur le CliniMACS Plus Instrument).

2. Vérifier les raccords Luer Lock au niveau des poches. Les raccords Luer Lock doivent être fermés hermétiquement.

Cell Collection Bag

Le CliniMACS Depletion Tubing Set est fourni avec une Cell Collection Bag déjà pré-assemblée. Noter le poids de la Cell Collection Bag vide. S'il faut plus d'une Cell Collection Bag pour effectuer une séparation, raccorder les poches à l'aide d'un set de transfert de plasma. Veiller à ce que toutes les branchements soient bien fermées. Noter le poids de la ou des Cell Collection Bags vide(s).

Accrocher la Non-Target Cell Bag, la Reapplication Bag et insérer la colonne de séparation

1. Accrocher la Non-Target Cell Bag et la Reapplication Bag au support de poche droit de l'instrument (voir Figure 7.13).
2. Ajuster la hauteur des supports de poche. Soulever ou abaisser les supports pour adapter la hauteur à la taille de la Non-Target Cell Bag et de la Reapplication Bag. S'assurer qu'ils sont positionnés suffisamment haut pour éviter toute pliure importante de la tubulure, qui pourrait restreindre le flux, et qu'ils sont suffisamment bas pour éviter toute tension importante de la tubulure et des raccords.

   AVIS

   Risque d'endommagement de l'instrument. La surcharge des supports de poche risque d'endommager l'instrument. La capacité de charge d'un seul support de poche est de 3 kg. Ne pas surcharger les supports de poche.

3. Insérer la colonne de séparation dans le support de la colonne de séparation comme indiqué (voir Figure 7.14).

   ⚠ AVERTISSEMENT

   Risque de blessures. Si la colonne de séparation est insérée ou retirée alors que l'unité magnétique est allumée, il existe un risque de blessures corporelles. Ne pas insérer ou retirer la colonne de séparation avant que l'unité magnétique ne soit éteinte.

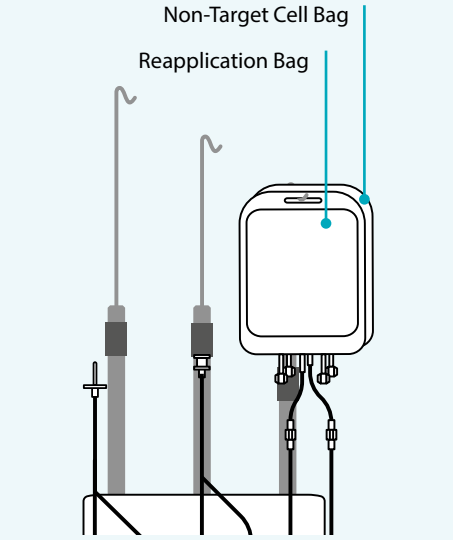


Figure 7.13 : Accrocher la Non-Target Cell Bag et la Reapplication Bag

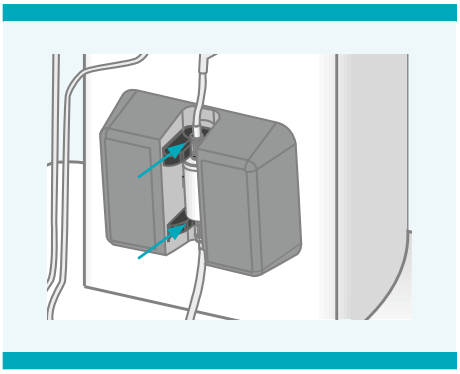


Figure 7.14 : Colonne de séparation dans le support de colonne de séparation

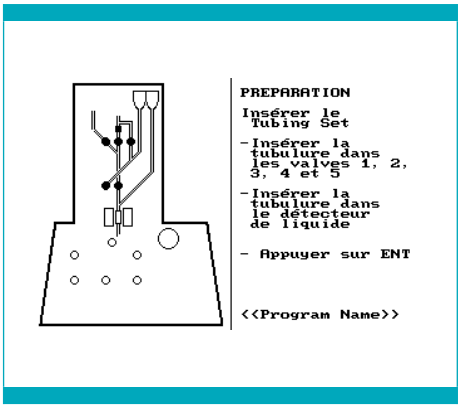
Pour continuer, appuyer sur **ENT**.

Monter la tubulure sur les valves nos 1, 2, 3, 4 et 5

L'Écran 7.54 s'affiche.

Les valves indiquées sur l'écran s'ouvrent automatiquement.

1. Insérer la tubulure dans les valves nos 1, 2, 3, 4 et 5.
2. Insérer la tubulure au-dessus de la valve n° 2 dans le détecteur de liquide (voir Figure 7.15).



Écran 7.54 : Charger les valves nos 1, 2, 3, 4 et 5

IMPORTANT

- *Pour garantir un bon fonctionnement, le détecteur de liquide et la tubulure insérée doivent être secs. Inspecter les deux avec précaution. En cas de présence de liquide, sécher la zone avec un chiffon doux et non pelucheux.*
- *Lors de l'exécution de chaque étape, vérifier que la tubulure et les éléments raccordés ne présentent pas de plis ou de torsions importantes qui pourraient restreindre le débit du liquide dans la tubulure. Vérifier toutes les valves pour s'assurer que la tubulure est bien ajustée.*
- *Insérer le jeu de tubulures uniquement dans les valves ouvertes (lorsque le bouton est poussé vers l'intérieur). Il n'est pas possible d'ajuster correctement la tubulure dans une valve fermée.*
- *S'il est nécessaire d'ajuster la tubulure après avoir fermé une valve, ne pas tirer sur la tubulure sans appuyer sur le bouton pour ouvrir la valve correspondante (voir Figure 7.16)*

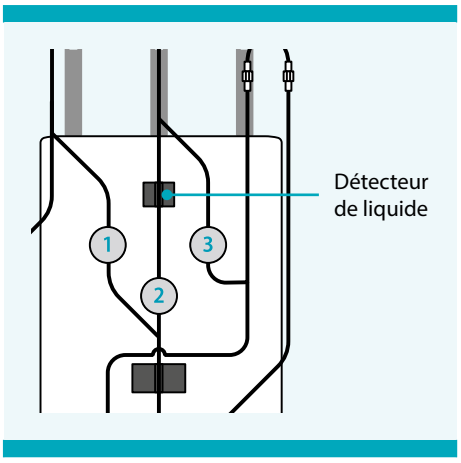


Figure 7.15 : Tubulure dans les valves

Pour continuer, appuyer sur **ENT**.

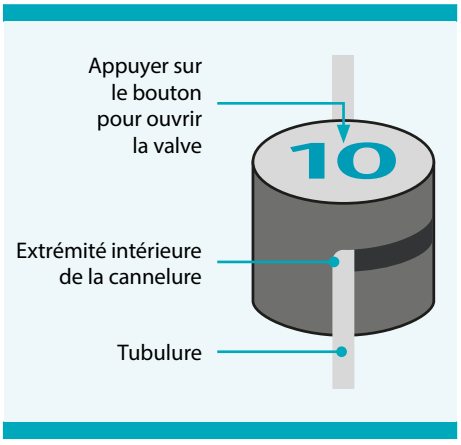
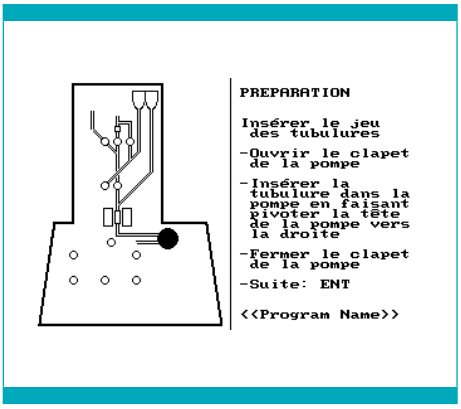


Figure 7.16 : Tubulure correctement insérée

Insérer la tubulure dans la pompe

L'Écran 7.55 s'affiche.



Écran 7.55 : Insérer la tubulure dans la pompe

1. Ouvrir la porte de la pompe en la soulevant par le bord gauche.
2. Insérer la bague de maintien supérieure de la tubulure de la pompe dans la rainure de la bague de maintien située sur le cadre de la pompe (voir Figure 7.17).
3. Faire tourner la tête de la pompe dans le sens des aiguilles d'une montre jusqu'à ce que la tubulure soit enfilée entre les deux broches de guidage de la tubulure et que la tubulure soit bien ajustée autour de la tête de la pompe. Veiller à ce que la tubulure ne soit pas pincée à l'extrémité des broches de guidage. (S'il est nécessaire d'ajuster la tubulure à l'intérieur de la pompe, la tubulure peut être sortie en soulevant l'extrémité inférieure et en tournant la tête de la pompe dans le sens inverse des aiguilles d'une montre.)
4. Insérer la bague de maintien inférieure de la tubulure de la pompe dans la rainure de la bague de maintien située sur le cadre de la pompe.
5. Répéter en faisant tourner la tête de la pompe dans les deux sens pour vérifier que la rotation de la tête de la pompe n'est pas bloquée.
6. Fermer la porte de la pompe.

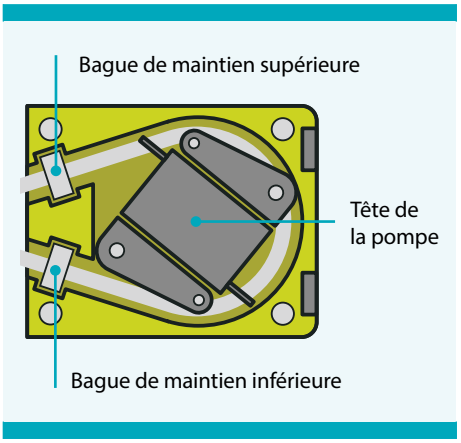


Figure 7.17 : Insérer la tubulure dans la pompe

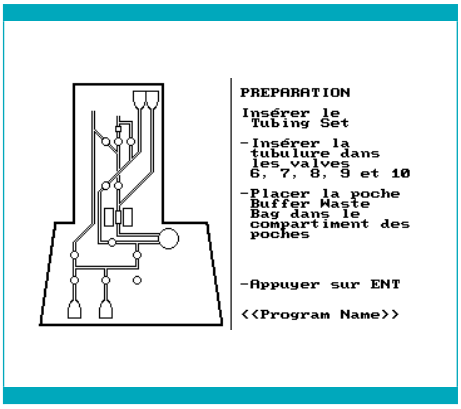
IMPORTANT

Pendant le programme de séparation cellulaire, la pompe s'arrête immédiatement dès que le corps de la pompe est ouvert. S'il reste ouvert pendant plus de 600 secondes, l'instrument abandonne le cycle en cours.

Pour continuer, appuyer sur **ENT**.

Monter la tubulure sur les valves nos 6, 7, 8, 9 et 10

L'Écran 7.56 s'affiche.



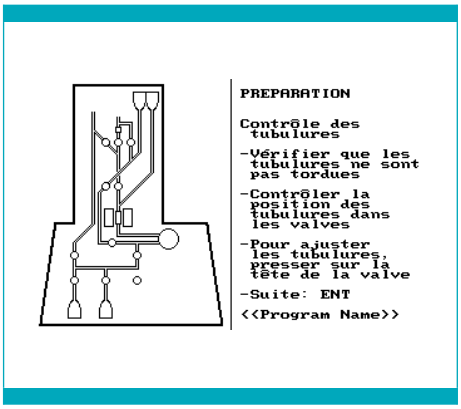
Écran 7.56 : Charger les valves nos 6, 7, 8, 9 et 10

1. Insérer la tubulure dans les valves nos 6, 7, 8, 9, et 10. S'assurer que la tubulure est bien installée dans l'ouverture de la valve.
2. Placer la Buffer Waste Bag dans le compartiment des poches. S'assurer que la tubulure n'est pas comprimée sous le couvercle du compartiment des poches.
3. S'assurer que l'écoulement vers la Cell Collection Bag est possible sans restriction.

Pour continuer, appuyer sur **ENT**.

Vérifier à nouveau toute la tubulure et tous les éléments raccordés.

L'Écran 7.57 s'affiche.



Écran 7.57 : Vérifier à nouveau toute la tubulure et tous les éléments raccordés.

1. Commencer avec la valve n° 1, vérifier que la tubulure est insérée correctement dans chacune des valves.

   Vérifier à nouveau la tubulure dans chaque valve. S'assurer que la tubulure entre et sort de chaque valve par l'élargissement à l'extrémité intérieure de la fente (voir Figure 7.16).
2. Vérifier que la tubulure n'est pas pliée ou tordue.

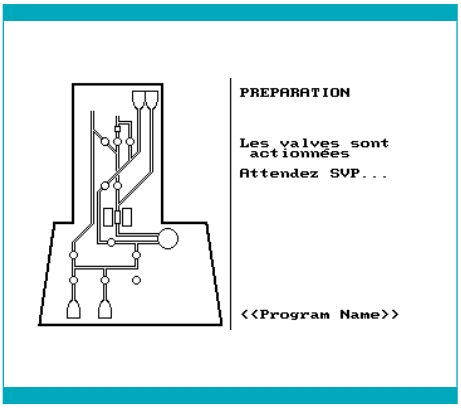
Remarque : S'il est nécessaire d'ajuster la tubulure après avoir fermé une valve, ne pas tirer sur la tubulure sans appuyer sur le bouton pour ouvrir la valve correspondante.

Pour continuer, appuyer sur **ENT**.

Réglage des valves

L'Écran 7.58 s'affiche.

Afin de s'assurer que la tubulure est bien placée dans les valves, l'instrument fait fonctionner toutes les valves et répète la séquence de test une deuxième fois. Observer et écouter pour s'assurer que toutes les valves fonctionnent correctement. Si l'une des valves ne fonctionne pas correctement, voir le chapitre 8 « Guide de dépannage » à la page 217. Cette étape peut être répétée en utilisant la touche ◄ suivie de la touche **ENT** (voir le paragraphe « Description » du manuel d'utilisation du CliniMACS Plus Instrument).

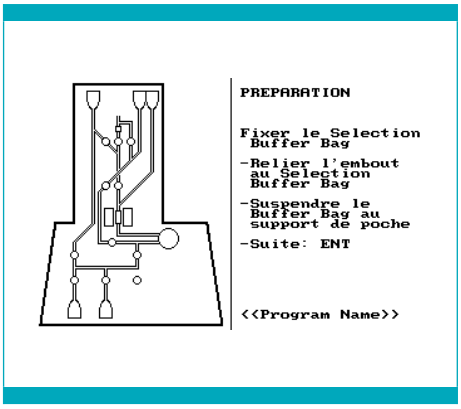


Écran 7.58 : Réglage des valves

Le moteur de l'aimant sera également testé pendant cette séquence de vérification.

Raccorder le CliniMACS PBS/EDTA Buffer

L'Écran 7.59 s'affiche.



Écran 7.59 : Accrocher la poche de tampon

Le tampon prescrit pour les séparations CliniMACS Plus est le CliniMACS PBS/EDTA Buffer complémenté avec de l'HSA à une concentration finale de 0,5% (p/v).

1. En utilisant des techniques aseptiques, retirer le bouchon de la pointe du tampon (voir Figure 7.12 à la page 180) sur le jeu de tubulures et brancher la pointe à la poche de tampon. S'assurer que le septum est percé, permettant l'écoulement libre du liquide. Presser doucement la poche pour vérifier que la pointe est bien placée dans la poche.
2. Accrocher la poche de tampon au crochet réservé à cet effet sur le support de poche (voir Figure 7.18).
3. Ajuster la hauteur du support de la poche de tampon. Soulever ou abaisser le support pour adapter la hauteur à la taille de la poche de tampon. S'assurer qu'il est positionné suffisamment haut pour éviter toute pliure importante de la tubulure qui pourrait restreindre le flux et qu'il est suffisamment bas pour éviter toute tension importante de la tubulure et des raccords.

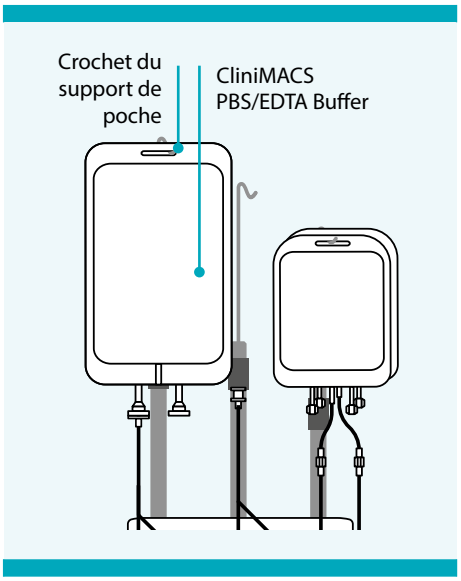


Figure 7.18 : Accrocher la poche de tampon

IMPORTANT

En raison de plusieurs étapes d'amorçage et de rinçage gravimétriques, il est essentiel que la poche de tampon soit positionnée aussi haut que possible, en veillant à ce qu'elle soit plus haute que la Reapplication Bag et la Non-Target Cell Bag (voir Figure 7.20 à la page 193).

Pour continuer, appuyer sur **ENT**.

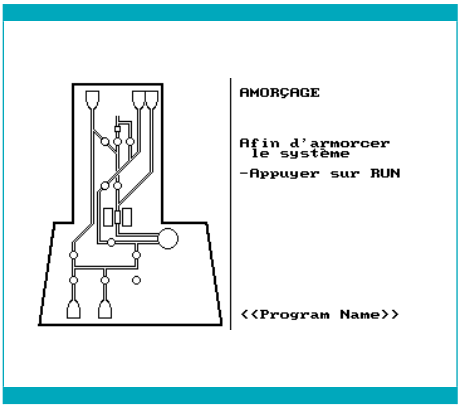
Démarrer l'amorçage

L'Écran 7.60 s'affiche.

Pour démarrer l'amorçage, appuyer sur **RUN**.

L'Écran 7.61 s'affiche.

Pendant la phase d'amorçage, le jeu de tubulures est rempli de CliniMACS PBS/EDTA Buffer. Le tampon circule dans le jeu de tubulures, y compris dans la colonne de séparation. Le liquide d'amorçage est recueilli dans la Buffer Waste Bag, la Reapplication Bag et la Non-Target Cell Bag, tandis que la Cell Collection Bag reste vide (voir Figure 7.12 à la page 180). Les cycles d'amorçage se poursuivront, en répétant une série d'étapes.



