Miltenyi Biotec

CliniMACS® Plus Anwendungen

Benutzerhandbuch



Die Komponenten des CliniMACS Systems, einschließlich der Reagenzien, Schlauchsets, Instrumente und PBS/EDTA-Puffer, werden unter einem nach ISO 13485 zertifizierten Qualitätssystem entwickelt, hergestellt und geprüft. In der EU sind die Komponenten des CliniMACS Systems als Medizinprodukte mit CE-Kennzeichnung für ihre jeweilige Zweckbestimmung erhältlich, sofern nichts anderes angegeben ist. In den USA ist das CliniMACS CD34 Reagent System, einschließlich des CliniMACS Plus Instruments, CliniMACS CD34 Reagent, CliniMACS Tubing Set TS und CliniMACS Tubing Set LS sowie des CliniMACS PBS/EDTA Buffer, von der FDA als ein Humanitarian Use Instrument (HUD) anerkannt und gemäß US-Bundesgesetz für die Verwendung zur Behandlung von Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) in der ersten Vollremission zugelassen. Die Wirksamkeit des Instruments für diese Indikation ist noch nicht nachgewiesen. Andere Produkte der CliniMACS Produktlinie sind nur im Rahmen eines genehmigten Antrags auf Zulassung für die klinische Prüfung (Investigational New Drug Application, IND), auf den Ausnahmestatus für Forschungszwecke (Investigational Device Exemption, IDE) oder gemäß FDA-Genehmigung verfügbar. In Australien sind die folgenden Komponenten des CliniMACS Plus Systems im Australian Register of Therapeutic Goods (ARTG) enthalten und daher zur Belieferung zugelassen: CliniMACS Plus Instrument, CliniMACS CD34 Reagent, CliniMACS Tubing Set, CliniMACS Tubing Set LS, CliniMACS Depletion Tubing Set und CliniMACS PBS/EDTA Buffer. Nur Produkte, die in das ARTG aufgenommen sind, dürfen in Australien verwendet werden.

Sofern nicht ausdrücklich etwas anderes angegeben ist, sind die Produkte und Dienstleistungen von Miltenyi Biotec nur für Forschungszwecke und nicht für therapeutische oder diagnostische Zwecke bestimmt.

Copyright © 2023 Miltenyi Biotec und/oder ihre verbundenen Unternehmen. Alle Rechte vorbehalten.

Dieses Handbuch darf ohne vorhergehende schriftliche Zustimmung seitens Miltenyi Biotec weder ganz noch in Auszügen und in keiner Form, sei es elektronisch, mechanisch, mittels Fotokopie, Mikrofilm, Aufzeichnung oder mit sonstigen Mitteln vervielfältigt, in Datenabrufsystemen gespeichert, übertragen, veröffentlicht oder verbreitet werden. Eine Ausnahme hiervon gilt für Eigentümer des CliniMACS Prodigy Systems, wenn die angefertigten Kopien ausschließlich zur Schulung der Mitarbeiter in der Bedienung und Instandhaltung des Geräts innerhalb der eigenen Firma oder Organisation verwendet werden.

CliniMACS, MACS, MACSmix, das Miltenyi Biotec Logo und MiniMACS sind eingetragene Marken oder Marken der Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG und/oder ihrer verbundenen Unternehmen in verschiedenen Ländern weltweit. Alle anderen in diesem Dokument erwähnten Marken sind Eigentum ihrer jeweiligen Inhaber und dienen nur der Identifikation.

CliniMACS® Plus Anwendungen

Benutzerhandbuch

Software-Version 2.4x

Stand: 2023-02
210-003-228/01

MD CE 0123

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

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

www.miltenyibiotec.com

Grundlegende Informationen

Dieses Benutzerhandbuch enthält Informationen zur Verwendung der CliniMACS Plus Anwendungen. Anweisungen, Warnhinweise, Vorsichtsmaßnahmen und andere wichtige Informationen zum Betrieb des CliniMACS Plus Instruments sind im Benutzerhandbuch des CliniMACS Plus Instruments zu finden.

⚠ WARNUNG

Das CliniMACS Plus System darf nur von geschulten Anwendern bedient werden. Lesen Sie vor der Inbetriebnahme des Systems die Sicherheitsinformationen, Warnhinweise, Vorsichtsmaßnahmen und Anweisungen für die ordnungsgemäße Bedienung des CliniMACS Plus Instruments in den Gebrauchsanweisungen des CliniMACS Plus Systems (einschließlich der Sicherheitshinweise im Benutzerhandbuch des CliniMACS Plus Instruments sowie Kapitel 3 "Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen" auf Seite 29 in diesem Benutzerhandbuch) und in allen sicherheitsbezogenen Empfehlungen von Miltenyi Biotec sorgfältig durch und stellen Sie sicher, dass Sie alles verstanden haben. Achten Sie insbesondere auf alle am Instrument angezeigten oder den Verbrauchsmaterialien, dem Zubehör, zusätzlichen Materialien und Geräten beigefügten Warnhinweise. Bediener müssen während des Betriebs des Instruments stets alle Sicherheitsinformationen, Warnhinweise, Vorsichtsmaßnahmen und Anweisungen einhalten und sich vergewissern, dass alle Sicherheitsinformationen, Warnhinweise, Vorsichtsmaßnahmen und Anweisungen beachtet werden. Die Nichteinhaltung der Sicherheitsinformationen, Warnhinweise, Vorsichtsmaßnahmen und Anweisungen in der Gebrauchsanweisung kann zu Funktionsstörungen des Instruments, Sachschäden, Verlust von Zielzellen, Verletzungen und/oder zum Tod führen.

Inhaltsverzeichnis

1	**Einführung**	**11**
1.1	Allgemeine Informationen	11
1.2	Markierung von Zellen mit CliniMACS Reagenzien	12
1.3	Magnetische Hochgradienten-Zellseparation	14
1.4	Separationsstrategien	14
1.4.1	Anreicherungsstrategie	15
1.4.2	Depletionsstrategie	16
2	**Glossar**	**19**
2.1	Grafische Darstellung	19
2.2	Glossar der Symbole	19
2.3	Glossar der Fachbegriffe	20
3	**Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen**	**29**
3.1	Verfahrensbezogene Warnhinweise	29
3.2	CliniMACS Reagenzien und Biotinkonjugate	30
3.3	Umgang mit infektiösem Material	31
3.4	Zelluläres Ausgangsmaterial	32
4	**Das CliniMACS Plus System**	**33**
4.1	CliniMACS Plus Instrument	33
4.2	CliniMACS Reagenzien und Biotinkonjugate	33
4.3	CliniMACS Schlauchsets	33
4.4	CliniMACS PBS/EDTA Buffer	33
4.5	CliniMACS Zubehör	34
4.6	Weitere erforderliche Materialien	34
4.7	Erforderliche Ausrüstung	35
5	**Anwendungsübersicht**	**37**
5.1	In vier SCHRITTEN zu Ihren Zielzellen	37
5.2	Übersichtstabelle	39

6	**Anwendungsspezifische Übersicht der SCHRITTE 1–4**	**43**
6.1	Anreicherung von CD34-positiven Zellen	43
6.1.1	SCHRITT 1: Zellpräparation und magnetische Markierung	43
6.1.2	SCHRITT 2: Wahl des Separationsprogramms	45
6.1.3	SCHRITT 3: Installation von CliniMACS Schlauchsets	46
6.1.4	SCHRITT 4: CliniMACS Plus Separation	46
6.2	Anreicherung von CD14-positiven Zellen	46
6.2.1	SCHRITT 1: Zellpräparation und magnetische Markierung	46
6.2.2	SCHRITT 2: Wahl des Separationsprogramms	49
6.2.3	SCHRITT 3: Installation von CliniMACS Schlauchsets	49
6.2.4	SCHRITT 4: CliniMACS Plus Separation	49
6.3	Anreicherung/Depletion mit dem CliniMACS Anti-Biotin Reagent	50
6.3.1	SCHRITT 1: Zellpräparation und magnetische Markierung	50
6.3.2	SCHRITT 2: Wahl des Separationsprogramms	54
6.3.3	SCHRITT 3: Installation von CliniMACS Schlauchsets	54
6.3.4	SCHRITT 4: CliniMACS Plus Separation	54
6.4	Anreicherung von CD56-positiven Zellen	55
6.4.1	SCHRITT 1: Zellpräparation und magnetische Markierung	55
6.4.2	SCHRITT 2: Wahl des Separationsprogramms	58
6.4.3	SCHRITT 3: Installation von CliniMACS Schlauchsets	58
6.4.4	SCHRITT 4: CliniMACS Plus Separation	58
6.5	Depletion von CD3-positiven Zellen	59
6.5.1	SCHRITT 1: Zellpräparation und magnetische Markierung	59
6.5.2	SCHRITT 2: Wahl des Separationsprogramms	63
6.5.3	SCHRITT 3: Installation von CliniMACS Schlauchsets	63
6.5.4	SCHRITT 4: CliniMACS Plus Separation	63
6.6	Depletion von CD19-positiven Zellen	64
6.6.1	SCHRITT 1: Zellpräparation und magnetische Markierung	64
6.6.2	SCHRITT 2: Wahl des Separationsprogramms	66
6.6.3	SCHRITT 3: Installation von CliniMACS Schlauchsets	66
6.6.4	SCHRITT 4: CliniMACS Plus Separation	66

6.7	Depletion von CD3-positiven Zellen und CD19-positiven Zellen	67
6.7.1	SCHRITT 1: Zellpräparation und magnetische Markierung	67
6.7.2	SCHRITT 2: Wahl des Separationsprogramms	70
6.7.3	SCHRITT 3: Installation von CliniMACS Schlauchsets	70
6.7.4	SCHRITT 4: CliniMACS Plus Separation	70
6.8	Anreicherung/Depletion von CD8-positiven Zellen	71
6.8.1	SCHRITT 1: Zellpräparation und magnetische Markierung	71
6.8.2	SCHRITT 2: Wahl des Separationsprogramms	74
6.8.3	SCHRITT 3: Installation von CliniMACS Schlauchsets	74
6.8.4	SCHRITT 4: CliniMACS Plus Separation	75
6.9	Anreicherung/Depletion von CD25-positiven Zellen	75
6.9.1	SCHRITT 1: Zellpräparation und magnetische Markierung	75
6.9.2	SCHRITT 2: Wahl des Separationsprogramms	80
6.9.3	SCHRITT 3: Installation von CliniMACS Schlauchsets	80
6.9.4	SCHRITT 4: CliniMACS Plus Separation	80
6.10	Anreicherung/Depletion von CD4-positiven Zellen	81
6.10.1	SCHRITT 1: Zellpräparation und magnetische Markierung	81
6.10.2	SCHRITT 2: Wahl des Separationsprogramms	85
6.10.3	SCHRITT 3: Installation von CliniMACS Schlauchsets	85
6.10.4	SCHRITT 4: CliniMACS Plus Separation	85
6.11	Depletion von CD4-positiven Zellen und CD8-positiven Zellen	85
6.11.1	SCHRITT 1: Zellpräparation und magnetische Markierung	86
6.11.2	SCHRITT 2: Wahl des Separationsprogramms	89
6.11.3	SCHRITT 3: Installation von CliniMACS Schlauchsets	89
6.11.4	SCHRITT 4: CliniMACS Plus Separation	89
6.12	Anreicherung von CD1c-(BDCA-1-)positiven Zellen – Teil 1: Depletion von CD19-positiven Zellen und Markierung von CD1c-(BDCA-1-)positiven Zellen	90
6.12.1	SCHRITT 1: Zellpräparation und magnetische Markierung	90
6.12.2	SCHRITT 2: Wahl des Separationsprogramms	92
6.12.3	SCHRITT 3: Installation von CliniMACS Schlauchsets	92
6.12.4	SCHRITT 4: CliniMACS Plus Separation	92

6.13 Anreicherung von CD1c-(BDCA-1-)positiven Zellen – Teil 2: Flexibles Markierungssystem 93
6.13.1 SCHRITT 1: Zellpräparation und magnetische Markierung 93
6.13.2 SCHRITT 2: Wahl des Separationsprogramms 95
6.13.3 SCHRITT 3: Installation von CliniMACS Schlauchsets 95
6.13.4 SCHRITT 4: CliniMACS Plus Separation 95
6.14 Anreicherung von CD304-(BDCA-4-)positiven Zellen 96
6.14.1 SCHRITT 1: Zellpräparation und magnetische Markierung 96
6.14.2 SCHRITT 2: Wahl des Separationsprogramms 98
6.14.3 SCHRITT 3: Installation von CliniMACS Schlauchsets 98
6.14.4 SCHRITT 4: CliniMACS Plus Separation 99
6.15 Depletion von TCRα/β-positiven Zellen 99
6.15.1 SCHRITT 1: Zellpräparation und magnetische Markierung 99
6.15.2 SCHRITT 2: Wahl des Separationsprogramms 102
6.15.3 SCHRITT 3: Installation von CliniMACS Schlauchsets 102
6.15.4 SCHRITT 4: CliniMACS Plus Separation 102
6.16 Depletion von CD45RA-positiven Zellen 103
6.16.1 SCHRITT 1: Zellpräparation und magnetische Markierung 103
6.16.2 SCHRITT 2: Wahl des Separationsprogramms 105
6.16.3 SCHRITT 3: Installation von CliniMACS Schlauchsets 106
6.16.4 SCHRITT 4: CliniMACS Plus Separation 106
6.17 Anreicherung von humanen IFN-gamma-sezernierenden Zellen mit dem CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma) 106
6.17.1 SCHRITT 1: Zellpräparation und magnetische Markierung 106
6.17.2 SCHRITT 2: Wahl des Separationsprogramms 119
6.17.3 SCHRITT 3: Installation von CliniMACS Schlauchsets 120
6.17.4 SCHRITT 4: CliniMACS Plus Separation 120

7 Genaue Erklärung von SCHRITT 1–4 121

7.1 SCHRITT 1: Zellpräparation und magnetische Markierung 121
7.1.1 Erste erforderliche Aktionen 121
7.1.2 Magnetische Markierung von Zellen 122

7.2 SCHRITT 2: Wahl des Separationsprogramms 136
7.2.1 Einschalten des CliniMACS Plus Instruments 136
7.2.2 CD34 SELECTION 1/2 136
7.2.3 ENRICHMENT 1.1 138
7.2.4 ENRICHMENT 3.2 143
7.2.5 DEPLETION 2.1 145
7.2.6 DEPLETION 3.1 151
7.3 SCHRITT 3: Installation von CliniMACS Schlauchsets 157
7.3.1 CliniMACS Tubing Set und CliniMACS Tubing Set LS 157
7.3.2 Alternative Installation von CliniMACS Schlauchsets 172
7.3.3 CliniMACS Depletion Tubing Set 178
7.4 SCHRITT 4: CliniMACS Plus Separation 193
7.4.1 CD34 SELECTION 1/2 193
7.4.2 ENRICHMENT 1.1 197
7.4.3 ENRICHMENT 3.2 202
7.4.4 DEPLETION 2.1 206
7.4.5 DEPLETION 3.1 210

8 Fehlerbehebung 215

8.1 Miltenyi Biotec Technical Support 215
8.2 Vorbereitung des Leukapheresats 215
8.3 CliniMACS Plus Instrument und CliniMACS Schlauchsets 216
8.3.1 Fehlermeldungen 216
8.3.2 Einsetzen und Vorspülen des Schlauchsets 217
8.4 Automatische Zellseparation 218
8.4.1 Warnmeldungen 218
8.4.2 Unerwartete Ereignisse: Alle Separationsprogramme 218
8.4.3 Unerwartete Ereignisse: Nur Anreicherungsprogramme 221
8.4.4 Unerwartete Ereignisse: CD34 SELECTION 1/2 221
8.4.5 Unerwartete Ereignisse: ENRICHMENT 1.1 223
8.4.6 Unerwartete Ereignisse: ENRICHMENT 3.2 224
8.4.7 Notfallprogramm (nur für Anreicherungsprogramme) 224
8.4.8 Unerwartete Ereignisse: DEPLETION 2.1 226

8.4.9 Unerwartete Ereignisse: DEPLETION 3.1 227
8.5 Zellseparationsleistung 229
8.5.1 Unerwartete Ereignisse: Nur Anreicherungsprogramme 229
8.5.2 Unerwartete Ereignisse: CD34 SELECTION 1/2, ENRICHMENT 1.1 231
8.5.3 Unerwartete Ereignisse: CD34 SELECTION 1/2 231
8.5.4 Unerwartete Ereignisse: ENRICHMENT 1.1 232
8.5.5 Unerwartete Ereignisse: DEPLETION 2.1 und DEPLETION 3.1 232

9 Rechtliche Hinweise 233
9.5.1 Eingeschränkte Garantie 233
9.5.2 Warenzeichen 234

1 Einführung

1.1 Allgemeine Informationen

Das CliniMACS Plus System bietet eine Reihe von Werkzeugen, die qualitativ hochwertige standardisierte Zellseparationen für therapeutische Anwendungen ermöglichen.

Das CliniMACS Plus System basiert auf der von Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG entwickelten magnetischen Zellseparationstechnologie (MACS®). Miltenyi Biotec stellt diese Produkte für klinische Anwendungen unter Einhaltung der europäischen regulatorischen Standards zur Verfügung.

Die CliniMACS Reagenzien und Biotinkonjugate sind nur für den *In-vitro*-Gebrauch vorgesehen und nicht für therapeutische Zwecke oder die direkte Infusion in Patienten bestimmt.

Die CliniMACS Reagenzien sind in Kombination mit dem CliniMACS Plus System für die Separation von menschlichen Zellen bestimmt.

Miltenyi Biotec als Hersteller des CliniMACS Plus Systems gibt keine Empfehlungen bezüglich der Anwendung separierter Zellen für therapeutische Zwecke und macht keine Aussagen zu einem klinischen Nutzen.

Für die Herstellung und Anwendung von Zielzellen bei Menschen müssen die nationalen gesetzlichen Bestimmungen und Vorschriften – für die EU zum Beispiel die Richtlinie 2004/23/EG (menschliche Gewebe und Zellen) bzw. die Richtlinie 2002/98/EG (menschliches Blut und Blutbestandteile) – eingehalten werden. Daher liegt jegliche klinische Anwendung der Zielzellen ausschließlich in der Verantwortung des Anwenders eines CliniMACS Plus Systems.

EINGESCHRÄNKTE GARANTIE
Falls das CliniMACS Plus System in einer Weise verwendet werden sollte, die nicht ausdrücklich in diesem Handbuch beschrieben wird, sind alle Gewährleistungen null und nichtig.

WICHTIG
Vor der Verwendung des CliniMACS Plus Systems oder einer der Komponenten außerhalb der Europäischen Union muss die regulatorische Zulassung des CliniMACS Plus Systems oder der jeweiligen CliniMACS Komponente im betreffenden Land bestätigt werden.

1.2 Markierung von Zellen mit CliniMACS Reagenzien

Die magnetische Zellsortierung (MACS) ist ein bewährtes, leistungsfähiges Verfahren zur Separation vieler Zelltypen in Forschungslaboren sowie in klinischen Anwendungen. Zellgemische werden in einem Magnetfeld mithilfe einer immunmagnetischen Markierung separiert, die für den jeweiligen Zelltyp, wie z.B. humane CD34-positive hämatopoetische Vorläuferzellen aus heterogenen hämatologischen Zellpopulationen, spezifisch ist.

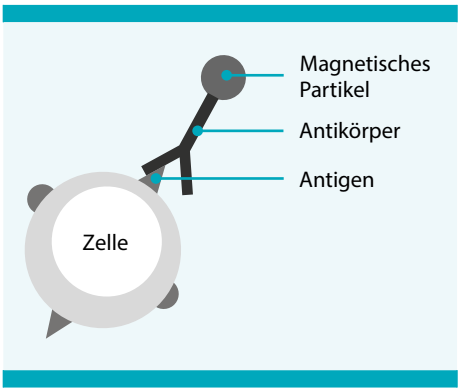


Abbildung 1.1: Magnetische Markierung von Zellen

Mit dem CliniMACS Plus System lassen sich Zellen auf drei verschiedene Arten magnetisch markieren:

- Direkt in einem einfachen Markierungsverfahren durch antigenspezifische Antikörper, die an superparamagnetische Eisen-Dextran-Partikel konjugiert sind (siehe Abbildung 1.1).
- Indirekt in einem zweistufigen Markierungsverfahren, dem sogenannten Flexible Labeling System. Im ersten Schritt werden die Zellen mit antigenspezifischen Antikörpern, die an Biotin konjugiert sind, markiert. Im zweiten Schritt werden diese Antikörper mit biotinspezifischen Antikörpern markiert, die an superparamagnetische Eisen-Dextran-Partikel konjugiert sind (siehe Abbildung 1.2).

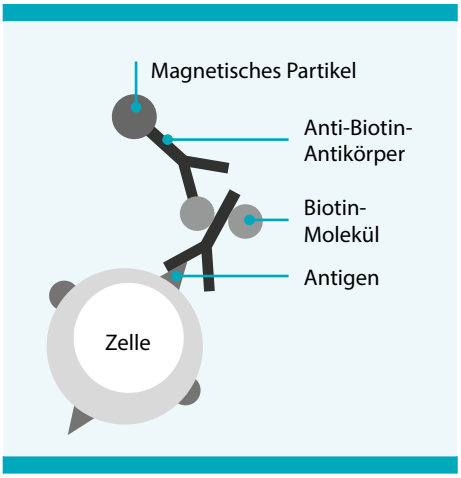


Abbildung 1.2: Flexible Labeling System

- Indirekt in einem zweistufigen Markierungsverfahren, dem sogenannten CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma). Zuerst werden die Zellen *in vitro* restimuliert, damit sie das Zytokin (z.B. IFN-gamma) sezernieren. Im ersten Markierungsschritt werden die restimulierten Zellen mit einem aus einem leukozytenspezifischen Antikörper und einem zytokinspezifischen Antikörper bestehenden Hybridmolekül markiert, dem sogenannten CliniMACS IFN-gamma Catchmatrix Reagent. Anschließend werden die Zellen inkubiert, um die Sekretion des Zytokins zu ermöglichen; dieses wird von der Catchmatrix auf der Zelloberfläche „eingefangen". Danach werden in einem zweiten Markierungsschritt die zytokinsezernierenden Zellen mit zytokinspezifischen Antikörpern markiert, die an superparamagnetische Eisen-Dextran-Partikel (CliniMACS IFN-gamma Enrichment Reagent) konjugiert sind (siehe Abbildung 1.3).

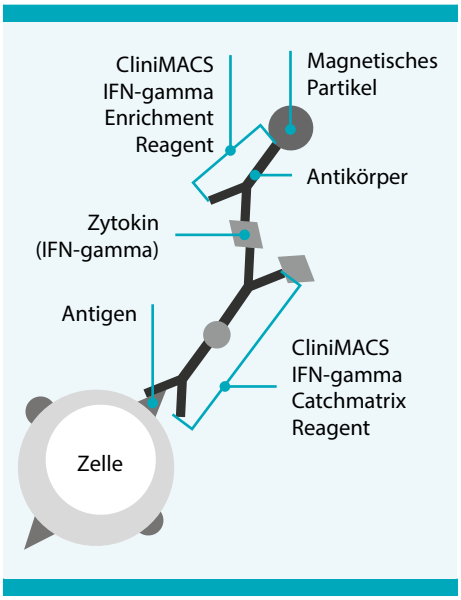


Abbildung 1.3: CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma)

1.3 Magnetische Hochgradienten-Zellseparation

Die magnetisch markierte Zellsuspension wird auf das mit einem Schlauchset vorbereitete CliniMACS Plus Instrument geladen. Diese magnetische Hochgradienten-Zellseparationseinheit besteht aus einem speziell entwickelten starken Permanentmagneten und einer Separationssäule mit ferromagnetischer Matrix.

Das Hochgradientenfeld ermöglicht die Erzeugung starker magnetischer Kräfte und eine schnelle Entmagnetisierung. Wenn kleine ferromagnetische Strukturen wie die Säulenmatrix in das Magnetfeld gebracht werden, stören sie die Homogenität des Feldes. Dies führt zur Erzeugung hoher magnetischer Gradienten. In ihrer unmittelbaren Umgebung erzeugen die ferromagnetischen Strukturen magnetische Kräfte, die 10.000-fach stärker sind als in konventionellen Geometrien. Das Hochgradientenfeld zieht die markierten Zellen an die Matrix und hält sie fest. Nach Entfernung der Säule vom Magneten ermöglicht die schnelle Entmagnetisierung der Säulenmatrix die Freisetzung der zurückgehaltenen Zellen.

1.4 Separationsstrategien

Das CliniMACS Plus System bietet dem Anwender verschiedene Separationsprogramme. Die Separationsprogramme können allgemein in Anreicherungsstrategien (CD34 SELECTION 1 und 2, ENRICHMENT 1.1 und ENRICHMENT 3.2) und Depletionsstrategien (DEPLETION 2.1 und DEPLETION 3.1) eingeteilt werden.

Anreicherung magnetisch markierter Zellen

Wenn eine Anreicherungsstrategie gewählt wird, werden die magnetisch markierten Zellen (primär mit einem CliniMACS Reagent markiert) in der Separationssäule zurückgehalten und die nicht markierten Zellen passieren die Säule. Die markierten Zellen (Zielzellen) werden im Cell Collection Bag und die nicht markierten Zellen (Nicht-Zielzellen) im Negative Fraction Bag gesammelt (siehe Abbildung 1.4).

Depletion magnetisch markierter Zellen

Die MACS-Technologie ermöglicht auch eine sehr effiziente Depletion von spezifischen Zellpopulationen. Unerwünschte Zellen werden spezifisch mit superparamagnetischen Partikeln markiert und bei der Passage durch die Hochgradienten-Magnetsäule von den Zielzellen separiert. Im Gegensatz zur Anreicherungsstrategie werden die nicht markierten Zellen (Zielzellen) im Cell Collection Bag und die markierten Zellen (Nicht-Zielzellen) im Negative Fraction Bag (siehe Abbildung 1.5) bzw. im Non-Target Cell Bag (siehe Abbildung 1.6 und Abbildung 1.7) gesammelt.

1.4.1 Anreicherungsstrategie

Anreicherung von Zellen unter Verwendung des CliniMACS Tubing Set oder CliniMACS Tubing Set LS

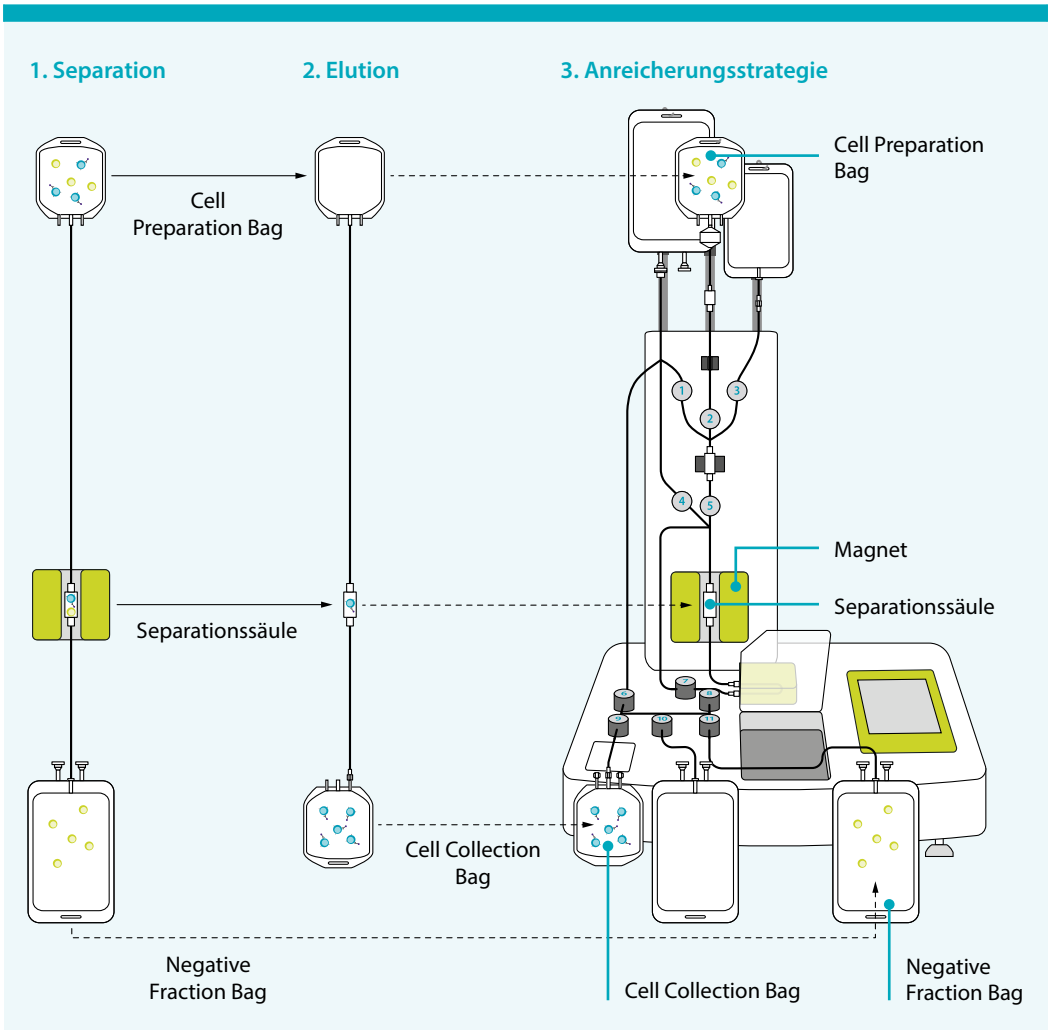


Abbildung 1.4: Strategie der Anreicherungsprogramme unter Verwendung des CliniMACS Tubing Set oder CliniMACS Tubing Set LS

1. Der Magnet steht in der „ON"-Position. Magnetisch markierte Zellen werden in der Separationssäule zurückgehalten, während andere nicht markierte Zellen (Nicht-Zielzellen) durch die Säule fließen und im Negative Fraction Bag gesammelt werden.