Écran 7.60 : Démarrer l'amorçage

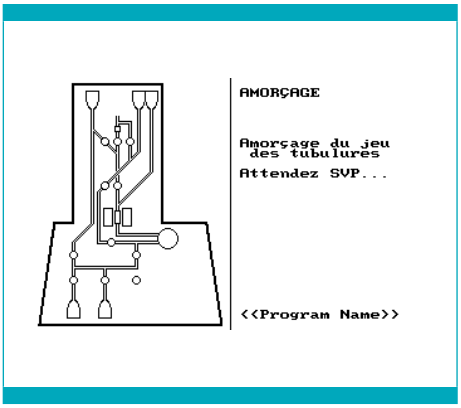
La phase d'amorçage dure environ 2,5 minutes. Le statut de la phase d'amorçage se met à jour sur l'écran.

Vérification pendant l'amorçage

Pendant la phase d'amorçage, vérifier toute la tubulure, tous les raccords, toutes les valves et la colonne de séparation pour détecter la présence de fuites ou de plis qui pourraient bloquer le passage du fluide.

En cas de fuites ou de mauvais fonctionnement, appuyer sur **STOP** pour arrêter le cycle.
L'opérateur disposera de 600 secondes pour résoudre le problème.

Redémarrer le processus en appuyant sur **RUN**.



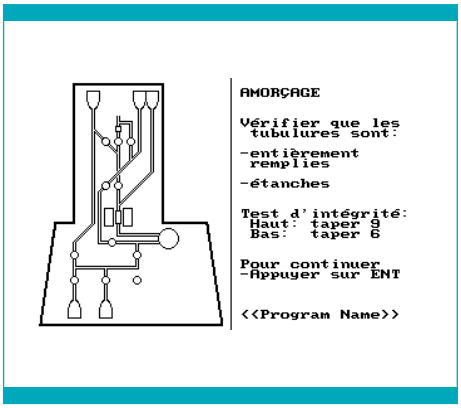
Écran 7.61 : Amorçage en cours

Après 600 secondes, le processus de séparation sera abandonné. Si l'opérateur ne peut pas résoudre le problème ou si le jeu de tubulures est défectueux, retirer le jeu de tubulures et le remplacer par un nouveau.

Remarque : Une fois l'amorçage démarré, il n'est pas possible de retourner à la procédure de configuration de l'instrument.

Vérification finale de toute la tubulure et de tous les éléments raccordés

L'Écran 7.62 s'affiche.



Écran 7.62 : Vérification finale de la tubulure et des éléments raccordés

Avant de commencer le cycle, vérifier les points suivants :

- présence de liquide dans toutes les parties du jeu de tubulures, sauf dans la tubulure située au-dessus des valves n^{os} 2 et 3,
- absence d'air en excès dans le jeu de tubulures,
- présence de liquide dans la Reapplication Bag, Buffer Waste Bag et Non-Target Cell Bag,
- absence de liquide dans la Cell Collection Bag.

Ne pas encore appuyer sur **ENT** .

Test d'intégrité

Pour plus de sécurité, il est nécessaire d'exécuter un test d'intégrité pour vérifier l'étanchéité du jeu de tubulures. La séquence de test consiste en deux séquences automatisées, qui permettent de surpressuriser et de tester séparément les parties supérieure et inférieure du jeu de tubulures.

⚠ ATTENTION

Risque de retard dans le processus. Si la pince située sous la Non-Target Cell Bag n'a pas été retirée après le test d'intégrité, les cellules non cibles (marquées) ne pourront pas être prélevées de la colonne de séparation pendant l'élution. La rétention ultérieure des cellules non cibles est alors impossible. La procédure de séparation doit être répétée. Retirer la pince une fois le test d'intégrité terminé.

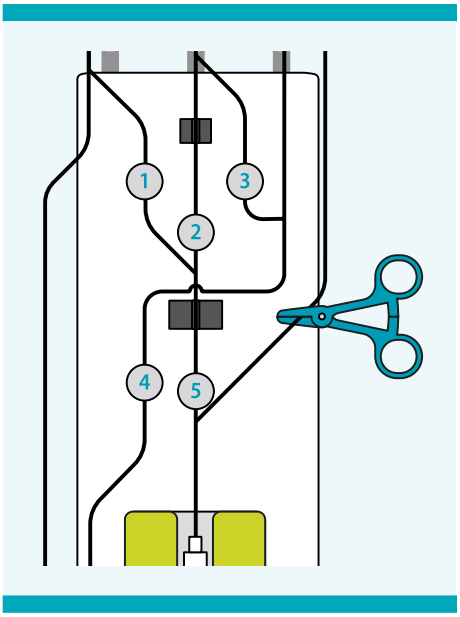


Figure 7.19 : Préparation pour le test d'intégrité

IMPORTANT

Le test d'intégrité ne fonctionnera correctement que si la tubulure est clampée sous la Non-Target Cell Bag. Clamper la tubulure sous la Non-Target Cell Bag, avant de démarrer le test d'intégrité. Retirer la pince une fois le test d'intégrité terminé.

Test d'intégrité pour la partie supérieure du jeu de tubulures

1. Lorsque l'opérateur effectue la « Vérification finale de toute la tubulure et de tous les éléments raccordés », l'Écran 7.63 s'affiche.

2. Après avoir effectué la « Vérification finale de toute la tubulure et de tous les éléments raccordés », **ne pas** appuyer sur **ENT**.

3. Pour passer au test d'intégrité de la partie supérieure, appuyer sur **9**.

   L'Écran 7.64 s'affiche.

   IMPORTANT
   Clamper la tubulure sous la valve de contrôle de la Non-Target Cell Bag.

4. Pour démarrer la séquence de test, appuyer sur **RUN**.

   Pour retourner à l'Écran 7.63, appuyer sur ◄.

5. Une fois la touche **RUN** appuyée, l'instrument lance la séquence de test automatique de la partie supérieure du jeu de tubulures.

   L'Écran 7.65 s'affiche.

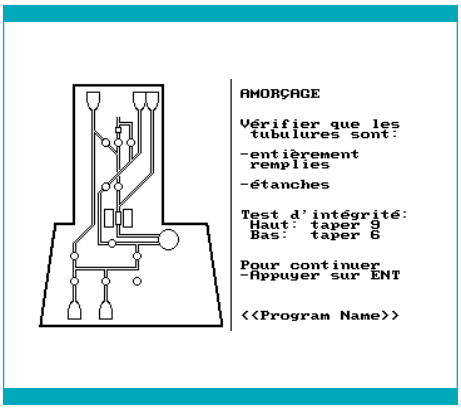
   Une surpression sera créée et maintenue pendant deux minutes. Pendant ce temps, l'opérateur doit surveiller tous les raccords au-dessus du raccord supérieure de la tubulure de la pompe.

   La séquence de test peut être terminée à tout moment en appuyant sur **ENT**.

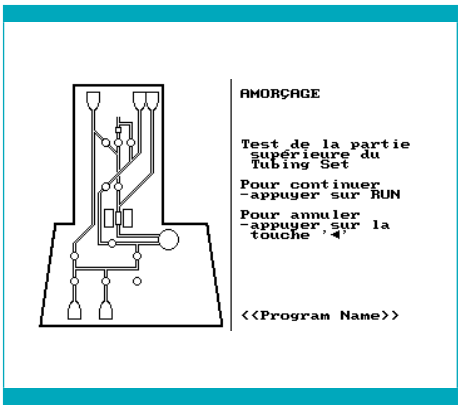
6. Après deux minutes, la pression est automatiquement libérée et l'Écran 7.63 s'affiche.

   Vérifier si des fuites se sont produites pendant la séquence de test. Si une fuite est observée au niveau de l'un des raccords du jeu de tubulures, le jeu de tubulures doit être débranché et remplacé par un nouveau jeu.

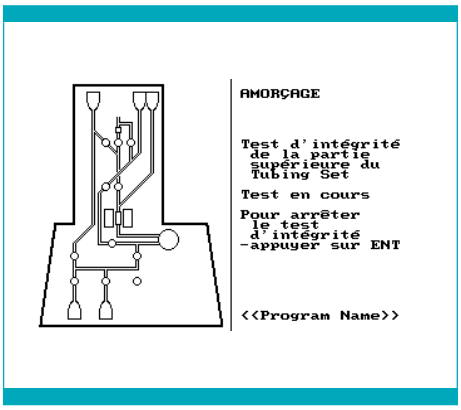
   Contacter Miltenyi Biotec Technical Support pour les instructions concernant le retour du jeu de tubulures défectueux.



Écran 7.63 : Démarrage du test d'intégrité pour la partie supérieure



Écran 7.64 : Démarrage du test d'intégrité pour la partie supérieure



Écran 7.65 : Démarrage du test d'intégrité pour la partie supérieure

7. Si aucune fuite n'est observée, continuer avec le test d'intégrité de la partie inférieure du jeu de tubulures.

Test d'intégrité pour la partie inférieure du jeu de tubulures

L'Écran 7.63 s'affiche.

1. Pour passer au test d'intégrité, appuyer sur **6**.
   Ne pas encore appuyer sur **ENT**.

   L'Écran 7.66 s'affiche.

2. Pour démarrer la séquence de test, appuyer sur **RUN**.

   Pour retourner à l'Écran 7.63, appuyer sur ◄.

3. Une fois la touche **RUN** appuyée, l'instrument lance la séquence de test automatique de la partie inférieure du jeu de tubulures.

   L'Écran 7.67 s'affiche.

   Une surpression sera créée et maintenue pendant 30 secondes.

   Pendant ce temps, l'opérateur doit surveiller le raccord de la tubulure inférieure de la pompe et les raccords en T entre les valves n^{os} 6, 8, 9 et 10.

   La séquence de test peut être terminée à tout moment en appuyant sur **ENT**.

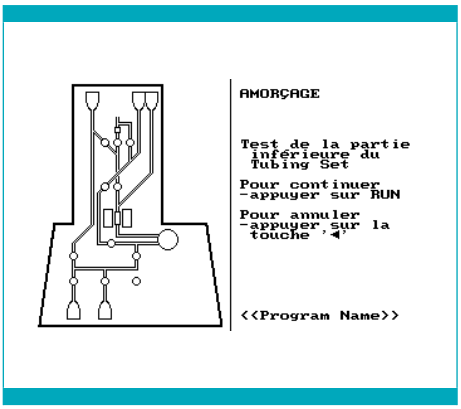
4. Après 30 secondes, la pression est automatiquement libérée et l'Écran 7.63 s'affiche.

   L'opérateur doit vérifier si des fuites se sont produites pendant la séquence de test. Si une fuite est observée au niveau de l'un des raccords du jeu de tubulures, le jeu de tubulures doit être débranché et remplacé par un nouveau jeu.

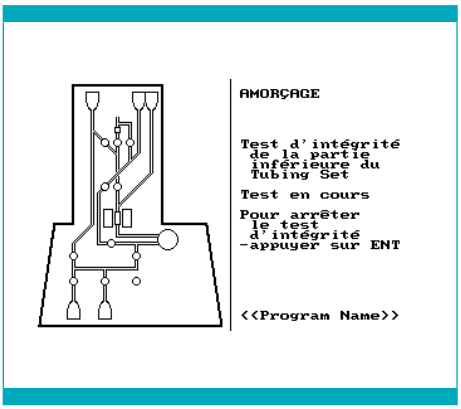
   Contacter Miltenyi Biotec Technical Support pour les instructions concernant le retour du jeu de tubulures défectueux.

5. **Ouvrir le passage vers la Non-Target Cell Bag en retirant la pince sous la valve de contrôle.**

6. Si aucune fuite n'est observée, l'opérateur peut maintenant continuer avec l'étape suivante en appuyant sur **ENT**.



Écran 7.66 : Démarrage du test d'intégrité pour la partie inférieure

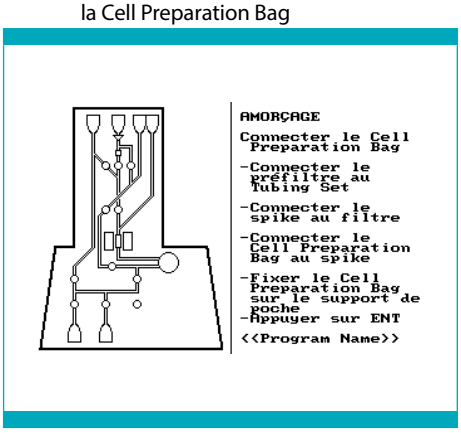


Écran 7.67 : Test d'intégrité pour la partie inférieure en cours

Raccorder la Cell Preparation Bag

L'Écran 7.68 s'affiche.

Support de poche pour la Cell Preparation Bag



Écran 7.68 : Raccorder la Cell Preparation Bag

Raccorder la Cell Preparation Bag (contenant les cellules marquées magnétiquement) au jeu de tubulures :

1. Dévisser le bouchon à vis (voir Figure 7.12 à la page 180) du jeu de tubulures.
2. Retirer le bouchon de la pointe du préfiltre. Insérer fermement la pointe du préfiltre dans le jeu de tubulures, en s'assurant que le septum est percé.
3. Retirer les bouchons du préfiltre et l'extrémité émoussée du raccord de pointe et raccorder les deux parties l'une à l'autre.
4. Retirer l'autre bouchon du raccord de pointe et brancher la pointe à la Cell Preparation Bag en s'assurant que le septum est bien percé, permettant ainsi l'écoulement libre du liquide. Presser doucement la poche pour vérifier que la pointe est bien placée dans la poche.
5. Vérifier le raccord entre la Cell Preparation Bag, le raccord de pointe, le prefiltre et le jeu de tubulures pour assurer que les raccord est corrects.
6. Accrocher la Cell Preparation Bag au support de poche (voir Figure 7.21).
7. S'assurer que les poches et les tubes accrochés au support de poche ne sont ni étirés ni pliés.

   En raison des étapes d'amorçage et de rinçage gravimétriques exécutées pendant la séparation automatisée, il est très important que les poches soient correctement nivelées. De plus, pour assurer le traitement complet de l'échantillon, il est essentiel que la Reapplication Bag et la Non-Target Cell Bag soient plus hautes que la Cell Prepration Bag (voir Figure 7.20):

   - **La position la plus haute :** poche de tampon
   - **Position intermédiaire :** Reapplication Bag et Non-Target Cell Bag
   - **La position la plus basse :** Cell Preparation Bag

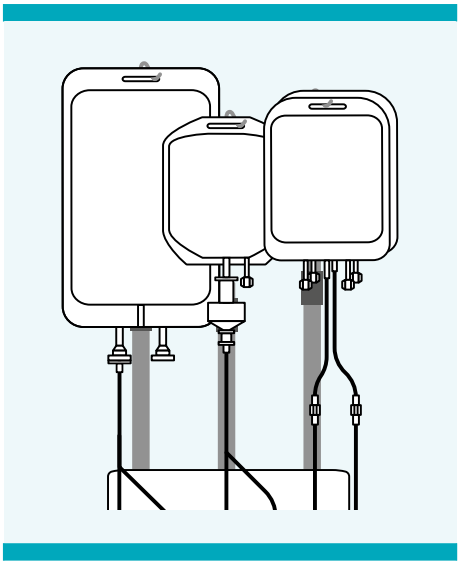


Figure 7.20 : Des poches correctement nivelées

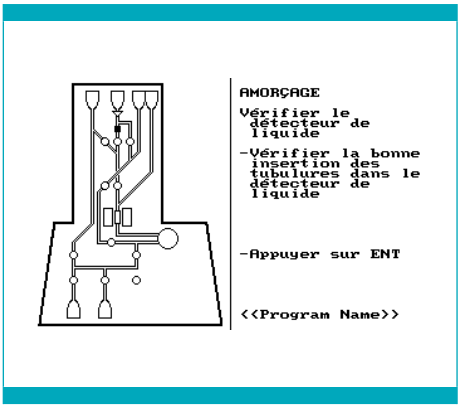
Pour continuer, appuyer sur **ENT**.

Vérification finale du détecteur de liquide

L'Écran 7.69 s'affiche.

1. Vérifier la tubulure au niveau du détecteur de liquide. S'assurer que la tubulure est correctement insérée, qu'elle n'a pas été déplacée pendant la procédure de chargement et de l'absence de liquide à l'extérieur de celle-ci.
2. S'assurer d'un flux libre vers chaque poche.

Pour continuer, appuyer sur **ENT**.



Écran 7.69 : Vérification finale du détecteur de liquide

▶ **Passer à l'ÉTAPE 4.**

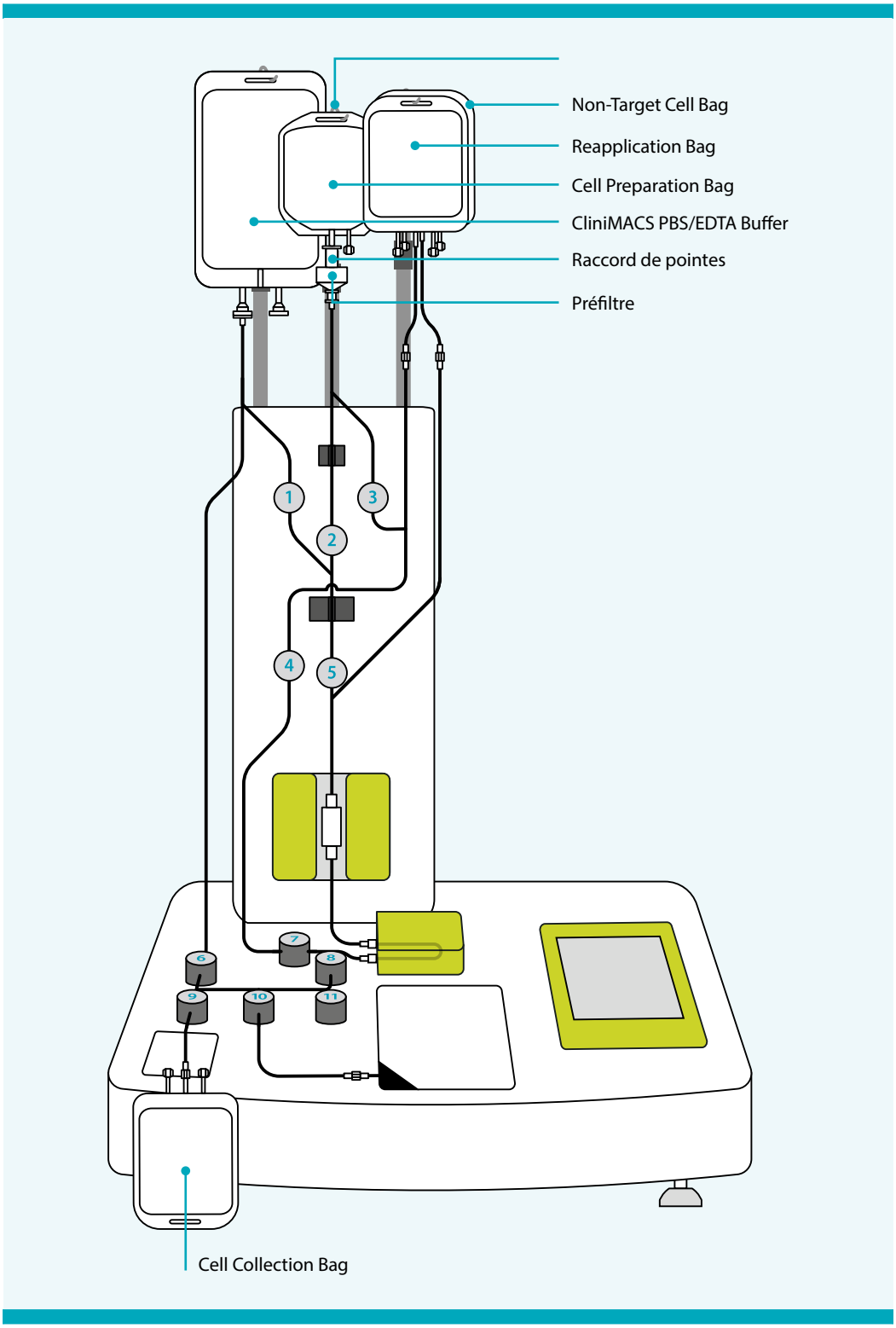


Figure 7.21 : Le CliniMACS Plus Instrument avec CliniMACS Depletion Tubing Set, CliniMACS PBS/EDTA Buffer, Cell Preparation Bag et Cell Collection Bag

7.4 ÉTAPE 4 : Séparation CliniMACS Plus

7.4.1 CD34 SELECTION 1/2

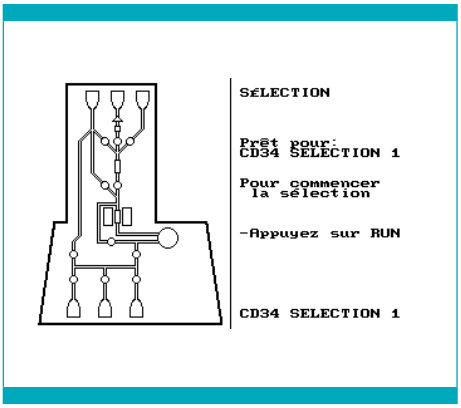
Une fois la vérification finale accomplie, le CliniMACS Plus Instrument est prêt à commencer la séparation (voir Écran 7.70).

Pour continuer, appuyer sur **RUN**.

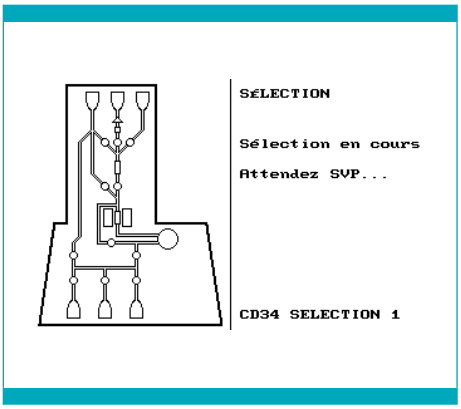
Une fois la touche **RUN** appuyée, l'instrument effectue automatiquement la procédure de séparation sélectionnée.

Á chaque étape de l'opération, un écran semblable à l'Écran 7.71 s'affiche pour indiquer le statut de la procédure de séparation.

L'indicateur de position de l'aimant est représenté par deux boîtes noires à côté de la colonne de séparation lorsque l'aimant se trouve en position « ON », c'est-à-dire qu'il a été déplacé vers l'avant pour magnétiser la colonne de séparation. Si l'indicateur de position de l'aimant est transparent (par ex. Écran 7.70), l'aimant est en position « OFF », c'est-à-dire qu'il a été déplacé vers l'arrière de l'instrument. Lorsque l'aimant est en position « OFF », la colonne de séparation se trouve en dehors du champ magnétique et n'est plus magnétisée.



Écran 7.70 : Démarrer la séparation



Écran 7.71 : Séparation en cours

Remarque : L'écran peut afficher un nom de programme différent selon le programme de séparation sélectionné (CD34 SELECTION 1 ou 2).

Procédure de séparation

Charger les cellules

La procédure de séparation commence en remplissant le préfiltre pour y retirer l'air restant.

Ensuite, la séparation des cellules marquées commence. La pompe aspire le contenu de la Cell Preparation Bag dans le jeu de tubulures et charge le produit cellulaire via la précolonne sur la colonne de séparation. Les cellules marquées magnétiquement (cellules cibles) sont retenues dans la colonne de séparation qui est placée dans le champ magnétique, tandis que les cellules non marquées

(cellules non cibles) passent à travers et sont recueillies dans la Negative Fraction Bag. Une fois la Cell Preparation Bag vide (ce qui est détecté automatiquement par le détecteur de liquide), le préfiltre est rincé deux fois avec du tampon.

Lavage I de la colonne
La précolonne et la colonne de séparation sont lavées intensivement pour éliminer toutes les cellules non marquées. Le tampon de lavage est recueilli dans la Buffer Waste Bag. Une fois le « Lavage I de la colonne » commencé, le temps total restant jusqu'à la fin de la procédure de séparation est affiché.

IMPORTANT
Au début de la séparation, le tampon est pompé vers le haut dans la Cell Preparation Bag pour remplir le préfiltre. Tapoter doucement sur le côté du filtre à plusieurs reprises pour éliminer les bulles qui pourraient être piégées dans le filtre.

Libération I des cellules

L'aimant est déplacé vers l'arrière de l'instrument (position « OFF »). Les cellules retenues sont libérées par un flux à grande vitesse, mais les cellules restent dans un cycle de tubulure interne.

Rechargement I des cellules

L'aimant est replacé en position « ON » pour magnétiser la colonne de séparation et les cellules sont ré-appliquées sur la colonne de séparation.

Lavage II de la colonne

Le rechargement des cellules est suivi d'une deuxième étape de lavage pour prélever les cellules non marquées restantes. Toute la tubulure est également rincée plusieurs fois.

Libération II des cellules, rechargement II des cellules, lavage III de la colonne

Les cellules sont libérées et ré-appliquées sur la colonne de séparation pour une deuxième fois afin de prélever toutes les cellules non marquées qui adhèrent de manière non spécifique à la matrice de la colonne. Ensuite, la colonne de séparation est lavée à nouveau.

Libération III des cellules, rechargement III des cellules, lavage IV de la colonne

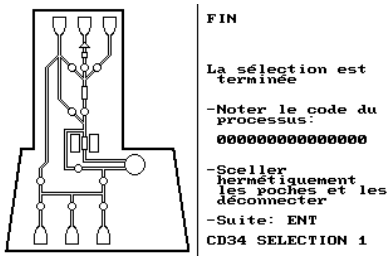
De plus, le programme de séparation CD34 SELECTION 2 comprend une troisième étape de libération et de ré-application.

Élution finale des cellules

L'aimant est déplacé en position « OFF » et les cellules marquées magnétiquement sont libérées de la colonne de séparation et recueillies dans la Cell Collection Bag.

Débrancher les poches et noter le code du processus

Une fois le cycle terminé, l'Écran 7.72 s'affiche.



Écran 7.72 : Débrancher les poches et noter le code du processus

1. Noter le code du processus.
2. Clamper ou sceller la tubulure au-dessus du raccord Luer reliant la Cell Collection Bag au jeu de tubulures (voir Figure 7.22).

   Faire trois soudures hermétiques sur la tubulure, directement au dessous de la valve n° 9. Couper avec précaution au niveau de la soudure centrale pour débrancher la Cell Collection Bag du jeu de tubulures.
3. Peser la Cell Collection Bag pleine. Noter le poids.

   Déterminer le poids de la fraction de cellules cibles en soustrayant le poids de la Cell Collection Bag vide du poids de la Cell Collection Bag contenant les cellules cibles. Noter le poids.
4. Mélanger avec précaution la suspension de cellules cibles par de légers mouvements de rotation. Prélever une quantité appropriée, par ex. 0,5 mL et conserver pour analyse.
5. Sceller la tubulure à l'aide de la soudeuse, au-dessus du raccord Luer de la Negative Fraction Bag. Faire trois soudures hermétiques sur la tubulure. Couper au niveau de la soudure centrale pour débrancher la Negative Fraction Bag.
6. Débrancher la Buffer Waste Bag de la même manière.

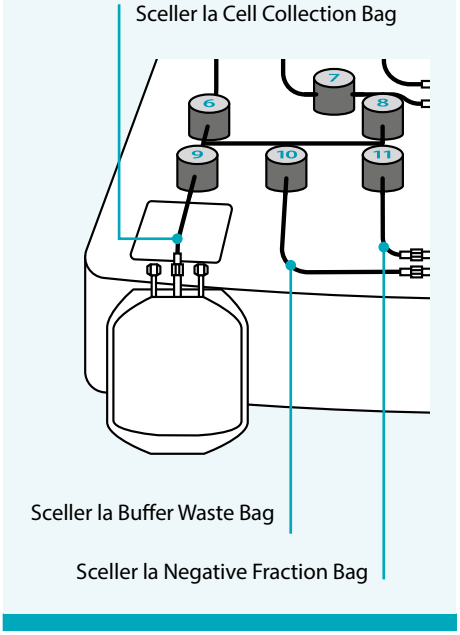


Figure 7.22 : Débrancher les poches

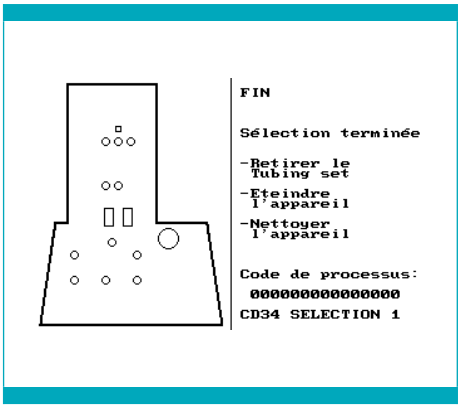
7. Décrocher la Negative Fraction Bag et la Buffer Waste Bag. Conserver toutes les poches jusqu'à ce que l'analyse finale de toutes les cellules ait été accomplie.

Maintenant, les cellules cibles peuvent être traitées selon les protocoles cliniques.

Pour continuer, appuyer sur **RUN**.

Démonter le jeu de tubulures et éteindre

L'Écran 7.73 s'affiche.



Écran 7.73 : Démonter le jeu de tubulures et éteindre

1. Retirer le jeu de tubulures : Commencer avec les valves n^{os} 6, 9 10 et 11, et en progressant vers le haut, débrancher la tubulure du détecteur de liquide et des valves en appuyant sur les valves. Sortir les colonnes des supports de colonne. Éliminer le jeu de tubulures comme déchet à risque biologique, conformément aux procédures hospitalières standard.
2. Éteindre le CliniMACS Plus Instrument.
3. Nettoyer l'instrument selon les instructions de nettoyage, voir le paragraphe « Nettoyage et désinfection » dans le manuel d'utilisation du CliniMACS Plus Instrument. Suivre les procédures standard pour le traitement de matières infectieuses.

Analyse des cellules

IMPORTANT

- *Il n'est pas nécessaire d'éliminer le CliniMACS PBS/EDTA Buffer avant l'administration des cellules cibles séparées si le volume ne dépasse pas 100 mL par transplantation aux débits de perfusion appropriés. L'état rénal du patient et les effets sur les électrolytes sanguins doivent être pris en compte. En particulier chez les enfants, les débits de perfusion doivent être ajustés en conséquence.*
- *Si le volume de la fraction des cellules cibles dépasse 100 mL, il doit être réduit par des moyens appropriés, par ex. par centrifugation ou remplacement du tampon, à une solution pour perfusion approuvée dans le pays de l'utilisateur.*

⚠ ATTENTION

Risque de diminution de la qualité des cellules cibles. Les cellules cibles doivent être analysées et il faut s'assurer qu'elles répondent aux exigences de l'utilisateur, sinon l'aptitude à l'application clinique peut être compromise. Examiner les cellules cibles quant à leur qualité et leur quantité en fonction de l'utilisation prévue.

Cet examen doit comprendre les paramètres suivants :

- nombre total de leucocytes
- viabilité et nombre total de cellules cibles
- pureté et récupération des cellules cibles

Il est également recommandé de déterminer le nombre total de leucocytes et la viabilité de la fraction de cellules non cibles. Cette liste est un exemple et d'autres tests devraient être inclus en fonction de l'utilisation prévue et des protocoles cliniques. Noter les données de l'analyse.

7.4.2 ENRICHMENT 1.1

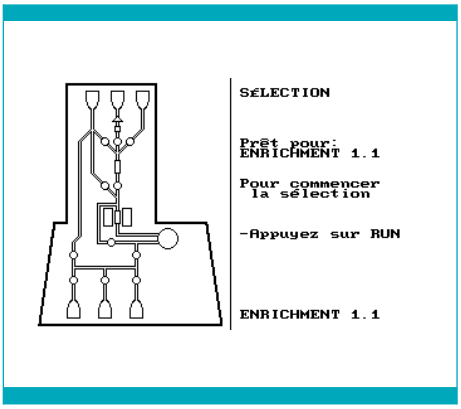
Une fois la vérification finale accomplie, le CliniMACS Plus Instrument est prêt à commencer la séparation. L'Écran 7.74 s'affiche.

Pour continuer, appuyer sur **RUN**.

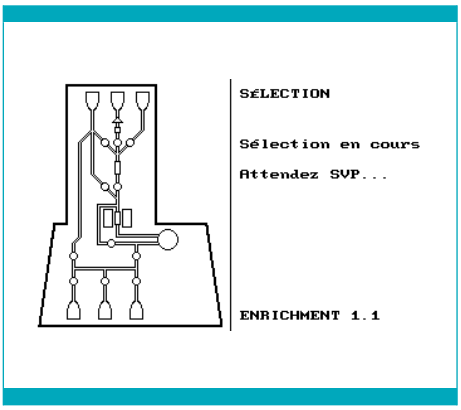
Une fois la touche **RUN** appuyée, l'instrument effectue automatiquement la procédure de séparation sélectionnée.

Á chaque étape de l'opération, un écran semblable à l'Écran 7.75 s'affiche pour indiquer le statut de la procédure de séparation.

L'indicateur de position de l'aimant est représenté par deux boîtes noires à côté de la colonne de séparation lorsque l'aimant se trouve en position « ON », c'est-à-dire qu'il a été déplacé vers l'avant pour magnétiser la colonne de séparation. Si l'indicateur de position de l'aimant est transparent (par ex. Écran 7.74), l'aimant est en position « OFF », c'est-à-dire qu'il a été déplacé vers l'arrière de l'instrument. Lorsque l'aimant est en position « OFF », donc à l'arrière de l'instrument, la colonne de séparation se trouve en dehors du champ magnétique et n'est plus magnétisée.



Écran 7.74 : Démarrer la séparation



Écran 7.75 : Séparation en cours

Procédure de séparation

Charger les cellules

La procédure de séparation commence en remplissant le préfiltre pour en retirer l'air restant. Ensuite, la séparation des cellules marquées commence. La pompe aspire le contenu de la Cell Preparation Bag dans le jeu de tubulures et charge le produit cellulaire via la précolonne sur la colonne de séparation. Les cellules marquées magnétiquement (cellules cibles) sont retenues dans la colonne de séparation qui est placée dans le champ magnétique, tandis que les cellules non marquées (cellules non cibles) passent à travers et sont recueillies dans la Negative Fraction Bag.

IMPORTANT

Au début de la séparation, le tampon est pompé vers le haut dans la Cell Preparation Bag pour remplir le préfiltre. Tapoter doucement sur le côté du filtre à plusieurs reprises pour éliminer les bulles qui pourraient être piégées dans le filtre.

Remarque :

- Si le nombre de cellules marquées magnétiquement (calculé par le logiciel CliniMACS Plus) dépasse la capacité de liaison dans la colonne de séparation, le programme de séparation charge et divise automatiquement l'échantillon cellulaire en fractions appropriées ("staged loading").
- Lorsque la capacité de la colonne de séparation est atteinte, le chargement est stoppé et le programme de séparation procède à l'étape suivante. Une fois la dernière étape (élution finale des cellules) terminée, la fraction suivante de l'échantillon sera chargée sur la colonne et traitée en conséquence.

Lavage I de la colonne

La précolonne et la colonne de séparation sont lavées intensivement pour éliminer toutes les cellules non marquées. Le tampon de lavage est recueilli dans la Buffer Waste Bag.

Libération des cellules

L'aimant est déplacé vers l'arrière de l'instrument (position « OFF »). Les cellules retenues sont libérées par un flux à grande vitesse, mais les cellules restent dans un cycle de tubulure interne.

Rechargement des cellules

L'aimant est replacé en position « ON » pour magnétiser la colonne de séparation et les cellules sont ré-appliquées sur la colonne de séparation.

Lavage II de la colonne

Le rechargement des cellules est suivi d'une deuxième étape de lavage pour prélever les cellules non marquées restantes. Toute la tubulure est également rincée plusieurs fois.