2. Der Magnet steht in der „OFF"-Position. Die magnetisch markierten Zellen (Zielzellen) werden von der Separationssäule gelöst und im Cell Collection Bag gesammelt.

3. Das Anreicherungsprogramm hält die magnetisch markierten Zellen in der Separationssäule zurück, und die nicht markierten Zellen (Nicht-Zielzellen) fließen durch die Säule und werden im Negative Fraction Bag gesammelt. Wenn der Magnet in die „OFF"-Position gestellt wird, werden die magnetisch markierten Zellen (Zielzellen) von der Säule gelöst und im Cell Collection Bag gesammelt. **Hinweis:** Die Zielzellfraktion wird immer im Cell Collection Bag gesammelt.

1.4.2 Depletionsstrategie

Depletion (Abreicherung) von Zellen unter Verwendung des CliniMACS Tubing Set LS: DEPLETION 2.1

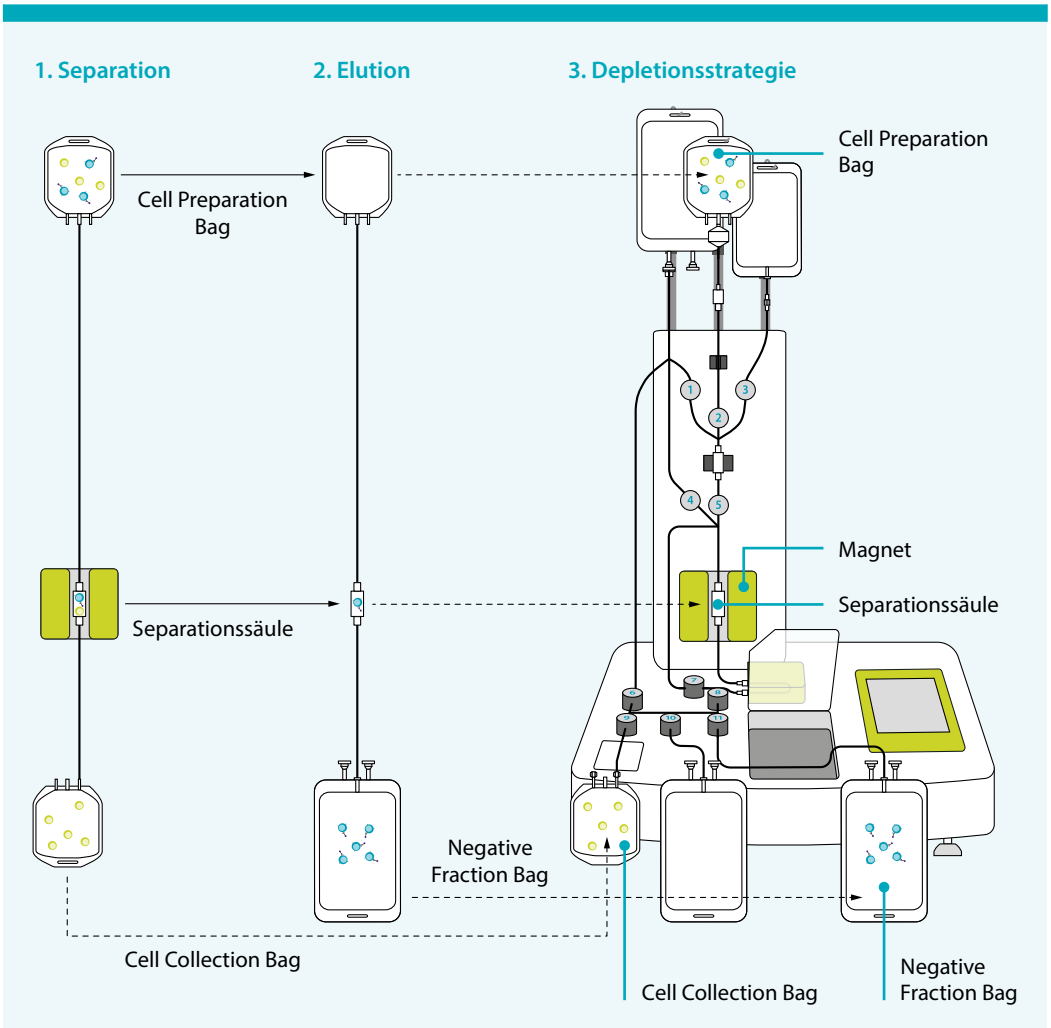


Abbildung 1.5: Strategie des Depletionsprogramms DEPLETION 2.1 unter Verwendung des CliniMACS Tubing Set LS

1. Der Magnet steht in der „ON"-Position. Magnetisch markierte Zellen werden in der Separationssäule zurückgehalten, während andere, nicht markierte Zellen (Zielzellen) durch die Säule fließen und im Cell Collection Bag gesammelt werden.
2. Der Magnet steht in der „OFF"-Position. Die magnetisch markierten Zellen (Nicht-Zielzellen) werden von der Separationssäule gelöst und im Negative Fraction Bag gesammelt.
3. Das Depletionsprogramm (DEPLETION 2.1) hält die magnetisch markierten Zellen in der Separationssäule zurück, und die nicht markierten Zellen (Zielzellen) fließen hindurch und werden im Cell Collection Bag gesammelt. Wenn der Magnet in die „OFF"-Position gestellt wird, werden die magnetisch markierten Zellen (Nicht-Zielzellen) von der Säule gelöst und im Negative Fraction Bag gesammelt. **Hinweis:** Die Zielzellfraktion wird immer im Cell Collection Bag gesammelt.

Depletion von Zellen unter Verwendung des CliniMACS Depletion Tubing Set: DEPLETION 3.1 (Teil 1: Staged Cell Loading [Bulk Loading Stage])

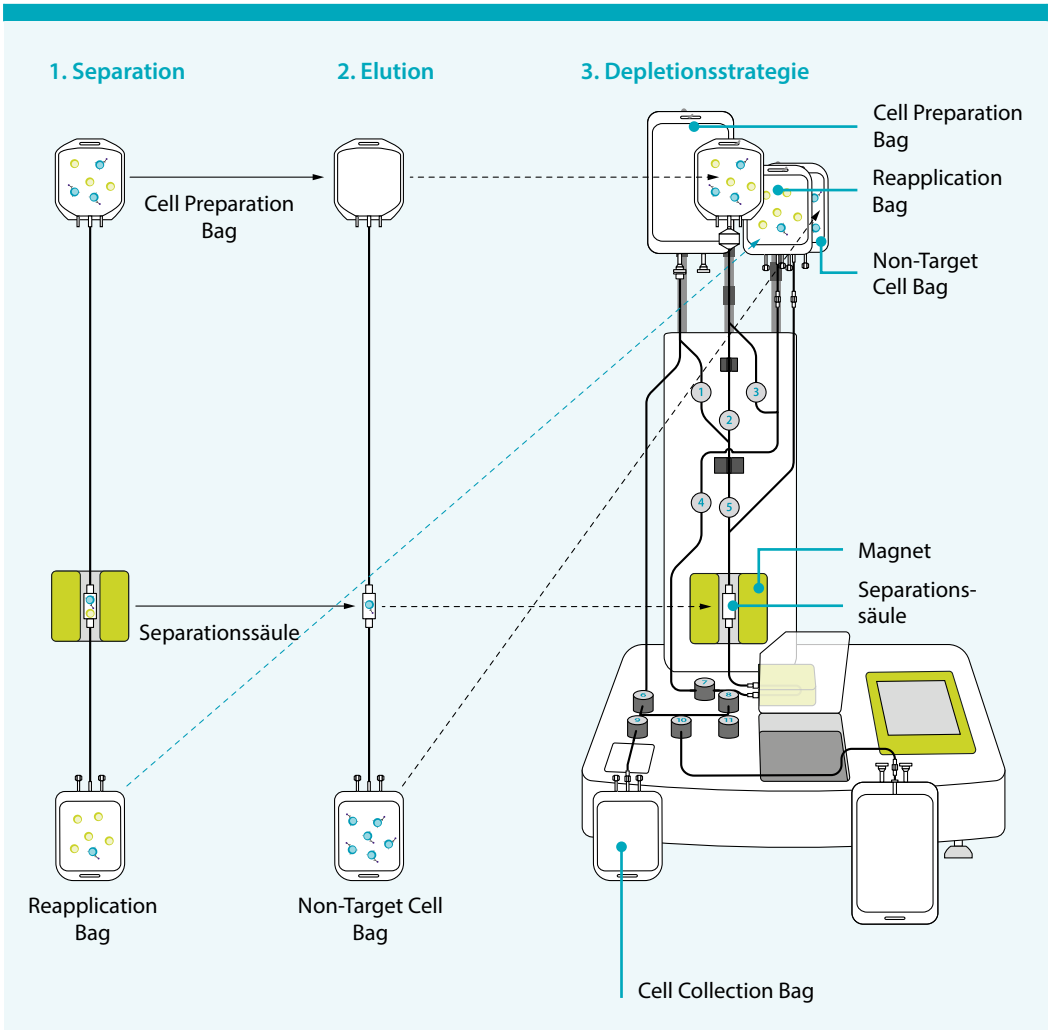


Abbildung 1.6: Strategie des Depletionsprogramms DEPLETION 3.1 unter Verwendung des CliniMACS Depletion Tubing Set (Teil 1)

1. Staged Cell Loading (Bulk Loading Stage): Der Magnet steht in der „ON"-Position. Magnetisch markierte Zellen werden in der Separationssäule zurückgehalten, während andere, nicht markierte Zellen (Zielzellen) durch die Säule fließen und im Reapplication Bag gesammelt werden.

2. Der Magnet steht in der„OFF"-Position. Die magnetisch markierten Zellen (Nicht-Zielzellen) werden von der Separationssäule gelöst und im Non-Target Cell Bag gesammelt.

3. Das Depletionsprogramm (DEPLETION 3.1) hält die magnetisch markierten Zellen in der Separationssäule zurück, und die nicht markierten Zellen (Zielzellen) fließen durch die Säule und werden im Reapplication Bag gesammelt, um für eine zweite sensitive Depletion erneut auf die Separationssäule aufgetragen zu werden (siehe Abbildung 1.7). Wenn der Magnet in die „OFF"-Position gestellt wird, werden die magnetisch markierten Zellen (Nicht-Zielzellen) von der Säule gelöst und im Non-Target Cell Bag gesammelt.

Depletion von Zellen unter Verwendung des CliniMACS Depletion Tubing Set: DEPLETION 3.1 (Teil 2: Sensitive Sample Loading [Sensitive Loading Stage])

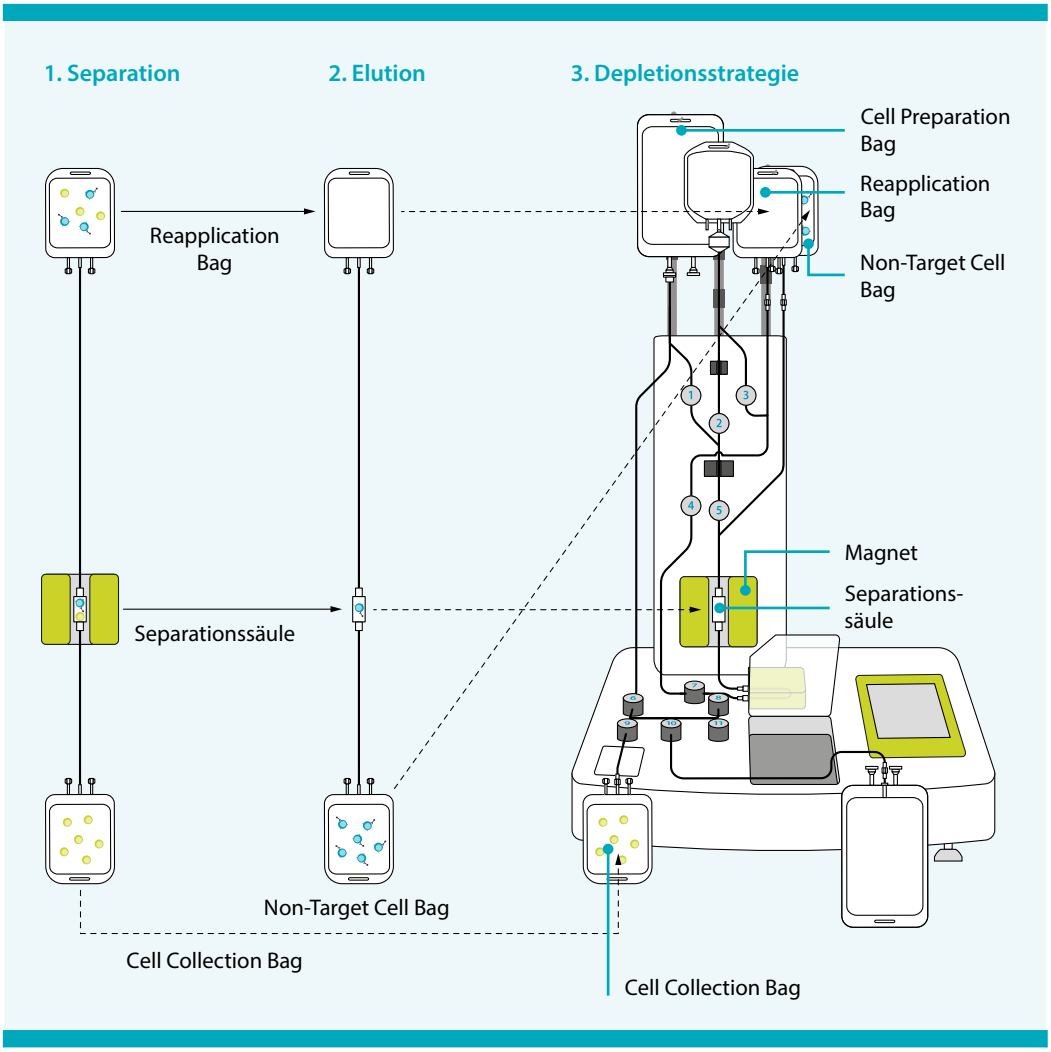


Abbildung 1.7: Strategie des Depletionsprogramms DEPLETION 3.1 unter Verwendung des CliniMACS Depletion Tubing Set (Teil 2)

4. Sensitive Sample Loading (Sensitive Loading Stage): Der Magnet steht in der„ON“-Position. Die Zellen aus dem Reapplication Bag werden erneut auf die Separationssäule aufgetragen. Die wenigen verbliebenen magnetisch markierten Zellen werden in der Separationssäule zurückgehalten, während die nicht markierten Zellen (Zielzellen) durch die Säule fließen und im Cell Collection Bag gesammelt werden.
5. Der Magnet steht in der„OFF“-Position. Die magnetisch markierten Zellen (Nicht-Zielzellen) werden von der Separationssäule gelöst und im Non-Target Cell Bag gesammelt.
6. Am Ende der Separation befinden sich die markierten Zellen (Nicht-Zielzellen) im Non-Target Cell Bag und die nicht markierten Zellen (Zielzellen) im Cell Collection Bag. **Hinweis:** Die Zielzellfraktion wird immer im Cell Collection Bag gesammelt.

2 Glossar

2.1 Grafische Darstellung

Die folgende Übersicht zeigt die in diesem Benutzerhandbuch verwendeten Signalwörter, die Anwender über potenzielle Risiken informieren, falls die beschriebenen Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen nicht beachtet werden. Die Gefährdungsstufe dient der Gefahreneinstufung, wie nachstehend beschrieben. Die Stufe, Art und Quelle der Gefahr und die möglichen Folgen, Verbote und Maßnahmen sind wie folgt angegeben. Die Symbole auf der linken Seite geben das Risiko genauer an.

⚠ WARNUNG

Weist auf eine Gefahrensituation hin, die den Tod oder schwere Verletzungen zur Folge haben kann, wenn sie nicht vermieden wird.

⚠ VORSICHT

Weist auf eine Gefahrensituation hin, die leichte oder mittelschwere Verletzungen zur Folge haben kann, wenn sie nicht vermieden wird.

HINWEIS

Weist auf Informationen hin, die als wichtig erachtet werden, aber nicht im Zusammenhang mit einer Gefährdung stehen (z.B.Hinweise auf Sachschäden).

WICHTIG

Weist die Anwender auf wichtige Verfahrensweisen oder Informationen hin, die nichts mit möglichen Personen- oder Sachschäden zu tun haben.

2.2 Glossar der Symbole

Eine Übersicht über die für das CliniMACS Plus System verwendeten Symbole ist im Benutzerhandbuch des CliniMACS Plus Instruments zu finden. Das Glossar der Symbole beschreibt die in den Benutzerhandbüchern und für die Kennzeichnung der CliniMACS Produkte verwendeten Symbole.

2.3 Glossar der Fachbegriffe

Anti-Biotin-Antikörper	Dieser Antikörper erkennt Zellen, die zuvor mit einem entsprechenden biotinylierten Antikörper oder Liganden markiert wurden
Apherese	Ein Blutreinigungsverfahren, bei dem Vollblut entnommen, ein gewünschter Bestandteil selektiert und zurückgehalten und der Rest des Blutes dem Spender wieder zurückgegeben wird
BDCA	Antigen dendritischer Zellen im Blut (Blood Dendritic Cell Antigen)
Beutelfach	Fach des CliniMACS Plus Instruments, in das der Negative Fraction Bag und der Buffer Waste Bag eingelgt werden
Beutelhalter	Halterung am CliniMACS Plus Instrument zur Aufhängung des Cell Preparation Bag, Non-Target Cell Bag, Priming Waste Bag, Reapplication Bag und des Pufferbeutels
Beutelverfahren	Sterile Verarbeitung und Transfer der Zellen in der geschlossenen Umgebung von Transferbeuteln
Buffer Waste Bag	Abfallbeutel zum Auffangen von Puffer während der Zellseparation mit dem CliniMACS Plus Instrument
CD1c (BDCA-1-) Antigen	CD1c ist Teil eines CD1-Genclusters, der vermutlich beim MHC-System eine Rolle spielt. Die CD1-Gene sind innerhalb einer Region mit 170.000 bp in einem Cluster auf dem menschlichen Chromosom 1q23.1 organisiert. Die von diesen Genen codierten Proteine (CD1a-e) werden als Heterodimere exprimiert, die aus einer schweren CD1-Kette, welche nicht-kovalent an ß2-Mikroglobulin gebunden ist, bestehen. CD1c ist an der Antigenpräsentation von mikrobiellen Glykolipiden oder Lipopeptid-Antigenen gegenüber T-Lymphozyten beteiligt. Im humanen peripheren Blut wird CD1c (BDCA-1) auf myeloiden dendritischen Zellen vom Typ 1 (MDC1) und auf einer Subpopulation von B-Lymphozyten exprimiert. Diese finden sich in Lymphknoten, Mantelzonen und Keimzentren, in der Marginalzone der Milz und im fetalen und adulten humanen peripheren Blut.

CD3-Antigen	Das CD3-Antigen kommt auf reifen humanen T-Zellen, Thymozyten und einer Subpopulation von NK-Zellen vor. Es ist mit dem T-Zell-Rezeptor (TCR) assoziiert und für die Signaltransduktion des TCR verantwortlich. Das CD3-Antigen ist ein Komplex aus fünf invariablen Ketten: γ, δ, ε, ζ und η. Der CD3-Antikörper erkennt alle T-Zellen, d. h. er reagiert mit 70-80% der humanen Lymphozyten im peripheren Blut und mit 65-85% der Thymozyten. Das vom Antikörper erkannte Epitop befindet sich auf der ε-Kette des CD3-Komplexes.
CD4-Antigen	Das CD4-Antigen wird auf den meisten Thymozyten und auf etwa zwei Dritteln der T-Zellen im peripheren Blut exprimiert; außerdem wird es auf Monozyten und Makrophagen exprimiert. CD4 ist ein akzessorisches Molekül für die Erkennung von Fremdantigenen in Verbindung mit Molekülen der MHC-Klasse II. Außerdem ist CD4 ein Rezeptor für HIV-1.
CD8-Antigen	Das CD8-Antigen ist ein über Disulfidbrücken verbundenes Dimer, das entweder als CD8α-Homodimer oder als CD8α/β-Heterodimer vorliegt. CD8 wird auf CD8-positiven T-Zellen und Thymozyten sowie auf einer Subpopulation von NK-Zellen und CD8-positiven γ/δ-T-Zellen stark exprimiert. CD8 fungiert als Co-Rezeptor mit MHC-Klasse-I-restringierten T-Zell-Rezeptoren bei der Antigenerkennung.
CD14-Antigen	Das CD14-Antigen ist ein auf Monozyten exprimiertes Zellmembran-Glykoprotein mit 53-55 kD. Das CD14-Antigen ist ein bekannter Rezeptor für den Komplex aus LPS und LPS-bindendem Protein (LBP).
CD19-Antigen	Das CD19-Antigen ist ein wichtiges Signaltransduktionsmolekül, das die Entwicklung, Aktivierung und Differenzierung von B-Lymphozyten reguliert. Als B-Zelllinien-Marker wird CD19 vom frühen Pro-B-Zell-Stadium bis zum B-Zell-Lymphoblasten-Stadium exprimiert, aber die Expression wird nach der B-Zell-Reifung zu Plasmazellen herunterreguliert. Das CD19-Antigen wird zudem auf den meisten malignen B-Zellen und auf einer Subpopulation von follikulären dendritischen Zellen exprimiert.
CD25-Antigen	Das CD25-Antigen, die Alpha-Kette des Interleukin-2-Rezeptors (IL-2Rα) mit niedriger Affinität, wird auf aktivierten T- und B-Zellen, NK-Zellen und Monozyten sowie auf regulatorischen CD4-positiven T-Zellen exprimiert. Das CD25-Antigen weist die drei Epitopregionen A, B und C auf. Der Antikörper des CliniMACS CD25 Reagent erkennt das Epitop A des CD25-Moleküls.

CD34-Antigen	Das CD34-Antigen ist ein stark glykosyliertes integrales Membranprotein vom Typ 1 mit 115 kDa, dessen Funktion unbekannt ist und das auf 1% bis 4% der normalen Knochenmarkzellen und weniger als 0,2% der normalen Leukozyten im peripheren Blut, auf Subpopulationen von Knochenmark-Stromazellen und auf Endothelzellen kleiner Gefäße in verschiedenen Geweben exprimiert wird.
CD45RA-Antigen	Das CD45RA-Antigen wird auf naiven CD4- und CD8 positiven T-Zellen sowie auf Subpopulationen von B-Zellen, NK-Zellen und Monozyten exprimiert. Es ist eine Isoform des häufigen Leukozytenantigens CD45, einer Transmembranprotein-Tyrosinphosphatase.
CD56-Antigen	Das CD56-Antigen ist ein Mitglied der NCAM-Familie (Familie der neuralen Zelladhäsionsmoleküle), die innerhalb des hämatopoetischen Systems auf NK- und NKT-Zellen exprimiert wird.
CD304-(BDCA-4-)Antigen	Das CD304-(BDCA-4-)Antigen ist ein Zelloberflächen-Glykoprotein mit 130-140 kDa, das in frischem Blut und Knochenmark ausschließlich auf plasmazytoiden dendritischen Zellen exprimiert wird.
Cell Collection Bag	Beutel, in dem die aufgereinigten Zielzellen nach der Separation gesammelt werden
Cell Preparation Bag	Beutel, in den das Zellprodukt transferiert wird und in dem die magnetische Markierung und das Spülen der Zellen erfolgt
CliniMACS Anti-Biotin Reagent	Reagenz zur magnetischen Markierung von Zellen, die primär mit biotinylierten Antikörpern oder Liganden markiert wurden
CliniMACS CD1c Biotin (BDCA-1)	Biotinylierter Antikörper zur Markierung humaner Zellen, die das CD1c-(BDCA-1-)Antigen exprimieren, bevor diese mit dem CliniMACS Anti-Biotin Reagent magnetisch markiert werden
CliniMACS CD3 Reagent	Reagenz zur magnetischen Markierung von Zellen, die das CD3-Antigen exprimieren
CliniMACS CD4 Reagent	Reagenz zur magnetischen Markierung von Zellen, die das CD4-Antigen exprimieren
CliniMACS CD8 Reagent	Reagenz zur magnetischen Markierung von Zellen, die das CD8-Antigen exprimieren
CliniMACS CD14 Reagent	Reagenz zur magnetischen Markierung von Zellen, die das CD14-Antigen exprimieren

CliniMACS CD19 Reagent	Reagenz zur magnetischen Markierung von Zellen, die das CD19-Antigen exprimieren
CliniMACS CD25 Reagent	Reagenz zur magnetischen Markierung von Zellen, die das CD25-Antigen exprimieren
CliniMACS CD34 Reagent	Reagenz zur magnetischen Markierung von Zellen, die das CD34-Antigen exprimieren
CliniMACS CD45RA Reagent	Reagenz zur magnetischen Markierung von Zellen, die das CD45RA-Antigen exprimieren
CliniMACS CD56 Reagent	Reagenz zur magnetischen Markierung von Zellen, die das CD56-Antigen exprimieren
CliniMACS CD304 (BDCA-4) Reagent	Reagenz zur magnetischen Markierung von Zellen, die das CD304-(BDCA-4-)Antigen exprimieren
CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma)	Kombination von Reagenzien, bestehend aus dem CliniMACS IFN-gamma Catchmatrix Reagent und dem CliniMACS IFN-gamma Enrichment Reagent. Mit dem CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma) können IFN-gamma-sezernierende Zellen nach *In-vitro*-Restimulation angereichert werden.
CliniMACS Depletion Tubing Set	Set aus Schläuchen, Anschlüssen, Säulen und Beuteln, mit dem die magnetisch markierte Zellsuspension verarbeitet wird und in dem die magnetische Zellseparation stattfindet; das Set wurde speziell für die spezifischen Erfordernisse der Depletion entwickelt
CliniMACS IFN-gamma Catchmatrix Reagent	Komponente des CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma) zur Oberflächenmarkierung von Leukozyten mit IFN-gamma-spezifischen Antikörpern
CliniMACS IFN-gamma Enrichment Reagent	Komponente des CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma) zur magnetischen Markierung von an das CliniMACS IFN-gamma Catchmatrix Reagent gebundenem IFN-gamma auf IFN-gamma-sezernierenden Zellen
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	Puffer, der zur Zellpräparation und Zellseparation mit dem CliniMACS Plus System verwendet wird: PBS (phosphatgepufferte Kochsalzlösung), ergänzt mit 1 mM EDTA, pH 7,2. Vor Gebrauch muss der CliniMACS PBS/EDTA Buffer mit HSA in Pharmaqualität bis zu einer Endkonzentration von 0,5% (Gewicht/Volumen, d. h. 5 g HSA pro Liter Puffer) ergänzt werden
CliniMACS Plus Instrument	Gerät zur magnetischen Zellseparation auf Basis der MACS-Technologie

CliniMACS TCRα/β-Biotin	Biotinylierter Antikörper zur Markierung humaner Zellen, die das TCRα/β-Antigen exprimieren, bevor diese mit dem CliniMACS Anti-Biotin Reagent magnetisch markiert werden
CliniMACS Tubing Set, CliniMACS Tubing Set LS	Set aus Schläuchen, Anschlüssen, Säulen und Beuteln, mit dem die magnetisch markierte Zellsuspension verarbeitet wird und in dem die magnetische Zellseparation stattfindet
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Fixierring	Teil des Schlauchsets, der dafür sorgt, dass der Pumpenschlauch an der richtigen Stelle verbleibt
Flüssigkeitssensor	Komponente des CliniMACS Plus Instruments, die Flüssigkeit in den Schläuchen detektiert
HSA	Humanes Serumalbumin.
Humanes Serumalbumin	HSA in Pharmaqualität, das im Land des Anwenders zugelassen ist, wird als Pufferzusatz beim Einsatz des CliniMACS Plus Systems benötigt
Hämatopoetische Vorläuferzellen	Vorläuferzellen der lymphoiden, myeloischen und erythrozytären Zelllinien
IgG	Immunglobulin G
Leukapherese	Apherese zur Entfernung von Leukozyten aus dem Blut
Luer-Verbindung	Schraubkupplung als Teil des Schlauchsets
Luer/Spike Interconnector	Transferset mit Anstechdorn und Spritzenadapter (weiblicher Luer) für Plasma bzw. Flüssigkeiten
MDC	Myeloide dendritische Zellen
Magnetischer Antikörper	Ein superparamagnetisch markierter Antikörper
Markierung	Reaktion von Zellen mit dem magnetischen Markierungsreagenz, z.B. CD34-positive Zellen mit dem CliniMACS CD34 Reagent
Monoklonale Antikörper	Ein einzelner Typ von Antikörper, der gegen ein spezifisches Epitop (Antigen, Antigendeterminante) gerichtet ist und von einem einzelnen Klon von B-Zellen oder einer einzelnen Hybridom-Zelllinie, die durch Fusion einer Lymphozytenzelle mit einer Myelomzelle entsteht, produziert wird. Einige Myelomzellen synthetisieren von Natur aus einzelne Antikörper.

Negative Fraction Bag	Beutel des CliniMACS Tubing Set und des CliniMACS Tubing Set LS, der die Nicht-Zielzellen-Fraktion enthält
Non-Target Cell Bag	Beutel des CliniMACS Depletion Tubing Set, der die Nicht-Zielzellen-Fraktion enthält
PBMC	Mononukleäre Zellen im peripheren Blut
Plasma Waste Bag	Abfallbeutel zum Sammeln von überschüssigem Plasma vor dem Markierungsverfahren
Plasma-Transferset	Transferset mit zwei Anstechdornen für Plasma bzw. Flüssigkeiten
Plasmaextraktor	Gerät zur Extraktion von Flüssigkeit aus dem Cell Preparation Bag nach dem Spülen der Zellen
Vorfilter	40-µm-Filter zwischen dem Cell Preparation Bag und der Vorsäule zum Abscheiden von Klumpen und Zelltrümmern
Priming Waste Bag	Beutel, in dem der Puffer aus dem Vorspülschritt gesammelt wird
Pumpensicherheitsschalter	Sensor, der den Pumpenbetrieb verhindert, wenn der Pumpendeckel offen ist
Reapplication Bag	Beutel des CliniMACS Depletion Tubing Set, in dem die nicht markierten Zellen während der Separation vorübergehend gesammelt werden. Die nicht markierten Zellen aus dem Reapplication Bag werden zweimal auf die Separationssäule aufgetragen, um eine hohe Reinheit der Zielzellen sicherzustellen.
Sampling Site Coupler	Injektionsanschluss, z.B. zur Entnahme von Proben oder Zugabe von CliniMACS Reagenzien zum Cell Preparation Bag
Schlauchpumpe	Pumpe im CliniMACS Plus Instrument zur Steuerung der Flussrate von Flüssigkeit im Schlauchset
Schweißgerät	Heizgerät zum Sterilverschließen von PVC-Schläuchen
Selektionspuffer	Siehe CliniMACS PBS/EDTA Buffer.
Selektionssäule	Siehe Separationssäule.
Selektionssäulenhalter	Siehe Separationssäulenhalter.

Separationsprogramm	Softwareprogramm zur Anreicherung oder Depletion von magnetisch markierten Zellsubpopulationen aus einer gemischten Zellpopulation. Je nach gewünschter Art der Separation kann ein entsprechendes Programm aus einem Menü von Separationsprogrammen ausgewählt werden.
Separationsreagenz	Reagenz zur magnetischen Markierung von Zellen, z.B. das CliniMACS CD34 Reagent
Separationssäule	Säule, in der magnetisch markierte Zellen separiert werden, wenn sie einem Magnetfeld ausgesetzt werden
Separationssäulenhalter	Geformte Führungen im Magnetgehäuse, an denen die Separationssäule fixiert wird
T-Verbindungsstück	T-förmiges Verbindungsstück an einem Schlauchset, an dem drei Schläuche zusammenkommen
TCRα/β-Antigen	Der TCRα/β ist das T-Zell-Rezeptor-Heterodimer, das aus zwei Transmembran-Glykoproteinketten, α und β, besteht. Beide Ketten sind Mitglieder der Ig-Superfamilie und bestehen aus einer konstanten und einer polymorphen variablen Region. Die variable Region des TCRα/β ist an der Erkennung von Antigenpeptiden beteiligt, die vom MHC-Komplex der antigenpräsentierenden Zellen präsentiert werden. Das TCRα/β-Antigen wird auf der Mehrzahl der T-Zellen im peripheren Blut exprimiert.
Taumelschüttler	Gerät zum Mischen des Zellprodukts während der Reaktion mit CliniMACS-Reagenzien
Transferbeutel	Beutel mit einem Schlauch und einem Dorn am Ende
Vorspülen	Schritt vor der Zellseparation, bei dem Puffer durch das Schlauchset gespült wird
Vorsäule	Erste Säule im CliniMACS Tubing Set und CliniMACS Tubing Set LS; dient als Filter zum Abscheiden von Zellen, die unspezifisch mit der Säulenmatrix in Wechselwirkung stehen
Vorsäulenhalter	Halterung am CliniMACS Plus Instrument, an die die Vorsäule angebracht wird
WBC	Weiße Blutzellen (Leukozyten)
Wash Waste Bag	Sammelbeutel, in dem der Spülüberstand durch Separation aus der sedimentierten Zellsuspension nach den Zentrifugationsschritten während der Probenvorbereitung gesammelt wird

Zelluläres Ausgangsmaterial	Zellhaltiges Produkt, das als Ausgangsmaterial für den CliniMACS Plus Separationsprozess verwendet wird, z.B. Leukapheresat, PBMC oder Knochenmark
rpm	Umdrehungen pro Minute
×g	Vielfaches der Gravitationsbeschleunigung der Erde

3 Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Dieses Kapitel beschreibt die potenziellen Risiken beim Betrieb des CliniMACS Plus Systems. Die örtlich geltenden Sicherheitsanweisungen und Richtlinien für den Arbeitsplatz sowie die Vorschriften für gute Herstellungspraxis, Gesundheitsschutz, Arbeitssicherheit und Unfallverhütung müssen stets beachtet werden. Für Anwendungshinweise, z.B.Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen, zum Umgang mit infektiösem Material und zellulärem Ausgangsmaterial sowie zu den Komponenten des CliniMACS Plus Systems beachten Sie bitte die betreffenden Abschnitte in der Gebrauchsanweisung der jeweiligen Komponente. Eine ausführliche Gebrauchsanweisung für das CliniMACS Plus Instrument finden Sie im Benutzerhandbuch des CliniMACS Plus Instruments.

Alle im Zusammenhang mit dem Produkt aufgetretenen schwerwiegenden Vorkommnisse sind der Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG – unter Verwendung der angegebenen Kontaktinformationen – und der zuständigen Behörde des Mitgliedsstaates anzuzeigen, in dem der Anwender des Produktes niedergelassen ist.

3.1 Verfahrensbezogene Warnhinweise

⚠ WARNUNG

Risiko einer Prozessstörung oder Beschädigung des Instruments. Risiko einer Prozessstörung oder Beschädigung des Instruments, wenn Verfahren von ungeschulten Bedienern durchgeführt werden. Alle Verarbeitungsverfahren dürfen nur von geschulten Bedienern durchgeführt werden. Die Schulung der Bediener erfolgt durch einen qualifizierten Vertreter von Miltenyi Biotec.

⚠ VORSICHT

Risiko einer verminderten Prozessleistung. Temperaturen unter oder über der Raumtemperatur können zu einer geringeren Viabilität, Reinheit und Ausbeute der Zielzellen führen. Führen Sie die Probenvorbereitung und Zellseparation bei Raumtemperatur (RT: +19 °C bis +25 °C [+66 °F bis +77 °F]). durch.

⚠ VORSICHT

Die Gerätesicherheit kann beeinträchtigt sein. Die Gerätesicherheit kann beeinträchtigt sein, wenn das Instrument nicht nach den Anweisungen des Herstellers verwendet wird. Lesen Sie die Sicherheitsinformationen, Warnhinweise, Vorsichtsmaßnahmen und Anweisungen für die ordnungsgemäße Bedienung des CliniMACS Plus Systems in der Gebrauchsanweisung des CliniMACS Plus Systems und in allen sicherheitsbezogenen Empfehlungen von Miltenyi Biotec vollständig durch und vergewissern Sie sich, dass Sie alles verstanden haben.

- Für die Herstellung und Anwendung von Zielzellen bei Menschen müssen die nationalen gesetzlichen Bestimmungen und Vorschriften – für die EU zum Beispiel die Richtlinie 2004/23/EG (menschliche Gewebe und Zellen) bzw. die

Richtlinie 2002/98/EG (menschliches Blut und Blutbestandteile) – eingehalten werden. Daher liegt jegliche klinische Anwendung der Zielzellen ausschließlich in der Verantwortung des Anwenders eines CliniMACS Plus Systems.

- Alle Gegenstände, die mit Blut oder Blutprodukten in Kontakt gekommen sind, müssen als infektiöses Material behandelt werden. Die Vorschriften zum Umgang mit infektiösem Material sind zu beachten.
- Alle Schläuche, Verbindungsstücke, Ventile, die Vorsäule und die Separationssäule sollten während der Vorspülung/Entlüftung gründlich auf Lecks kontrolliert werden.
- Alle Beutel, auch die bei der Probenvorbereitung verwendeten Beutel, sollten aufbewahrt werden, bis die Abschlussanalyse der gesammelten Zellen beendet und die erfolgreiche Separation der Zielzellen bestätigt worden ist.

3.2 CliniMACS Reagenzien und Biotinkonjugate

- Wenn Patienten die Zielzellfraktion infundiert oder injiziert wird, können sie Spuren von murinen Antikörpern und Eisen-Dextran ausgesetzt werden.
- Eisen-Dextran-Partikel und/oder murine Antikörper können allergische oder anaphylaktische Reaktionen bei Patienten auslösen. Deshalb sollten Notfallausrüstung und -medikamente bereitgehalten werden.
- Die Separation von Zellen mit den CliniMACS Reagenzien und Biotinkonjugaten darf nur von geschultem Personal durchgeführt werden.
- Personen, die CliniMACS Reagenzien und Biotinkonjugate verwenden, sollten über Erfahrung in der Separation von Zellen aus Knochenmark oder peripherem Blut verfügen.
- Die Nicht-Zielzellen sind nicht für die therapeutische Anwendung bestimmt und dürfen Patienten nicht reinfundiert werden.
- Die CliniMACS Reagenzien und Biotinkonjugate sind nur für den *In-vitro*-Gebrauch vorgesehen und nicht für therapeutische Zwecke oder die direkte Infusion in Patienten bestimmt.
- Die Anwendung der CliniMACS Reagenzien und Biotinkonjugate bei Patienten mit bekannter oder vermuteter Empfindlichkeit gegenüber Maus-Immunglobulinen oder Eisen-Dextran wird nicht empfohlen.
- Patienten können humane Anti-Maus-Antikörper (HAMA) entwickeln.
- Die Reagenzien dürfen nach dem auf dem Produktetikett angegebenen Verfalldatum nicht mehr verwendet werden.
- Bei beschädigter Verpackung nicht verwenden. Reagenzien nur verwenden, wenn das Fläschchen unbeschädigt und versiegelt ist.

3.3 Umgang mit infektiösem Material

⚠ WARNUNG

Gefahr von schweren Verletzungen oder Tod. Abhängig vom verwendeten biologischen Material kann ein Kontakt zu schweren Verletzungen oder zum Tod führen. Tragen Sie stets persönliche Schutzausrüstung gemäß den Warnhinweisen und Vorsichtsmaßnahmen, insbesondere wenn infektiöses Material verwendet wird oder wurde.

- Um eine Kontamination des zellulären Ausgangsmaterials zu vermeiden, müssen alle Vorbereitungsschritte unter sterilen Bedingungen und unter Anwendung aseptischer Techniken (z.B. in der sterilen Werkbank) durchgeführt werden.
- Die Person, die die Zellseparation durchführt, muss in der korrekten Anwendung der Ausrüstung sowie im Umgang mit Blutprodukten und Knochenmarkaspirat geschult sein.
- Die Person, die die Zellseparation durchführt, muss beim Arbeiten mit Patientenproben und beim Umgang mit potenziell infektiösem Material geeignete Kleidung (z.B. Laborkittel, Handschuhe und Schutzbrille) tragen.
- Alle Blutprodukte müssen als potenzielle Biogefahr behandelt werden. Das Leukapheresat, Blutprodukte, Knochenmarkaspirat, gesammelte Zellen, gebrauchter Puffer, gebrauchte Schlauchsets und sonstige Materialien, die mit diesen Flüssigkeiten in Kontakt gekommen sind, müssen gemäß den Anforderungen des Krankenhauses bzw. der Einrichtung als biogefährdendes Material behandelt werden.
- Das CliniMACS Plus Instrument sollte nach jedem Separationslauf als potenzielle Biogefahr betrachtet und gemäß den Anforderungen des Krankenhauses bzw. der Einrichtung mit einem wässrigen bioziden Reinigungsmittel (z.B. Bacillol® plus oder Meliseptol®, siehe auch Abschnitt „Reinigung und Wartung“ im Benutzerhandbuch des CliniMACS Plus Instruments) gereinigt werden.
- Einmalmaterial ist gemäß den Anforderungen des Krankenhauses bzw. der Einrichtung als biogefährdendes Material zu betrachten.

3.4 Zelluläres Ausgangsmaterial

WICHTIG

Die Markierung und Separation von Zellen sollte sobald wie möglich nach der Gewinnung des zellulären Ausgangsmaterials beginnen. Das Produkt sollte nicht älter als 24 Stunden sein, wenn das Markierungs- und Separationsverfahren begonnen wird.

- Das zelluläre Ausgangsmaterial (z.B. Leukapheresat) sollte in Standardentnahmebeuteln gemäß den Standardverfahren des Krankenhauses bzw. der Einrichtung entnommen werden.
- Das Behältnis mit dem zellulären Ausgangsmaterial muss mit der Patienten-ID, Uhrzeit, Datum und Ort der Entnahme gemäß den Verfahren, die zur Anwendung mit dem klinischen Protokoll vorgegeben sind, gekennzeichnet werden.
- Für den Transport sollte das zelluläre Ausgangsmaterial in isolierten Behältern verpackt und auf kontrollierter Raumtemperatur (RT: +19 °C bis +25 °C [+66 °F bis +77 °F]). gehalten werden, wobei die zur Anwendung mit dem klinischen Protokoll zulässigen Standardverfahren des Krankenhauses bzw. der Einrichtung für die Blutentnahme einzuhalten sind. Das Material nicht einfrieren. Die Zellkonzentration sollte während des Transports $0{,}2\times10^9$ Zellen pro mL nicht überschreiten.
- Intensives Mischen des zellulären Ausgangsmaterials ist zu vermeiden.
- Wenn das zelluläre Ausgangsmaterial gelagert werden muss, z.B. über Nacht, sollte es auf kontrollierter Raumtemperatur (RT: +19 °C bis +25 °C [+66 °F bis +77 °F]). gehalten werden. Während der Lagerung sollte die Leukozytenkonzentration niemals $0{,}2\times10^9$ Zellen pro mL überschreiten.
- Die Zellen sind in autologem Plasma zu lagern. Wenn die Zellkonzentration höher als $0{,}2\times10^9$ Zellen pro mL ist, muss das zelluläre Ausgangsmaterial mit autologem Plasma verdünnt werden.

4 Das CliniMACS Plus System

Das CliniMACS Plus System, bestehend aus den Komponenten CliniMACS Plus Instrument, CliniMACS Reagenz(ien), CliniMACS Schlauchsets, CliniMACS PBS/EDTA Buffer und weiterem Zubehör, das kombiniert verwendet werden muss, ist zur *In-vitro*-Separation von spezifischen menschlichen Zellen für klinische Anwendungen bestimmt.

WICHTIG

Für Anwendungshinweise, z.B. Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen, zu den Komponenten des CliniMACS Plus Systems beachten Sie bitte die Gebrauchsanweisung der jeweiligen Komponente.

4.1 CliniMACS Plus Instrument

Das CliniMACS Plus Instrument ist ein elektromechanisches Instrument, das mit einem Permanentmagneten, einer Schlauchpumpe, Quetschventilen, einer elektronischen Steuerung und Software ausgestattet ist.

4.2 CliniMACS Reagenzien und Biotinkonjugate

Die CliniMACS Reagenzien sind dunkel gefärbte, nicht visköse, kolloidale Lösungen, die zellspezifische Antikörperkonjugate in Puffer enthalten. Die Antikörper in den Reagenzien sind chemisch an superparamagnetische Partikel gekoppelt.

Die CliniMACS Biotinkonjugate sind klare, farblose Lösungen, die kovalent an Biotin gebundene Antikörper in Puffer enthalten. Die Antikörper sind hochspezifisch und ermöglichen die *In-vitro*-Markierung von seltenen Zielzellen.

4.3 CliniMACS Schlauchsets

Die CliniMACS Schlauchsets sind sterile Einmalprodukte zur Verwendung in Kombination mit dem CliniMACS Plus Instrument für die *In-vitro*-Anreicherung oder -Depletion von menschlichen Zellen aus heterogenen hämatologischen Zellpopulationen.

4.4 CliniMACS PBS/EDTA Buffer

Der CliniMACS PBS/EDTA Buffer ist eine Spül- und Transportflüssigkeit für die *In-vitro*-Separation von menschlichen Zellen.

4.5 CliniMACS Zubehör

- **Plasma-Transferset:**
  Transferset mit zwei Anstechdornen für Plasma oder Flüssigkeiten, Transfer Set Coupler/Coupler (REF 200-073-902) oder gleichwertig
- **Luer/Spike Interconnector:**
  Transferset mit Anstechdorn und Spritzenadapter (weiblicher Luer) für Plasma oder Flüssigkeiten, Luer/Spike Interconnector (REF 200-073-903) oder gleichwertig

4.6 Weitere erforderliche Materialien

Zusätzlich zu den CliniMACS-Produkten können weitere Materialien für eine CliniMACS Plus Separation erforderlich sein:

- **Transferbeutel, geeignet zur Zentrifugation:**
  Transferbeutel 150 mL, Terumo oder gleichwertig
  Transferbeutel 600 mL, Terumo oder gleichwertig
  Transferbeutel 1.000 mL, Terumo oder gleichwertig
- **Zellkulturbeutel, gasdurchlässig:**
  MACS GMP Cell Differentiation Bag – 100 mL oder gleichwertig
- **Sampling Site Coupler:**
  Sampling Site Coupler, Terumo oder gleichwertig
- **Plasma-Transferset:**
  Transferset mit zwei Anstechdornen für Plasma oder Flüssigkeiten, Fenwal oder gleichwertig
- **Luer/Spike Interconnector:**
  Transferset mit Anstechdorn und Spritzenadapter (weiblicher Luer) für Plasma oder Flüssigkeiten, Charter Medical oder gleichwertig
- **Vorfilter:**
  Bluttransfusionsfilter, Haemonetics® oder gleichwertig
- **Spritzen und Nadeln:**
  geeignete Spritzen (5 mL, 10 mL, 20 mL, 50 mL) und hypodermische 20-G-Injektionsnadeln
- **Schlauchklemmen**
- **Probenröhrchen**
- **Humanes Serumalbumin (HSA):**
  Nur HSA in Pharmaqualität verwenden, das als zugelassenes Produkt im Land des Anwenders erhältlich ist.
- **Immunglobulin G in klinischer Qualität:**
  Nur IgG in Pharmaqualität verwenden, das als zugelassenes Produkt im Land des Anwenders erhältlich ist, für Deutschland z. B.: Gamunex® 10% oder gleichwertig.

- **Zellkulturmedium:**
  z.B. RPMI 1640 oder gleichwertig
- **Anwendungsspezifische Materialien:**
  individueller biotinylierter zellspezifischer Antikörper oder Ligand; AB-Serum oder alternativ autologes Serum

4.7 Erforderliche Ausrüstung

- **unterbrechungsfreie Stromversorgung (UPS):**
  empfohlene UPS: APC Smart-UPS 1500 VA USB und seriell 230 V, hergestellt von APC (American Power Conversion) oder gleichwertig.
- **sterile Werkbank**
- **Schweißgerät für sterile Schläuche:**
  Terumo Sterile Connection Device (TSCD®) oder gleichwertig
- **Taumelschüttler:**
  Plattformschüttler, Heidolph Instruments oder gleichwertig
- **Zentrifuge:**
  Zentrifuge, Sorvall oder gleichwertig und Zentrifugenbecher mit aerosoldichten Kappen
- **Plasmaextraktor:**
  Plasma Separation Stand, Terumo Equipment oder gleichwertig
- **Tischwaage:**
  Laborwaage, Mettler Toledo oder gleichwertig mit 1 kg Tragfähigkeit, Auflösung bis 0,1 g
- **Schlauchschweißgerät:**
  Manuelles Schweißgerät Hematron III, Baxter oder gleichwertig
- **Tubing Stripper:**
  Tube Stripper, Baxter oder gleichwertig
- **Behälter für infektiösen Abfall**

Zusätzlich benötigte Ausrüstung für das CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma):

- 24-Well-Kulturschale Corning™ Costar™ 24-Well-Kulturplatte, Sigma Aldrich oder gleichwertig
- 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 Anwendungsübersicht

5.1 In vier SCHRITTEN zu Ihren Zielzellen

Im folgenden Kapitel wird ein Überblick über die CliniMACS Plus Separation gegeben. Die CliniMACS Plus Separation wird in vier SCHRITTEN durchgeführt. Im ersten Schritt werden die Zellen vorbereitet und magnetisch markiert. Im zweiten Schritt wird ein geeignetes Separationsprogramm gewählt. Im dritten Schritt wird das Schlauchset am CliniMACS Plus Instrument installiert, und im vierten Schritt werden die Zellen automatisch separiert.

Eine Dokumentation der anwendungsspezifischen Prozessdaten kann erforderlich sein. Für hilfreiche Arbeitsblätter wenden Sie sich an den Miltenyi Biotec Technical Support.

Das Benutzerhandbuch CliniMACS Plus Anwendungen beschreibt verschiedene Optionen für jeden Schritt (verschiedene Reagenzien, Schlauchsets und Programme). Bevor Sie eine Anwendung starten, müssen Sie die anwendungsspezifischen Kapitel (Kapitel 6) und die genaue Erläuterung der SCHRITTE 1–4 (Kapitel 7) anhand der auf der nächsten Seite beginnenden Übersichtstabelle wählen. Die Übersichtstabelle enthält Informationen zu den betreffenden Abschnitten des Benutzerhandbuchs. Die Übersichtstabelle basiert auf der für die Separation benötigten Art und Anzahl der Reagenzien, der Anzahl an Zellen, der Art des Schlauchsets und des erforderlichen Separationsprogramms.

SCHRITT 1: Zellpräparation und magnetische Markierung

SCHRITT 1 beschreibt die Vorbereitung des Zellprodukts und die magnetische Markierung der spezifischen Zellen, die das betreffende Antigen exprimieren. Folgen Sie den Anweisungen des betreffenden Abschnitts. Fahren Sie mit SCHRITT 2 fort.

SCHRITT 2: Wahl des Separationsprogramms

SCHRITT 2 beschreibt die Wahl eines Separationsprogramms des CliniMACS Plus Instruments. Je nachdem, welcher Zelltyp und welche Zellzahl separiert werden soll, müssen unterschiedliche Programme gewählt werden. Um festzustellen, welches Programm anwendbar ist, gehen Sie zur Übersichtstabelle auf der nächsten Seite. Lesen Sie den betreffenden Abschnitt für das gewählte Separationsprogramm. Folgen Sie den Anweisungen im betreffenden Abschnitt. Fahren Sie mit SCHRITT 3 fort.

SCHRITT 3: Installation von CliniMACS Schlauchsets

SCHRITT 3 erläutert die Installation des Schlauchsets am CliniMACS Plus Instrument. Folgen Sie den Anweisungen im betreffenden Abschnitt. Fahren Sie mit SCHRITT 4 fort.

SCHRITT 4: CliniMACS Plus Separation

SCHRITT 4 beschreibt die automatische CliniMACS Plus Separation. Das CliniMACS Plus Instrument führt das (in SCHRITT 2 gewählte) automatische Zellseparationsverfahren durch. Folgen Sie den Anweisungen des betreffenden Abschnitts.

WICHTIG

In der Übersichtstabelle auf den folgenden Seiten werden Informationen zu den typischen CliniMACS Reagenzien zusammengefasst. Wenn eine Separation einer anderen Anzahl von Zielzellen durchgeführt werden soll, finden Sie in den Anleitungen der anwendungsspezifischen Übersicht Hinweise zur maximalen Kapazität der jeweiligen Anwendung. Folgen Sie den Anweisungen der anwendungsspezifischen Abschnitte und den genauen Erklärungen der SCHRITTE 1–4. Siehe Übersichtstabelle.

5.2 Übersichtstabelle

Anwendungs-kapazität	Reagenz-fläschchen	Schlauchset	Separations-programm	Anwendungs-spezifischer Abschnitt	Genaue Erklärung der SCHRITTE 1–4 in den Abschnitten			
					SCHRITT 1	SCHRITT 2	SCHRITT 3	SCHRITT 4
Anti-Biotin (REF 173-01) – Anreicherung								
≤40×10^9 Gesamtzellen	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) – Depletion (Anwendung im normalen Maßstab)								
≤40×10^9 Gesamtzellen	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) – Depletion (Anwendung im großen Maßstab)								
>40–80×10^9 Gesamtzellen	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) – Anreicherung								
IFN-sezernierende Zellen aus ≤1×10^9 Gesamtzellen	1 Kit (2 Reagenz-fläschchen)	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) – Depletion - Teil 1 von 2								
≤5×10^9 CD19-positive Zellen aus ≤40×10^9 Gesamtzellen (WBC)	1× CD19 Reagent und 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) – Anreicherung - Teil 2 von 2								
≤0,2×10^9 CD1c-(BDCA-1-) positive Zellen aus ≤40×10^9 Gesamtzellen (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) – Depletion (Anwendung im normalen Maßstab)								
≤15×10^9 CD3-positive Zellen aus ≤40×10^9 Gesamtzellen	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) – Depletion (Anwendung im großen Maßstab)								
>15–20×10^9 CD3-positive Zellen aus >40–80×10^9 Gesamtzellen	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
CD3 (REF 273-01) – Depletion (Anwendung im normalen Maßstab)								
≤15×10^9 CD3-positive Zellen aus ≤40×10^9 Gesamtzellen	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

Anwendungs-kapazität	Reagenz-fläschchen	Schlauchset	Separations-programm	Anwendungs-spezifischer Abschnitt	Genaue Erklärung der SCHRITTE 1–4 in den Abschnitten			
					SCHRITT 1	SCHRITT 2	SCHRITT 3	SCHRITT 4
CD3 (REF 273-01) – Depletion (Anwendung im großen Maßstab)								
>15–30×10^9 CD3-positive Zellen aus >40–80×10^9 Gesamtzellen	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) – Anreicherung								
≤5×10^9 CD4-positive Zellen aus ≤40×10^9 Gesamtzellen	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) – Depletion								
≤12×10^9 CD4-positive Zellen aus ≤40×10^9 Gesamtzellen	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) – Anreicherung								
≤4×10^9 CD8-positive Zellen aus ≤40×10^9 Gesamtzellen	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) – Depletion								
≤4×10^9 CD8-positive Zellen aus ≤40×10^9 Gesamtzellen	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
CD4/CD8-Kombination (REF 276-01/REF 275-01) – Depletion								
≤12×10^9 CD4-positive Zellen und ≤4×10^9 CD8-positive Zellen aus ≤40×10^9 Gesamtzellen	1× CD4 Reagent und 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) – Anreicherung								
≤4×10^9 CD14-positive Zellen aus ≤20×10^9 Gesamtzellen	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) – Depletion								
≤5×10^9 CD19-positive Zellen aus ≤40×10^9 Gesamtzellen	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

Anwendungs-kapazität	Reagenz-fläschchen	Schlauchset	Separations-programm	Anwendungs-spezifischer Abschnitt	Genaue Erklärung der SCHRITTE 1–4 in den Abschnitten			
					SCHRITT 1	SCHRITT 2	SCHRITT 3	SCHRITT 4
CD3/CD19-Kombination (REF 273-01/REF 179-01) – Depletion								
≤15×10^9 CD3-positive Zellen und ≤5×10^9 CD19-positive Zellen aus ≤40×10^9 Gesamtzellen	1× CD3 Reagent und 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) – Anreicherung								
≤0,6×10^9 CD25-positive Zellen aus ≤40×10^9 Gesamtzellen (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) – Anreicherung								
≤0,6×10^9 stark exprimierende CD25-positive Zellen aus ≤40×10^9 Gesamtzellen (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) – Depletion (Anwendung im normalen Maßstab)								
≤6×10^9 CD25-positive Zellen aus ≤40×10^9 Gesamtzellen (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) – Depletion (Anwendung im großen Maßstab)								
>6–12×10^9 CD25-positive Zellen aus >40–80×10^9 Gesamtzellen (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) – Anreicherung (Anwendung im normalen Maßstab)								
≤0,6×10^9 CD34-positive Zellen aus ≤60×10^9 Gesamtzellen	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) – Anreicherung (Anwendung im großen Maßstab)								
>0.6–1.2×10^9 CD34-positive Zellen aus >60–120×10^9 Gesamtzellen	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
CD45RA (REF 701-46) – Depletion								
≤20×10^9 CD45RA-positive Zellen aus ≤50×10^9 Gesamtzellen	1× CD45RA 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

Anwendungs-kapazität	Reagenz-fläschchen	Schlauchset	Separations-programm	Anwendungs-spezifischer Abschnitt	Genaue Erklärung der SCHRITTE 1–4 in den Abschnitten			
					SCHRITT 1	SCHRITT 2	SCHRITT 3	SCHRITT 4
CD56 (REF 271-01) – Anreicherung								
≤5×10^9 CD56-positive Zellen aus ≤40×10^9 Gesamtzellen	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) – Anreicherung								
≤$0{,}2\times10^9$ CD304-(BDCA-4-) positive Zellen aus ≤40×10^9 Gesamtzellen	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) – Depletion								
≤24×10^9 TCRα/β-positive Zellen aus ≤60×10^9 Gesamtzellen	1× TCRα/β-Biotin und 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

Tabelle 5.1: Übersicht der verfügbaren Anwendungen mit entsprechenden Schlauchsets und Separationsprogrammen

6 Anwendungsspezifische Übersicht der SCHRITTE 1–4

6.1 Anreicherung von CD34-positiven Zellen

Das CliniMACS Plus CD34 System mit dem CliniMACS Plus Instrument, CliniMACS CD34 Reagent, CliniMACS Tubing Set oder CliniMACS Tubing Set LS und CliniMACS PBS/EDTA Buffer ist zur *In-vitro*-Anreicherung von humanen CD34-positiven hämatopoetischen Vorläuferzellen aus heterogenen hämatologischen Zellpopulationen bestimmt.