Élution finale des cellules

L'aimant est déplacé en position « OFF » et les cellules marquées magnétiquement (cellules cibles) sont libérées de la colonne de séparation et recueillies dans la Cell Collection Bag.

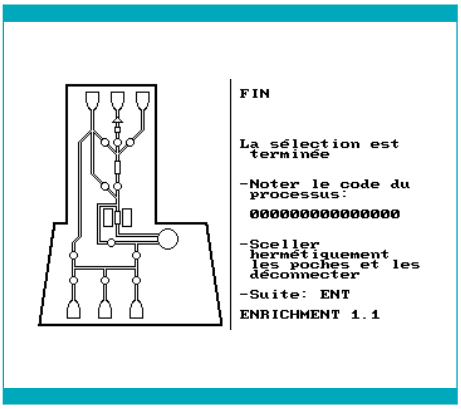
Débrancher les poches et noter le code du processus

Une fois le cycle terminé, l'Écran 7.76 s'affiche.

1. Noter le code du processus.
2. Clamper ou sceller la tubulure au-dessus du raccord Luer reliant la Cell Collection Bag au jeu de tubulures (voir Figure 7.22).

   Faire trois soudures hermétiques sur la tubulure, directement au dessous de la valve n° 9. Couper avec précaution au niveau de la soudure centrale pour débrancher la Cell Collection Bag du jeu de tubulures.
3. Peser la Cell Collection Bag pleine. Noter le poids.

   Déterminer le poids de la fraction de cellules cibles en soustrayant le poids de la Cell Collection Bag vide du poids de la Cell Collection Bag contenant les cellules cibles. Noter le poids.
4. Mélanger avec précaution la suspension de cellules cibles par de légers mouvements de rotation. Prélever une quantité appropriée, par ex. 0,5 mL et la conserver pour analyse.
5. Sceller la tubulure à l'aide de la soudeuse, au-dessus du raccord Luer de la Negative Fraction Bag. Faire trois soudures hermétiques sur la tubulure. Couper au niveau de la soudure centrale pour débrancher la Negative Fraction Bag.
6. Débrancher la Buffer Waste Bag de la même manière.



Écran 7.76 : Débrancher les poches et noter le code du processus

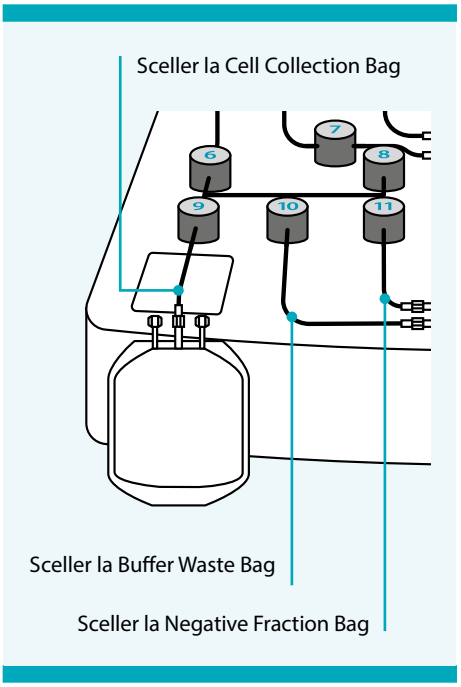


Figure 7.23 : Débrancher les poches

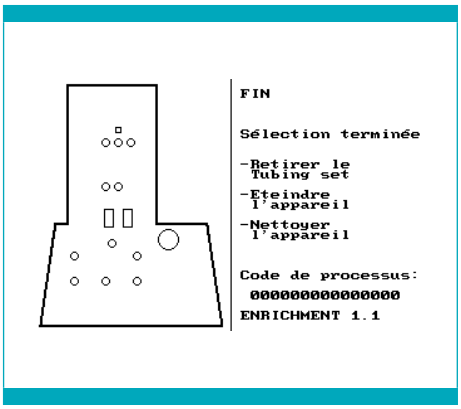
7. Décrocher la Negative Fraction Bag et la Buffer Waste Bag. Conserver toutes les poches jusqu'à ce que l'analyse finale de toutes les cellules ait été accomplie.

Maintenant, les cellules cibles peuvent être traitées selon les protocoles cliniques.

Pour continuer, appuyer sur **ENT**.

Démonter le jeu de tubulures et éteindre

L'Écran 7.77 s'affiche.



Écran 7.77 : Démonter le jeu de tubulures et éteindre

1. Retirer le jeu de tubulures : Commencer avec les valves n^{os} 6, 9 10 et 11, et en progressant vers le haut, débrancher la tubulure du détecteur de liquide et des valves en appuyant sur les valves. Sortir les colonnes des supports de colonne. Éliminer le jeu de tubulures comme déchet à risque biologique, conformément aux procédures hospitalières standard.
2. Éteindre le CliniMACS Plus Instrument.
3. Nettoyer l'instrument selon les instructions de nettoyage, voir le paragraphe « Nettoyage et désinfection » dans le manuel d'utilisation du CliniMACS Plus Instrument. Suivre les procédures standard pour le traitement de matières infectieuses.

Analyse des cellules

IMPORTANT

- *Il n'est pas nécessaire d'éliminer le CliniMACS PBS/EDTA Buffer avant l'administration des cellules cibles séparées si le volume ne dépasse pas 100 mL par transplantation aux débits de perfusion appropriés. L'état rénal du patient et les effets sur les électrolytes sanguins doivent être pris en compte. En particulier chez les enfants, les débits de perfusion doivent être ajustés en conséquence.*
- *Si le volume de la fraction des cellules cibles dépasse 100 mL, il doit être réduit par des moyens appropriés, par ex. par centrifugation ou remplacement du tampon, à une solution pour perfusion approuvée dans le pays de l'utilisateur.*

⚠ ATTENTION

Risque de diminution de la qualité des cellules cibles. Les cellules cibles doivent être analysées et il faut s'assurer qu'elles répondent aux exigences de l'utilisateur, sinon l'aptitude à l'application clinique peut être compromise. Examiner les cellules cibles quant à leur qualité et leur quantité en fonction de l'utilisation prévue.

Cet examen doit comprendre les paramètres suivants :

- nombre total de leucocytes
- viabilité et nombre total de cellules cibles
- pureté (efficacité de la déplétion) et récupération des cellules cibles.

Il est également recommandé de déterminer le nombre total de leucocytes et la viabilité de la fraction de cellules non cibles. Cette liste est un exemple et d'autres tests devraient être inclus en fonction de l'utilisation prévue et des protocoles cliniques. Noter les données de l'analyse.

7.4.3 ENRICHMENT 3.2

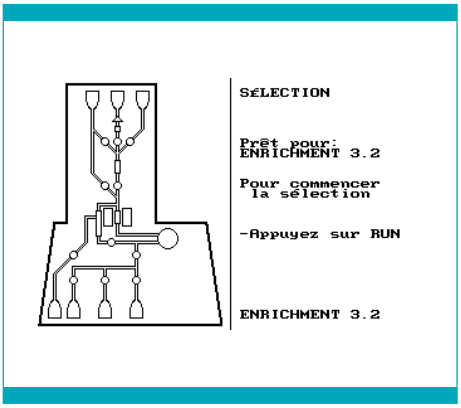
Une fois la vérification finale accomplie, le CliniMACS Plus Instrument est prêt à commencer la séparation. L'Écran 7.78 s'affiche.

Pour continuer, appuyer sur **RUN**.

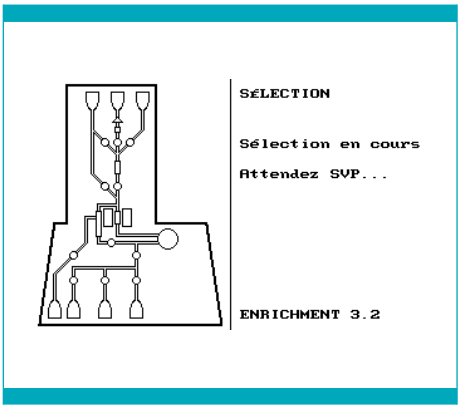
Une fois la touche **RUN** appuyée, l'instrument effectue automatiquement la procédure de séparation sélectionnée.

Á chaque étape de l'opération, un écran semblable à l'Écran 7.79 s'affiche pour indiquer le statut de la procédure de séparation.

L'indicateur de position de l'aimant est représenté par deux boîtes noires à côté de la colonne de séparation lorsque l'aimant se trouve en position « ON », c'est-à-dire qu'il a été déplacé vers l'avant pour magnétiser la colonne de séparation. Si l'indicateur de position de l'aimant est transparent (par ex. Écran 7.78), l'aimant est en position « OFF », c'est-à-dire qu'il a été déplacé vers l'arrière de l'instrument. Lorsque l'aimant est en position « OFF », donc à l'arrière de l'instrument, la colonne de séparation se trouve en dehors du champ magnétique et n'est plus magnétisée.



Écran 7.78 : Démarrer la séparation



Écran 7.79 : Séparation en cours

Procédure de séparation

Charger les cellules

La procédure de séparation commence en remplissant le préfiltre pour en retirer l'air restant. Ensuite, la séparation des cellules marquées commence. La pompe aspire le contenu de la Cell Preparation Bag dans le jeu de tubulures et charge le produit cellulaire via la précolonne sur la colonne de séparation. Les cellules marquées magnétiquement (cellules cibles) sont retenues dans la colonne de séparation qui est placée dans le champ magnétique, tandis que les cellules non marquées (cellules non cibles) passent à travers et sont recueillies dans la Negative Fraction Bag. Une fois la Cell Preparation Bag vide (ce qui est détecté automatiquement par le détecteur de liquide), le préfiltre est rincé deux fois à l'aide du tampon.

IMPORTANT
Au début de la séparation, le tampon est pompé vers le haut dans la Cell Preparation Bag pour remplir le préfiltre. Tapoter doucement sur le côté du filtre à plusieurs reprises pour éliminer les bulles qui pourraient être piégées dans le filtre.

Lavage I de la colonne

La précolonne et la colonne de séparation sont lavées intensivement pour éliminer toutes les cellules non marquées. Le tampon de lavage est recueilli dans la Buffer Waste Bag.

Libération I des cellules

L'aimant est déplacé vers l'arrière de l'instrument (position « OFF »). Les cellules retenues sont libérées par un flux à grande vitesse, mais les cellules restent dans un cycle de tubulure interne.

Rechargement I des cellules

L'aimant est replacé en position « ON » pour magnétiser la colonne de séparation et les cellules sont ré-appliquées sur la colonne de séparation.

Lavage II de la colonne

Le rechargement des cellules est suivi d'une deuxième étape de lavage pour prélever les cellules non marquées restantes. Toute la tubulure est également rincée plusieurs fois.

Libération II des cellules, rechargement II des cellules, lavage III de la colonne

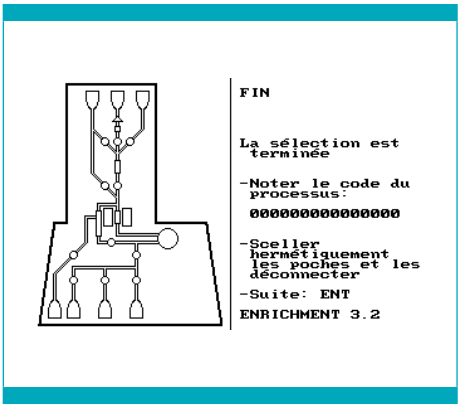
Les cellules sont libérées et réappliquées sur la colonne de séparation pour une deuxième fois afin d'éliminer toutes les cellules non marquées qui adhèrent de manière non spécifique à la matrice de la colonne. Ensuite, la colonne de séparation est lavée à nouveau.

Élution finale des cellules

L'aimant est déplacé en position « OFF » et les cellules marquées magnétiquement (cellules cibles) sont libérées et recueillies dans la Cell Collection Bag.

Débrancher les poches et noter le code du processus

Une fois le cycle terminé, l'Écran 7.80 s'affiche.



Écran 7.80 : Débrancher les poches et noter le code du processus

1. Noter le code du processus.
2. Clamper ou sceller la tubulure au-dessus du raccord Luer reliant la Cell Collection Bag au jeu de tubulures (voir Figure 7.23).

   Faire trois soudures hermétiques sur la tubulure, directement au dessous de la valve n° 9. Couper avec précaution au niveau de la soudure centrale pour débrancher la Cell Collection Bag du jeu de tubulures.
3. Peser la Cell Collection Bag pleine. Noter le poids.

   Déterminer le poids de la fraction de cellules cibles en soustrayant le poids de la Cell Collection Bag vide du poids de la Cell Collection Bag contenant les cellules cibles. Noter le poids.
4. Mélanger avec précaution la suspension de cellules cibles par de légers mouvements de rotation. Prélever une quantité appropriée, par ex. 0,5 mL et la conserver pour analyse.
5. Sceller la tubulure à l'aide de la soudeuse, au-dessus du raccord Luer de la Negative Fraction Bag. Faire trois soudures hermétiques sur la tubulure. Couper au niveau de la soudure centrale pour débrancher la Negative Fraction Bag.
6. Débrancher la Buffer Waste Bag de la même manière.

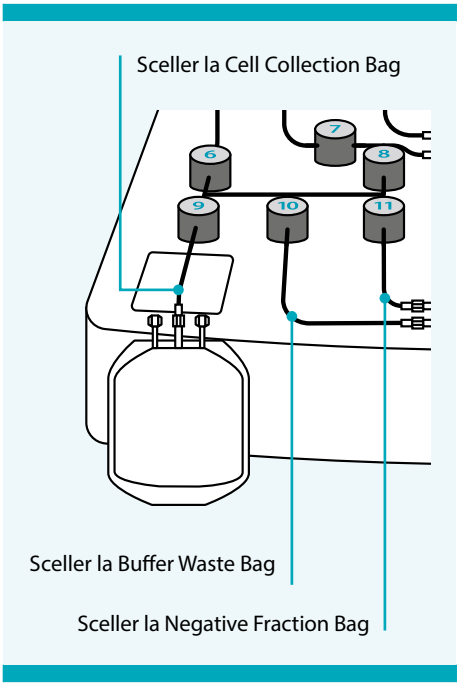


Figure 7.24 : Débrancher les poches

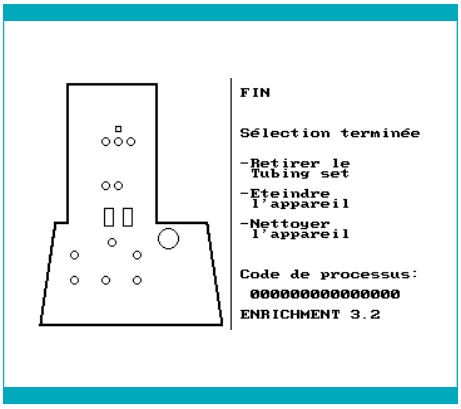
7. Décrocher la Negative Fraction Bag et la Buffer Waste Bag. Conserver toutes les poches jusqu'à ce que l'analyse finale de toutes les cellules ait été accomplie.

Maintenant, les cellules cibles peuvent être traitées selon les protocoles cliniques.

Pour continuer, appuyer sur **ENT**.

Démonter le jeu de tubulures et éteindre

L'Écran 7.81 s'affiche.



Écran 7.81 : Démonter le jeu de tubulures et éteindre

1. Retirer le jeu de tubulures : Commencer avec les valves n^{os} 6, 9 10 et 11, et en progressant vers le haut, débrancher la tubulure du détecteur de liquide et des valves en appuyant sur les valves. Sortir les colonnes des supports de colonne. Éliminer le jeu de tubulures comme déchet à risque biologique, conformément aux procédures hospitalières standard.
2. Éteindre le CliniMACS Plus Instrument.
3. Nettoyer l'instrument selon les instructions de nettoyage, voir le paragraphe « Nettoyage et désinfection » dans le manuel d'utilisation du CliniMACS Plus Instrument. Suivre les procédures standard pour le traitement de matières infectieuses.

Analyse des cellules

IMPORTANT

- *Il n'est pas nécessaire d'éliminer le CliniMACS PBS/EDTA Buffer avant l'administration des cellules cibles séparées si le volume ne dépasse pas 100 mL par transplantation aux débits de perfusion appropriés. L'état rénal du patient et les effets sur les électrolytes sanguins doivent être pris en compte. En particulier chez les enfants, les débits de perfusion doivent être ajustés en conséquence.*
- *Si le volume de la fraction des cellules cibles dépasse 100 mL, il doit être réduit par des moyens appropriés, par ex. par centrifugation ou remplacement du tampon, à une solution pour perfusion approuvée dans le pays de l'utilisateur.*

⚠ ATTENTION

Risque de diminution de la qualité des cellules cibles. Les cellules cibles doivent être analysées et il faut s'assurer qu'elles répondent aux exigences de l'utilisateur, sinon l'aptitude à l'application clinique peut être compromise. Examiner les cellules cibles quant à leur qualité et leur quantité en fonction de l'utilisation prévue.

Cet examen doit comprendre les paramètres suivants :

- nombre total de leucocytes
- viabilité et nombre total de cellules cibles
- pureté et récupération des cellules cibles

Il est également recommandé de déterminer le nombre total de leucocytes et la viabilité de la fraction de cellules non cibles. Cette liste est un exemple et d'autres tests devraient être inclus en fonction de l'utilisation prévue et des protocoles cliniques. Noter les données de l'analyse.

7.4.4 DEPLETION 2.1

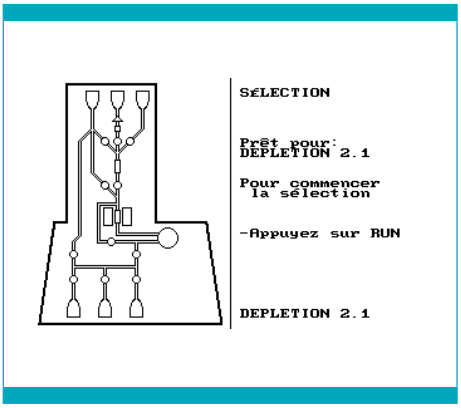
Une fois la vérification finale accomplie, le CliniMACS Plus Instrument est prêt à commencer la séparation. L'Écran 7.82 s'affiche.

Pour continuer, appuyer sur **RUN**.