6.1.1 SCHRITT 1: Zellpräparation und magnetische Markierung

Erste erforderliche Aktionen

Anwendungskapazität

- Anwendung im normalen Maßstab: bis zu $0{,}6\times10^9$ CD34-positive Zellen aus bis zu 60×10^9 Gesamtzellen (WBC)
- Anwendung im großen Maßstab: mehr als $0{,}6\times10^9$ und bis zu $1{,}2\times10^9$ CD34-positive Zellen aus bis zu 120×10^9 Gesamtzellen (WBC)

⚠ VORSICHT

Risiko einer ungenügenden Leistung in Bezug auf die Separation markierter Zellen. Wenn die Anwendungsspezifikationen überschritten werden, besteht das Risiko einer ungenügenden spezifischen Markierung. Verwenden Sie die benötigte Menge an Zellen und Reagenz gemäß der Beschreibung der jeweiligen Anwendung.

Benötigte CliniMACS-Materialien

Material	Artikel-nummer	Menge	Separationsprogramm
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1	–
CliniMACS CD34 Reagent	171-01	• 1 Fläschchen (normaler Maßstab) • 2 Fläschchen (großer Maßstab)	–
CliniMACS Tubing Set	161-01	1 Schlauchset	CD34 SELECTION 1
CliniMACS Tubing Set LS	162-01	1 Schlauchset	CD34 SELECTION 2
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	3×1.000-mL-Beutel[1]	–

1 Vor Gebrauch den CliniMACS PBS/EDTA Buffer mit HSA auf eine Endkonzentration von 0,5% (w/v) einstellen.

Tabelle 6.1: Benötigte CliniMACS Materialien zur Anreicherung von CD34-positiven Zellen

Weitere erforderliche Materialien

- **Cell Preparation Bag:**
  ein 600-mL-Transferbeutel, geeignet zur Zentrifugation, sowie ein Sampling Site Coupler und zwei Plasma-Transfersets für das Zellpräparationsverfahren
- **Plasma Waste Bag und Wash Waste Bags:**
  drei 600-mL-Transferbeutel, geeignet zur Zentrifugation
- **Cell Collection Bag:**
  ein 150-mL-Transferbeutel in Kombination mit einem Luer/Spike Interconnector zur Verbindung des Cell Collection Bag mit dem Schlauchset
- ein Vorfilter
- Schlauchklemmen
- geeignete Spritzen (verschiedene Größen) und hypodermische 20-G-Injektionsnadeln
- Humanes Serumalbumin (HSA) als Zusatz zum CliniMACS PBS/EDTA Buffer bis zu einer Endkonzentration von 0,5% (w/v)
- Probenröhrchen

▶ Vorbereitung der Beutel

Das Gewicht des leeren Cell Collection Bag und Cell Preparation Bag gemäß der Beschreibung in Abschnitt 7.1.1 auf Seite 121 ermitteln.

Magnetische Markierung von Zellen

Eine ausführliche Beschreibung der folgenden Schritte finden Sie in Abschnitt 7.1 “SCHRITT 1: Zellpräparation und magnetische Markierung” auf Seite 121.

▶ Analyse des zellulären Ausgangsmaterials

▶ Transfer des zellulären Ausgangsmaterials in den Cell Preparation Bag

Beträgt das Gewicht des zellulären Ausgangsmaterials mehr als 200 g, aber die Gesamtanzahl der Zellen liegt unter 120×10^9 und die der CD34-positiven Zellen unter $1{,}2\times10^9$, zentrifugieren Sie die Probe, um das Volumen auf maximal 200 g zu reduzieren und fahren danach mit den folgenden Schritten fort.

▶ Verdünnung des zellulären Ausgangsmaterials

Puffer zugeben: Gewicht des Pufferzusatzes = Gewicht des zellulären Ausgangsmaterials × 2

▶ Zentrifugation

Zentrifugieren bei 200×g, ohne Bremse, 15 Minuten, Raumtemperatur (RT: +19 °C bis +25 °C [+66 °F bis +77 °F])

▶ **Volumeneinstellung: Markierungsvolumen 95 g (±5 g) (Anwendung im normalen Maßstab) oder 190 g (±5 g) (Anwendung im großen Maßstab)**

1. Überstand abnehmen, um die Probe nach folgender Gleichung einzustellen: Gewicht des abzunehmenden Überstands = Gewicht des verdünnten Zellprodukts – Markierungsvolumen
2. Das Zellpellet resuspendieren.

▶ **Inkubation mit dem CliniMACS CD34 Reagent**

1. 1 oder 2 Fläschchen CliniMACS CD34 Reagent (siehe Tabelle 6.1) zugeben. Den Inhalt behutsam mischen.
2. Auf dem Taumelschüttler für 30 Minuten bei RT inkubieren (25 rpm).

▶ **Entfernung von überschüssigem Reagenz**

1. Cell Preparation Bag mit Puffer füllen.
2. Zentrifugieren (200×g, ohne Bremse, 15 Minuten, RT).
3. So viel Überstand wie möglich abnehmen. **Hinweis:** Mindestens 500 g Überstand abnehmen. Wenn der abgenommene Überstand weniger als diese Menge ist, werden insgesamt drei Spülschritte (anstelle von nur zwei) empfohlen. Anderenfalls wird eventuell zu wenig ungebundenes Reagenz entfernt.
4. Das Zellpellet resuspendieren.
5. Cell Preparation Bag mit Puffer füllen.
6. Zentrifugieren (200×g, ohne Bremse, 15 Minuten, RT).
7. So viel Überstand wie möglich abnehmen.
8. Das Zellpellet resuspendieren.
9. Das Auftragsvolumen auf 150 g (Anwendung im normalen Maßstab) oder 275 g (Anwendung im großen Maßstab) einstellen.

Hinweis: Nach Entfernung von überschüssigem Reagenz eine Probe zur späteren Analyse entnehmen (optional).

6.1.2 SCHRITT 2: Wahl des Separationsprogramms

▶ **Einschalten des CliniMACS Plus Instruments**

▶ **Wahl des Separationsprogramms CD34 SELECTION 1/2**
(Verwendung von 1 Fläschchen: CD34 SELECTION 1, oder Verwendung von 2 Fläschchen: CD34 SELECTION 2)

Siehe Abschnitt 7.2.2 auf Seite 136.

6.1.3 SCHRITT 3: Installation von CliniMACS Schlauchsets

- **CliniMACS Tubing Set und CliniMACS Tubing Set LS**

Siehe Abschnitt 7.3.1 auf Seite 157.

6.1.4 SCHRITT 4: CliniMACS Plus Separation

- **Separationsverfahren**
- **Trennen der Beutel und Notieren des Prozesscodes**
- **Deinstallieren des Schlauchsets und Abschalten**
- **Analyse der Zellen**

Siehe Abschnitt 7.4.1 auf Seite 193.

6.2 Anreicherung von CD14-positiven Zellen

Das CliniMACS Plus CD14 System mit dem CliniMACS Plus Instrument, CliniMACS CD14 Reagent, CliniMACS Tubing Set und CliniMACS PBS/EDTA Buffer ist zur *In-vitro*-Anreicherung von humanen CD14-positiven Zellen aus heterogenen hämatologischen Zellpopulationen bestimmt.

6.2.1 SCHRITT 1: Zellpräparation und magnetische Markierung

Erste erforderliche Aktionen

Anwendungskapazität

Bis zu 4×10^9 CD14-positive Zellen aus bis zu 20×10^9 Gesamtzellen (WBC)

⚠ VORSICHT

Risiko einer ungenügenden Leistung in Bezug auf die Separation markierter Zellen. Wenn die Anwendungsspezifikationen überschritten werden, besteht das Risiko einer ungenügenden spezifischen Markierung. Verwenden Sie die benötigte Menge an Zellen und Reagenz gemäß der Beschreibung der jeweiligen Anwendung.

Benötigte CliniMACS-Materialien

Material	Artikel-nummer	Menge
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS CD14 Reagent	272-01	1 Fläschchen
CliniMACS Tubing Set	161-01	1 Schlauchset
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	3×1.000-mL-Beutel[1]

1 Siehe Tabelle 6.3 und Tabelle 6.4. Vor Gebrauch den CliniMACS PBS/EDTA Buffer mit HSA auf eine Endkonzentration von 0,5% (w/v) einstellen.

Tabelle 6.2: Benötigte CliniMACS Materialien zur Anreicherung von CD14-positiven Zellen

Weitere erforderliche Materialien

- **Cell Preparation Bag:**
  ein 600-mL-Transferbeutel, geeignet zur Zentrifugation, sowie ein Sampling Site Coupler und ein Plasma-Transferset für das Zellpräparationsverfahren
- **Plasma Waste Bag und Wash Waste Bag:**
  zwei 600-mL-Transferbeutel, geeignet zur Zentrifugation
- **Cell Collection Bag:**
  ein 150-mL- oder ein 600-mL-Transferbeutel in Kombination mit einem Luer/Spike Interconnector zur Verbindung des Cell Collection Bag mit dem Schlauchset (siehe Tabelle 6.4)
- **Wenn der Austausch des Negative Fraction Bag und des Buffer Waste Bag erforderlich ist:**
  zwei 1.000-mL-Transferbeutel in Kombination mit zwei Luer/Spike Interconnectors zur Verbindung der Beutel mit dem Schlauchset (siehe Tabelle 6.4)
- **Wenn mehr als 1 Liter Puffer für die Separation benötigt wird:**
  ein Plasma-Transferset zur Verbindung der Pufferbeutel (siehe Tabelle 6.4)
- ein Vorfilter
- Schlauchklemmen
- geeignete Spritzen (verschiedene Größen) und hypodermische 20-G-Injektionsnadeln

Übersicht der benötigten Materialien

Zellpräparation	
Gesamtzellen (WBC)	≤20×10^9
Markierte Zellen	≤4×10^9
Anzahl an Reagenzfläschchen	1–2
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1.000 mL
Plasma-Transferset	1

Tabelle 6.3: Benötigtes Material für die Zellpräparation von CD14-positiven Zellen

Separation		
Markierte Zellen	≤2×10^9	>2–4×10^9
Negative Fraction Bag	–	Originalbeutel des Schlauchsets durch 1.000-mL-Transferbeutel ersetzen
Buffer Waste Bag	–	
Priming Waste Bag	–	–
Cell Collection Bag	150 mL	600 mL
Luer/Spike Interconnector	1	3
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1.000 mL	2.000 mL
Plasma-Transferset	–	1

Tabelle 6.4: Benötigtes Material zur Anreicherung von CD14-positiven Zellen

▶ Vorbereitung der Beutel

Das Gewicht des leeren Cell Collection Bag und Cell Preparation Bag gemäß der Beschreibung in Abschnitt 7.1.1 auf Seite 121 ermitteln.

Magnetische Markierung von Zellen

Eine ausführliche Beschreibung der folgenden Schritte finden Sie in Abschnitt 7.1 “SCHRITT 1: Zellpräparation und magnetische Markierung” auf Seite 121.

▶ Analyse des zellulären Ausgangsmaterials

▶ Transfer des zellulären Ausgangsmaterials in den Cell Preparation Bag

▶ Verdünnung des zellulären Ausgangsmaterials

Puffer zugeben: Gewicht des Pufferzusatzes = 600 g – Gewicht des zellulären Ausgangsmaterials

▶ Zentrifugation

Zentrifugieren bei 300×g, ohne Bremse, 15 Minuten, Raumtemperatur (RT: +19 °C bis +25 °C [+66 °F bis +77 °F]).

▶ Volumeneinstellung: Markierungsvolumen 50 g (±5 g)

1. Überstand abnehmen, um die Probe nach folgender Gleichung einzustellen: Gewicht des abzunehmenden Überstands = Gewicht des verdünnten zellulären Ausgangsmaterials – Markierungsvolumen
2. Das Zellpellet resuspendieren.

▶ Inkubation mit dem CliniMACS CD14 Reagent

1. 1 Fläschchen CliniMACS CD14 Reagent zugeben. Den Inhalt behutsam mischen.
2. Auf dem Taumelschüttler für 15 Minuten bei RT inkubieren (25 rpm).

- **Entfernung von überschüssigem Reagenz**

  1. Cell Preparation Bag mit Puffer füllen.
  2. Zentrifugieren (300×g, ohne Bremse, 15 Minuten, RT).
  3. So viel Überstand wie möglich abnehmen. **Hinweis:** Mindestens 500 g Überstand abnehmen. Werden weniger als 500 g Überstand abgenommen, werden insgesamt zwei Spülschritte (anstelle von nur einem) empfohlen. Anderenfalls wird eventuell zu wenig ungebundenes Reagenz entfernt.
  4. Das Zellpellet resuspendieren.
  5. Das Auftragsvolumen auf 100 g einstellen.

  Hinweis: Nach Entfernung von überschüssigem Reagenz eine Probe zur späteren Analyse entnehmen (optional).

6.2.2 SCHRITT 2: Wahl des Separationsprogramms

- **Einschalten des CliniMACS Plus Instruments**
- **Wahl des Separationsprogramms ENRICHMENT 1.1**
- **Eingabe der Probenparameter**

Siehe Abschnitt 7.2.3 auf Seite 138.

6.2.3 SCHRITT 3: Installation von CliniMACS Schlauchsets

- **CliniMACS Tubing Set und CliniMACS Tubing Set LS**

Siehe Abschnitt 7.3.1 auf Seite 157.

6.2.4 SCHRITT 4: CliniMACS Plus Separation

- **Separationsverfahren**
- **Trennen der Beutel und Notieren des Prozesscodes**
- **Deinstallieren des Schlauchsets und Abschalten**
- **Analyse der Zellen**

Siehe Abschnitt 7.4.2 auf Seite 197.

6.3 Anreicherung/Depletion mit dem CliniMACS Anti-Biotin Reagent

Das CliniMACS Plus Anti-Biotin System mit dem CliniMACS Plus Instrument, CliniMACS Anti-Biotin Reagent, CliniMACS Tubing Set oder CliniMACS Tubing Set LS und CliniMACS PBS/EDTA Buffer ist zur *In-vitro*-Anreicherung oder Depletion von humanen Zellen, die zuvor mit biotinylierten Antikörpern markiert wurden, bestimmt.

6.3.1 SCHRITT 1: Zellpräparation und magnetische Markierung

Erste erforderliche Aktionen

Anwendungskapazität

- **Anreicherung:** bis zu 40×10^9 Gesamtzellen (WBC)
- **Depletion:**
  Anwendung im normalen Maßstab: bis zu 40×10^9 Gesamtzellen (WBC)
  Anwendung im großen Maßstab: mehr als 40 und bis zu 80×10^9 Gesamtzellen (WBC)

⚠ VORSICHT

Risiko einer ungenügenden Leistung in Bezug auf die Separation markierter Zellen. Wenn die Anwendungsspezifikationen überschritten werden, besteht das Risiko einer ungenügenden spezifischen Markierung. Verwenden Sie die benötigte Menge an Zellen und Reagenz gemäß der Beschreibung der jeweiligen Anwendung.

Benötigte CliniMACS-Materialien

Material	Artikel-nummer	Menge	Separationsprogramm
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1	–
CliniMACS Anti-Biotin Reagent	173-01	• 1 Fläschchen (normaler Maßstab) • 2 Fläschchen (großer Maßstab)	–
CliniMACS Tubing Set	161-01	1 Schlauchset	ENRICHMENT 1.1
CliniMACS Tubing Set LS	162-01	1 Schlauchset	DEPLETION 2.1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	• 3×1.000-mL-Beutel[1] (normaler Maßstab) • 4×1.000-mL-Beutel[1] (großer Maßstab)	–

1 Die Puffermenge variiert je nach gewähltem Separationsprogramm und Anzahl der markierten Zellen (siehe Tabelle 6.6 bis Tabelle 6.9). Vor Gebrauch den CliniMACS PBS/EDTA Buffer mit HSA auf eine Endkonzentration von 0,5% (w/v) einstellen.

Tabelle 6.5: Benötigte CliniMACS Materialien für die Anreicherung/Depletion mit dem CliniMACS Anti-Biotin Reagent

Weitere erforderliche Materialien

- **Cell Preparation Bag:**
  ein 600-mL-Transferbeutel, geeignet zur Zentrifugation, sowie ein Sampling Site Coupler und zwei Plasma-Transfersets für das Zellpräparationsverfahren
- **Plasma Waste Bag und Wash Waste Bag:**
  zwei 600-mL-Transferbeutel, geeignet zur Zentrifugation
- **Cell Collection Bag:**
  ein 600-mL- oder ein 1.000-mL-Transferbeutel in Kombination mit einem Luer/Spike Interconnector zur Verbindung des Cell Collection Bag mit dem Schlauchset (siehe Tabelle 6.7 und Tabelle 6.9)
- **Wenn der Austausch des Negative Fraction Bag, des Buffer Waste Bag und/oder des Priming Waste Bag erforderlich ist:**
  zwei bis drei 1.000-mL-Transferbeutel in Kombination mit zwei Luer/Spike Interconnectors zur Verbindung der Beutel mit dem Schlauchset (siehe Tabelle 6.7 und Tabelle 6.9). Den Priming Waste Bag unter Verwendung des Schweißgeräts für sterile Schläuche austauschen.
- **Wenn mehr als 1 Liter Puffer für die Separation benötigt wird:**
  ein bis zwei Plasma-Transfersets zur Verbindung der Pufferbeutel (siehe Tabelle 6.7 und Tabelle 6.9)
- ein Vorfilter
- Schlauchklemmen
- geeignete Spritzen (verschiedene Größen) und hypodermische 20-G-Injektionsnadeln
- Humanes Serumalbumin (HSA) als Zusatz zum CliniMACS PBS/EDTA Buffer bis zu einer Endkonzentration von 0,5% (w/v)
- Probenröhrchen
- individueller biotinylierter zellspezifischer Antikörper oder Ligand

Übersicht der Materialien

Zellpräparation (ENRICHMENT 1.1)	
Gesamtzellen (WBC)	$\leq 40 \times 10^9$
Anzahl an Reagenzfläschchen	1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	2.000 mL
Plasma-Transferset	2

Tabelle 6.6: Benötigte Materialien für die Zellpräparation (ENRICHMENT 1.1)

Separation (ENRICHMENT 1.1)		
Markierte Zellen	≤2×10^9	>2–5×10^9
Negative Fraction Bag	–	Originalbeutel des Schlauchsets durch 1.000-mL-Transferbeutel ersetzen
Buffer Waste Bag	–	
Priming Waste Bag	–	–
Cell Collection Bag	600 mL	600 mL
Luer/Spike Interconnector	1	3
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1.000 mL	2.000 mL
Plasma-Transferset	–	1

Tabelle 6.7: Benötigte Materialien für die Anreicherung (ENRICHMENT 1.1)

Zellpräparation (DEPLETION 2.1)		
Gesamtzellen (WBC)	≤40×10^9	>40–80×10^9
Anzahl an Reagenzfläschchen	1	2
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	2.000 mL	2.000 mL
Plasma-Transferset	2	2

Tabelle 6.8: Benötigte Materialien für die Zellpräparation (DEPLETION 2.1)

Separation (DEPLETION 2.1)			
Markierte Zellen	<5×10^9	5–13×10^9	>13–20×10^9
Negative Fraction Bag	–	Originalbeutel des Schlauchsets durch 1.000-mL-Transferbeutel ersetzen	Originalbeutel des Schlauchsets durch 1.000-mL-Transferbeutel ersetzen
Buffer Waste Bag	–		
Priming Waste Bag	–	–	
Cell Collection Bag	600 mL	1.000 mL	1.000 mL
Luer/Spike Interconnector	1	3	4
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1.000 mL	2.000 mL	3.000 mL
Plasma-Transferset	–	1	2

Tabelle 6.9: Benötigte Materialien für die Depletion (DEPLETION 2.1)

▶ Vorbereitung der Beutel

Das Gewicht des leeren Cell Collection Bag und Cell Preparation Bag gemäß der Beschreibung in Abschnitt 7.1.1 auf Seite 121 ermitteln.

Magnetische Markierung von Zellen

Eine ausführliche Beschreibung der folgenden Schritte finden Sie in Abschnitt 7.1 “SCHRITT 1: Zellpräparation und magnetische Markierung” auf Seite 121.

▶ Analyse des zellulären Ausgangsmaterials

▶ Transfer des zellulären Ausgangsmaterials in den Cell Preparation Bag

Verdünnung des zellulären Ausgangsmaterials

Puffer zugeben: Gewicht des Pufferzusatzes = Gewicht des zellulären Ausgangsmaterials × 2

Zentrifugation

1. Zentrifugieren bei 300×g, ohne Bremse, 15 Minuten, Raumtemperatur (RT: +19 °C bis +25 °C [+66 °F bis +77 °F]).
2. Überstand abnehmen, um das Volumen für die primäre Antikörpermarkierung gemäß den Empfehlungen des Herstellers des primären Antikörpers einzustellen.
3. Das Zellpellet resuspendieren.

Markierung der Zellen: Inkubation mit dem primären Antikörper

Folgen Sie der Gebrauchsanweisung des Herstellers des primären Antikörpers.

Entfernung von überschüssigem Konjugat (1. Spülen)

1. Puffer zugeben: Gewicht des Pufferzusatzes = 600 g – Gewicht des Zellprodukts
2. Zentrifugieren bei 300×g, ohne Bremse, 15 Minuten, Raumtemperatur (RT: +19 °C bis +25 °C)

Volumeneinstellung: Markierungsvolumen 95 g (±5 g) (Anwendung im normalen Maßstab) oder 190 g (±5 g) (Anwendung im großen Maßstab)

1. Überstand abnehmen, um die Probe nach folgender Gleichung einzustellen: Gewicht des abzunehmenden Überstands = Gewicht des verdünnten Zellprodukts – Markierungsvolumen
   Hinweis: Mindestens 500 g Überstand abnehmen. Werden weniger als 500 g Überstand abgenommen, werden insgesamt zwei Spülschritte (anstelle von nur einem) empfohlen. Anderenfalls wird eventuell zu wenig ungebundenes Reagenz entfernt.
2. Das Zellpellet resuspendieren.

Magnetische Markierung der Zellen: Inkubation mit dem CliniMACS Anti-Biotin Reagent

1. 1 oder 2 Fläschchen CliniMACS Anti-Biotin Reagent (siehe Tabelle 6.6 und Tabelle 6.8) zugeben. Den Inhalt behutsam mischen.
2. Auf dem Taumelschüttler für 30 Minuten bei RT inkubieren (25 rpm).

- **Entfernung von überschüssigem Reagenz (2. Spülen)**

  1. Cell Preparation Bag mit Puffer füllen.
  2. Zentrifugieren (300×g, ohne Bremse, 15 Minuten, RT).
  3. So viel Überstand wie möglich abnehmen. **Hinweis:** Mindestens 500 g Überstand abnehmen. Wenn der abgenommene Überstand weniger als die oben angegebene Menge ist, werden insgesamt zwei Spülschritte (anstelle von nur einem) empfohlen. Anderenfalls wird eventuell zu wenig ungebundenes Reagenz entfernt.
  4. Das Zellpellet resuspendieren.
  5. Das Auftragsvolumen auf 100 g (Anwendung im normalen Maßstab) oder 200 g (Anwendung im großen Maßstab) einstellen.

  Hinweis: Nach Entfernung von überschüssigem Reagenz eine Probe zur späteren Analyse entnehmen (optional).

6.3.2 SCHRITT 2: Wahl des Separationsprogramms

- **Einschalten des CliniMACS Plus Instruments**
- **Wahl des Separationsprogramms ENRICHMENT 1.1 oder DEPLETION 2.1**
- **Eingabe der Probenparameter**

Siehe Abschnitt 7.2.3 auf Seite 138 oder 7.2.5 auf Seite 145.

6.3.3 SCHRITT 3: Installation von CliniMACS Schlauchsets

- **CliniMACS Tubing Set und CliniMACS Tubing Set LS**

Siehe Abschnitt 7.3.1 auf Seite 157.

6.3.4 SCHRITT 4: CliniMACS Plus Separation

- **Separationsverfahren**
- **Trennen der Beutel und Notieren des Prozesscodes**
- **Deinstallieren des Schlauchsets und Abschalten**
- **Analyse der Zellen**

Siehe Abschnitt 7.4.2 auf Seite 197 und 7.4.4 auf Seite 206.

6.4 Anreicherung von CD56-positiven Zellen

Das CliniMACS Plus CD56 System mit dem CliniMACS Plus Instrument, CliniMACS CD56 Reagent, CliniMACS Tubing Set und CliniMACS PBS/EDTA Buffer ist zur *In-vitro*-Anreicherung von humanen CD56-positiven Zellen aus heterogenen hämatologischen Zellpopulationen bestimmt.

6.4.1 SCHRITT 1: Zellpräparation und magnetische Markierung

Erste erforderliche Aktionen

Anwendungskapazität

Bis zu 5×10^9 CD56-positive Zellen aus bis zu 40×10^9 Gesamtzellen (WBC)

⚠ VORSICHT

Risiko einer ungenügenden Leistung in Bezug auf die Separation markierter Zellen. Wenn die Anwendungsspezifikationen überschritten werden, besteht das Risiko einer ungenügenden spezifischen Markierung. Verwenden Sie die benötigte Menge an Zellen und Reagenz gemäß der Beschreibung der jeweiligen Anwendung.

Benötigte CliniMACS-Materialien

Material	Artikel-nummer	Menge
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS CD56 Reagent	271-01	1 Fläschchen
CliniMACS Tubing Set	161-01	1 Schlauchset
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	3×1.000-mL-Beutel[1]

1 Siehe Tabelle 6.11 und Tabelle 6.12. Vor Gebrauch den CliniMACS PBS/EDTA Buffer mit HSA auf eine Endkonzentration von 0,5% (w/v) einstellen.

Tabelle 6.10: Benötigte CliniMACS Materialien zur Anreicherung von CD56-positiven Zellen

Weitere erforderliche Materialien

- **Cell Preparation Bag:**
  ein 600-mL-Transferbeutel, geeignet zur Zentrifugation, sowie ein Sampling Site Coupler und ein Plasma-Transferset für das Zellpräparationsverfahren
- **Plasma Waste Bag und Wash Waste Bag:**
  zwei 600-mL-Transferbeutel, geeignet zur Zentrifugation
- **Cell Collection Bag:**
  ein 150-mL- oder 600-mL-Transferbeutel in Kombination mit einem Luer/Spike Interconnector zur Verbindung des Cell Collection Bag mit dem Schlauchset (siehe Tabelle 6.12)

- **Wenn der Austausch des Negative Fraction Bag und des Buffer Waste Bag erforderlich ist:**
  zwei 1.000-mL-Transferbeutel in Kombination mit zwei Luer/Spike Interconnectors zur Verbindung der Beutel mit dem Schlauchset (siehe Tabelle 6.12)
- **Wenn mehr als 1 Liter Puffer für die Separation benötigt wird:**
  Ein Plasma-Transferset zur Verbindung der Pufferbeutel (siehe Tabelle 6.12)
- ein Vorfilter
- Schlauchklemmen
- Spritzen (verschiedene Größen) und hypodermische 20-G-Injektionsnadeln
- Humanes Serumalbumin (HSA) als Zusatz zum CliniMACS PBS/EDTA Buffer bis zu einer Endkonzentration von 0,5% (w/v)
- Probenröhrchen

Übersicht der benötigten Materialien

Zellpräparation	
Gesamtzellen (WBC)	≤40×10^9
Anzahl an Reagenzfläschchen	1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1.000 mL
Plasma-Transferset	1

Tabelle 6.11: Benötigte Materialien für die Zellpräparation von CD56-positiven Zellen

Separation		
Markierte Zellen	≤2×10^9	>2–5×10^9
Negative Fraction Bag	–	Originalbeutel des Schlauchsets durch 1.000-mL-Transferbeutel ersetzen
Buffer Waste Bag	–	
Priming Waste Bag	–	–
Cell Collection Bag	150 mL	600 mL
Luer/Spike Interconnector	1	3
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1.000 mL	2.000 mL
Plasma-Transferset	–	1

Tabelle 6.12: Benötigte Materialien zur Anreicherung von CD56-positiven Zellen

▶ Vorbereitung der Beutel

Das Gewicht des leeren Cell Collection Bag und Cell Preparation Bag gemäß der Beschreibung in Abschnitt 7.1.1 auf Seite 121 ermitteln.

Magnetische Markierung von Zellen

Eine ausführliche Beschreibung der folgenden Schritte finden Sie in Abschnitt 7.1 “SCHRITT 1: Zellpräparation und magnetische Markierung” auf Seite 121.

▶ Analyse des zellulären Ausgangsmaterials

▶ Transfer des zellulären Ausgangsmaterials in den Cell Preparation Bag

▶ Verdünnung des zellulären Ausgangsmaterials

Puffer zugeben: Gewicht des Pufferzusatzes = 600 g – Gewicht des zellulären Ausgangsmaterials

▶ Zentrifugation

Zentrifugieren bei 200×g, ohne Bremse, 15 Minuten, Raumtemperatur (RT: +19 °C bis +25 °C [+66 °F bis +77 °F]).

▶ Volumeneinstellung: Markierungsvolumen 95 g (±5 g)

1. Überstand vollständig abnehmen, wobei darauf zu achten ist, dass das Zellpellet nicht resuspendiert wird.
2. Das Zellpellet nach Entfernung des Überstands vorsichtig resuspendieren.
3. Das Gewicht des Cell Preparation Bag (CPB) durch Zugabe von Puffer nach folgender Gleichung einstellen: Zielgewicht des gefüllten CPB = 95 g + Gewicht des leeren CPB
4. Die Zellen resuspendieren.

▶ Inkubation mit dem CliniMACS CD56 Reagent

1. 1 Fläschchen CliniMACS CD56 Reagent zugeben. Den Inhalt behutsam mischen.
2. Auf dem Taumelschüttler für 30 Minuten bei RT inkubieren (25 rpm).

▶ Entfernung von überschüssigem Reagenz

1. Cell Preparation Bag mit Puffer füllen.
2. Zentrifugieren (300×g, ohne Bremse, 15 Minuten, RT).
3. So viel Überstand wie möglich abnehmen. **Hinweis:** Mindestens 500 g Überstand abnehmen. Werden weniger als 500 g Überstand abgenommen, werden insgesamt zwei Spülschritte (anstelle von nur einem) empfohlen. Anderenfalls wird eventuell zu wenig ungebundenes Reagenz entfernt.
4. Das Zellpellet nach Entfernung des Überstands vorsichtig resuspendieren.
5. Das Auftragsvolumen auf 150 g einstellen.

Hinweis: Nach Entfernung von überschüssigem Reagenz eine Probe zur späteren Analyse entnehmen (optional).

6.4.2 SCHRITT 2: Wahl des Separationsprogramms

- **Einschalten des CliniMACS Plus Instruments**
- **Wahl des Separationsprogramms ENRICHMENT 1.1**
- **Eingabe der Probenparameter**

Siehe Abschnitt 7.2.3 auf Seite 138.

6.4.3 SCHRITT 3: Installation von CliniMACS Schlauchsets

- **CliniMACS Tubing Set und CliniMACS Tubing Set LS**

Siehe Abschnitt 7.3.1 auf Seite 157.

6.4.4 SCHRITT 4: CliniMACS Plus Separation

- **Separationsverfahren**
- **Trennen der Beutel und Notieren des Prozesscodes**
- **Deinstallieren des Schlauchsets und Abschalten**
- **Analyse der Zellen**

Siehe Abschnitt 7.4.2 auf Seite 197.

6.5 Depletion von CD3-positiven Zellen

Das CliniMACS Plus CD3 System mit dem CliniMACS Plus Instrument, CliniMACS CD3 Reagent, CliniMACS Tubing Set LS oder CliniMACS Depletion Tubing Set und CliniMACS PBS/EDTA Buffer ist zur *In-vitro*-Depletion von humanen CD3-positiven Zellen aus heterogenen hämatologischen Zellpopulationen bestimmt.

6.5.1 SCHRITT 1: Zellpräparation und magnetische Markierung

Erste erforderliche Aktionen

Anwendungskapazität

- Anwendung im normalen Maßstab: bis zu 15×10^9 CD3-positive Zellen aus bis zu 40×10^9 Gesamtzellen (WBC) unter Verwendung des CliniMACS Tubing Set LS oder des CliniMACS Depletion Tubing Set
- Anwendung im großen Maßstab: mehr als 15×10^9 und bis zu 20×10^9 CD3-positive Zellen aus mehr als 40×10^9 und bis zu 80×10^9 Gesamtzellen (WBC) unter Verwendung des CliniMACS Tubing Set LS oder mehr als 15×10^9 und bis zu 30×10^9 CD3-positive Zellen aus mehr als 40×10^9 und bis zu 80×10^9 Gesamtzellen (WBC) unter Verwendung des CliniMACS Depletion Tubing Set

⚠ VORSICHT

Risiko einer ungenügenden Leistung in Bezug auf die Separation markierter Zellen. Wenn die Anwendungsspezifikationen überschritten werden, besteht das Risiko einer ungenügenden spezifischen Markierung. Verwenden Sie die benötigte Menge an Zellen und Reagenz gemäß der Beschreibung der jeweiligen Anwendung.

Benötigte CliniMACS-Materialien

Material	Artikel-nummer	Menge	Separationsprogramm
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1	
CliniMACS CD3 Reagent	273-01	• 1 Fläschchen (normaler Maßstab) • 2 Fläschchen (großer Maßstab)	
CliniMACS Tubing Set LS	162-01	1 Schlauchset	DEPLETION 2.1
CliniMACS Depletion Tubing Set	261-01	1 Schlauchset	DEPLETION 3.1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	Bis zu 5×1.000-mL-Beutel[1]	

1 Siehe Tabelle 6.14 bis Tabelle 6.16. Vor Gebrauch den CliniMACS PBS/EDTA Buffer mit HSA auf eine Endkonzentration von 0,5% (w/v) einstellen.

2 **Anmerkung:** Für hohe Zahlen von markierten Zellen wird empfohlen, ein CliniMACS Depletion Tubing Set zu verwenden, um Verarbeitungszeit einzusparen (Beispiel: 20×10^9 markierte Zellen werden mit dem CliniMACS Tubing Set LS innerhalb von fünf Stunden verarbeitet, verglichen mit zwei Stunden bei Verwendung eines CliniMACS Depletion Tubing Set).

Tabelle 6.13: Benötigte CliniMACS Materialien zur Depletion von CD3-positiven Zellen

Weitere erforderliche Materialien

- **Cell Preparation Bag:**
  ein 600-mL-Transferbeutel, geeignet zur Zentrifugation, sowie ein Sampling Site Coupler und zwei Plasma-Transfersets für das Zellpräparationsverfahren
- **Plasma Waste Bag und Wash Waste Bag:**
  zwei 600-mL-Transferbeutel, geeignet zur Zentrifugation
- **Cell Collection Bag:**
  ein bis zwei 600-mL-Transferbeutel in Kombination mit einem Luer/Spike Interconnector zur Verbindung des Cell Collection Bag mit dem Schlauchset

  Wenn zwei Cell Collection Bags für die Separation benötigt werden, ein Plasma-Transferset zur Verbindung beider Beutel verwenden. Ein 600-mL-Transferbeutel ist bereits am CliniMACS Depletion Tubing Set angebracht (siehe Tabelle 6.15 und Tabelle 6.16).
- **Wenn der Austausch des Negative Fraction Bag, des Buffer Waste Bag und/oder des Priming Waste Bag erforderlich ist:**
  zwei bis drei 1.000-mL-Transferbeutel in Kombination mit zwei Luer/Spike Interconnectors zur Verbindung der Beutel mit dem Schlauchset (sieheTabelle 6.15 und Tabelle 6.16)

  Den Priming Waste Bag unter Verwendung des Schweißgeräts für sterile Schläuche austauschen.
- **Wenn mehr als 1 Liter Puffer für die Separation benötigt wird:**
  ein bis zwei Plasma-Transfersets zur Verbindung der Pufferbeutel (siehe Tabelle 6.15 und Tabelle 6.16)
- ein Vorfilter
- Schlauchklemmen
- Spritzen (verschiedene Größen) und hypodermische 20-G-Injektionsnadeln
- Humanes Serumalbumin (HSA) als Zusatz zum CliniMACS PBS/EDTA Buffer bis zu einer Endkonzentration von 0,5% (w/v)
- Immunglobulin G in klinischer Qualität
- Probenröhrchen

WICHTIG

Nach Eingabe der Probenparameter (SCHRITT 2) berechnet die CliniMACS Plus Software die Volumina, die im Reapplication Bag, Cell Collection Bag, Non-Target Cell Bag und Buffer Waste Bag gesammelt werden. Wenn das Volumen der berechneten Flüssigkeit das Standardvolumen von 500 mL überschreitet, ist ein Austausch der Beutel erforderlich.

Übersicht der benötigten Materialien

Zellpräparation		
Gesamtzellen (WBC)	≤40×10^9	>40–80×10^9
Markierte Zellen	≤15×10^9	>15–30×10^9
Anzahl an Reagenzfläschchen	1	2
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	2.000 mL	2.000 mL
Plasma-Transferset	2	2
Auftragsvolumen	150 mL	250–300 mL

Tabelle 6.14: Benötigte Materialien für die Zellpräparation von CD3-positiven Zellen

Separation (DEPLETION 2.1)			
Markierte Zellen	≤5×10^9	>5–13×10^9	>13–20×10^9
Negative Fraction Bag	–	Originalbeutel des Schlauchsets durch 1.000-mL-Transferbeutel ersetzen	Originalbeutel des Schlauchsets durch 1.000-mL-Transferbeutel ersetzen
Buffer Waste Bag	–		
Priming Waste Bag	–	–	
Cell Collection Bag	600 mL	1–2×600 mL	2×600 mL
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1.000 mL	2.000 mL	3.000 mL
Luer/Spike Interconnector	1	3	3
Plasma-Transferset	–	1–2	3

Tabelle 6.15: Benötigte Materialien zur Depletion von CD3-positiven Zellen (DEPLETION 2.1)

Separation (DEPLETION 3.1)		
Markierte Zellen	≤29×10^9	>29–30×10^9
Non-Target Cell Bag	Kein Beutelaustausch erforderlich	
Buffer Waste Bag		
Reapplication Bag		
Cell Collection Bag	–	1×600 mL (zusätzlich)
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1.000 mL	
Plasma-Transferset	–	1

Tabelle 6.16: Benötigte Materialien zur Depletion von CD3-positiven Zellen (DEPLETION 3.1)

Hinweis: Die für die Separation benötigten Materialien können auch ermittelt werden, indem das CliniMACS Plus Instrument eingeschaltet, das gewünschte Separationsprogramm (DEPLETION 2.1 für das CliniMACS Tubing Set LS und DEPLETION 3.1 für das CliniMACS Depletion Tubing Set) gewählt wird und die Probenparameter eingegeben werden. Die CliniMACS Plus Software berechnet die benötigten Größen der Beutel, die mit dem Schlauchset zu verbinden sind, und das benötigte Puffergewicht.

▶ Vorbereitung der Beutel

Das Gewicht des leeren Cell Collection Bag und Cell Preparation Bag gemäß der Beschreibung in Abschnitt 7.1.1 auf Seite 121 ermitteln.

Magnetische Markierung von Zellen

Eine ausführliche Beschreibung der folgenden Schritte finden Sie in Abschnitt 7.1 “SCHRITT 1: Zellpräparation und magnetische Markierung” auf Seite 121.

▶ Analyse des zellulären Ausgangsmaterials

Die Anzahl aller CD3-markierten Zellen (einschließlich der unspezifischen CD3-Bindung, nicht nur echte T-Zellen) bestimmen. Diese Anzahl für die Anwendungsspezifikationen und bei der Eingabe der Probenparameter (siehe SCHRITT 2) berücksichtigen.

▶ Transfer des zellulären Ausgangsmaterials in den Cell Preparation Bag

▶ Verdünnung des zellulären Ausgangsmaterials

Puffer zugeben: Gewicht des Pufferzusatzes = 600 g – Gewicht des zellulären Ausgangsmaterials

▶ Zentrifugation

Zentrifugieren bei 200×g, ohne Bremse, 15 Minuten, Raumtemperatur (RT: +19 °C bis +25 °C [+66 °F bis +77 °F]).

▶ Volumeneinstellung: Markierungsvolumen 95 g (±5 g) (Anwendung im normalen Maßstab) oder 190 g (±5 g) (Anwendung im großen Maßstab)

1. Überstand vollständig abnehmen, wobei darauf zu achten ist, dass das Zellpellet nicht resuspendiert wird.
2. Das Zellpellet nach Entfernung des Überstands vorsichtig resuspendieren.
3. Das Gewicht des Cell Preparation Bag (CPB) durch Zugabe von Puffer nach folgender Gleichung (IgG-Gewicht berücksichtigen) einstellen: Zielgewicht des gefüllten CPB = Markierungsvolumen – IgG-Gewicht + Gewicht des leeren CPB
4. Das Zellpellet resuspendieren.

▶ Inkubation mit Immunglobulin in klinischer Qualität

1. IgG zugeben (1,5 mg/mL).
2. Auf dem Taumelschüttler für 5 Minuten bei RT inkubieren (25 rpm).

▶ Inkubation mit dem CliniMACS CD3 Reagent

1. 1 oder 2 Fläschchen CliniMACS CD3 Reagent (siehe Tabelle 6.14) zugeben. Den Inhalt behutsam mischen.
2. Auf dem Taumelschüttler für 30 Minuten bei RT inkubieren (25 rpm).

- **Entfernung von überschüssigem Reagenz**

1. Cell Preparation Bag mit Puffer füllen.
2. Zentrifugieren (300×g, ohne Bremse, 15 Minuten, RT).
3. So viel Überstand wie möglich abnehmen. **Hinweis:** Mindestens 500 g Überstand abnehmen. Werden weniger als 500 g Überstand abgenommen, werden insgesamt zwei Spülschritte (anstelle von nur einem) empfohlen. Anderenfalls wird eventuell zu wenig ungebundenes Reagenz entfernt.
4. Das Zellpellet resuspendieren.
5. Das Auftragsvolumen auf 150 g (Anwendung im normalen Maßstab) oder 250–300 g (Anwendung im großen Maßstab) einstellen.

6.5.2 SCHRITT 2: Wahl des Separationsprogramms

- **Einschalten des CliniMACS Plus Instruments**

- **Wahl des Separationsprogramms DEPLETION 2.1 oder DEPLETION 3.1**
  (bei Einsatz des CliniMACS Tubing Set LS bzw. des CliniMACS Depletion Tubing Set)

- **Eingabe der Probenparameter**
  (entsprechend der Analyse des zellulären Ausgangsmaterials (siehe SCHRITT 1))

Siehe Abschnitt 7.2.5 auf Seite 145 oder 7.2.6 auf Seite 151.

6.5.3 SCHRITT 3: Installation von CliniMACS Schlauchsets

- **CliniMACS Tubing Set und CliniMACS Tubing Set LS**

oder

- **CliniMACS Depletion Tubing Set**

Siehe Abschnitt 7.3.1 auf Seite 157 oder 7.3.3 auf Seite 178.

6.5.4 SCHRITT 4: CliniMACS Plus Separation

- **Separationsverfahren**

- **Trennen der Beutel und Notieren des Prozesscodes**

- **Deinstallieren des Schlauchsets und Abschalten**

- **Analyse der Zellen**

Siehe Abschnitt 7.4.4 auf Seite 206 oder 7.4.5 auf Seite 210.

6.6 Depletion von CD19-positiven Zellen

Das CliniMACS Plus CD19 System mit dem CliniMACS Plus Instrument, CliniMACS CD19 Reagent, CliniMACS Tubing Set LS und CliniMACS PBS/EDTA Buffer ist zur *In-vitro*-Depletion von humanen CD19-positiven Zellen aus heterogenen hämatologischen Zellpopulationen bestimmt.

6.6.1 SCHRITT 1: Zellpräparation und magnetische Markierung

Erste erforderliche Aktionen

Anwendungskapazität

Bis zu 5×10^9 CD19-positive Zellen aus bis zu 40×10^9 Gesamtzellen (WBC)

⚠ VORSICHT

Risiko einer ungenügenden Leistung in Bezug auf die Separation markierter Zellen. Wenn die Anwendungsspezifikationen überschritten werden, besteht das Risiko einer ungenügenden spezifischen Markierung. Verwenden Sie die benötigte Menge an Zellen und Reagenz gemäß der Beschreibung der jeweiligen Anwendung.

Benötigte CliniMACS-Materialien

Material	Artikel-nummer	Menge
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS CD19 Reagent	179-01	1 Fläschchen
CliniMACS Tubing Set LS	162-01	1 Schlauchset
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	2×1.000-mL-Beutel[1]

1 Vor Gebrauch den CliniMACS PBS/EDTA Buffer mit HSA auf eine Endkonzentration von 0,5% (w/v) einstellen.

Tabelle 6.17: Benötigte CliniMACS Materialien zur Depletion von CD19-positiven Zellen

Weitere erforderliche Materialien

- **Cell Preparation Bag:**
  ein 600-mL-Transferbeutel, geeignet zur Zentrifugation, sowie ein Sampling Site Coupler und ein Plasma-Transferset für das Zellpräparationsverfahren
- **Plasma Waste Bag und Wash Waste Bag:**
  zwei 600-mL-Transferbeutel, geeignet zur Zentrifugation
- **Cell Collection Bag:**
  ein 600-mL-Transferbeutel in Kombination mit einem Luer/Spike Interconnector zur Verbindung des Cell Collection Bag mit dem Schlauchset
- ein Vorfilter

- Schlauchklemmen
- Spritzen (verschiedene Größen) und hypodermische 20-G-Injektionsnadeln
- Humanes Serumalbumin (HSA) als Zusatz zum CliniMACS PBS/EDTA Buffer bis zu einer Endkonzentration von 0,5% (w/v)
- Probenröhrchen

▶ Vorbereitung der Beutel

Das Gewicht des leeren Cell Collection Bag und Cell Preparation Bag gemäß der Beschreibung in Abschnitt 7.1.1 auf Seite 121 ermitteln.

Magnetische Markierung von Zellen

Eine ausführliche Beschreibung der folgenden Schritte finden Sie in Abschnitt 7.1 “SCHRITT 1: Zellpräparation und magnetische Markierung” auf Seite 121.

▶ Analyse des zellulären Ausgangsmaterials

▶ Transfer des zellulären Ausgangsmaterials in den Cell Preparation Bag

▶ Verdünnung des zellulären Ausgangsmaterials

Puffer zugeben: Gewicht des Pufferzusatzes = 600 g – Gewicht des zellulären Ausgangsmaterials

▶ Zentrifugation

Zentrifugieren bei 200×g, ohne Bremse, 15 Minuten, Raumtemperatur (RT: +19 °C bis +25 °C [+66 °F bis +77 °F]).

▶ Volumeneinstellung: Markierungsvolumen 95 g (±5 g)

1. Überstand vollständig abnehmen, wobei darauf zu achten ist, dass das Zellpellet nicht resuspendiert wird.
2. Das Zellpellet nach Entfernung des Überstands vorsichtig resuspendieren.
3. Das Gewicht des Cell Preparation Bag (CPB) durch Zugabe von Puffer nach folgender Gleichung einstellen: Zielgewicht des gefüllten CPB = 95 g + Gewicht des leeren CPB
4. Das Zellpellet resuspendieren.

▶ Inkubation mit dem CliniMACS CD19 Reagent

1. 1 Fläschchen CliniMACS CD19 Reagent zugeben. Den Inhalt behutsam mischen.
2. Auf dem Taumelschüttler für 30 Minuten bei RT inkubieren (25 rpm).

- **Entfernung von überschüssigem Reagenz**

1. Cell Preparation Bag mit Puffer füllen.
2. Zentrifugieren (300×g, ohne Bremse, 15 Minuten, RT).
3. So viel Überstand wie möglich abnehmen. **Hinweis:** Mindestens 500 g Überstand abnehmen. Werden weniger als 500 g Überstand abgenommen, werden insgesamt zwei Spülschritte (anstelle von nur einem) empfohlen. Anderenfalls wird eventuell zu wenig ungebundenes Reagenz entfernt.
4. Das Zellpellet resuspendieren.
5. Das Auftragsvolumen auf 100 g einstellen.

6.6.2 SCHRITT 2: Wahl des Separationsprogramms

- **Einschalten des CliniMACS Plus Instruments**
- **Wahl des Separationsprogramms DEPLETION 2.1**
- **Eingabe der Probenparameter**

Siehe Abschnitt 7.2.5 auf Seite 145.

6.6.3 SCHRITT 3: Installation von CliniMACS Schlauchsets

- **CliniMACS Tubing Set und CliniMACS Tubing Set LS**

Siehe Abschnitt 7.3.1 auf Seite 157.

6.6.4 SCHRITT 4: CliniMACS Plus Separation

- **Separationsverfahren**
- **Trennen der Beutel und Notieren des Prozesscodes**
- **Deinstallieren des Schlauchsets und Abschalten**
- **Analyse der Zellen**

Siehe Abschnitt 7.4.4 auf Seite 206.

6.7 Depletion von CD3-positiven Zellen und CD19-positiven Zellen

Das CliniMACS Plus CD3/CD19 System mit dem CliniMACS Plus Instrument, CliniMACS CD3 Reagent, CliniMACS CD19 Reagent, CliniMACS Depletion Tubing Set und CliniMACS PBS/EDTA Buffer ist zur simultanen *In-vitro*-Depletion von humanen CD3-positiven Zellen und humanen CD19-positiven Zellen aus heterogenen hämatologischen Zellpopulationen bestimmt.

6.7.1 SCHRITT 1: Zellpräparation und magnetische Markierung

Erste erforderliche Aktionen

Anwendungskapazität

Bis zu 15×10^9 CD3-positive Zellen und bis zu 5×10^9 CD19-positive Zellen aus bis zu 40×10^9 Gesamtzellen (WBC)

⚠ VORSICHT

Risiko einer ungenügenden Leistung in Bezug auf die Separation markierter Zellen. Wenn die Anwendungsspezifikationen überschritten werden, besteht das Risiko einer ungenügenden spezifischen Markierung. Verwenden Sie die benötigte Menge an Zellen und Reagenz gemäß der Beschreibung der jeweiligen Anwendung.

Benötigte CliniMACS-Materialien

Material	Artikel-nummer	Menge
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS CD3 Reagent	273-01	1 Fläschchen
CliniMACS CD19 Reagent	179-01	1 Fläschchen
CliniMACS Depletion Tubing Set	261-01	1 Schlauchset
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	4×1.000-mL-Beutel[1]

1 Vor Gebrauch den CliniMACS PBS/EDTA Buffer mit HSA auf eine Endkonzentration von 0,5% (w/v) einstellen.

Tabelle 6.18: Benötigte CliniMACS Materialien für die Depletion von CD3-positiven Zellen und CD19-positiven Zellen

Weitere benötigte Materialien

- **Cell Preparation Bag:**
  ein 600-mL-Transferbeutel, geeignet zur Zentrifugation, sowie ein Sampling Site Coupler und zwei Plasma-Transfersets für das Zellpräparationsverfahren
- **Plasma Waste Bag und Wash Waste Bag:**
  zwei 600-mL-Transferbeutel, geeignet zur Zentrifugation
- **Cell Collection Bag:**
  ein 600-mL-Transferbeutel in Kombination mit einem Luer/Spike Interconnector zur Verbindung des Cell Collection Bag mit dem Schlauchset
- ein Vorfilter
- Schlauchklemmen
- Spritzen (verschiedene Größen) und hypodermische 20-G-Injektionsnadeln
- Humanes Serumalbumin (HSA) als Zusatz zum CliniMACS PBS/EDTA Buffer bis zu einer Endkonzentration von 0,5% (w/v)
- Immunglobulin G in klinischer Qualität
- Probenröhrchen

WICHTIG

Nach Eingabe der Probenparameter (SCHRITT 2) berechnet die CliniMACS Plus Software die Volumina, die im Reapplication Bag, Cell Collection Bag, Non-Target Cell Bag und Buffer Waste Bag gesammelt werden. Wenn das Volumen der berechneten Flüssigkeit das Standardvolumen von 500 mL überschreitet, ist ein Austausch der Beutel erforderlich.

▶ Vorbereitung der Beutel

Das Gewicht des leeren Cell Collection Bag und Cell Preparation Bag gemäß der Beschreibung in Abschnitt 7.1.1 auf Seite 121 ermitteln.

Magnetische Markierung von Zellen

Eine ausführliche Beschreibung der folgenden Schritte finden Sie in Abschnitt 7.1 “SCHRITT 1: Zellpräparation und magnetische Markierung” auf Seite 121.

▶ Analyse des zellulären Ausgangsmaterials

Die Anzahl aller CD3- und CD19-markierten Zellen (einschließlich der unspezifischen CD3- und CD19-Bindung, nicht nur echte T- und B-Zellen) bestimmen. Diese Anzahl für die Anwendungsspezifikationen und bei der Eingabe der Probenparameter (siehe SCHRITT 2) berücksichtigen.

▶ Transfer des zellulären Ausgangsmaterials in den Cell Preparation Bag

Verdünnung des zellulären Ausgangsmaterials

Puffer zugeben: Gewicht des Pufferzusatzes = 600 g – Gewicht des zellulären Ausgangsmaterials

Zentrifugation

Zentrifugieren bei 200×g, ohne Bremse, 15 Minuten, Raumtemperatur (RT: +19 °C bis +25 °C [+66 °F bis +77 °F]).

Volumeneinstellung: Markierungsvolumen 87,5 g (±5 g)

1. Überstand vollständig abnehmen, wobei darauf zu achten ist, dass das Zellpellet nicht resuspendiert wird.
2. Das Zellpellet nach Entfernung des Überstands vorsichtig resuspendieren.
3. Das Gewicht des Cell Preparation Bag (CPB) durch Zugabe von Puffer nach folgender Gleichung (IgG-Gewicht berücksichtigen) einstellen: Zielgewicht des gefüllten CPB = 87,5 g – IgG-Gewicht + Gewicht des leeren CPB
4. Das Zellpellet resuspendieren.

Inkubation mit Immunglobulin in klinischer Qualität

1. IgG zugeben (1,5 mg/mL).
2. Auf dem Taumelschüttler für 5 Minuten bei RT inkubieren (25 rpm).

Inkubation mit dem CliniMACS CD3 Reagent und dem CliniMACS CD19 Reagent

1. 1 Fläschchen CliniMACS CD3 Reagent und 1 Fläschchen CliniMACS CD19 Reagent zugeben. Den Inhalt behutsam mischen.
2. Auf dem Taumelschüttler für 30 Minuten bei RT inkubieren (25 rpm).