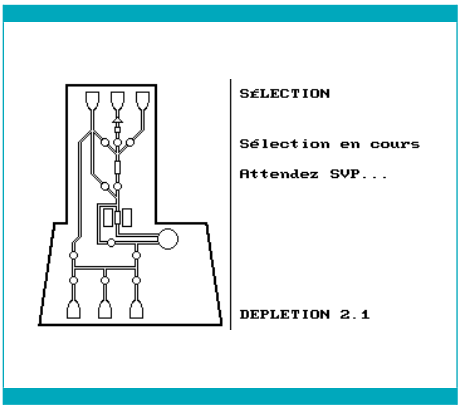
Une fois la touche **RUN** appuyée, l'instrument effectue automatiquement la procédure de séparation sélectionnée.

Á chaque étape de l'opération, un écran semblable à l'Écran 7.83 s'affiche pour indiquer le statut de la procédure de séparation.

L'indicateur de position de l'aimant est représenté par deux boîtes noires à côté de la colonne de séparation lorsque l'aimant se trouve en position « ON », c'est-à-dire qu'il a été déplacé vers l'avant pour magnétiser la colonne de séparation. Si l'indicateur de position de l'aimant est transparent (par ex. Écran 7.82), l'aimant est en position « OFF », c'est-à-dire qu'il a été déplacé vers l'arrière de l'instrument. Lorsque l'aimant est en position « OFF », donc à l'arrière de l'instrument, la colonne de séparation se trouve en dehors du champ magnétique et n'est plus magnétisée.



Écran 7.82 : Démarrer la séparation



Écran 7.83 : Séparation en cours

Procédure de séparation

Charger les cellules

La procédure de séparation commence en remplissant le préfiltre pour compléter l'amorçage du système. Ensuite, la séparation des cellules marquées commence. La pompe aspire le contenu de la Cell Preparation Bag dans le jeu de tubulures. Les cellules marquées magnétiquement (cellules non cibles) sont retenues dans la colonne de séparation qui est placée dans le champ magnétique, tandis que les cellules non marquées (cellules cibles) passent à travers et sont recueillies dans la Cell Collection Bag.

IMPORTANT
Au début de la séparation, le tampon est pompé vers le haut dans la Cell Preparation Bag pour remplir le préfiltre. Tapoter doucement sur le côté du filtre à plusieurs reprises pour éliminer les bulles qui pourraient être piégées dans le filtre.

Rinçage du préfiltre

Une fois l'échantillon cellulaire chargé complètement sur le jeu de tubulures, le préfiltre est rincé deux fois avec le tampon pour réduire la perte de cellules dans le filtre.

Remarque :

- Si le nombre de cellules marquées magnétiquement (calculé par le logiciel CliniMACS Plus) dépasse la capacité de liaison dans la colonne de séparation, le programme de séparation charge et divise automatiquement l'échantillon cellulaire en fractions appropriées ("staged loading").
- Lorsque la capacité de la colonne de séparation est atteinte, le chargement est stoppé et le programme de séparation procède à l'étape suivante. Une fois la dernière étape (élution finale des cellules) terminée, la fraction suivante de l'échantillon sera chargée sur la colonne.

Lavage de la colonne

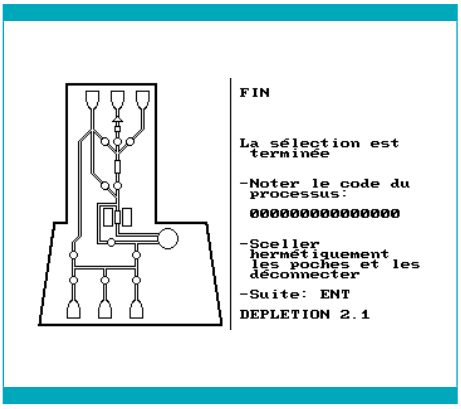
La précolonne et la colonne de séparation sont lavées intensivement pour éliminer toutes les cellules non marquées. Le tampon de lavage est recueilli dans la Buffer Waste Bag.

Élution finale des cellules

L'aimant est déplacé en position « OFF ». Les cellules marquées magnétiquement sont d'abord éluées vers la Priming Waste Bag. Ce n'est qu'après la dernière étape de chargement que toutes les cellules marquées magnétiquement (cellules non cibles) sont libérées de la colonne de séparation et recueillies dans la Negative Fraction Bag pour réduire le contenu en cellules marquées dans la tubulure de la pompe.

Débrancher les poches et noter le code du processus

Une fois le cycle terminé, l'Écran 7.84 s'affiche.



Écran 7.84 : Débrancher les poches et noter le code du processus

1. Noter le code du processus.
2. Clamper ou sceller la tubulure au-dessus du raccord Luer reliant la Cell Collection Bag au jeu de tubulures (voir Figure 7.24).

   Faire trois soudures hermétiques sur la tubulure, directement au dessous de la valve n° 9. Couper avec précaution au niveau de la soudure centrale pour débrancher la Cell Collection Bag du jeu de tubulures.
3. Peser la Cell Collection Bag pleine. Noter le poids.

   Déterminer le poids de la fraction de cellules cibles en soustrayant le poids de la Cell Collection Bag vide du poids de la Cell Collection Bag contenant les cellules cibles. Noter le poids.
4. Mélanger avec précaution la suspension de cellules cibles par de légers mouvements de rotation. Prélever une quantité appropriée, par ex. 0,5 mL et la conserver pour analyse.
5. Sceller la tubulure à l'aide de la soudeuse, au-dessus du raccord Luer de la Negative Fraction Bag. Faire trois soudures hermétiques sur la tubulure. Couper au niveau de la soudure centrale pour débrancher la Negative Fraction Bag.
6. Débrancher la Buffer Waste Bag de la même manière.

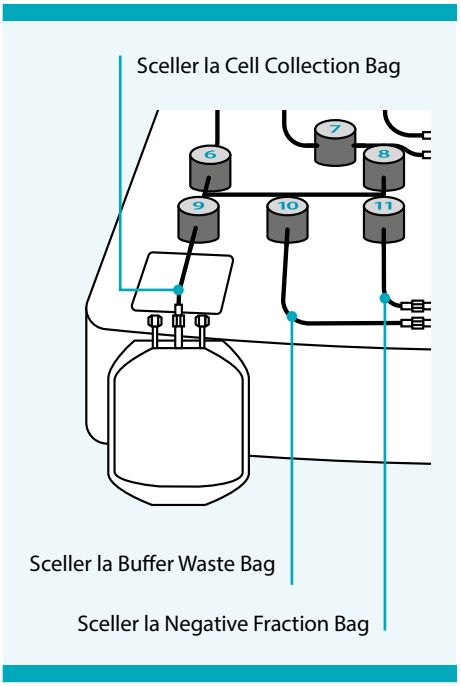


Figure 7.25 : Débrancher les poches

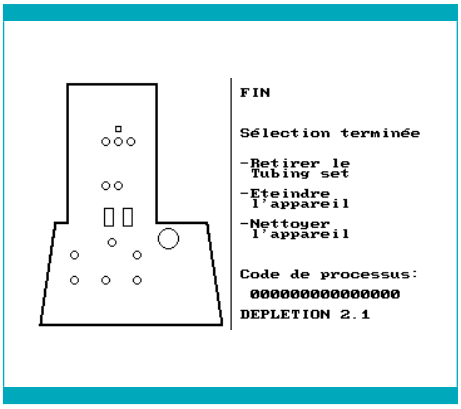
7. Décrocher la Negative Fraction Bag et la Buffer Waste Bag. Conserver toutes les poches jusqu'à ce que l'analyse finale de toutes les cellules ait été accomplie.

Maintenant, les cellules cibles peuvent être traitées selon les protocoles cliniques.

Pour continuer, appuyer sur **ENT**.

Démonter le jeu de tubulures et éteindre

L'Écran 7.85 s'affiche.



Écran 7.85 : Démonter le jeu de tubulures et éteindre

1. Démonter le jeu de tubulures : Commencer avec les valves nos 6, 9 et 10, et en progressant vers le haut, débrancher la tubulure du détecteur de liquide et des valves en appuyant sur les valves. Sortir les colonnes des supports de colonne. Éliminer le jeu de tubulures comme déchet à risque biologique, conformément aux procédures hospitalières standard.
2. Éteindre le CliniMACS Plus Instrument.
3. Nettoyer l'instrument selon les instructions de nettoyage, voir le paragraphe « Nettoyage et désinfection » dans le manuel d'utilisation du CliniMACS Plus Instrument. Suivre les procédures standard pour le traitement de matières infectieuses.

Analyse des cellules

IMPORTANT

- *Il n'est pas nécessaire d'éliminer le CliniMACS PBS/EDTA Buffer avant l'administration des cellules cibles séparées si le volume ne dépasse pas 100 mL par transplantation aux débits de perfusion appropriés. L'état rénal du patient et les effets sur les électrolytes sanguins doivent être pris en compte. En particulier chez les enfants, les débits de perfusion doivent être ajustés en conséquence.*
- *Si le volume de la fraction des cellules cibles dépasse 100 mL, il doit être réduit par des moyens appropriés, par ex. par centrifugation ou remplacement du tampon, à une solution pour perfusion approuvée dans le pays de l'utilisateur.*

⚠ ATTENTION

Risque de diminution de la qualité des cellules cibles. Les cellules cibles doivent être analysées et il faut s'assurer qu'elles répondent aux exigences de l'utilisateur, sinon l'aptitude à l'application clinique peut être compromise. Examiner les cellules cibles quant à leur qualité et leur quantité en fonction de l'utilisation prévue.

Cet examen doit comprendre les paramètres suivants :

- nombre total de leucocytes
- viabilité et nombre total de cellules cibles
- efficacité de la déplétion

Il est également recommandé de déterminer le nombre total de leucocytes et la viabilité de la fraction de cellules non cibles. Cette liste est un exemple et d'autres tests devraient être inclus en fonction de l'utilisation prévue et des protocoles cliniques. Noter les données de l'analyse.

7.4.5 DEPLETION 3.1

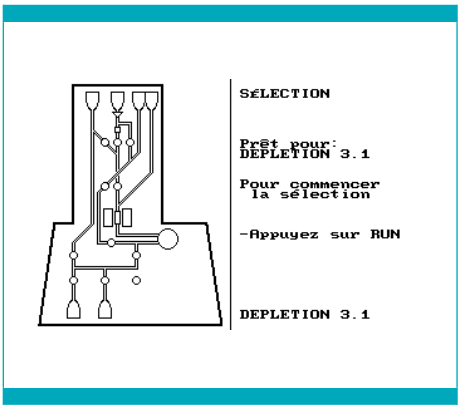
Une fois la vérification finale accomplie, le CliniMACS Plus Instrument est prêt à commencer la séparation. L'Écran 7.86 s'affiche.

Pour continuer, appuyer sur **RUN**.

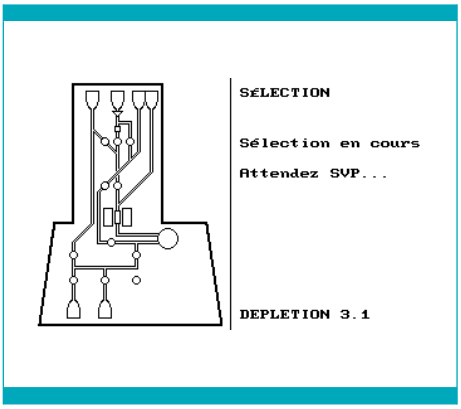
Une fois la touche **RUN** appuyée, l'instrument effectue automatiquement la procédure de séparation sélectionnée.

Á chaque étape de l'opération, un écran semblable à l'Écran 7.87 s'affiche pour indiquer le statut de la procédure de séparation.

L'indicateur de position de l'aimant est représenté par deux boîtes noires à côté de la colonne de séparation lorsque l'aimant se trouve en position « ON », c'est-à-dire qu'il a été déplacé vers l'avant pour magnétiser la colonne de séparation. Si l'indicateur de position de l'aimant est transparent (par ex. Écran 7.86), l'aimant est en position « OFF », c'est-à-dire qu'il a été déplacé vers l'arrière de l'instrument. Lorsque l'aimant est en position « OFF », donc à l'arrière de l'instrument, la colonne de séparation se trouve en dehors du champ magnétique et n'est plus magnétisée.



Écran 7.86 : Démarrer la séparation



Écran 7.87 : Séparation en cours

Procédure de séparation

Depletion 3.1 est un programme de déplétion en deux étapes, c.-à-d. que les cellules sont appliquées deux fois sur la colonne de séparation.

Dans la première partie du processus, la majorité des cellules marquées est déplétée (Staged Cell Loading [Bulk Loading Stage]). Dans la deuxième partie du processus, les quelques cellules marquées restantes sont déplétées (Sensitive Sample Loading [Sensitive Loading Stage]).

IMPORTANT

Au début de la séparation, le tampon est pompé vers le haut dans la Cell Preparation Bag pour remplir le préfiltre. Tapoter doucement sur le côté du filtre à plusieurs reprises pour éliminer les bulles qui pourraient être piégées dans le filtre.

Remarque :
Si le nombre de cellules marquées magnétiquement (calculé par le logiciel CliniMACS Plus) dépasse la capacité de liaison dans la colonne de séparation, le programme de séparation charge et divise automatiquement l'échantillon cellulaire en fractions appropriées ("staged loading"). Entre chaque étape de chargement, la colonne de séparation est lavée pour éliminer toutes les cellules marquées. Les cellules marquées sont éluées et retenues dans la Non-Target Cell Bag. Le tampon de lavage est recueilli dans la Reapplication Bag.

Staged cell loading (Bulk Loading Stage)

La procédure de séparation commence en remplissant le préfiltre pour compléter l'amorçage du système. Ensuite, la séparation des cellules marquées commence. La pompe aspire le contenu de la Cell Preparation Bag dans le jeu de tubulures. Les cellules marquées magnétiquement (cellules non cibles) sont retenues dans la colonne de séparation qui est placée dans le champ magnétique, tandis que les cellules non marquées (cellules cibles) passent à travers et sont recueillies dans la Reapplication Bag.

Sensitive sample loading (Sensitive Loading Stage)

Pour une déplétion supplémentaire, les cellules retenues dans Reapplication Bag sont rechargées sur la colonne de séparation à une vitesse plus faible. Alors que les quelques cellules marquées restantes sont maintenant retenues sur la colonne, les cellules non marquées (cellules cibles) traversent le champ magnétique et sont recueillies dans la Cell Collection Bag.

Rinçage du préfiltre et de la Reapplication Bag

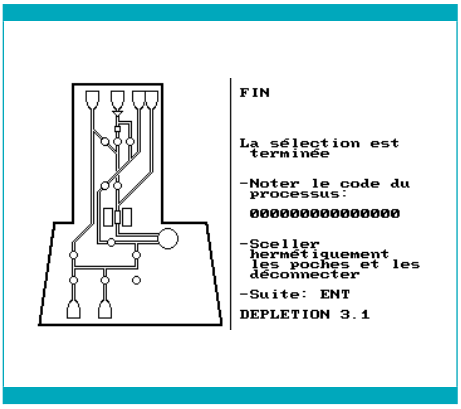
Une fois les deux étapes de déplétion de l'échantillon de cellules terminées, le préfiltre et la Reapplication Bag sont rincés deux fois avec le tampon pour réduire la perte de cellules dans le système.

Élimination des cellules non cibles.

L'aimant est déplacé en position « OFF ». Les cellules marquées magnétiquement (cellules non cibles) sont libérées de la colonne de séparation et recueillies dans la Non-Target Cell Bag après chaque étape de chargement.

Débrancher les poches et noter le code du processus

Une fois le cycle terminé, l'Écran 7.88 s'affiche.



Écran 7.88 : Débrancher les poches et noter le code du processus

1. Noter le code du processus.
2. Clamper ou sceller la tubulure au-dessus du raccord Luer reliant la Cell Collection Bag au jeu de tubulures (voir Figure 7.25).

   Faire trois soudures hermétiques sur la tubulure, directement au dessous de la valve n° 9. Couper avec précaution au niveau de la soudure centrale pour débrancher la Cell Collection Bag du jeu de tubulures.
3. Peser la Cell Collection Bag pleine. Noter le poids.

   Déterminer le poids de la fraction de cellules cibles en soustrayant le poids de la Cell Collection Bag vide du poids de la Cell Collection Bag contenant les cellules cibles. Noter le poids.
4. Mélanger avec précaution la suspension de cellules cibles par de légers mouvement de rotation. Prélever une quantité appropriée, par ex. 0,5 mL et la conserver pour analyse.
5. Sceller la tubulure à l'aide de la soudeuse, au-dessus du raccord Luer de la Buffer Waste Bag. Faire trois soudures hermétiques sur la tubulure. Couper avec précaution au niveau de la soudure centrale pour débrancher la Buffer Waste Bag.

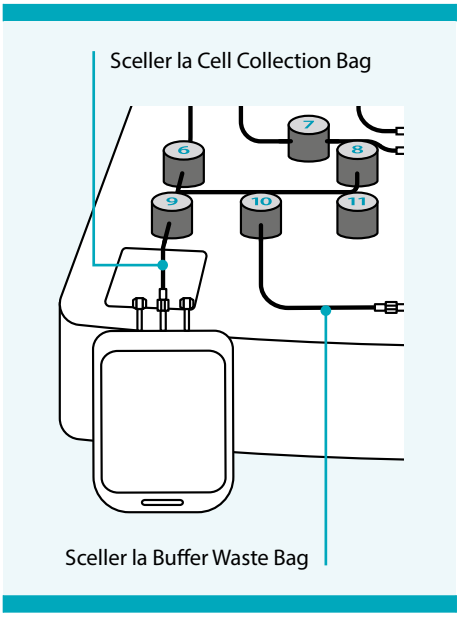


Figure 7.26 : Débrancher les poches

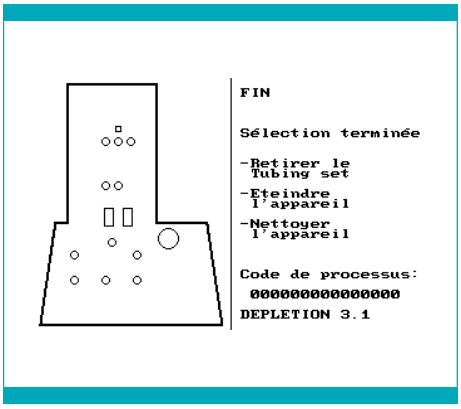
6. Débrancher la Non-Target Cell Bag de la même manière.
7. Déchrocher la Non-Target Cell Bag et la Buffer Waste Bag. Conserver toutes les poches jusqu'à ce que l'analyse finale de toutes les cellules ait été accomplie.