Entfernung von überschüssigem Reagenz

1. Cell Preparation Bag mit Puffer füllen.
2. Zentrifugieren (300×g, ohne Bremse, 15 Minuten, RT).
3. So viel Überstand wie möglich abnehmen. **Hinweis:** Mindestens 500 g Überstand abnehmen. Werden weniger als 500 g Überstand abgenommen, werden insgesamt zwei Spülschritte (anstelle von nur einem) empfohlen. Anderenfalls wird eventuell zu wenig ungebundenes Reagenz entfernt.
4. Das Zellpellet resuspendieren.
5. Das Auftragsvolumen auf 150 g einstellen.

6.7.2 SCHRITT 2: Wahl des Separationsprogramms

- **Einschalten des CliniMACS Plus Instruments**
- **Wahl des Separationsprogramms DEPLETION 3.1**
- **Eingabe der Probenparameter**
  (entsprechend der Analyse des zellulären Ausgangsmaterials (siehe SCHRITT 1))

Siehe Abschnitt 7.2.6 auf Seite 151.

6.7.3 SCHRITT 3: Installation von CliniMACS Schlauchsets

- **CliniMACS Depletion Tubing Set**

Siehe Abschnitt 7.3.3 auf Seite 178.

6.7.4 SCHRITT 4: CliniMACS Plus Separation

- **Separationsverfahren**
- **Trennen der Beutel und Notieren des Prozesscodes**
- **Deinstallieren des Schlauchsets und Abschalten**
- **Analyse der Zellen**

Siehe Abschnitt 7.4.5 auf Seite 210.

6.8 Anreicherung/Depletion von CD8-positiven Zellen

Das CliniMACS Plus CD8 System mit dem CliniMACS Plus Instrument, CliniMACS CD8 Reagent, CliniMACS Tubing Set oder CliniMACS Tubing Set LS und CliniMACS PBS/EDTA Buffer ist zur *In-vitro*-Anreicherung oder -Depletion von humanen CD8-positiven Zellen aus heterogenen hämatologischen Zellpopulationen bestimmt.

6.8.1 SCHRITT 1: Zellpräparation und magnetische Markierung

Erste erforderliche Aktionen

Anwendungskapazität

- **Anreicherung:** bis zu 4×10^9 markierte Zellen aus bis zu 40×10^9 Gesamtzellen (WBC) unter Verwendung des CliniMACS Tubing Set
- **Depletion:** bis zu 4×10^9 markierte Zellen aus bis zu 40×10^9 Gesamtzellen (WBC) unter Verwendung des CliniMACS Tubing Set LS

⚠ VORSICHT

Risiko einer ungenügenden Leistung in Bezug auf die Separation markierter Zellen. Wenn die Anwendungsspezifikationen überschritten werden, besteht das Risiko einer ungenügenden spezifischen Markierung. Verwenden Sie die benötigte Menge an Zellen und Reagenz gemäß der Beschreibung der jeweiligen Anwendung.

Benötigte CliniMACS-Materialien

Material	Artikel-nummer	Menge	Separationsprogramm
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1	–
CliniMACS CD8 Reagent	275-01	1 Fläschchen	–
CliniMACS Tubing Set	161-01	1 Schlauchset	ENRICHMENT 1.1
CliniMACS Tubing Set LS	162-01	1 Schlauchset	DEPLETION 2.1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	Bis zu 3×1.000-mL-Beutel[1]	–

1 Siehe Tabelle 6.20 bis Tabelle 6.22. Vor Gebrauch den CliniMACS PBS/EDTA Buffer mit HSA auf eine Endkonzentration von 0,5% (w/v) einstellen.

Tabelle 6.19: Benötigte CliniMACS Materialien zur Anreicherung/Depletion von CD8-positiven Zellen

Weitere erforderliche Materialien

- **Cell Preparation Bag:**
  ein 600-mL-Transferbeutel, geeignet zur Zentrifugation, sowie ein Sampling Site Coupler und ein Plasma-Transferset für das Zellpräparationsverfahren

- **Plasma Waste Bag und Wash Waste Bag:**
  zwei 600-mL-Transferbeutel, geeignet zur Zentrifugation
- **Cell Collection Bag:**
  ein 600-mL-Transferbeutel in Kombination mit einem Luer/Spike Interconnector zur Verbindung des Cell Collection Bag mit dem Schlauchset (siehe Tabelle 6.21 und Tabelle 6.22)
- **Wenn der Austausch des Negative Fraction Bag und des Buffer Waste Bag erforderlich ist:**
  zwei 1.000-mL-Transferbeutel in Kombination mit zwei Luer/Spike Interconnectors zur Verbindung der Beutel mit dem Schlauchset (siehe Tabelle 6.21 und Tabelle 6.22)
- **Wenn mehr als 1 Liter Puffer für die Separation benötigt wird:**
  ein Plasma-Transferset zur Verbindung der Pufferbeutel (siehe Tabelle 6.21 und Tabelle 6.22)
- ein Vorfilter
- Schlauchklemmen
- Spritzen (verschiedene Größen) und hypodermische 20-G-Injektionsnadeln
- Humanes Serumalbumin (HSA) als Zusatz zum CliniMACS PBS/EDTA Buffer bis zu einer Endkonzentration von 0,5% (w/v)
- Probenröhrchen

WICHTIG

Nach Eingabe der Probenparameter (SCHRITT 2) berechnet die CliniMACS Plus Software die Volumina, die im Priming Waste Bag, Cell Collection Bag, Negative Fraction Bag und Buffer Waste Bag gesammelt werden. Wenn das Volumen der berechneten Flüssigkeit das Standardvolumen von 500 mL überschreitet, ist ein Austausch der Beutel entsprechend der folgenden Übersicht der benötigten Materialien erforderlich.

Übersicht der benötigten Materialien

Zellpräparation	
Gesamtzellen	$\leq 40\times10^9$
Markierte Zellen	$\leq 4\times10^9$
Anzahl an Reagenzfläschchen	1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1.000 mL
Plasma-Transferset	1
Auftragsvolumen	100 mL

Tabelle 6.20: Benötigte Materialien für die Zellpräparation von CD8-positiven Zellen

Separation (ENRICHMENT 1.1)		
Markierte Zellen	$<2\times10^9$	$2–4\times10^9$
Negative Fraction Bag	–	Originalbeutel des Schlauchsets durch 1.000-mL-Transferbeutel ersetzen
Buffer Waste Bag	–	
Priming Waste Bag	–	–
Cell Collection Bag	600 mL	600 mL
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1.000 mL	2.000 mL
Luer/Spike Interconnector	1	3
Plasma-Transferset	–	1

Tabelle 6.21: Benötigte Materialien zur Anreicherung von CD8-positiven Zellen

Separation (DEPLETION 2.1)	
Markierte Zellen	$\leq4\times10^9$
Negative Fraction Bag	Kein Beutelaustausch erforderlich
Buffer Waste Bag	
Priming Waste Bag	
Cell Collection Bag	600 mL
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1.000 mL
Luer/Spike Interconnector	1

Tabelle 6.22: Benötigte Materialien zur Depletion von CD8-positiven Zellen

▶ Vorbereitung der Beutel

Das Gewicht des leeren Cell Collection Bag und Cell Preparation Bag gemäß der Beschreibung in Abschnitt 7.1.1 auf Seite 121 ermitteln.

Magnetische Markierung von Zellen

Eine ausführliche Beschreibung der folgenden Schritte finden Sie in Abschnitt 7.1 “SCHRITT 1: Zellpräparation und magnetische Markierung” auf Seite 121.

▶ Analyse des zellulären Ausgangsmaterials

▶ Transfer des zellulären Ausgangsmaterials in den Cell Preparation Bag

▶ Verdünnung des zellulären Ausgangsmaterials

Puffer zugeben: Gewicht des Pufferzusatzes = Gewicht des zellulären Ausgangsmaterials × 2

▶ Zentrifugation

Zentrifugieren bei 300×g, ohne Bremse, 15 Minuten, Raumtemperatur (RT: +19 °C bis +25 °C [+66 °F bis +77 °F]).

▶ **Volumeneinstellung: Markierungsvolumen 95 g (±5 g)**

1. Überstand vollständig abnehmen, wobei darauf zu achten ist, dass das Zellpellet nicht resuspendiert wird.
2. Das Zellpellet nach Entfernung des Überstands vorsichtig resuspendieren.
3. Das Gewicht des Cell Preparation Bag (CPB) durch Zugabe von Puffer einstellen. Das Zielgewicht des mit verdünntem Zellprodukt gefüllten CPB nach folgender Gleichung berechnen: Zielgewicht des gefüllten CPB = 95 g – Gewicht des leeren CPB
4. Das Zellpellet resuspendieren.

▶ **Inkubation mit dem CliniMACS CD8 Reagent**

1. 1 Fläschchen CliniMACS CD8 Reagent zugeben. Den Inhalt behutsam mischen.
2. Auf dem Taumelschüttler für 30 Minuten bei RT inkubieren (25 rpm).

▶ **Entfernung von überschüssigem Reagenz**

1. Cell Preparation Bag mit Puffer füllen.
2. Zentrifugieren (300×g, ohne Bremse, 15 Minuten, RT).
3. So viel Überstand wie möglich abnehmen. **Hinweis:** Mindestens 500 g Überstand abnehmen. Werden weniger als 500 g Überstand abgenommen, werden insgesamt zwei Spülschritte (anstelle von nur einem) empfohlen. Anderenfalls wird eventuell zu wenig ungebundenes Reagenz entfernt.
4. Das Zellpellet resuspendieren.
5. Das Auftragsvolumen auf 100 g einstellen.

6.8.2 SCHRITT 2: Wahl des Separationsprogramms

▶ **Einschalten des CliniMACS Plus Instruments**

▶ **Wahl des Separationsprogramms ENRICHMENT 1.1 oder DEPLETION 2.1**

▶ **Eingabe der Probenparameter**

Siehe Abschnitt 7.2.3 auf Seite 138 oder 7.2.5 auf Seite 145.

6.8.3 SCHRITT 3: Installation von CliniMACS Schlauchsets

▶ **CliniMACS Tubing Set und CliniMACS Tubing Set LS**

Siehe Abschnitt 7.3.1 auf Seite 157.

6.8.4 SCHRITT 4: CliniMACS Plus Separation

- **Separationsverfahren**
- **Trennen der Beutel und Notieren des Prozesscodes**
- **Deinstallieren des Schlauchsets und Abschalten**
- **Analyse der Zellen**

Siehe Abschnitt 7.4.2 auf Seite 197 oder 7.4.4 auf Seite 206.

6.9 Anreicherung/Depletion von CD25-positiven Zellen

Das CliniMACS Plus CD25 System mit dem CliniMACS Plus Instrument, CliniMACS CD25 Reagent, CliniMACS Tubing Set oder CliniMACS Tubing Set LS und CliniMACS PBS/EDTA Buffer ist zur *In-vitro*-Anreicherung oder -Depletion von humanen CD25-positiven Zellen – vorzugsweise stark CD25-exprimierenden Zellen – aus heterogenen hämatologischen Zellpopulationen bestimmt.

6.9.1 SCHRITT 1: Zellpräparation und magnetische Markierung

Erste erforderliche Aktionen

Anwendungskapazität

- **Anreicherung:** CD25-positive oder stark CD25-exprimierende Zellen: bis zu $0{,}6\times10^9$ markierte Zellen aus bis zu 40×10^9 Gesamtzellen (WBC) unter Verwendung des CliniMACS Tubing Set
- **Depletion:**
  Anwendung im normalen Maßstab: mehr als 6×10^9 und bis zu 12×10^9 CD25-positive Zellen aus mehr als 40×10^9 bis zu 80×10^9 Gesamtzellen (WBC) unter Verwendung des CliniMACS Tubing Set LS
  Anwendung im großen Maßstab: 6-12×10^9 CD25-positive Zellen aus 80×10^9 Gesamtzellen (WBC) unter Verwendung des CliniMACS Tubing Set LS

⚠ VORSICHT

Risiko einer ungenügenden Leistung in Bezug auf die Separation markierter Zellen. Wenn die Anwendungsspezifikationen überschritten werden, besteht das Risiko einer ungenügenden spezifischen Markierung. Verwenden Sie die benötigte Menge an Zellen und Reagenz gemäß der Beschreibung der jeweiligen Anwendung.

Benötigte CliniMACS-Materialien

Material	Artikel-nummer	Menge	Separationsprogramm
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1	–
CliniMACS CD25 Reagent	274-01	• 1 Fläschchen (normaler Maßstab) • 2 Fläschchen (großer Maßstab)	–
CliniMACS Tubing Set	161-01	1 Schlauchset	ENRICHMENT 3.2
CliniMACS Tubing Set LS	162-01	1 Schlauchset	DEPLETION 2.1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	Bis zu 4×1.000-mL-Beutel[1]	–

1 Siehe Tabelle 6.24 bis Tabelle 6.27. Vor Gebrauch den CliniMACS PBS/EDTA Buffer mit HSA auf eine Endkonzentration von 0,5% (w/v) einstellen.

Tabelle 6.23: Benötigte CliniMACS Materialien zur Anreicherung/Depletion von CD25-positiven Zellen

Weitere erforderliche Materialien

- **Cell Preparation Bag:**
  ein 600-mL-Transferbeutel, geeignet zur Zentrifugation, sowie ein Sampling Site Coupler und ein bis zwei Plasma-Transfersets für das Zellpräparationsverfahren
- **Plasma Waste Bag und Wash Waste Bag:**
  zwei 600-mL- (oder zwei 1.000-mL-) Transferbeutel, geeignet zur Zentrifugation
- **Cell Collection Bag:**
  ein 150-mL- oder ein bis zwei 600-mL-Transferbeutel in Kombination mit einem Luer/Spike Interconnector zur Verbindung des Cell Collection Bag mit dem Schlauchset

  Wenn zwei Cell Collection Bags für die Separation benötigt werden, ein Plasma-Transferset zur Verbindung beider Beutel verwenden (siehe Tabelle 6.25 und Tabelle 6.27).
- **Wenn der Austausch des Negative Fraction Bag und des Buffer Waste Bag erforderlich ist:**
  zwei 1.000-mL-Transferbeutel in Kombination mit zwei Luer/Spike Interconnectors zur Verbindung der Beutel mit dem Schlauchset (siehe Tabelle 6.25 und Tabelle 6.27)
- **Wenn mehr als 1 Liter Puffer für die Separation benötigt wird:**
  ein Plasma-Transferset zur Verbindung der Pufferbeutel (siehe Tabelle 6.25 und Tabelle 6.27)
- ein Vorfilter
- Schlauchklemmen
- Spritzen (verschiedene Größen) und hypodermische 20-G-Injektionsnadeln
- Humanes Serumalbumin (HSA) als Zusatz zum CliniMACS PBS/EDTA Buffer bis zu einer Endkonzentration von 0,5% (w/v)
- Probenröhrchen

WICHTIG

Nach Eingabe der Probenparameter (SCHRITT 2) berechnet die CliniMACS Plus Software die Volumina, die im Priming Waste Bag, Cell Collection Bag, Negative Fraction Bag und Buffer Waste Bag gesammelt werden. Wenn das Volumen der berechneten Flüssigkeit das Standardvolumen von 500 mL überschreitet, ist ein Austausch der Beutel entsprechend der folgenden Übersicht der benötigten Materialien erforderlich.

Übersicht der benötigten Materialien

Zellpräparation (ENRICHMENT 3.2)		
Anwendung	**Anreicherung von CD25-positiven Zellen**	**Anreicherung von stark CD25-exprimierenden Zellen**
Gesamtzellen (WBC)	≤40×10^9	≤40×10^9
Markierte Zellen	≤$0{,}6\times10^9$	≤$0{,}6\times10^9$
Anzahl an Reagenzfläschchen	1	1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1.000–2.000 mL	2.000 mL
Plasma-Transferset	1–2	2
Markierungsvolumen	190 mL	380 mL
Markierungstemperatur	Raumtemperatur	+4 °C bis +8 °C (+39 °F bis +46 °F)

Tabelle 6.24: Benötigte Materialien für die Zellpräparation von CD25-positiven/stark CD25-exprimierenden Zellen (ENRICHMENT 3.2)

Separation (ENRICHMENT 3.2)		
Anwendung	**Anreicherung von CD25-positiven Zellen**	**Anreicherung von stark CD25-exprimierenden Zellen**
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1.000 mL	1.000 mL
Negative Fraction Bag	Kein Beutelaustausch erforderlich	
Buffer Waste Bag		
Priming Waste Bag		
Cell Collection Bag	150 mL	150 mL
Luer/Spike Interconnector	1	1

Tabelle 6.25: Benötigte Materialien für die Anreicherung von CD25-positiven/stark CD25-exprimierenden Zellen (ENRICHMENT 3.2)

Zellpräparation (DEPLETION 2.1)		
Gesamtzellen (WBC)	≤40×10^9	>40–80×10^9
Markierte Zellen	≤6×10^9	>6–12×10^9
Anzahl an Reagenzfläschchen	1	2
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1.000–2.000 mL	1.000–2.000 mL
Plasma-Transferset	1–2	1–2
Markierungsvolumen	95 mL	190 mL
Markierungstemperatur	Raumtemperatur	Raumtemperatur

Tabelle 6.26: Benötigte Materialien für die Zellpräparation von CD25-positiven Zellen (DEPLETION 2.1)

Separation (DEPLETION 2.1)		
Gesamtzellen (WBC)	≤40×10^9	>40–80×10^9
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1.000 mL für <5×10^9 markierte Zellen	2.000 mL für 5–12×10^9 markierte Zellen
Negative Fraction Bag	–	Originalbeutel des Schlauchsets durch 1.000-mL-Transferbeutel ersetzen
Buffer Waste Bag	–	
Priming Waste Bag	–	–
Cell Collection Bag	600 mL	2×600 mL
Luer/Spike Interconnector	1	3
Plasma-Transferset	–	2

Tabelle 6.27: Benötigte Materialien zur Depletion von CD25-positiven Zellen (DEPLETION 2.1)

▶ Vorbereitung der Beutel

Das Gewicht des leeren Cell Collection Bag und Cell Preparation Bag gemäß der Beschreibung in Abschnitt 7.1.1 auf Seite 121 ermitteln.

Magnetische Markierung von Zellen

Eine ausführliche Beschreibung der folgenden Schritte finden Sie in Abschnitt 7.1 “SCHRITT 1: Zellpräparation und magnetische Markierung” auf Seite 121.

WICHTIG

- *Den Puffer für die Zellpräparation zur Anreicherung oder Depletion von CD25-positiven Zellen bei +19 °C bis +25 °C lagern.*
- *Die magnetische Markierung bei der Zellpräparation für die Anreicherung von stark CD25 exprimierenden Zellen muss mit kaltem Puffer (+4 °C bis +8 °C [+39 °F bis+46 °F]) durchgeführt werden. Niedrigere oder höhere Temperaturen können zu geringerer Reinheit und Ausbeute der Zielzellen führen.*

▶ Analyse des zellulären Ausgangsmaterials

Transfer des zellulären Ausgangsmaterials in den Cell Preparation Bag

Verdünnung des zellulären Ausgangsmaterials

Puffer zugeben: Gewicht des Pufferzusatzes = Gewicht des zellulären Ausgangsmaterials × 2

Zentrifugation

Zentrifugieren bei 300×g, ohne Bremse, 15 Minuten, Raumtemperatur (RT: +19 °C bis +25 °C [+66 °F bis +77 °F]).

Volumeneinstellung: Markierungsvolumen für

Anreicherung von CD25-positiven Zellen: 190 g (± 5 g)
Anreicherung von stark CD25-exprimierenden Zellen: 380 g (± 5 g)[1]
Depletion von CD25-positiven Zellen (Anwendung im normalen Maßstab): 95 g
Depletion von CD25-positiven Zellen (Anwendung im großen Maßstab): 190 g

1. Überstand vollständig abnehmen, wobei darauf zu achten ist, dass das Zellpellet nicht resuspendiert wird.
2. Das Zellpellet nach Entfernung des Überstands vorsichtig resuspendieren.
3. Das Gewicht des Cell Preparation Bag (CPB) durch Zugabe von Puffer nach folgender Gleichung einstellen: Zielgewicht des gefüllten CPB = Markierungsvolumen + Gewicht des leeren CPB
4. Das Zellpellet resuspendieren.

Inkubation mit dem CliniMACS CD25 Reagent

1. 1 oder 2 Fläschchen CliniMACS CD25 Reagent (siehe Tabelle 6.24 und Tabelle 6.26) zugeben. Den Inhalt behutsam mischen.
2. Auf dem Taumelschüttler (25 rpm) inkubieren.
   a) Anreicherung oder Depletion von CD25-positiven Zellen: 30 Minuten bei RT
   b) Anreicherung von stark CD25-exprimierenden Zellen: 15 Minuten bei (+4 °C bis +8 °C [+39 °F bis+46 °F]).

Entfernung von überschüssigem Reagenz

1. Cell Preparation Bag mit Puffer füllen.
2. Zentrifugieren (300×g, ohne Bremse, 15 Minuten, RT).
3. So viel Überstand wie möglich abnehmen. **Hinweis:** Mindestens 500 g Überstand abnehmen. Werden weniger als 500 g Überstand abgenommen, werden insgesamt zwei Spülschritte (anstelle von nur einem) empfohlen. Anderenfalls wird eventuell zu wenig ungebundenes Reagenz entfernt.

1 Die magnetische Markierung für die Anreicherung von stark CD25-exprimierenden Zellen muss mit kaltem Puffer (+4 °C bis +8 °C [+39 °F bis+46 °F]) durchgeführt werden.

4. Das Zellpellet resuspendieren.
5. Das Auftragsvolumen auf 100 g (Anwendung im normalen Maßstab) oder 200 g (Anwendung im großen Maßstab) einstellen.

6.9.2 SCHRITT 2: Wahl des Separationsprogramms

- **Einschalten des CliniMACS Plus Instruments**
- **Wahl des Separationsprogramms ENRICHMENT 3.2 oder DEPLETION 2.1**
- **Eingabe der Probenparameter**
  (nicht für ENRICHMENT 3.2)

Siehe Abschnitt 7.2.4 auf Seite 143 oder 7.2.5 auf Seite 145.

6.9.3 SCHRITT 3: Installation von CliniMACS Schlauchsets

- **CliniMACS Tubing Set und CliniMACS Tubing Set LS**

Siehe Abschnitt 7.3.1 auf Seite 157.

6.9.4 SCHRITT 4: CliniMACS Plus Separation

- **Separationsverfahren**
- **Trennen der Beutel und Notieren des Prozesscodes**
- **Deinstallieren des Schlauchsets und Abschalten**
- **Analyse der Zellen**

Siehe Abschnitt 7.4.3 auf Seite 202 oder 7.4.4 auf Seite 206.

6.10 Anreicherung/Depletion von CD4-positiven Zellen

Das CliniMACS Plus CD4 System mit dem CliniMACS Plus Instrument, CliniMACS CD4 Reagent, CliniMACS Tubing Set oder CliniMACS Tubing Set LS und CliniMACS PBS/EDTA Buffer ist zur *In-vitro*-Anreicherung oder -Depletion von humanen CD4-positiven Zellen aus heterogenen hämatologischen Zellpopulationen bestimmt.

6.10.1 SCHRITT 1: Zellpräparation und magnetische Markierung

Erste erforderliche Aktionen

Anwendungskapazität

- **Anreicherung:** bis zu 5×10^9 markierte Zellen aus bis zu 40×10^9 Gesamtzellen (WBC) unter Verwendung des CliniMACS Tubing Set
- **Depletion:** bis zu 12×10^9 markierte Zellen aus bis zu 40×10^9 Gesamtzellen (WBC) unter Verwendung des CliniMACS Tubing Set LS

Hinweis: Wenn die Anzahl der berechneten Zellen die Anwendungskapazität überschreitet, die Probe teilen und mit jeder Probe separat fortfahren, wobei für jeden Lauf des CliniMACS Plus Instruments ein neues Schlauchset zu verwenden ist.

⚠ VORSICHT

Risiko einer ungenügenden Leistung in Bezug auf die Separation markierter Zellen. Wenn die Anwendungsspezifikationen überschritten werden, besteht das Risiko einer ungenügenden spezifischen Markierung. Verwenden Sie die benötigte Menge an Zellen und Reagenz gemäß der Beschreibung der jeweiligen Anwendung.

Benötigte CliniMACS-Materialien

Material	Artikel-nummer	Menge	Separationsprogramm
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1	–
CliniMACS CD4 Reagent	276-01	1 Fläschchen	–
CliniMACS Tubing Set	161-01	1 Schlauchset	ENRICHMENT 1.1
CliniMACS Tubing Set LS	162-01	1 Schlauchset	DEPLETION 2.1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	Bis zu 4×1.000-mL-Beutel[1]	–

1 Siehe Tabelle 6.29 bis Tabelle 6.32. Vor Gebrauch den CliniMACS PBS/EDTA Buffer mit HSA auf eine Endkonzentration von 0,5% (w/v) einstellen.

Tabelle 6.28: Benötigte CliniMACS Materialien zur Anreicherung/Depletion von CD4-positiven Zellen

Weitere erforderliche Materialien

- **Cell Preparation Bag:**
  ein 600-mL-Transferbeutel, geeignet zur Zentrifugation, sowie ein Sampling Site Coupler und ein Plasma-Transferset für das Zellpräparationsverfahren
- **Plasma Waste Bag und Wash Waste Bag:**
  zwei 600-mL- (oder zwei 1.000-mL-)Transferbeutel, geeignet zur Zentrifugation
- **Cell Collection Bag:**
  ein 150-mL- oder ein bis zwei 600-mL-Transferbeutel in Kombination mit einem Luer/Spike Interconnector zur Verbindung des Cell Collection Bag mit dem Schlauchset

  Wenn zwei Cell Collection Bags für die Separation benötigt werden, ein Plasma-Transferset zur Verbindung beider Beutel verwenden (siehe Tabelle 6.30 und Tabelle 6.32).
- **Wenn der Austausch des Negative Fraction Bag, des Buffer Waste Bag und/oder des Priming Waste Bag erforderlich ist:**
  bis zu drei 1.000-mL-Transferbeutel in Kombination mit zwei Luer/Spike Interconnectors zur Verbindung der Beutel mit dem Schlauchset (siehe Tabelle 6.30 und Tabelle 6.32)

  Den Priming Waste Bag unter Verwendung des Schweißgeräts für sterile Schläuche austauschen.
- **Wenn mehr als 1 Liter Puffer für die Separation benötigt wird:**
  ein bis zwei Plasma-Transfersets zur Verbindung der Pufferbeutel (siehe Tabelle 6.30 und Tabelle 6.32)
- ein Vorfilter
- Schlauchklemmen
- Spritzen (verschiedene Größen) und hypodermische 20-G-Injektionsnadeln
- Humanes Serumalbumin (HSA) als Zusatz zum CliniMACS PBS/EDTA Buffer bis zu einer Endkonzentration von 0,5% (w/v)
- Probenröhrchen

WICHTIG

Nach Eingabe der Probenparameter (SCHRITT 2) berechnet die CliniMACS Plus Software die Volumina, die im Priming Waste Bag, Cell Collection Bag, Negative Fraction Bag und Buffer Waste Bag gesammelt werden. Wenn das Volumen der berechneten Flüssigkeit das Standardvolumen von 500 mL überschreitet, ist ein Austausch der Beutel entsprechend der folgenden Übersicht der benötigten Materialien erforderlich.