Maintenant, les cellules cibles peuvent être traitées selon les protocoles cliniques.

Pour continuer, appuyer sur **ENT**.

Démonter le jeu de tubulures et éteindre

L'Écran 7.89 s'affiche.



Écran 7.89 : Démonter le jeu de tubulures et éteindre

1. Retirer le jeu de tubulures : Commencer avec les valves nos 6, 9 et 10, et en progressant vers le haut, débrancher la tubulure du détecteur de liquide et des valves en appuyant sur les valves. Sortir les colonnes des supports de colonne. Éliminer le jeu de tubulures comme déchet à risque biologique, conformément aux procédures hospitalières standard.
2. Éteindre le CliniMACS Plus Instrument.
3. Nettoyer l'instrument selon les instructions de nettoyage, voir le paragraphe « Nettoyage et désinfection » dans le manuel d'utilisation du CliniMACS Plus Instrument. Suivre les procédures standard pour le traitement de matières infectieuses.

Analyse des cellules

IMPORTANT

- *Il n'est pas nécessaire d'éliminer le CliniMACS PBS/EDTA Buffer avant l'administration des cellules cibles séparées si le volume ne dépasse pas 100 mL par transplantation aux débits de perfusion appropriés. L'état rénal du patient et les effets sur les électrolytes sanguins doivent être pris en compte. En particulier chez les enfants, les débits de perfusion doivent être ajustés en conséquence.*
- *Si le volume de la fraction des cellules cibles dépasse 100 mL, il doit être réduit par des moyens appropriés, par ex. par centrifugation ou remplacement du tampon, à une solution pour perfusion approuvée dans le pays de l'utilisateur.*

⚠ ATTENTION

Risque de diminution de la qualité des cellules cibles. Les cellules cibles doivent être analysées et il faut s'assurer qu'elles répondent aux exigences de l'utilisateur, sinon l'aptitude à l'application clinique peut être compromise. Examiner les cellules cibles quant à leur qualité et leur quantité en fonction de leur utilisation prévue.

Cet examen doit comprendre les paramètres suivants :

- nombre total de leucocytes
- Viabilité et nombre total de cellules cibles
- L'efficacité de la déplétion

Il est également recommandé de déterminer le nombre total de leucocytes et la viabilité de la fraction de cellules non cibles. Cette liste est un exemple et d'autres tests devraient être inclus en fonction de l'utilisation prévue et des protocoles cliniques. Noter les données de l'analyse.

8 Guide de dépannage

Ce chapitre est destiné à fournir des informations de référence sur de possibles événements imprévus pouvant survenir et à suggérer les actions appropriées à mener. Pour toute information ne figurant pas dans le chapitre suivant, contacter Miltenyi Biotec Technical Support dans les meilleurs délais.

Remarque : L'ordre de ce chapitre suit la séquence réelle d'une séparation.

8.1 Miltenyi Biotec Technical Support

Dans tous les cas de dysfonctionnement de l'instrument ou d'échec du processus, qui ne peuvent être corrigés par l'opérateur (messages d'erreur), contacter l'équipe du Miltenyi Biotec Technical Support :

+49 2204 8306-3803
technicalsupport@miltenyi.com

Rendez-vous sur www.miltenyibiotec.com pour obtenir les coordonnées de votre Miltenyi Biotec Technical Support local.

8.2 Préparation du produit de leucaphérèse

- L'échantillon reçu est dilué

  Dans le cas idéal, le marquage magnétique est effectué dans le produit de leucaphérèse dilué. Ajuster le produit de leucaphérèse à une dilution finale d'environ 1:3. Dans le cas où le facteur de dilution de l'échantillon reçu est supérieur à 1:3 ou en cas de concentration de plasma inconnue dans l'échantillon, ajouter des immunoglobulines avant d'y ajouter le réactif (concentration d'immunoglobulines recommandée : 1,5 mg par mL). Il est important de maintenir une certaine concentration d'immunoglobulines dans l'échantillon pendant le marquage afin de minimiser les liaisons non spécifiques du réactif.

- Nombre faible de cellules cibles dans le produit de leucaphérèse

  La mobilisation des cellules souches était insuffisante. Vérifier l'analyse du produit de leucaphérèse.

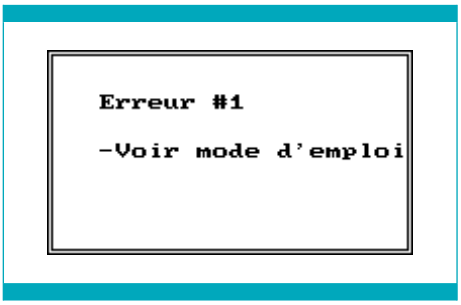
■ Mauvaise viabilité des cellules dans le produit de leucaphérèse

Le produit de leucaphérèse a pu être récolté, conservé ou transporté de manière inappropriée. Pour garantir un échantillon de meilleure qualité, il faut réaliser la préparation et la séparation du produit de leucaphérèse immédiatement après la leucaphérèse. Conserver le produit de leucaphérèse à une concentration de leucocytes inférieure à $0{,}2\times10^9$ par mL. Si nécessaire, diluer le produit de leucaphérèse avec du plasma autologue. Le produit de leucaphérèse ne doit pas avoir plus de 24 heures au début de la procédure de marquage et de séparation. S'il faut conserver le produit de leucaphérèse, par ex. pendant la nuit, il doit être conservé à température ambiante contrôlée (+19 °C à +25 °C [+ 66 °F à +77 °F]).

8.3 Le CliniMACS Plus Instrument et les jeux de tubulures CliniMACS

8.3.1 Messages d'erreur

Il existe un certain nombre de dysfonctionnements de l'instrument ou du logiciel possibles Ceux-ci sont indiqués comme tels et seront affichés à l'écran. Ces messages se réfèrent à des erreurs internes et ne peuvent pas être corrigés par l'opérateur. Noter le numéro du message d'erreur et contacter le service Miltenyi Biotec Technical Support.



Écran 8.1 : Message d'erreur n° 1

Un message d'erreur possible est affiché sur l'Écran 8.1.

Contrairement aux messages d'erreur, les défaillances qui peuvent être corrigées par l'opérateur, sont signalées comme « Messages d'avertissement » (voir le paragraphe 8.4.1).

8.3.2 Installation et amorçage du jeu de tubulures

■ La valve ne s'ouvre pas quand l'opérateur reçoit l'instruction d'insérer la tubulure dans une valve particulière

Les valves sont conçues pour fonctionner correctement une fois que la tubulure a été insérée. Appuyer manuellement sur la valve pour l'ouvrir. Observer la valve attentivement durant la séquence de vérification. Si la valve ne se baisse pas lors de la séquence de vérification, voir le paragraphe « La valve ne se baisse pas lors de la séquence de vérification des valves ».

- La valve ne se baisse pas lors de la séquence de vérification des valves

  S'assurer que la tubulure est correctement insérée. Vérifier que les valves ont été minutieusement nettoyées. Chaque valve contaminée par un liquide doit être remplacée. Contacter le service Miltenyi Biotec Technical Support.

- Le tampon fuit du jeu de tubulures pendant l'amorçage

  Le jeu de tubulures est défectueux. Éteindre le CliniMACS Plus Instrument et redémarrer l'étape d'amorçage avec un nouveau jeu de tubulures et du nouveau tampon en quantité suffisante.

- Présence d'air en excès dans le jeu de tubulures après l'amorçage

  La poche de tampon n'a pas été percé correctement. Utiliser un nouveau jeu de tubulures et du nouveau tampon en quantité suffisante et redémarrer la procédure séparation CliniMACS Plus. S'assurer que le septum de la poche de tampon a été percé correctement.

- Volume inattendu de tampon dans les poches après l'amorçage. Après l'amorçage, le liquide ne doit se trouver que dans la Priming Waste Bag et la Buffer Waste Bag

  Le jeu de tubulures n'est pas monté correctement. Le liquide peut fuir au delà des valves si celles-ci ne fonctionnent pas convenablement ou si le jeu de tubulures n'est pas installé correctement. Retirer le jeu de tubulures et le remplacer par un nouveau. Recommencer la procédure d'amorçage avec du nouveau tampon en quantité suffisante. Une mauvaise insertion du jeu de tubulures peut causer une mauvaise performance de la séparation CliniMACS Plus.

- Le moteur de la pompe cale pendant l'amorçage

  La tubulure de la pompe n'a pas été insérée correctement. Appuyer sur **STOP** pour interrompre l'amorçage et éteindre en appuyant sur « OFF » et puis allumer de nouveau en appuyant sur « ON ». Clamper la voie du tampon avec une pince pendant la procédure d'installation et retirer la pince avant de recommencer la phase d'amorçage.

8.4 Séparation cellulaire automatisée

8.4.1 Messages d'avertissement

Contrairement aux messages d'erreur (voir paragraphe 8.3.1), les messages d'avertissement s'affichent sur l'écran quand le système de contrôle interne du CliniMACS Plus Instrument reconnaît une défaillance qui peut être corrigée par l'opérateur. Normalement, le message est accompagné d'un signal sonore (« bip »). Si un message d'avertissement apparaît durant la séparation CliniMACS Plus, suivre les instructions sur l'écran pour continuer la séparation cellulaire.

De façon générale, les messages d'avertissement apparaissent en appuyant sur **STOP** ou quand la porte de la pompe est ouverte, cale ou quand le détecteur de liquide signale une erreur.

Étant donné que des événements imprévus différents peuvent survenir pendant les différents programmes de séparation, le paragraphe suivant est subdivisé en conséquence.

8.4.2 Événements imprévus : tous les programmes de séparation

Erreur détectée par le détecteur de liquide

Message d'avertissement n° 1 s'affichera au cours du démarrage de chargement des cellules si le détecteur de liquide ne peut pas détecter de liquide dans la tubulure. Comme le préfiltre est rincé avec du tampon avant le chargement des cellules, la tubulure doit contenir du liquide à ce stade.

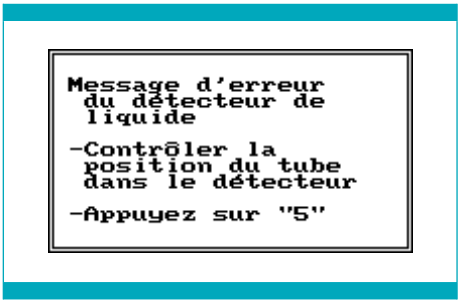


Figure 8.1 : Message d'avertissement n° 1

Vérifier les points suivants :

1. La tubulure a-t-elle été insérée correctement ? Dans le détecteur de liquide ? Si non, la remettre en place.
2. La tubulure a-t-elle été remplie de tampon ? Si non, voir point 3.
3. Si la tubulure n'est pas remplie de tampon, vérifier qu'elle ne présente pas de plis bloquant le flux vers le haut en direction du préfiltre et de la Cell Preparation Bag. Ajuster la position du jeu de tubulures. Si nécessaire, ajuster vers le haut ou vers le bas la hauteur des supports de poche à l'aide des pinces des supports de poche. Ajuster la position des tubulures dans les valves. Afin de modifier la position des tubulures, ouvrir la valve en appuyant manuellement sur le bouton. Vérifier que la tubulure n'est pas pliée, tordue ou tendue.
4. La Cell Preparation Bag, a-t-elle été percée correctement? Vérifier que le préfiltre a bien percé le septum du port de la Cell Preparation Bag.
5. Si la tubulure n'est pas remplie complètement de tampon : La pointe du tampon du jeu de tubulures a-t-elle percé la poche de tampon? Pour corriger, voir « Présence d'air en excès dans le jeu de tubulures après l'amorçage » dans le paragraphe 8.3.2.

Une fois l'action corrective effectuée, poursuivre la séparation en cours et appuyer sur **5**. Si le message d'avertissement n° 1 réapparaît après que toutes les possibilités énumérées ci-dessus ont été envisagées, il se peut que le problème soit dû à un dysfonctionnement du détecteur de liquide. Contacter le service Miltenyi Biotec Technical Support.

Les cellules rejoignent la mauvaise région du jeu de tubulures. Le liquide fuit en passant la/les valve(s)

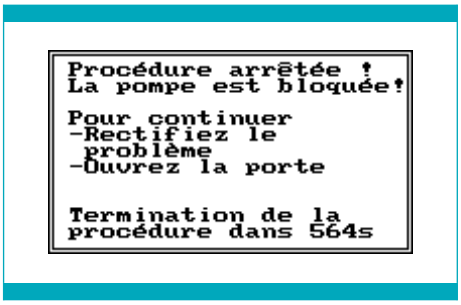
- Le jeu de tubulures n'a pas été inséré correctement. Si l'instrument est en fonctionnement, appuyer sur **STOP** et clamper la tubulure avec une pince. Ajuster la tubulure en appuyant tout d'abord sur la valve correspondante. Retirer la pince à clamper et appuyer sur **RUN** pour continuer la séparation. La séparation sera stoppée si **RUN** n'est pas appuyé dans les 600 secondes.
- La valve ne fonctionne pas correctement. Appuyer sur **STOP**. Clamper la tubulure avec une pince. Appuyer sur la valve manuellement à plusieurs reprises pour libérer la valve bloquée. Retirer la pince à clamper et appuyer sur **RUN** pour continuer. La séparation sera stoppée si **RUN** n'est pas appuyé dans les 600 secondes. Si l'opérateur ne réussit pas à débloquer la valve, contacter le service Miltenyi Biotec Technical Support.
- Le mauvais programme logiciel a été utilisé. Vérifier l'affichage pour le nom du programme utilisé. Arrêter le cycle en appuyant sur **STOP** et contacter immédiatement le service Miltenyi Biotec Technical Support.

L'aimant ne se déplace pas.

Le mécanisme de l'aimant ne fonctionne pas. Il y a un problème avec le mécanisme de l'aimant. Un message d'erreur s'affiche (voir paragraphe 8.3.1). Noter le numéro du message d'erreur et contacter le service Miltenyi Biotec Technical Support.

Le moteur de la pompe cale pendant la séparation cellulaire.

La tubulure de la pompe n'a pas été insérée correctement, ce qui peut empêcher la pompe de tourner. Dans ce cas, le message d'avertissement n° 2 s'affichera sur l'écran. L'opérateur disposera de 600 secondes pour corriger la position de la tubulure de la pompe.



Écran 8.2 : Message d'avertissement n° 2

1. Retirer avec précaution la tubulure de la pompe.
2. Vérifier que la tubulure n'a pas été endommagée à cause de la mauvaise insertion. S'il y a des fuites sur la tubulure de la pompe, pincer la tubulure au dessus et au dessous de la colonne de séparation, afin de garder les cellules retenues dans la colonne et contacter le service Miltenyi Biotec Technical Support.
3. Si la tubulure est intacte, la remettre correctement en place dans la pompe.
4. Appuyer sur **RUN** pour redémarrer la séparation dans les 600 secondes, autrement la séparation sera arrêtée.

Si le tube de la pompe est plat et affaissé, cela indique que la colonne est bloquée. Dans ce cas, contacter le service Miltenyi Biotec Technical Support.

■ L'étape de chargement de l'échantillon ne s'arrête pas alors que la Cell Preparation Bag et le préfiltre sont vides.

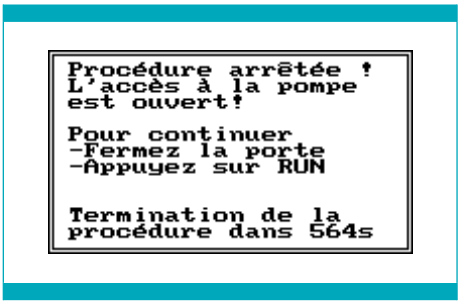
Le détecteur de liquide ne fonctionne pas correctement, par ex. à cause d'humidité sur la surface de la tubulure dans le détecteur de liquide. Appuyer sur **STOP** pour interrompre la séparation. Retirer la tubulure du détecteur de liquide. Utiliser un essuie-tout ou du matériel absorbant pour sécher la tubulure et la région de contact. Remettre la tubulure dans le détecteur de liquide et appuyer sur **RUN**. Ne pas interrompre la séquence pour plus de 600 secondes, autrement la séparation sera arrêtée.

S'il est impossible d'activer le détecteur de liquide de cette façon, appuyer sur **STOP** puis **2** et confirmer avec **ENT** pour sauter le chargement d'échantillon et pour continuer avec la séparation.

8.4.3 Événements imprévus : Programmes d'enrichissement uniquement

■ Le cycle s'arrête avant la fin du programme de séparation cellulaire.

- La porte de la pompe est ouverte : Pour des raisons de sécurité, la séparation en cours s'arrêtera automatiquement pendant le fonctionnement de l'instrument si la porte de la pompe est ouverte. Message n° 5 s'affichera sur l'écran.



Écran 8.3 : Message d'avertissement n°5

  Fermer la porte de la pompe et appuyer sur **RUN**.

  Si, dans ce cas, la touche **RUN** n'est pas actionnée dans les 600 secondes, le cycle de séparation sera interrompu et la séparation cellulaire ne sera pas terminée. Récupérer autant d'échantillon que possible du jeu de tubulures en lançant le PROGRAMME D'URGENCE.

- Coupure de courant : Une coupure de courant entraîne l'arrêt de la séparation CliniMACS Plus. La séparation des cellules ne sera pas terminée une fois l'alimentation électrique rétablie. Récupérer autant d'échantillon que possible du jeu de tubulures en lançant le PROGRAMME D'URGENCE.