Übersicht der benötigten Materialien

Zellpräparation (ENRICHMENT 1.1)	
Gesamtzellen (WBC)	≤40×10^9
Markierte Zellen	≤5×10^9
Anzahl an Reagenzfläschchen	1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1.000 mL
Plasma-Transferset	1

Tabelle 6.29: Benötigte Materialien für die Zellpräparation von CD4-positiven Zellen (ENRICHMENT 1.1)

Separation (ENRICHMENT 1.1)		
Markierte Zellen	≤2×10^9	>2–5×10^9
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1.000 mL	2.000 mL
Negative Fraction Bag	–	Originalbeutel des Schlauchsets durch 1.000-mL-Transferbeutel ersetzen
Buffer Waste Bag	–	
Priming Waste Bag	–	–
Cell Collection Bag	150 mL	600 mL
Luer/Spike Interconnector	1	3
Plasma-Transferset	–	1

Tabelle 6.30: Benötigte Materialien zur Anreicherung von CD4-positiven Zellen (ENRICHMENT 1.1)

Zellpräparation (DEPLETION 2.1)	
Gesamtzellen (WBC)	≤40×10^9
Markierte Zellen	≤12×10^9
Anzahl an Reagenzfläschchen	1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1.000 mL
Plasma-Transferset	1

Tabelle 6.31: Benötigte Materialien für die Zellpräparation von CD4-positiven Zellen (DEPLETION 2.1)

Separation (DEPLETION 2.1)		
Markierte Zellen	<5×10^9	5–12×10^9
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1.000 mL	2.000 mL
Negative Fraction Bag	–	Originalbeutel des Schlauchsets durch 1.000-mL-Transferbeutel ersetzen
Buffer Waste Bag	–	
Priming Waste Bag	–	–
Cell Collection Bag	1×600 mL	1–2×600 mL
Luer/Spike Interconnector	1	3
Plasma-Transferset	–	1–2

Tabelle 6.32: Benötigte Materialien zur Depletion von CD4-positiven Zellen (DEPLETION 2.1)

▶ Vorbereitung der Beutel

Das Gewicht des leeren Cell Collection Bag und Cell Preparation Bag gemäß der Beschreibung in Abschnitt 7.1.1 auf Seite 121 ermitteln.

Magnetische Markierung von Zellen

Eine ausführliche Beschreibung der folgenden Schritte finden Sie in Abschnitt 7.1 “SCHRITT 1: Zellpräparation und magnetische Markierung” auf Seite 121.

▶ Analyse des zellulären Ausgangsmaterials

▶ Transfer des zellulären Ausgangsmaterials in den Cell Preparation Bag

▶ Verdünnung des zellulären Ausgangsmaterials

Puffer zugeben: Gewicht des Pufferzusatzes = Gewicht des zellulären Ausgangsmaterials × 2

▶ Zentrifugation

Zentrifugieren bei 300×g, ohne Bremse, 15 Minuten, Raumtemperatur (RT: +19 °C bis +25 °C [+66 °F bis +77 °F]).

▶ Volumeneinstellung: Markierungsvolumen 95 g (± 5 g)

1. Überstand abnehmen, um die Probe nach folgender Gleichung einzustellen: Gewicht des abzunehmenden Überstands = Gewicht des verdünnten Zellprodukts – 95 g
2. Das Zellpellet resuspendieren.

▶ Inkubation mit dem CliniMACS CD4 Reagent

1. 1 Fläschchen CliniMACS CD4 Reagent zugeben. Den Inhalt behutsam mischen.
2. Auf dem Taumelschüttler für 30 Minuten bei RT inkubieren (25 rpm).

▶ Entfernung von überschüssigem Reagenz

1. Cell Preparation Bag mit Puffer füllen.
2. Zentrifugieren (300×g, ohne Bremse, 15 Minuten, RT).
3. So viel Überstand wie möglich abnehmen. **Hinweis:** Mindestens 500 g Überstand abnehmen. Werden weniger als 500 g Überstand abgenommen, werden insgesamt zwei Spülschritte (anstelle von nur einem) empfohlen. Anderenfalls wird eventuell zu wenig ungebundenes Reagenz entfernt.
4. Das Zellpellet resuspendieren.
5. Das Auftragsvolumen auf 100 g einstellen.

6.10.2 SCHRITT 2: Wahl des Separationsprogramms

- **Einschalten des CliniMACS Plus Instruments**
- **Wahl des Separationsprogramms ENRICHMENT 1.1 oder DEPLETION 2.1**
- **Eingabe der Probenparameter**

Siehe Abschnitt 7.2.3 auf Seite 138 und 7.2.5 auf Seite 145.

6.10.3 SCHRITT 3: Installation von CliniMACS Schlauchsets

- **CliniMACS Tubing Set und CliniMACS Tubing Set LS**

Siehe Abschnitt 7.3.1 auf Seite 157.

6.10.4 SCHRITT 4: CliniMACS Plus Separation

- **Separationsverfahren**
- **Trennen der Beutel und Notieren des Prozesscodes**
- **Deinstallieren des Schlauchsets und Abschalten**
- **Analyse der Zellen**

Siehe Abschnitt 7.4.2 auf Seite 197 oder 7.4.4 auf Seite 206.

6.11 Depletion von CD4-positiven Zellen und CD8-positiven Zellen

Das CliniMACS Plus CD4/CD8 System mit dem CliniMACS Plus Instrument, CliniMACS CD4 Reagent, CliniMACS CD8 Reagent, CliniMACS Tubing Set LS und CliniMACS PBS/EDTA Buffer ist zur simultanen *In-vitro*-Depletion von humanen CD4-positiven und CD8-positiven Zellen aus heterogenen hämatologischen Zellpopulationen bestimmt.

6.11.1 SCHRITT 1: Zellpräparation und magnetische Markierung

Erste erforderliche Aktionen

Anwendungskapazität

Bis zu 12×10^9 CD4-positive Zellen und bis zu 4×10^9 CD8-positive Zellen aus bis zu 40×10^9 Gesamtzellen (WBC)

Hinweis: Wenn die Anzahl der berechneten Zellen die Anwendungskapazität überschreitet, die Probe teilen und mit jeder Probe separat fortfahren, wobei für jeden Lauf des CliniMACS Plus Instruments ein neues Schlauchset zu verwenden ist.

⚠ VORSICHT

Risiko einer ungenügenden Leistung in Bezug auf die Separation markierter Zellen. Wenn die Anwendungsspezifikationen überschritten werden, besteht das Risiko einer ungenügenden spezifischen Markierung. Verwenden Sie die benötigte Menge an Zellen und Reagenz gemäß der Beschreibung der jeweiligen Anwendung.

Benötigte CliniMACS-Materialien

Material	Artikel-nummer	Menge
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS CD4 Reagent	276-01	1 Fläschchen
CliniMACS CD8 Reagent	275-01	1 Fläschchen
CliniMACS Tubing Set LS	162-01	1 Schlauchset
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	Bis zu 4×1.000-mL-Beutel[1]

1 Siehe Tabelle 6.34 und Tabelle 6.35. Vor Gebrauch den CliniMACS PBS/EDTA Buffer mit HSA auf eine Endkonzentration von 0,5% (w/v) einstellen.

Tabelle 6.33: Benötigte CliniMACS Materialien für die Depletion von CD4-positiven Zellen und CD8-positiven Zellen

Weitere erforderliche Materialien

- **Cell Preparation Bag:**
  ein 600-mL-Transferbeutel, geeignet zur Zentrifugation, sowie ein Sampling Site Coupler und ein Plasma-Transferset für das Zellpräparationsverfahren
- **Plasma Waste Bag und Wash Waste Bag:**
  zwei 600-mL- (oder zwei 1.000-mL-)Transferbeutel, geeignet zur Zentrifugation

- **Cell Collection Bag:**
  ein bis zwei 600-mL-Transferbeutel in Kombination mit einem Luer/Spike Interconnector zur Verbindung des Cell Collection Bag mit dem Schlauchset

  Wenn zwei Cell Collection Bags für die Separation benötigt werden, ein Plasma-Transferset zur Verbindung beider Beutel verwenden (siehe Tabelle 6.35).

- **Wenn der Austausch des Negative Fraction Bag, des Buffer Waste Bag und/oder des Priming Waste Bag erforderlich ist:**
  bis zu drei 1.000-mL-Transferbeutel in Kombination mit zwei Luer/Spike Interconnectors zur Verbindung der Beutel mit dem Schlauchset (siehe Tabelle 6.35)

  Den Priming Waste Bag unter Verwendung des Schweißgerät für sterile Schläuche austauschen.

- **Wenn mehr als 1 Liter Puffer für die Separation benötigt wird:**
  ein bis zwei Plasma-Transfersets zur Verbindung der Pufferbeutel (siehe Tabelle 6.35)

- ein Vorfilter
- Schlauchklemmen
- Spritzen (verschiedene Größen) und hypodermische 20-G-Injektionsnadeln
- Humanes Serumalbumin (HSA) als Zusatz zum CliniMACS PBS/EDTA Buffer bis zu einer Endkonzentration von 0,5% (w/v)
- Probenröhrchen

WICHTIG

Nach Eingabe der Probenparameter (SCHRITT 2) berechnet die CliniMACS Plus Software die Volumina, die im Priming Waste Bag, Cell Collection Bag, Negative Fraction Bag und Buffer Waste Bag gesammelt werden. Wenn das Volumen der berechneten Flüssigkeit das Standardvolumen von 500 mL überschreitet, ist ein Austausch der Beutel entsprechend der folgenden Übersicht der benötigten Materialien erforderlich.

Übersicht der benötigten Materialien

Zellpräparation	
Gesamtzellen (WBC)	$\leq 40\times10^9$
Markierte Zellen	$\leq 12\times10^9$ CD4-positive Zellen und $\leq 4\times10^9$ CD8-positive Zellen
Anzahl an Reagenzfläschchen	1 Fläschchen CliniMACS CD4 Reagent und 1 Fläschchen CliniMACS CD8 Reagent
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1.000 mL
Plasma-Transferset	1

Tabelle 6.34: Benötigte Materialien für die Zellpräparation von CD4-positiven und CD8-positiven Zellen

Separation			
Markierte Zellen	$<5\times10^9$	$5–13\times10^9$	$>13–16\times10^9$
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1.000 mL	2.000 mL	3.000 mL
Negative Fraction Bag	–	Originalbeutel des Schlauchsets durch 1.000-mL-Transferbeutel ersetzen	Originalbeutel des Schlauchsets durch 1.000-mL-Transferbeutel ersetzen
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
Plasma-Transferset	–	1–2	3

Tabelle 6.35: Benötigte Materialien zur Depletion von CD4-positiven und CD8-positiven Zellen

▶ Vorbereitung der Beutel

Das Gewicht des leeren Cell Collection Bag und Cell Preparation Bag gemäß der Beschreibung in Abschnitt 7.1.1 auf Seite 121 ermitteln.

Magnetische Markierung von Zellen

Eine ausführliche Beschreibung der folgenden Schritte finden Sie in Abschnitt 7.1 “SCHRITT 1: Zellpräparation und magnetische Markierung” auf Seite 121.

▶ Analyse des zellulären Ausgangsmaterials

▶ Transfer des zellulären Ausgangsmaterials in den Cell Preparation Bag

▶ Verdünnung des zellulären Ausgangsmaterials

Puffer zugeben: Gewicht des Pufferzusatzes = Gewicht des zellulären Ausgangsmaterials × 2

▶ Zentrifugation

Zentrifugieren bei 300×g, ohne Bremse, 15 Minuten, Raumtemperatur (RT: +19 °C bis +25 °C [+66 °F bis +77 °F]).

▶ Volumeneinstellung: Markierungsvolumen 88 g (± 5 g)

1. Überstand abnehmen, um die Probe nach folgender Gleichung einzustellen: Gewicht des abzunehmenden Überstands = Gewicht des verdünnten Zellprodukts – Markierungsvolumen
2. Das Zellpellet resuspendieren.

▶ Inkubation mit dem CliniMACS CD4 Reagent und CliniMACS CD8 Reagent

1. 1 Fläschchen CliniMACS CD4 Reagent und 1 Fläschchen CliniMACS CD8 Reagent zugeben. Den Inhalt behutsam mischen.
2. Auf dem Taumelschüttler für 30 Minuten bei RT inkubieren (25 rpm).

▶ **Entfernung von überschüssigem Reagenz**

1. Cell Preparation Bag mit Puffer füllen.
2. Zentrifugieren (300×g, ohne Bremse, 15 Minuten, RT).
3. So viel Überstand wie möglich abnehmen. **Hinweis:** Mindestens 500 g Überstand abnehmen. Werden weniger als 500 g Überstand abgenommen, werden insgesamt zwei Spülschritte (anstelle von nur einem) empfohlen. Anderenfalls wird eventuell zu wenig ungebundenes Reagenz entfernt.
4. Das Zellpellet resuspendieren.
5. Das Auftragsvolumen auf 100 g einstellen.

6.11.2 SCHRITT 2: Wahl des Separationsprogramms

▶ **Einschalten des CliniMACS Plus Instruments**

▶ **Wahl des Separationsprogramms DEPLETION 2.1**

▶ **Eingabe der Probenparameter**

Siehe Abschnitt 7.2.5 auf Seite 145.

6.11.3 SCHRITT 3: Installation von CliniMACS Schlauchsets

▶ **CliniMACS Tubing Set und CliniMACS Tubing Set LS**

Siehe Abschnitt 7.3.1 auf Seite 157.

6.11.4 SCHRITT 4: CliniMACS Plus Separation

▶ **Separationsverfahren**

▶ **Trennen der Beutel und Notieren des Prozesscodes**

▶ **Deinstallieren des Schlauchsets und Abschalten**

▶ **Analyse der Zellen**

Siehe Abschnitt 7.4.4 auf Seite 206.

6.12 Anreicherung von CD1c-(BDCA-1-) positiven Zellen – Teil 1: Depletion von CD19-positiven Zellen und Markierung von CD1c-(BDCA-1-)positiven Zellen

Das CliniMACS Plus CD1c (BDCA-1)-Biotin System mit dem CliniMACS Plus Instrument, CliniMACS CD1c (BDCA-1)-Biotin, CliniMACS CD19 Reagent, CliniMACS Anti-Biotin Reagent, CliniMACS Tubing Set LS, CliniMACS Tubing Set und CliniMACS PBS/EDTA Buffer ist zur *In-vitro*-Anreicherung von humanen CD1c-(BDCA-1-) positiven Zellen aus heterogenen hämatologischen Zellpopulationen nach Depletion von CD19-positiven Zellen bestimmt.

6.12.1 SCHRITT 1: Zellpräparation und magnetische Markierung

Erste erforderliche Aktionen

Anwendungskapazität

Depletion von bis zu 5×10^9 CD19-positiven Zellen und Markierung von bis zu $0{,}2\times10^9$ CD1c-(BDCA-1-) positiven Zellen aus bis zu 40×10^9 Gesamtzellen (WBC)

⚠ VORSICHT

Risiko einer ungenügenden Leistung in Bezug auf die Separation markierter Zellen. Wenn die Anwendungsspezifikationen überschritten werden, besteht das Risiko einer ungenügenden spezifischen Markierung. Verwenden Sie die benötigte Menge an Zellen und Reagenz gemäß der Beschreibung der jeweiligen Anwendung.

Benötigte CliniMACS-Materialien

Material	Artikel-nummer	Menge
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS CD1c (BDCA-1)-Biotin	277-01	1 Fläschchen
CliniMACS CD19 Reagent	179-01	1 Fläschchen
CliniMACS Tubing Set LS	162-01	1 Schlauchset
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	2×1.000-mL-Beutel[1]

1 Vor Gebrauch den Buffer mit HSA auf eine Endkonzentration von 0,5% (w/v) einstellen.

Tabelle 6.36: Benötigte CliniMACS Materialien zur Anreicherung von CD1c-(BDCA-1-) positiven Zellen (Teil 1)

Weitere benötigte Materialien (für Teil 1 und Teil 2)

- **Cell Preparation Bag:**
  zwei 600-mL-Transferbeutel, geeignet zur Zentrifugation, sowie zwei Sampling Site Coupler und drei Plasma-Transfersets für das Zellpräparationsverfahren

- **Plasma Waste Bags und Wash Waste Bags:**
  fünf 600-mL-Transferbeutel, geeignet zur Zentrifugation
- **Cell Collection Bag (Teil 1):**
  ein 600-mL-Transferbeutel, geeignet zur Zentrifugation, in Kombination mit einem Luer/Spike Interconnector zur Verbindung des Cell Collection Bag mit dem Schlauchset
- **Cell Collection Bag (Teil 2):**
  ein 150-mL-Transferbeutel, geeignet zur Zentrifugation, in Kombination mit einem Luer/Spike Interconnector zur Verbindung des Transferbeutels mit dem Schlauchset
- zwei Vorfilter
- Schlauchklemmen
- Spritzen (verschiedene Größen) und hypodermische 20-G-Injektionsnadeln
- Humanes Serumalbumin (HSA) als Zusatz zum CliniMACS PBS/EDTA Buffer bis zu einer Endkonzentration von 0,5% (w/v)
- Probenröhrchen

Magnetische Markierung von Zellen (Teil 1)

Eine ausführliche Beschreibung der folgenden Schritte finden Sie in Abschnitt 7.1 “SCHRITT 1: Zellpräparation und magnetische Markierung” auf Seite 121.

▶ Analyse des zellulären Ausgangsmaterials

▶ Transfer des zellulären Ausgangsmaterials in den Cell Preparation Bag

▶ Verdünnung des zellulären Ausgangsmaterials

Puffer zugeben: Gewicht des Pufferzusatzes = Gewicht des zellulären Ausgangsmaterials × 2

▶ Zentrifugation

Zentrifugieren bei 200×g, ohne Bremse, 15 Minuten, Raumtemperatur (RT: +19 °C bis +25 °C [+66 °F bis +77 °F]).

▶ Volumeneinstellung: Markierungsvolumen 90 g (± 5 g)

1. Das Zellpellet nach Entfernung des Überstands vorsichtig resuspendieren.
2. Das Gewicht des Cell Preparation Bag, Teil 1 (CPB), durch Zugabe von Puffer nach folgender Gleichung einstellen: Zielgewicht des gefüllten CPB Teil 1 = 90 g + Gewicht des leeren CPB
3. Das Zellpellet resuspendieren.

▶ **Inkubation mit dem CliniMACS CD19 Reagent und CliniMACS Cd1c (BDCA-1)-Biotin**

1. 1 Fläschchen CliniMACS CD19 Reagent und 1 Fläschchen CliniMACS Cd1c (BDCA-1)-Biotin zugeben. Den Inhalt behutsam mischen.
2. Auf dem Taumelschüttler für 30 Minuten bei RT inkubieren (25 rpm).

▶ **Entfernung von überschüssigem Reagenz**

1. Cell Preparation Bag, Teil 1, mit Puffer füllen.
2. Zentrifugieren (300×g, ohne Bremse, 15 Minuten, RT).
3. So viel Überstand wie möglich abnehmen. **Hinweis:** Mindestens 500 g Überstand abnehmen. Werden weniger als 500 g Überstand abgenommen, werden insgesamt zwei Spülschritte (anstelle von nur einem) empfohlen. Anderenfalls wird eventuell zu wenig ungebundenes Reagenz entfernt.
4. Das Zellpellet resuspendieren.
5. Das Auftragsvolumen auf 100 g einstellen.

6.12.2 SCHRITT 2: Wahl des Separationsprogramms

▶ **Einschalten des CliniMACS Plus Instruments**

▶ **Wahl des Separationsprogramms DEPLETION 2.1**

▶ **Eingabe der Probenparameter**

Siehe Abschnitt 7.2.5 auf Seite 145.

6.12.3 SCHRITT 3: Installation von CliniMACS Schlauchsets

▶ **CliniMACS Tubing Set und CliniMACS Tubing Set LS**

Siehe Abschnitt 7.3.1 auf Seite 157.

6.12.4 SCHRITT 4: CliniMACS Plus Separation

▶ **Separationsverfahren**

▶ **Trennen der Beutel und Notieren des Prozesscodes**

▶ **Deinstallieren des Schlauchsets und Abschalten**

▶ Analyse der Zellen

Siehe Abschnitt 7.4.4 auf Seite 206.

6.13 Anreicherung von CD1c-(BDCA-1-) positiven Zellen – Teil 2: Flexibles Markierungssystem

Das CliniMACS Plus CD1c (BDCA-1)-Biotin System mit dem CliniMACS Plus Instrument, CliniMACS CD1c (BDCA-1)-Biotin, CliniMACS CD19 Reagent, CliniMACS Anti-Biotin Reagent, CliniMACS Tubing Set LS, CliniMACS Tubing Set und CliniMACS PBS/EDTA Buffer ist zur *In-vitro*-Anreicherung von humanen CD1c-(BDCA-1-) positiven Zellen aus heterogenen hämatologischen Zellpopulationen nach Depletion von CD19-positiven Zellen bestimmt.

6.13.1 SCHRITT 1: Zellpräparation und magnetische Markierung

Erste erforderliche Aktionen

Anwendungskapazität

Bis zu $0{,}2\times10^9$ CD1c-(BDCA-1-) positive Zellen aus bis zu 40×10^9 Gesamtzellen (WBC)

⚠ VORSICHT

Risiko einer ungenügenden Leistung in Bezug auf die Separation markierter Zellen. Wenn die Anwendungsspezifikationen überschritten werden, besteht das Risiko einer ungenügenden spezifischen Markierung. Verwenden Sie die benötigte Menge an Zellen und Reagenz gemäß der Beschreibung der jeweiligen Anwendung.

Benötigte CliniMACS-Materialien

Material	Artikel-nummer	Menge
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS Anti-Biotin Reagent	173-01	1 Fläschchen
CliniMACS Tubing Set	161-01	1 Schlauchset
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	3×1.000-mL-Beutel[1]

1 Vor Gebrauch den Puffer mit HSA auf eine Endkonzentration von 0,5% (w/v) einstellen.

Tabelle 6.37: Benötigte CliniMACS Materialien zur Anreicherung von CD1c-(BDCA-1-) positiven Zellen (Teil 2)

Weitere erforderliche Materialien

Bezüglich der zusätzlich benötigten Materialien siehe Teil 1.

▶ Vorbereitung der Beutel

Das Gewicht des leeren Cell Collection Bag und Cell Preparation Bag gemäß der Beschreibung in Abschnitt 7.1.1 auf Seite 121 ermitteln.

Magnetische Markierung von Zellen (CD19-depletiertes Zellprodukt (Teil 2))

Eine ausführliche Beschreibung der folgenden Schritte finden Sie in Abschnitt 7.1 “SCHRITT 1: Zellpräparation und magnetische Markierung” auf Seite 121.

▶ Transfer des CD19-depletierten zellulären Ausgangsmaterials in den Cell Preparation Bag, Teil 2

▶ Verdünnung des CD19-depletierten zellulären Ausgangsmaterials

Puffer zugeben: Gewicht des Pufferzusatzes = 600 g – Gewicht des CD19-depletierten zellulären Ausgangsmaterials

▶ Zentrifugation

Zentrifugieren bei 300×g, ohne Bremse, 15 Minuten, Raumtemperatur (RT: +19 °C bis +25 °C [+66 °F bis +77 °F]).

▶ Volumeneinstellung: Markierungsvolumen 95 g (± 5 g)

1. Überstand abnehmen, um die Probe nach folgender Gleichung einzustellen: Gewicht des abzunehmenden Überstands = Gewicht des verdünnten Zellprodukts – Markierungsvolumen
2. Das Zellpellet resuspendieren.

▶ Inkubation mit dem CliniMACS Anti-Biotin Reagent

1. 1 Fläschchen CliniMACS Anti-Biotin Reagent zugeben. Den Inhalt behutsam mischen.
2. Auf dem Taumelschüttler für 30 Minuten bei RT inkubieren (25 rpm).

▶ Entfernung von überschüssigem Reagenz

1. Cell Preparation Bag, Teil 2, mit Puffer füllen.
2. Zentrifugieren (300×g, ohne Bremse, 15 Minuten, RT).
3. So viel Überstand wie möglich abnehmen.
4. Das Zellpellet resuspendieren.
5. Cell Preparation Bag, Teil 2, mit Puffer füllen.
6. Zentrifugieren (300×g, ohne Bremse, 15 Minuten, RT).

7. So viel Überstand wie möglich abnehmen.
8. Das Zellpellet resuspendieren.
9. Das Auftragsvolumen auf 100 g einstellen.

6.13.2 SCHRITT 2: Wahl des Separationsprogramms

- **Einschalten des CliniMACS Plus Instruments**
- **Wahl des Separationsprogramms ENRICHMENT 3.2**

Siehe Abschnitt 7.2.4 auf Seite 143.

6.13.3 SCHRITT 3: Installation von CliniMACS Schlauchsets

- **CliniMACS Tubing Set und CliniMACS Tubing Set LS**

Siehe Abschnitt 7.3.1 auf Seite 157.

6.13.4 SCHRITT 4: CliniMACS Plus Separation

- **Separationsverfahren**
- **Trennen der Beutel und Notieren des Prozesscodes**
- **Deinstallieren des Schlauchsets und Abschalten**
- **Analyse der Zellen**

Siehe Abschnitt 7.4.3 auf Seite 202.

6.14 Anreicherung von CD304-(BDCA-4-) positiven Zellen

Das CliniMACS Plus CD304 (BDCA-4) System mit dem CliniMACS Plus Instrument, CliniMACS CD304 (BDCA-4) Reagent, CliniMACS Tubing Set und CliniMACS PBS/EDTA Buffer ist zur *In-vitro*-Anreicherung von humanen CD304-(BDCA-4-) positiven Zellen aus heterogenen hämatologischen Zellpopulationen bestimmt.

6.14.1 SCHRITT 1: Zellpräparation und magnetische Markierung

Erste erforderliche Aktionen

Anwendungskapazität

Bis zu $0{,}2\times10^9$ CD304-(BDCA-4-) positive Zellen aus bis zu 40×10^9 Gesamtzellen (WBC)

⚠ VORSICHT

Risiko einer ungenügenden Leistung in Bezug auf die Separation markierter Zellen. Wenn die Anwendungsspezifikationen überschritten werden, besteht das Risiko einer ungenügenden spezifischen Markierung. Verwenden Sie die benötigte Menge an Zellen und Reagenz gemäß der Beschreibung der jeweiligen Anwendung.

Benötigte CliniMACS-Materialien

Material	Artikel-nummer	Menge
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS CD304 (BDCA-4) Reagent	278-01	1 Fläschchen
CliniMACS Tubing Set	161-01	1 Schlauchset
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	4×1.000-mL-Beutel[1]

1 Vor Gebrauch den CliniMACS PBS/EDTA Buffer mit HSA auf eine Endkonzentration von 0,5% (w/v) einstellen.

Tabelle 6.38: Benötigte CliniMACS Materialien zur Anreicherung von CD304-(BDCA-4-) positiven Zellen

Weitere erforderliche Materialien

- **Cell Preparation Bag:**
  ein 600-mL-Transferbeutel, geeignet zur Zentrifugation, sowie ein Sampling Site Coupler und drei Plasma-Transfersets für das Zellpräparationsverfahren
- **Plasma Waste Bags und Wash Waste Bags:**
  fünf 600-mL-Transferbeutel, geeignet zur Zentrifugation

Cell Collection Bag:
ein 150-mL-Transferbeutel in Kombination mit einem Luer/Spike Interconnector zur Verbindung des Cell Collection Bag mit dem Schlauchset

- ein Vorfilter
- Schlauchklemmen
- Spritzen (verschiedene Größen) und hypodermische 20-G-Injektionsnadeln
- Humanes Serumalbumin (HSA) als Zusatz zum CliniMACS PBS/EDTA Buffer bis zu einer Endkonzentration von 0,5% (w/v)
- Probenröhrchen

▶ Vorbereitung der Beutel

Das Gewicht des leeren Cell Collection Bag und Cell Preparation Bag gemäß der Beschreibung in Abschnitt 7.1.1 auf Seite 121 ermitteln.

Magnetische Markierung von Zellen

Eine ausführliche Beschreibung der folgenden Schritte finden Sie in Abschnitt 7.1 “SCHRITT 1: Zellpräparation und magnetische Markierung” auf Seite 121.

▶ Analyse des zellulären Ausgangsmaterials

▶ Transfer des zellulären Ausgangsmaterials in den Cell Preparation Bag

▶ Verdünnung des depletierten zellulären Ausgangsmaterials

Puffer zugeben: Gewicht des Pufferzusatzes = 600 g – Gewicht des zellulären Ausgangsmaterials

▶ Zentrifugation

Zentrifugieren bei 200×g, ohne Bremse, 15 Minuten, Raumtemperatur (RT: +19 °C bis +25 °C [+66 °F bis +77 °F]).

▶ Die Schritte „Verdünnung des zellulären Ausgangsmaterials“ und „Zentrifugation“ zweimal wiederholen

1. Einen Transferbeutel auf 600 g auffüllen
2. Zentrifugieren bei 300×g ohne Bremse, 15 Minuten, Raumtemperatur (RT: +19 °C bis +25 °C [+66 °F bis +77 °F]).
3. Überstand abnehmen.

▶ **Volumeneinstellung: Markierungsvolumen 95 g (± 5 g)**

1. Überstand vollständig abnehmen, wobei darauf zu achten ist, dass das Zellpellet nicht resuspendiert wird.
2. Das Zellpellet nach Entfernung des Überstands vorsichtig resuspendieren.
3. Das Gewicht des Cell Preparation Bag (CPB) durch Zugabe von Puffer nach folgender Gleichung einstellen: Zielgewicht des gefüllten CPB = 95 g + Gewicht des leeren CPB.
4. Das Zellpellet resuspendieren.