8.4.4 Événements imprévus : CD34 SELECTION 1/2

- L'étape de chargement s'arrête avant que l'échantillon n'ait été complètement chargé sur les colonnes

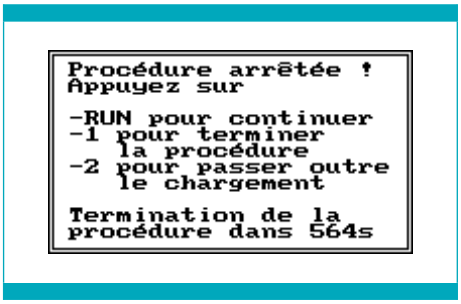
  Le préfiltre est obstrué par une grande quantité de débris cellulaires ou en raison d'un remplissage incomplet du filtre. En raison d'un pompage continu, un vide a été créé ce qui a conduit à la génération de bulles d'air activant le détecteur de liquide. Par conséquent, le processus de séparation s'est poursuivi avec les lavages de la colonne avant que tout l'échantillon puisse être chargé. Il est impossible de redémarrer le chargement de l'échantillon une fois que la séquence de chargement s'est arrêtée.

  Laisser le CliniMACS Plus Instrument terminer le programme de séparation. Ne pas interrompre le cycle en cours, parce que cela peut entraîner une perte inutile de cellules. Une fois la procédure de séparation terminée, filtrer l'échantillon restant avec un filtre à sang en ligne de 200 µm et le transférer dans une nouvelle poche de transfert. Exécuter immédiatement une deuxième séparation avec un nouveau jeu de tubulures et une quantité suffisante de nouveau tampon.

- La tubulure s'est rompue dans la pompe et/ou de l'air est présent en excès dans le jeu de tubulures au dessous de la précolonne pendant le chargement des cellules

  La précolonne est bloquée par trop de débris de cellules provenant de la Cell Preparation Bag. Il faut sauter manuellement le chargement de l'échantillon résiduel et continuer la séparation avec les cellules déjà chargées sur le système.

1. Appuyer sur **STOP** pour interrompre la séparation. Message d'avertissement n° 3 s'affichera.



Écran 8.4 : Message d'avertissement n° 3

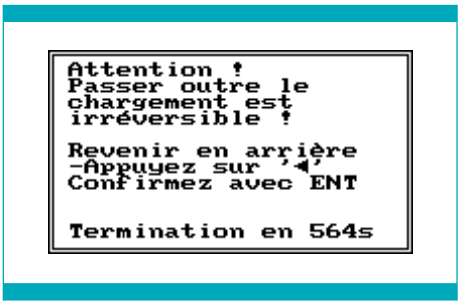
2. Appuyer sur **2** pour sauter le processus de chargement de cellules.

   Message d'avertissement n° 4 s'affichera et donnera à l'opérateur la possibilité de confirmer ou de changer son choix car le saut du chargement d'échantillon est irréversible.

3. Appuyer sur **ENT** et le programme de séparation arrêtera le chargement de l'échantillon et continuera avec le lavage des colonnes.

Clamper avec une pince la tubulure en dessous du préfiltre afin d'empêcher l'écoulement des cellules hors de la Cell Preparation Bag vers le jeu de tubulures. Une fois la procédure de séparation terminée, filtrer l'échantillon restant avec un filtre à sang en ligne de 200 µm et le transférer dans une nouvelle poche de transfert.

Exécuter immédiatement une deuxième séparation avec un nouveau jeu de tubulures et une quantité suffisante de nouveau tampon.



Écran 8.5 : Message d'avertissement n° 4

8.4.5 Événements imprévus : ENRICHMENT 1.1

- L'étape de chargement s'arrête avant que l'échantillon n'ait été complètement chargé sur les colonnes.

  Le préfiltre est obstrué par une grande quantité de débris cellulaires ou en raison d'un remplissage incomplet du filtre. En raison d'un pompage continu, un vide a été créé ce qui a conduit à la génération de bulles d'air. Celles-ci ont activé le détecteur de liquide et le processus de séparation est directement passé à l'étape finale du chargement de l'échantillon. Une partie de l'échantillon pourrait rester dans la Cell Preparation Bag une fois la séparation terminée.

  Laisser le CliniMACS Plus Instrument terminer le programme de séparation. Ne pas interrompre le cycle en cours, parce que cela peut entraîner une perte inutile de cellules.

  Déterminer le nombre total de cellules, le pourcentage de cellules cibles et le volume de chargement de l'échantillon restant dans la Cell Preparation Bag et saisir les paramètres actuels de l'échantillon lors de la configuration de l'instrument (ÉTAPE 2). Une fois la procédure de séparation terminée, filtrer l'échantillon restant avec un filtre à sang en ligne de 200 µm et le transférer dans une nouvelle poche de transfert. Exécuter immédiatement une deuxième séparation avec un nouveau jeu de tubulures et une quantité suffisante de nouveau tampon.

- Des valeurs de paramètres de l'échantillon incorrectes ont été saisies

  Le volume de chargement de l'échantillon saisi était inférieur au volume réel dans la Cell Preparation Bag. Il est impossible de redémarrer le chargement de l'échantillon une fois qu'il s'est arrêté.

  Laisser le CliniMACS Plus Instrument terminer le programme de séparation. Ne pas interrompre le cycle en cours, parce que cela peut entraîner une perte inutile de cellules.

  Déterminer le nombre total de cellules, le pourcentage de cellules cibles et le volume de chargement de l'échantillon restant dans la Cell Preparation Bag et saisir les paramètres actuels de l'échantillon lors de la configuration de l'instrument (ÉTAPE 2). Traiter l'échantillon restant avec un nouveau jeu de tubulures, un nouveau préfiltre et une quantité suffisante de nouveau tampon.

- Le moteur de la pompe cale pendant l'élution des cellules cibles dans la Cell Collection Bag

  La pince à clamper près de la Cell Collection Bag n'est pas ouverte pendant la séquence d'élution. Par conséquent, le passage vers la Cell Collection Bag est bloqué.

  Appuyer sur **STOP** et ouvrir la pince près de la Cell Collection Bag. Ouvrir la porte de la pompe et vérifier que la tubulure de la pompe est correctement insérée. Fermer la porte de la pompe et appuyer sur **RUN** pour redémarrer la séquence d'élution dans les 600 secondes.

8.4.6 Événements imprévus: ENRICHMENT 3.2

- L'étape de chargement s'arrête avant que l'échantillon n'ait été complètement chargé sur les colonnes

  Le préfiltre est obstrué par une grande quantité de débris cellulaires ou en raison d'un remplissage incomplet du filtre. En raison d'un pompage continu, un vide a été créé ce qui a conduit à la génération de bulles d'air. Celles-ci ont activé le détecteur de liquide et le processus de séparation est passé aux lavages de la colonne avant que tout l'échantillon puisse être chargé. Il est impossible de redémarrer le chargement de l'échantillon une fois que la séquence de chargement s'est arrêtée.

  Laisser le CliniMACS Plus Instrument terminer le programme de séparation. Ne pas interrompre le cycle en cours, parce que cela peut entraîner une perte inutile de cellules.

  Une fois la procédure de séparation terminée, filtrer l'échantillon restant avec un filtre à sang en ligne de 200 µm et le transférer dans une nouvelle poche de transfert. Exécuter immédiatement une deuxième séparation avec un nouveau jeu de tubulures et une quantité suffisante de nouveau tampon.

- Le moteur de la pompe cale pendant l'élution des cellules cibles dans la Cell Collection Bag

  La pince à clamper près de la Cell Collection Bag n'est pas ouverte pendant la séquence d'élution. Par conséquent, le passage vers la Cell Collection Bag est bloqué.

  Appuyer sur **STOP** et ouvrir la pince près de la Cell Collection Bag. Ouvrir la porte de la pompe et vérifier que la tubulure de la pompe est correctement insérée. Fermer la porte de la pompe et appuyer sur **RUN** pour redémarrer la séquence d'élution dans les 600 secondes.

8.4.7 Programme d'urgence (pour programmes d'enrichissement uniquement)

Si jamais un cycle s'est terminé de manière irréversible avant que les cellules cibles ne soient éluées de la colonne de séparation, le programme d'urgence peut être exécuté pour éluer les cellules de la colonne de séparation. Ce programme n'a été conçu que pour être utilisé avec tous les programmes d'enrichissement en combinaison avec un CliniMACS Tubing Set (REF 161-01) ou un CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01).

Le programme d'urgence ne doit pas être utilisé avec un programme de déplétion.

Remarque : Le programme d'urgence élue environ 75 mL de liquide. Vérifier qu'une Cell Collection Bag appropriée est raccordée au jeu de tubulures.

1. Pour s'assurer que la colonne de séparation n'est pas magnétisée, éteindre l'instrument, attendre 5 secondes, puis rallumer l'instrument. L'aimant sera retiré de l'unité de séparation magnétique (voir le paragraphe « Description » du manuel d'utilisation du CliniMACS Plus Instrument). Vérifier l'absence d'un champ magnétique en tenant un petit objet magnétisable contre l'unité de séparation magnétique. Si l'aimant ne s'est pas retiré, ou en cas de coupure de courant, contacter le service Miltenyi Biotec Technical Support.

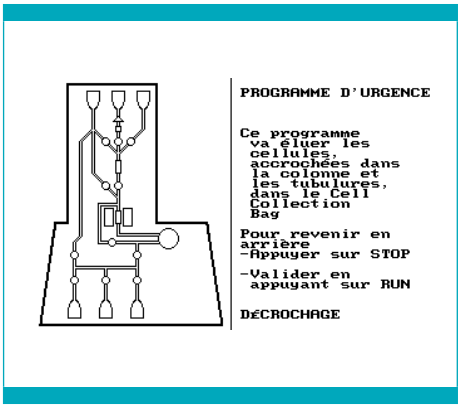
2. Attendre jusqu'à ce que l'écran affiche la page de démarrage (voir le paragraphe « Installation » dans le manuel d'utilisation du CliniMACS Plus Instrument).

   Pour activer le programme d'urgence, appuyer sur **4**. L' Écran 8.6 s'affiche.

3. Pour poursuivre l'élution des cellules piégées, appuyer sur **RUN**.

   Remarque : Pour quitter le programme d'urgence sans démarrer l'élution des cellules piégées, appuyer sur **STOP**.

4. Transférer les cellules éluées et recueillies dans la Cell Collection Bag dans une nouvelle poche de transfert de 600 mL. Regrouper éventuellement les cellules restantes dans la Cell Preparation Bag avec les cellules éluées par le programme d'urgence. Démarrer une nouvelle procédure de séparation en utilisant un nouveau jeu de tubulures et une quantité suffisante de nouveau tampon.



Écran 8.6 : Programme d'urgence

8.4.8 Événements imprévus : DEPLETION 2.1

- Les cellules cibles n'atteignent pas la Cell Collection Bag

  La pompe n'est pas en mesure de charger le produit de la Cell Preparation Bag car la pince près de la Cell Collection Bag n'est pas ouverte pendant la séquence de chargement des cellules. Appuyer sur **STOP** et ouvrir la pince près de la Cell Collection Bag. Poursuivre le processus de déplétion en appuyant sur **RUN**.

  Laisser le CliniMACS Plus Instrument terminer le programme de séparation. Ne pas interrompre le cycle en cours, parce que cela peut entraîner une perte inutile de cellules. Si une partie du produit reste dans la Cell Preparation Bag après la fin de la procédure de déplétion, traiter les cellules restantes avec un nouveau jeu de tubulures, un nouveau préfiltre et une quantité suffisante de nouveau tampon.

  Déterminer le nombre total de cellules, le pourcentage de cellules marquées et le volume de chargement de l'échantillon et saisir les paramètres actuels de l'échantillon lors de la configuration de l'instrument (ÉTAPE 2) et commencer la nouvelle déplétion.

- L'étape de chargement s'arrête avant que l'échantillon n'ait été complètement chargé sur les colonnes

  Des bulles d'air provenant de l'échantillon et/ou du préfiltre ont activé le détecteur de liquide avant que tout l'échantillon n'ait été chargé. Arrêter l'analyse en cours et vérifier le nombre total de cellules et l'efficacité de la déplétion des cellules dans la Cell Collection Bag. Si nécessaire, traiter l'échantillon restant avec un nouveau jeu de tubulures, un nouveau préfiltre et une quantité suffisante de nouveau tampon.

Déterminer le nombre total de cellules, le pourcentage de cellules marquées et le volume de chargement de l'échantillon et saisir les paramètres actuels de l'échantillon lors de la configuration de l'instrument (ÉTAPE 2) et commencer la nouvelle déplétion.

8.4.9 Événements imprévus : DEPLETION 3.1

- L'étape de chargement s'arrête pendant le Staged Cell Loading avant que l'échantillon n'ait été complètement chargé sur les colonnes

  - Le préfiltre est inséré à l'envers. Par conséquent, la fonction de la chambre compte-gouttes n'est pas disponible et les bulles d'air peuvent passer directement par le détecteur de liquide, ce qui provoque l'arrêt du chargement de l'échantillon avant que l'échantillon complet ait été appliqué. L'instrument poursuit le processus de déplétion en passant directement à l'étape suivante. Il est impossible de redémarrer le chargement de l'échantillon une fois qu'il s'est arrêté.
  - Le préfiltre est obstrué par une grande quantité de débris cellulaires ou en raison d'un remplissage incomplet du filtre. En raison d'un pompage continu, un vide a été créé ce qui a conduit à la génération de bulles d'air. Celles-ci ont activé le détecteur de liquide et le processus de séparation est directement passé à l'étape finale du chargement de l'échantillon. Une partie de l'échantillon pourrait rester dans la Cell Preparation Bag une fois la séparation terminée.

  Arrêter le cycle en cours et regrouper le contenu de la Reapplication Bag et de la Cell Preparation Bag. Traiter les cellules restantes avec un nouveau jeu de tubulures, un nouveau préfiltre et une quantité suffisante de nouveau tampon.

- L'étape de chargement s'arrête pendant le Sensitive Sample Loading (Sensitive Loading Stage)

  La Reapplication Bag est suspendue plus bas que la Cell Preparation Bag. Pendant l'étape de chargement sensitif, la Cell Preparation Bag se vide avant que le volume de la Reapplication Bag ne soit complètement chargé. Il est donc possible qu'une bulle d'air active le détecteur de liquide avant que l'échantillon ne soit complètement chargé dans la Reapplication Bag après la fin de la procédure de déplétion. Il n'est pas possible de redémarrer le chargement de l'échantillon une fois qu'il s'est arrêté.

  Laisser le CliniMACS Plus Instrument terminer le programme de séparation. Ne pas interrompre le cycle en cours, parce que cela peut entraîner une perte inutile de cellules. Traiter l'échantillon restant avec un nouveau jeu de tubulures, un nouveau préfiltre et une quantité suffisante de nouveau tampon.

  Déterminer le nombre total de cellules, le pourcentage de cellules marquées et le volume de chargement de l'échantillon et saisir les paramètres actuels de l'échantillon pendant la configuration de l'instrument (ÉTAPE 2). Considérer la

nécessité obligatoire de trois grands supports de poche pour le programme DEPLETION 3.1 et se référer aux instructions d'installation pour les hauteurs des poches appropriées (voir paragraphe 7.3.3).

Les cellules cibles (cellules non marquées) n'atteignent pas la Reapplication Bag pendant le Staged Cell Loading Bulk (Loading Stage)

La mauvaise tubulure a été insérée dans la valve n° 3 (bras droit de la tubulure de la Reapplication Bag au lieu du bras gauche (adaptateur en Y) de la tubulure). Appuyer sur **STOP** et retirer la mauvaise tubulure de la valve n° 3. Insérer manuellement la tubulure correcte (bras gauche de la tubulure de la Reapplication Bag) dans la valve n° 3 comme décrit dans les instructions d'installation. Appuyer sur **RUN** pour poursuivre la procédure de déplétion dans les 600 secondes.

Laisser le CliniMACS Plus Instrument terminer le programme de séparation. Ne pas interrompre le cycle en cours, parce que cela peut entraîner une perte inutile de cellules. Vérifier l'efficacité de la déplétion de la fraction cible dans la Cell Collection Bag. Si l'efficacité de la déplétion n'est pas suffisante, répéter la procédure de déplétion avec un nouveau jeu de tubulures, un nouveau préfiltre et une quantité suffisante de nouveau tampon.

Déterminer le nombre total de cellules, le pourcentage de cellules marquées et le volume de chargement de l'échantillon et saisir les paramètres actuels de l'échantillon lors de la configuration de l'instrument (ÉTAPE 2) et commencer la nouvelle déplétion.

Les cellules s'écoulent dans la poche de tampon pendant les étapes de rinçage gravimétrique

La poche de tampon est suspendue trop bas (plus bas que la Cell Preparation Bag). Appuyer sur **STOP** et ajuster le support de la poche de tampon à la bonne hauteur. S'assurer que trois grands supports de poche sont installés pour le programme DEPLETION 3.1 et se référer aux instructions d'installation pour les hauteurs de poches appropriées (voir le paragraphe 7.3.3).

- Si les cellules n'ont pas atteint la poche de tampon, il suffit d'ouvrir manuellement les valves n^{os} 1 et 2 pour permettre aux cellules de refluer rapidement dans la Cell Preparation Bag. Une fois que le tube de la poche de tampon est à nouveau vide, fermer les valves n^{os} 1 et 2 et appuyer sur **RUN** pour poursuivre la procédure de déplétion dans les 600 secondes.
- Si les cellules ont déjà atteint la poche de tampon, échanger la poche de tampon, ouvrir manuellement les valves n^{os} 1 et 2 pour un bref rinçage du tube de la poche de tampon et appuyer sur **RUN** pour poursuivre la procédure de déplétion dans les 600 secondes. Traiter l'échantillon restant dans la poche de tampon si nécessaire (si le volume dépasse 300 mL, transférer d'abord l'échantillon dans une poche convenant à la centrifugation pour réduire le volume) en utilisant un nouveau jeu de tubulures.

■ Le moteur de la pompe cale pendant la première élution des cellules marquées dans la Non-Target Cell Bag

- La pince à clamper n'a pas été retirée après le test d'intégrité. Appuyer sur **STOP** et retirer la pince à clamper. Ouvrir la porte de la pompe et vérifier que la tubulure de la pompe est insérée correctement. Fermer la porte de la pompe et appuyer sur **RUN** pour redémarrer la séquence d'élution dans les 600 secondes.
- La mauvaise tubulure a été insérée dans la valve n° 3 (Non-Target Cell Bag au lieu du bras gauche (adaptateur en Y) de la tubulure de la Reapplication Bag). Appuyer sur **STOP** et retirer la tubulure de la Non-Target Cell Bag de la valve n° 3. Insérer manuellement la tubulure correcte (bras gauche de la tubulure de la Reapplication Bag) dans la valve n° 3 comme décrit dans les instructions d'installation. Appuyer sur **RUN** pour redémarrer la séquence d'élution dans les 600 secondes.

8.5 Performance de la séparation cellulaire

8.5.1 Événements imprévus : Programmes d'enrichissement uniquement

■ Le rendement des cellules cibles est faible

- Les cellules cibles ont été faiblement marquées par le réactif:
  - Le réactif est périmé. Vérifier la date de péremption. Ne pas utiliser de réactif après la date limite d'utilisation.
  - Le réactif n'a pas été stocké correctement. Vérifier la température de stockage. Ne pas utiliser de réactif qui a été stocké de manière incorrecte (voir la notice d'utilisation du réactif).
  - La procédure de marquage recommandée n'a pas été suivie. Se référer aux paragraphes du manuel relatifs à la préparation de l'échantillon et à la procédure de séparation.
- Des cellules ont été perdues pendant les étapes de préparation.
  - Des cellules ont été éliminées avec le surnageant dans la Plasma Waste Bag et les Wash Waste Bags en raison d'une sédimentation incomplète ou d'une resuspension prématurée des cellules, par ex. lorsque la poche a été retirée de la centrifugeuse. Comparer les teneurs en leucocytes du produit cellulaire non marqué et du produit cellulaire marqué. Vérifier les paramètres de centrifugation pour une centrifugation correcte. Déterminer le nombre de cellules de toutes les poches de déchets.
  - Le tampon ne contenait pas d'HSA. Complémenter le tampon avec de l'HSA pour obtenir une concentration finale de 0,5% (p/v) (voir le paragraphe « Matériels CliniMACS requis » de l'application respective).
  - Les paramètres de centrifugation étaient sous-optimaux. Vérifier les paramètres de centrifugation.

  - Déséquilibre de la centrifugeuse, utilisation du frein ou chargement asymétrique de la centrifugeuse.
- L'analyse était incorrecte.
  - Une erreur d'échantillonnage s'est produite. Vérifier la présence de cellules agglutinées ou déposées dans la suspension cellulaire. S'assurer que des échantillons représentatifs ont été prélevés et répéter l'analyse.
  - Une erreur de coloration s'est produite. Vérifier les réactifs de cytométrie de flux. Répéter la coloration.
  - Les paramètres du cytomètre de flux étaient incorrects. Vérifier les paramètres de l'instrument.

La pureté des cellules cibles est faible

- Le produit cellulaire a été conservé de manière inappropriée. La préparation et la séparation du produit cellulaire doivent être effectuées immédiatement après la leucaphérèse. Conserver le produit cellulaire à une concentration de leucocytes inférieure à $0{,}2\times10^9$ par mL. Si nécessaire, diluer le produit cellulaire avec un plasma autologue. Le produit cellulaire ne doit pas avoir plus de 24 heures au début de la procédure de marquage et de séparation. S'il faut conserver le produit cellulaire, p. ex. pendant la nuit, il doit être maintenu à température ambiante contrôlée (+19 °C à +25 °C [+66 °F à +77 °F]).
- Non respect du protocole de marquage magnétique (par ex. volumes incorrects pendant le marquage magnétique). Suivre les instructions données pour le marquage magnétique (voir ÉTAPE 1 dans le paragraphe de l'application respective). Pour le dépannage, déterminer les sous-populations de leucocytes (cellules B, cellules T, monocytes, granulocytes et plaquettes) qui contaminent la fraction de cellules cibles et contacter le service Miltenyi Biotec Technical Support pour obtenir des conseils.
- Un nombre élevé de granulocytes a contaminé le produit de départ (paramétrage sous-optimal de l'aphérèse). Les granulocytes mourants fixeront alors le réactif CliniMACS de manière non spécifique, ce qui peut entraîner une diminution de la pureté des cellules cibles.
- La valve ne fonctionne pas correctement. La fraction des cellules non cibles éluées a été contaminée par une partie de la fraction non cible ou de la fraction de déchets du tampon. Vérifier l'emplacement de la tubulure dans les valves pour s'assurer de son bon fonctionnement. Évaluer le contenu en cellules non cibles de la fraction de cellules non cibles et des déchets de tampon. Si nécessaire, regrouper les fractions des cellules cibles et non cibles, les réduire à un volume adéquat et répéter la séparation en utilisant un nouveau jeu de tubulures et une quantité suffisante de nouveau tampon.

■ Rétention non spécifique de cellules mortes provenant du produit cellulaire ou fortes pertes de cellules non spécifiques tout au long de la procédure

- Le tampon ne contient pas d'HSA. Complémenter le tampon avec de l'HSA pour obtenir une concentration finale de 0,5% (p/v) (voir le paragraphe « Matériels CliniMACS requis » de l'application respective).
- Le produit cellulaire a pu être conservé de manière inappropriée. La préparation et la séparation du produit cellulaire doivent être effectuées immédiatement après la leucaphérèse. Conserver le produit cellulaire à une concentration de leucocytes inférieure à $0{,}2\times10^9$ par mL. Si nécessaire, diluer le produit de leucaphérèse avec un plasma autologue. Le produit cellulaire ne doit pas avoir plus de 24 heures au début de la procédure de marquage et de séparation. S'il faut conserver le produit cellulaire, p. ex. pendant la nuit, il doit être maintenu à température ambiante contrôlée (+19 °C à +25 °C [+66 °F à +77 °F]).
- Chargement incomplet de l'échantillon en raison de l'obstruction de la colonne de séparation, du préfiltre ou de la précolonne. Vérifier le nombre total de cellules et l'efficacité de la déplétion de cellules restantes.

8.5.2 Événements imprévus : CD34 SELECTION 1/2, ENRICHMENT 1.1

■ La pureté des cellules cibles est faible

L'élution de la colonne de séparation était incomplète.

- Le programme de séparation a été arrêté. Vérifier le message d'erreur sur l'écran. Continuer avec le paragraphe « Le cycle s'arrête avant la fin du programme de séparation cellulaire. » (voir le paragraphe 8.4.3 à la page 222).
- Une panne sur la pompe ou sur une valve s'est produite. Récupérer les cellules du jeu de tubulures en suivant le programme d'urgence décrit dans le paragraphe 8.4.7. Vérifier les volumes de toutes les fractions. Évaluer le contenu en cellules cibles de la Buffer Waste Bag et de la Negative Fraction Bag.
- La tubulure vers la Cell Collection Bag est bloquée. Vérifier que le jeu de tubulures n'a pas de pinces fermées, d'occlusions ou de plis.
- La capacité du réactif et/ou du jeu de tubulures a été dépassée. Se référer aux limites de capacité de l'application correspondante.
- La tubulure n'a pas été correctement insérée. Vérifier que la tubulure est insérée correctement dans toutes les valves.

8.5.3

8.5.4 Événements imprévus : CD34 SELECTION 1/2

■ La pureté des cellules cibles est faible

Les cellules non cibles ont été retenues.

- La mobilisation des cellules cibles était faible. Le nombre de cellules cibles était très faible. Ainsi, un faible nombre de cellules non cibles contaminantes (par ex. granulocytes, monocytes, plaquettes) peut entraîner une diminution de la pureté.
- Une quantité insuffisante de plasma ou d'immunoglobulines était présente lors du marquage magnétique. Suivre les instructions données pour le marquage magnétique (voir ÉTAPE 1 de l'application respective).

  S'il est impossible de garantir une concentration finale d'environ 30% de plasma autologue dans l'échantillon pendant le marquage magnétique, ajouter de l'immunoglobuline à l'échantillon. Une concentration finale de 1,5 mg/mL est recommandée pour bloquer efficacement la liaison non spécifique des réactifs pendant le marquage magnétique.

8.5.5 Événements imprévus : ENRICHMENT 1.1

■ Le rendement des cellules cibles est faible

Saisie incorrecte des paramètres de l'échantillon. Comparer la saisie des paramètres avec les résultats de l'analyse.

8.5.6 Événements imprévus : DEPLETION 2.1 et DEPLETION 3.1

■ L'efficacité de la déplétion est faible

Si l'efficacité de la déplétion est insuffisante, traiter l'échantillon résiduel avec un nouveau jeu de tubulures et du nouveau tampon en quantité suffisante. Un nouveau marquage des cellules devant subir une déplétion doit être envisagé. Déterminer le nombre de cellules et le pourcentage des cellules à déplétер et saisir les paramètres actuels de l'échantillon pendant la configuration de l'instrument (ÉTAPE 2). Si des agrégats visibles apparaissent, il est recommandé de filtrer les cellules avant qu'un nouveau cycle soit effectué. Prendre en compte que les cellules peuvent être perdues à cause de l'agrégation et une filtration additionnelle.

- La capacité du réactif et/ou du jeu de tubulures a été dépassée. Se référer aux limites de capacité de l'application correspondante.
- Détermination incorrecte des cellules à marquer par le réactif.
- Saisie incorrecte des paramètres de l'échantillon. Comparer la saisie des paramètres avec les résultats de l'analyse.

- Viabilité réduite des cellules. Les cellules mortes peuvent se fixer de façon non spécifique à la colonne de séparation ce qui réduit la capacité de marquage de la colonne, conduisant potentiellement à une efficacité de déplétion plus basse. Assurer une meilleure qualité du produit cellulaire et traiter le produit aussi frais que possible. Les produits conservés qui ont plus de 24 heures ne doivent pas être utilisés. Si la conservation est nécessaire, le produit cellulaire doit être conservé à une température ambiante contrôlée (+19 °C à +25 °C [+66 °F à +77 °F]). La concentration cellulaire ne doit pas dépasser $0,2\times10^9$ par mL. Si nécessaire, diluer le produit cellulaire avec du plasma autologue afin d'obtenir une concentration cellulaire optimale.

9 Mentions légales

9.1 Garantie limitée

À l'exception des dispositions figurant dans une déclaration de garantie spécifique qui peut accompagner votre produit, ou sauf accord contraire par écrit d'un représentant dûment autorisé de Miltenyi Biotec, la garantie de Miltenyi Biotec couvrant les produits achetés directement auprès de Miltenyi Biotec sera régie par les conditions générales de vente selon lesquelles les produits vous ont été fournis par le revendeur Miltenyi Biotec correspondant. Ces conditions générales sont disponibles sur demande ou sur www.miltenyibiotec.com. Les conditions générales de vente applicables peuvent varier d'un pays ou d'une région à l'autre. Rien de ce qui figure dans le présent document ne doit être interprété comme une garantie supplémentaire.

Pour les produits achetés auprès de distributeurs ou revendeurs tiers (p. ex. achetés auprès d'un prestataire de services local autorisé de Miltenyi Biotec), des conditions générales différentes peuvent s'appliquer.

Pour connaître la garantie couvrant le produit, consulter le bordereau de marchandises, la facture, le reçu ou toute autre documentation commerciale. Certains éléments d'une combinaison de produits achetée peuvent avoir une durée de garantie plus courte que celle mentionnée sur le bordereau de marchandises, la facture, le reçu ou toute autre documentation commerciale (p. ex. biens ayant une durée de vie limitée et sujets à obsolescence).

La garantie de Miltenyi Biotec pour ce produit couvre uniquement les problèmes relatifs au produit qui sont dus à des défauts de matériel ou de fabrication dans le cadre d'une utilisation normale. Elle ne couvre pas les problèmes relatifs au produit qui sont causés par tout autre motif, y compris mais sans s'y limiter les problèmes dus à une utilisation du produit différente de celle spécifiquement décrite dans ce manuel, par exemple : une utilisation inappropriée ou inadaptée, un montage ou une installation incorrect(e) par un opérateur ou un tiers, une usure normale, une mise en service, une manipulation, un stockage, une maintenance ou un entretien négligent(e) ou incorrect(e), le non-respect des instructions d'utilisation, la modification non autorisée d'une quelconque partie de ce produit ou l'utilisation de consommables, d'accessoires ou de matières premières inadapté(e)s.

La garantie de Miltenyi Biotec ne couvre pas les produits vendus EN L'ÉTAT ou AVEC TOUS LES DÉFAUTS ni les consommables. Rien de ce qui figure dans le présent document ne doit être interprété comme une garantie supplémentaire.

Miltenyi Biotec doit impérativement être informé sans délai en cas de réclamation formulée dans le cadre de cette garantie. Si un défaut de matériel ou de fabrication apparaît pendant la période de garantie, Miltenyi Biotec prendra les mesures appropriées pour restaurer la pleine fonctionnalité de l'instrument.

Limitation des dommages
Miltenyi Biotec ne sera pas tenu pour responsable des dommages indirects ou accessoires résultant de l'inexécution d'une garantie ou condition expresse ou implicite concernant ce produit.

Certain(e)s pays/états ou juridictions n'autorisant pas l'exclusion ou la limitation des dommages indirects ou accessoires, les limitations ou exclusions ci-dessus peuvent ne pas s'appliquer dans votre cas. Cette déclaration de garantie vous octroie des droits légaux spécifiques et vous pouvez avoir d'autres droits, qui peuvent différer selon les états ou les juridictions.

9.2 Marques commerciales

CliniMACS, MACS, MACSmix, le logo Miltenyi Biotec et le MiniMACS sont des marques déposées ou des marques commerciales de Miltenyi Biotec et/ou de ses sociétés affiliées dans différents pays du monde. Toutes les autres marques commerciales mentionnées dans cette documentation sont la propriété de leurs détenteurs respectifs et ne sont utilisés qu'à des fins d'identification.

Miltenyi Biotec

Allemagne/Autriche
Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG
Friedrich-Ebert-Straße 68
51429 Bergisch Gladbach
Allemagne
+49 2204 8306-0
+49 2204 85197
macsde@miltenyi.com

États-Unis/Canada
Miltenyi Biotec Inc.
2303 Lindbergh Street
Auburn, CA 95602
USA
800 FOR MACS
+1 866 811 4466
+1 877 591 1060
macsus@miltenyi.com

Australie
Miltenyi Biotec
Australia Pty. Ltd.
Unit 11, 2 Eden Park Drive
Macquarie Park NSW 2113
Australie
+61 2 8877 7400
+61 2 9889 5044
macsau@miltenyi.com

Benelux
Miltenyi Biotec B.V.
Dellaertweg 9C
2316 WZ Leiden
Pays-Bas
macsnl@miltenyi.com
Service client Pays-Bas
0800 4020120
0800 4020100
Service client Belgique
0800 94016
0800 99626
Service client Luxembourg
800 24971
800 24984

Chine
Miltenyi Biotec Technology &
Trading (Shanghai) Co., Ltd.
Room A401, 4/F
No. 1077, Zhangheng Road
Pudong New Area
201203 Shanghai
P.R. China
+86 21 6235 1005-0
+86 21 6235 0953
macscn@miltenyi.com.cn

Corée du Sud
Miltenyi Biotec Korea Co., Ltd.
Donggeuk 7F
562 Nonhyeon-ro
Gangnam-gu
Séoul 06136
Corée du Sud
+82 2 555 1988
+82 2 555 8890
macskr@miltenyi.com

Espagne
Miltenyi Biotec S.L.
C/Luis Buñuel 2
Ciudad de la Imagen
28223 Pozuelo de Alarcón (Madrid)
Espagne
+34 91 512 12 90
+34 91 512 12 91
macses@miltenyi.com

Pays nordiques et baltes
Miltenyi Biotec Norden AB
Medicon Village
Scheeletorget 1
223 81 Lund
Suède
macsse@miltenyi.com

Service client Suède
0200 111 800
+46 280 72 99
Service client Danemark
80 20 30 10
+46 46 280 72 99
Service client Finlande, Norvège, Islande et pays baltes
+46 46 280 72 80
+46 46 280 72 99

France
Miltenyi Biotec SAS
10 rue Mercoeur
75011 Paris
France
+33 1 56 98 16 16
macsfr@miltenyi.com

Hongkong
Miltenyi Biotec Hong Kong Ltd.
Unit 301, Lakeside 1
No. 8 Science Park West Avenue
Hong Kong Science Park
Pak Shek Kok, New Territories
Hongkong
+852 3751 6698
+852 3619 5772
macshk@miltenyi.com.hk

Italie
Miltenyi Biotec S.r.l.
Via Paolo Nanni Costa, 30
40133 Bologna
Italie
+39 051 6 460 411
+39 051 6 460 499
macsit@miltenyi.com

Japon
Miltenyi Biotec K.K.
NEX-Eitai Building 5F
16-10 Fuyuki, Koto-ku
Tokyo 135-0041
Japon
+81 3 5646 8910
+81 3 5646 8911
macsjp@miltenyi.com

Royaume-Uni
Miltenyi Biotec Ltd.
Almac House, Church Lane
Bisley, Surrey GU24 9DR
Royaume-Uni
+44 1483 799 800
+44 1483 799 811
macsuk@miltenyi.com

Singapour
Miltenyi Biotec Asia Pacific Pte Ltd.
438B Alexandra Road, Block B
Alexandra Technopark
#06-01
Singapour 119968
+65 6238 8183
+65 6238 0302
macssg@miltenyi.com

Suisse
Miltenyi Biotec Swiss AG
Gibelinstrasse 27
4500 Solothurn
Suisse
+41 32 623 08 47
+49 2204 85197
macsch@miltenyi.com

www.miltenyibiotec.com

Miltenyi Biotec fournit des produits et services dans le monde entier. Rendez-vous sur **www.miltenyibiotec.com/local** pour trouver votre interlocuteur Miltenyi Biotec le plus proche.

CliniMACS, MACS, MACSmix, le logo Miltenyi Biotec et le MiniMACS sont des marques déposées ou des marques commerciales de Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG et/ou de ses filiales dans différents pays du monde. Copyright © 2023 Miltenyi Biotec et/ou ses filiales. Tous droits réservés.

210-003-234/01 | Publié : 2023-02