▶ **Inkubation mit dem CliniMACS CD304 (BDCA-4) Reagent**

1. 1 Fläschchen CliniMACS CD304 (BDCA-4) Reagent zugeben. Den Inhalt behutsam mischen.
2. Auf dem Taumelschüttler für 30 Minuten bei RT inkubieren (25 rpm).

▶ **Entfernung von überschüssigem Reagenz**

1. Cell Preparation Bag mit Puffer füllen.
2. Zentrifugieren (300×g, ohne Bremse, 15 Minuten, RT).
3. So viel Überstand wie möglich abnehmen.
4. Das Zellpellet resuspendieren.
5. Das Auftragsvolumen auf 100 g einstellen.

6.14.2 SCHRITT 2: Wahl des Separationsprogramms

▶ **Einschalten des CliniMACS Plus Instruments**

▶ **Wahl des Separationsprogramms ENRICHMENT 3.2**

Siehe Abschnitt 7.2.4 auf Seite 143.

6.14.3 SCHRITT 3: Installation von CliniMACS Schlauchsets

▶ **CliniMACS Tubing Set und CliniMACS Tubing Set LS**

Siehe Abschnitt 7.3.1 auf Seite 157.

6.14.4 SCHRITT 4: CliniMACS Plus Separation

- **Separationsverfahren**
- **Trennen der Beutel und Notieren des Prozesscodes**
- **Deinstallieren des Schlauchsets und Abschalten**
- **Analyse der Zellen**

Siehe Abschnitt 7.4.3 auf Seite 202.

6.15 Depletion von TCRα/β-positiven Zellen

Das CliniMACS Plus TCRα/β-Biotin System mit dem CliniMACS Plus Instrument, CliniMACS TCRα/β-Biotin, CliniMACS Anti-Biotin Reagent, CliniMACS Depletion Tubing Set und CliniMACS PBS/EDTA Buffer ist zur *In-vitro*-Depletion von humanen TCRα/β-positiven Zellen aus heterogenen hämatologischen Zellpopulationen bestimmt.

6.15.1 SCHRITT 1: Zellpräparation und magnetische Markierung

Erste erforderliche Aktionen

Anwendungskapazität

Bis zu 24×10^9 TCRα/β-positive Zellen aus bis zu 60×10^9 Gesamtzellen (WBC)

⚠ VORSICHT

Risiko einer ungenügenden Leistung in Bezug auf die Separation markierter Zellen. Wenn die Anwendungsspezifikationen überschritten werden, besteht das Risiko einer ungenügenden spezifischen Markierung. Verwenden Sie die benötigte Menge an Zellen und Reagenz gemäß der Beschreibung der jeweiligen Anwendung.

Benötigte CliniMACS-Materialien

Material	Artikel-nummer	Menge
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS TCRα/β-Biotin	701-48	1 Fläschchen
CliniMACS Anti-Biotin Reagent	173-01	2 Fläschchen
CliniMACS Depletion Tubing Set	261-01	1 Schlauchset
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	Bis zu 4×1.000-mL-Beutel[1]

1 Vor Gebrauch den CliniMACS PBS/EDTA Buffer mit HSA auf eine Endkonzentration von 0,5% (w/v) einstellen.

Tabelle 6.39: Benötigte CliniMACS Materialien zur Depletion von TCRα/β-positiven Zellen

Weitere erforderliche Materialien

- **Cell Preparation Bag:**
  ein 600-mL-Transferbeutel, geeignet zur Zentrifugation, sowie ein Sampling Site Coupler und zwei Plasma-Transfersets für das Zellpräparationsverfahren
- **Plasma Waste Bags und Wash Waste Bags:**
  vier 600-mL- (oder 1.000-mL-)Transferbeutel, geeignet zur Zentrifugation
- **Cell Collection Bag:**
  Ein 600-mL-Cell Collection Bag ist bereits am CliniMACS Depletion Tubing Set vormontiert.
- ein Vorfilter
- Schlauchklemmen
- Spritzen (verschiedene Größen) und hypodermische 20-G-Injektionsnadeln
- Humanes Serumalbumin (HSA) als Zusatz zum CliniMACS PBS/EDTA Buffer bis zu einer Endkonzentration von 0,5% (w/v)
- Probenröhrchen

▶ Vorbereitung der Beutel

Das Gewicht des leeren Cell Collection Bag und Cell Preparation Bag gemäß der Beschreibung in Abschnitt 7.1.1 auf Seite 121 ermitteln.

Magnetische Markierung von Zellen

Eine ausführliche Beschreibung der folgenden Schritte finden Sie in Abschnitt 7.1 “SCHRITT 1: Zellpräparation und magnetische Markierung” auf Seite 121.

Analyse des zellulären Ausgangsmaterials

Den prozentualen Anteil aller TCRα/β-markierten Zellen an der Gesamtzahl der Zellen (einschließlich der unspezifischen TCRα/β-Bindung, nicht nur der echten TCRα/β-positiven Zellen) bestimmen. Diese Anzahl für die Anwendungsspezifikationen und bei der Eingabe der Probenparameter (siehe SCHRITT 2) berücksichtigen.

Transfer des zellulären Ausgangsmaterials in den Cell Preparation Bag

Verdünnung des zellulären Ausgangsmaterials

Puffer zugeben: Gewicht des Pufferzusatzes = Gewicht des zellulären Ausgangsmaterials × 2

Zentrifugation

1. Zentrifugieren bei 200×g, ohne Bremse, 15 Minuten, Raumtemperatur (RT: +19 °C bis +25 °C)
2. Überstand abnehmen.

Volumeneinstellung: Markierungsvolumen 95 g (± 5 g)

1. Überstand vollständig abnehmen, wobei darauf zu achten ist, dass das Zellpellet nicht resuspendiert wird.
2. Das Zellpellet nach Entfernung des Überstands vorsichtig resuspendieren.
3. Das Gewicht des Cell Preparation Bag (CPB) durch Zugabe von Puffer nach folgender Gleichung einstellen: Zielgewicht des gefüllten CPB = 95 g + Gewicht des leeren CPB
4. Das Zellpellet resuspendieren.

Markierung der Zellen: Inkubation mit dem CliniMACS TCRα/β-Biotin

1. 1 Fläschchen CliniMACS TCRα/β-Biotin zugeben. Den Inhalt behutsam mischen.
2. Auf dem Taumelschüttler für 30 Minuten bei RT inkubieren (25 rpm).

Entfernung von überschüssigem Konjugat: diesen Schritt wiederholen

1. Cell Preparation Bag mit Puffer füllen.
2. Zentrifugieren (300×g, ohne Bremse, 15 Minuten, RT).
3. So viel Überstand wie möglich abnehmen.
4. Das Zellpellet resuspendieren und das Gewicht auf 190 g nach dem zweiten Spülen einstellen.

- **Magnetische Markierung der Zellen: Inkubation mit dem CliniMACS Anti-Biotin Reagent**

  1. 2 Fläschchen CliniMACS Anti-Biotin Reagent zugeben. Den Inhalt behutsam mischen.
  2. Auf dem Taumelschüttler für 30 Minuten bei RT inkubieren (25 rpm).

- **Entfernung von überschüssigem Reagenz**

  1. Cell Preparation Bag mit Puffer füllen.
  2. Zentrifugieren (300×g, ohne Bremse, 15 Minuten, RT).
  3. So viel Überstand wie möglich abnehmen. **Hinweis:** Mindestens 500 g Überstand abnehmen. Werden weniger als 500 g Überstand abgenommen, werden insgesamt zwei Spülschritte (anstelle von nur einem) empfohlen. Anderenfalls wird eventuell zu wenig ungebundenes Reagenz entfernt.
  4. Das Zellpellet resuspendieren.
  5. Das Auftragsvolumen auf 150 g einstellen. Eine maximale WBC-Konzentration von $0{,}4\times10^9$ WBC/mL wird empfohlen.

6.15.2 SCHRITT 2: Wahl des Separationsprogramms

- **Einschalten des CliniMACS Plus Instruments**
- **Wahl des Separationsprogramms DEPLETION 3.1**
- **Eingabe der Probenparameter**

Siehe Abschnitt 7.2.6 auf Seite 151.

6.15.3 SCHRITT 3: Installation von CliniMACS Schlauchsets

- **CliniMACS Depletion Tubing Set**

Siehe Abschnitt 7.3.3 auf Seite 178.

6.15.4 SCHRITT 4: CliniMACS Plus Separation

- **Separationsverfahren**
- **Trennen der Beutel und Notieren des Prozesscodes**
- **Deinstallieren des Schlauchsets und Abschalten**

▶ Analyse der Zellen

Siehe Abschnitt 7.4.5 auf Seite 210.

6.16 Depletion von CD45RA-positiven Zellen

Das CliniMACS Plus CD45RA System mit dem CliniMACS Plus Instrument, CliniMACS CD45RA Reagent, CliniMACS Depletion Tubing Set und CliniMACS PBS/EDTA Buffer ist zur *In-vitro*-Depletion von humanen CD45RA-positiven Zellen aus heterogenen hämatologischen Zellpopulationen bestimmt.

6.16.1 SCHRITT 1: Zellpräparation und magnetische Markierung

Erste erforderliche Aktionen

Anwendungskapazität

Bis zu 20×10^9 CD45RA-positive Zellen aus bis zu 50×10^9 Gesamtzellen (WBC)

⚠ VORSICHT

Risiko einer ungenügenden Leistung in Bezug auf die Separation markierter Zellen. Wenn die Anwendungsspezifikationen überschritten werden, besteht das Risiko einer ungenügenden spezifischen Markierung. Verwenden Sie die benötigte Menge an Zellen und Reagenz gemäß der Beschreibung der jeweiligen Anwendung.

Benötigte CliniMACS-Materialien

Material	Artikel-nummer	Menge
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS CD45RA Reagent	701-46	1 Fläschchen
CliniMACS Depletion Tubing Set	261-01	1 Schlauchset
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	3×1.000-mL-Beutel[1]

1 Vor Gebrauch den CliniMACS PBS/EDTA Buffer mit HSA auf eine Endkonzentration von 0,5% (w/v) einstellen.

Tabelle 6.40: Benötigte CliniMACS Materialien zur Depletion von CD45RA-positiven Zellen

Weitere erforderliche Materialien

- **Cell Preparation Bags:**
  ein 600-mL-Transferbeutel, geeignet zur Zentrifugation, sowie ein Sampling Site Coupler und zwei Plasma-Transfersets für das Zellpräparationsverfahren
- **Plasma Waste Bags und Wash Waste Bags:**
  zwei 600-mL-Transferbeutel geeignet zur Zentrifugation

- **Cell Collection Bag:**
  Ein 600-mL-Cell Collection Bag ist bereits am CliniMACS Depletion Tubing Set vormontiert.
- ein Vorfilter
- Schlauchklemmen
- Spritzen (verschiedene Größen) und hypodermische 20-G-Injektionsnadeln
- Humanes Serumalbumin (HSA) als Zusatz zum CliniMACS PBS/EDTA Buffer bis zu einer Endkonzentration von 0,5% (w/v)
- Probenröhrchen

WICHTIG

Eine alternative Quelle von Ausgangszellen kann die Nicht-Zielzellen-Fraktion einer CliniMACS Plus CD34-Separation sein. Die Verwendung des CliniMACS CD45RA Reagent wird nur für zelluläres Ausgangsmaterial empfohlen, das CD45RA-positive Zellen im normalen Häufigkeitsbereich (bis zu 80%) enthält. Höhere Häufigkeiten sind bei einigen Spendern beobachtet worden, bei denen CD45RA aufgrund einer seltenen Mutation im CD45-Gen von fast allen PBMC exprimiert wird. In diesen Fällen kann die Depletionseffizienz und/oder Wiedergewinnung unzureichend sein.

▶ Vorbereitung der Beutel

Das Gewicht des leeren Cell Collection Bag und Cell Preparation Bag gemäß der Beschreibung in Abschnitt 7.1.1 auf Seite 121 ermitteln.

Magnetische Markierung von Zellen

Eine ausführliche Beschreibung der folgenden Schritte finden Sie in Abschnitt 7.1 “SCHRITT 1: Zellpräparation und magnetische Markierung” auf Seite 121.

▶ Analyse des zellulären Ausgangsmaterials

Den prozentualen Anteil aller CD45RA-markierten Zellen an der Gesamtzahl der Zellen (einschließlich der unspezifischen CD45RA-Bindung, nicht nur der echten CD45RA-positiven Zellen) bestimmen. Diese Anzahl für die Anwendungsspezifikationen und bei der Eingabe der Probenparameter (siehe SCHRITT 2) berücksichtigen.

▶ Transfer des zellulären Ausgangsmaterials in den Cell Preparation Bag

▶ Verdünnung des depletierten zellulären Ausgangsmaterials

Puffer zugeben: Gewicht des Pufferzusatzes = Gewicht des zellulären Ausgangsmaterials × 2

▶ Zentrifugation

Zentrifugieren bei 200×g, ohne Bremse, 15 Minuten, Raumtemperatur (RT: +19 °C bis +25 °C [+66 °F bis +77 °F]).

Wenn die Nicht-Zielzellen-Fraktion einer CliniMACS CD34-Separation als alternative Quelle des Ausgangsmaterials verwendet wird, kann der Verdünnungsschritt ausgelassen werden. Fahren Sie mit dem Zentrifugationsschritt fort und zentrifugieren Sie die Zellen bei 300×g (ohne Bremse) für 15 Minuten bei RT.

▶ Volumeneinstellung: Markierungsvolumen 95 g (± 5 g)

1. Überstand vollständig abnehmen, wobei darauf zu achten ist, dass das Zellpellet nicht resuspendiert wird.
2. Das Zellpellet nach Entfernung des Überstands vorsichtig resuspendieren.
3. Das Gewicht des Cell Preparation Bag (CPB) durch Zugabe von Puffer nach folgender Gleichung einstellen: Zielgewicht des gefüllten CPB = 95 g + Gewicht des leeren CPB
4. Das Zellpellet resuspendieren.

▶ Inkubation mit dem CliniMACS CD45RA Reagent

1. 1 Fläschchen CliniMACS CD45RA Reagent zugeben. Den Inhalt behutsam mischen.
2. Auf dem Taumelschüttler für 30 Minuten bei RT inkubieren (25 rpm).

▶ Entfernung von überschüssigem Reagenz

1. Cell Preparation Bag mit Puffer füllen.
2. Zentrifugieren (300×g, ohne Bremse, 15 Minuten, RT).
3. So viel Überstand wie möglich abnehmen. **Hinweis:** Mindestens 500 g Überstand abnehmen. Werden weniger als 500 g Überstand abgenommen, werden insgesamt zwei Spülschritte (anstelle von nur einem) empfohlen. Anderenfalls wird eventuell zu wenig ungebundenes Reagenz entfernt.
4. Das Zellpellet resuspendieren.
5. Das Auftragsvolumen einstellen. Das Gewicht des benötigten Puffers zur Einstellung des Gewichts der Zellsuspension auf ca. 125 g berechnen. Die Zellkonzentration sollte $0{,}4\times10^9$ WBC/mL nicht überschreiten: Gewicht des Pufferzusatzes (g) = 125 g – Gewicht des Zellprodukts nach dem Spülen (g)

6.16.2 SCHRITT 2: Wahl des Separationsprogramms

▶ Einschalten des CliniMACS Plus Instruments

▶ Wahl des Separationsprogramms DEPLETION 3.1

▶ Eingabe der Probenparameter

Siehe Abschnitt 7.2.6 auf Seite 151.

6.16.3 SCHRITT 3: Installation von CliniMACS Schlauchsets

- **CliniMACS Depletion Tubing Set**

Siehe Abschnitt 7.3.3 auf Seite 178.

6.16.4 SCHRITT 4: CliniMACS Plus Separation

- **Separationsverfahren**
- **Trennen der Beutel und Notieren des Prozesscodes**
- **Deinstallieren des Schlauchsets und Abschalten**
- **Analyse der Zellen**

Siehe Abschnitt 7.4.5 auf Seite 210.

6.17 Anreicherung von humanen IFN-gamma-sezernierenden Zellen mit dem CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma)

Das CliniMACS Plus CCS (IFN-gamma) System mit dem CliniMACS Plus Instrument, CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma), CliniMACS Tubing Set und CliniMACS PBS/EDTA Buffer ist zur *In-vitro*-Anreicherung von humanen IFN-gamma-sezernierenden Zellen aus heterogenen hämatologischen Zellpopulationen bestimmt.

6.17.1 SCHRITT 1: Zellpräparation und magnetische Markierung

Erste erforderliche Aktionen

Anwendungskapazität

IFN-gamma-sezernierende Zellen aus bis zu 1×10^9 Gesamtzellen (WBC)

⚠ VORSICHT

Risiko einer ungenügenden Leistung in Bezug auf die Separation markierter Zellen. Wenn die Anwendungsspezifikationen überschritten werden, besteht das Risiko einer ungenügenden spezifischen Markierung. Verwenden Sie die benötigte Menge an Zellen und Reagenz gemäß der Beschreibung der jeweiligen Anwendung.

Benötigte CliniMACS-Materialien

Material	Artikel-nummer	Menge
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma)	279-01	1 Set
CliniMACS Tubing Set	161-01	1 Schlauchset
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	3×1.000-mL-Beutel[1]

1 Vor Gebrauch den CliniMACS PBS/EDTA Buffer mit HSA auf eine Endkonzentration von 0,5% (w/v) einstellen.

Tabelle 6.41: Benötigte CliniMACS Materialien zur Anreicherung von humanen IFN-gamma-sezernierenden Zellen

WICHTIG

Den Puffer für die Zellpräparation kalt bei +2 °C bis +8 °C (+36 °F bis +46 °F) lagern. Niedrigere oder höhere Umgebungstemperaturen können zu geringerer Reinheit und Ausbeute der Zielzellen führen.

Weitere erforderliche Materialien

- **Cell Preparation Bags:**
  zwei 600-mL-Transferbeutel, geeignet zur Zentrifugation, sowie zwei Sampling Site Coupler und zwei Plasma-Transfersets für das Zellpräparationsverfahren
- **Plasma Waste Bags und Wash Waste Bags:**
  neun 600-mL-Transferbeutel, geeignet zur Zentrifugation
- **Mediumbeutel:**
  acht 600-mL-Transferbeutel, geeignet zur Zentrifugation
- **Cell Collection Bag (Teil 2):**
  ein 150-mL-Transferbeutel, geeignet zur Zentrifugation, in Kombination mit einem Luer/Spike Interconnector zur Verbindung des Transferbeutels mit dem Schlauchset
- ein gasdurchlässiger 100-mL-Zellkulturbeutel
- ein Vorfilter
- Schlauchklemmen
- Spritzen (verschiedene Größen) und hypodermische 20-G-Injektionsnadeln
- Humanes Serumalbumin (HSA) als Zusatz zum CliniMACS PBS/EDTA Buffer bis zu einer Endkonzentration von 0,5% (w/v)
- Probenröhrchen
- 120 mL AB-Serum oder alternativ autologes Serum als Zusatz für die verwendeten Medien
- 1.000 mL Zellkulturmedium (RPMI 1640), +4 °C (+39 °F)
- 1.100 mL Zellkulturmedium (RPMI 1640), +37 °C (+99 °F), supplementiert mit 10% (v/v) AB-Serum oder alternativ autologem Serum

- 500 mL Zellkulturmedium (RPMI 1640, +4 °C (+39 °F), supplementiert mit 2% (v/v) AB-Serum oder alternativ autologem Serum

▶ Erforderliche Ausrüstung

Informationen zur benötigten Ausrüstung für eine CliniMACS Plus Separation finden Sie in Abschnitt 4.7.

Benötigte zusätzliche Ausrüstung für eine Anwendung unter Einsatz des CliniMACS Plus CCS (IFN-gamma) Systems:

- 24-Well-Kulturschale
- MiniMACS Separationseinheit
- MS-Säulen
- Pre-Separation Filter (nur für MS-Säulen)
- MACSmix Tube Rotator

▶ Vorbereitung der Beutel

Das Gewicht des leeren Cell Collection Bag und Cell Preparation Bag gemäß der Beschreibung in Abschnitt 7.1.1 auf Seite 121 ermitteln.

Hinweis: Die Zentrifuge auf +4 °C (+39 °F) vorkühlen. Nach der Sekretionsphase wird ein dritter Cell Preparation Bag zur Rekombination der Zellsuspensionen benötigt. Kennzeichnen Sie deshalb einen der vier 600-mL-Transferbeutel (vorbereitet mit 125 mL Medium (RPMI), supplementiert mit 10% AB-Serum) als **Cell Preparation Bag Nr. 3 (Separation)**.

Präparation des zellulären Ausgangsmaterials

Die folgenden Abschnitte beschreiben das empfohlene Beutelverfahren für die Präparation des zellulären Ausgangsmaterials unter Verwendung des Schweißgerätes für sterile Schläuche.

- Der Anwender muss mit der Bedienung und Verwendung des Schweißgerätes für sterile Schläuche vertraut sein.
- Vor Beginn des Zellmarkierungs- und Zellseparationsverfahrens ist sicherzustellen, dass sämtliches benötigtes Verbrauchsmaterial und die gesamte benötigte Ausrüstung verfügbar sind.

Transfer des zellulären Ausgangsmaterials in den Cell Preparation Bag Nr. 1

1. Das Datum und die Uhrzeit des Beginns notieren, bevor Sie mit der Vorbereitung des zellulären Ausgangsmaterials beginnen.
2. Das Volumen des zellulären Ausgangsmaterials bestimmen, indem 1 mL Ausgangsmaterial als Entsprechung zu 1 g betrachtet wird (1 g ≙ 1 mL).

3. Den Beutel mit dem zellulären Ausgangsmaterial mit beiden Händen halten und den Inhalt mit einer sanften Rotationsbewegung gründlich mischen.

4. Mithilfe des Schweißgerätes für sterile Schläuche den Cell Preparation Bag Nr. 1 mit dem Beutel, der das zelluläre Ausgangsmaterial enthält, verbinden.

5. Die Schlauchklemme öffnen, um das entsprechende Gewicht an zellulärem Ausgangsmaterial (das maximal 1×10^9 Zellen entsprechend der zuvor bestimmten Leukozytenhäufigkeit enthält) in den Cell Preparation Bag Nr. 1 zu transferieren. Visuell kontrollieren (anhand der Skala), ob das entsprechende Gewicht transferiert wurde. Die Schlauchklemme nahe dem (am) Cell Preparation Bag schließen.

6. Den Schlauch hermetisch verschließen und die Beutel trennen; dabei mindestens 15 cm Schlauch am Cell Preparation Bag Nr. 1 für weitere Verbindungen belassen (siehe Abbildung 6.1). Mit dem Schweißgerät drei nebeneinander liegende Verschlüsse im Schlauch anlegen. Darauf achten, dass die Verschlüsse vollständig sind. Am mittleren Verschluss abtrennen. Den Beutel, der das zelluläre Ausgangsmaterial enthielt, aufbewahren, bis die Separation und die Abschlussanalyse aller Zellen abgeschlossen ist.

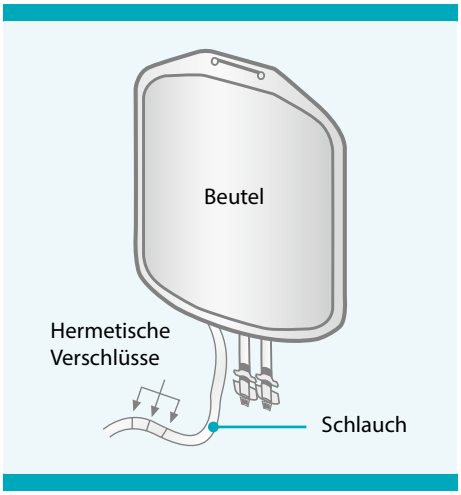


Abbildung 6.1: Verschließen eines Beutels

7. Die Waage tarieren. Den gefüllten Cell Preparation Bag Nr. 1 auf die Waage legen, und den Schlauch auf dem Tisch liegen lassen. Das Gewicht des gefüllten Cell Preparation Bag Nr. 1 notieren.

8. Das Gewicht des zellulären Ausgangsmaterials durch Subtrahieren des Gewichts des leeren Cell Preparation Bag Nr. 1 vom Gewicht des mit dem ursprünglichen zellulären Ausgangsmaterial gefüllten Cell Preparation Bag Nr. 1 bestimmen. Das berechnete Gewicht notieren.

Gewicht des zellulären Ausgangsmaterials (g)	=	Gewicht des gefüllten Cell Preparation Bag Nr. 1 (g)	–	Gewicht des leeren Cell Preparation Bag Nr. 1 (g)

Verdünnung des zellulären Ausgangsmaterials

Das zelluläre Ausgangsmaterial muss mit Kulturmedium verdünnt werden. Das Ausgangsmaterial mit kaltem Medium (+2 °C bis +8 °C [+36 °F bis +46 °F]) auf ein Gesamtvolumen von 500 mL verdünnen. Das Gewicht des Mediumzusatzes nach folgender Gleichung berechnen und notieren.

Gewicht des Mediumzusatzes (g)	=	500 g	–	Gewicht des verdünnten zellulären Ausgangsmaterials (g)

1. Einen der Mediumbeutel nehmen und mithilfe des Schweißgerätes für sterile Schläuche mit dem Cell Preparation Bag Nr. 1 verbinden.
2. Den Cell Preparation Bag Nr. 1 auf die Waage legen und die Waage tarieren. Den Mediumbeutel an einen Beutelhalter hängen.
3. Die Schlauchklemme nahe dem (am) Cell Preparation Bag Nr. 1 öffnen. Durch visuelle Kontrolle der Skala auf der Waage das berechnete Gewicht an Medium in den Cell Preparation Bag Nr. 1 transferieren.
4. Wenn das korrekte Gewicht an Medium transferiert wurde, die Schlauchklemme nahe dem (am) Cell Preparation Bag Nr. 1 schließen, um den Durchfluss zu stoppen.
5. Den Schlauch mit dem Schweißgerät fest verschließen und dabei mindestens 15 cm Schlauch am Cell Preparation Bag Nr. 1 für weitere Verbindungen belassen. Den Mediumbeutel trennen.
6. Den Cell Preparation Bag Nr. 1 mit beiden Händen halten und den Inhalt mit einer sanften Rotationsbewegung gründlich mischen. Intensives Mischen der Zellen vermeiden.
7. Die Waage tarieren und den gefüllten Cell Preparation Bag Nr. 1 wiegen. Das Gewicht notieren.
8. Das Gewicht des verdünnten zellulären Ausgangsmaterials durch Subtrahieren des Gewichts des leeren Cell Preparation Bag Nr. 1 vom Gewicht des gefüllten Cell Preparation Bag Nr. 1 bestimmen. Das berechnete Gewicht notieren.

Gewicht des verdünnten zellulären Ausgangsmaterials (g)	=	Gewicht des gefüllten Cell Preparation Bag Nr. 1 (g)	–	Gewicht des leeren Cell Preparation Bag Nr. 1 (g)

⚠ WARNUNG

Kontaminationsgefahr. Wenn die Beutel nicht für die Zellpräparation geeignet sind oder nicht korrekt in den Zentrifugenbecher platziert werden, besteht Kontaminationsgefahr durch Beschädigung eines Beutels. Verwenden Sie geeignete Beutel, knicken Sie lose Teile der Beutel oder Schläuche nach unten, wobei darauf zu achten ist, dass der Beutel unversehrt bleibt, und platzieren Sie die Beutel sicher in den Zentrifugenbecher.

⚠ VORSICHT

Risiko einer verminderten Zellseparationsleistung. Wenn die Beutel nicht korrekt in den Zentrifugenbecher platziert werden, besteht das Risiko eines Zellverlustes beim Abnehmen des Überstands. Knicken Sie lose Teile der Beutel oder Schläuche nach unten und platzieren Sie die Beutel sicher in den Zentrifugenbecher.

Zentrifugation

1. Mit dem Schweißgerät für sterile Schläuche den leeren Plasma Waste Bag Nr. 1 mit dem Cell Preparation Bag Nr. 1 verbinden.
2. Lose Teile des Cell Preparation Bag Nr. 1 oder Schläuche nach unten knicken. Die zwei Beutel sicher in den Zentrifugenbecher platzieren.
3. Den beladenen Becher mit einem entsprechend beschwerten Becher ausbalancieren. Es ist wichtig, dass die Zentrifuge genau ausbalanciert ist.
4. Die Zellen mit 200×g (ohne Bremse) für 10 Minuten bei Raumtemperatur (RT: +19 °C bis +25 °C [+66 °F bis +77 °F]). zentrifugieren.
5. Die Beutel aus der Zentrifuge nehmen und dabei darauf achten, dass das Zellpellet nicht zerstört wird. Den Cell Preparation Bag Nr. 1 auf den Plasmaextraktor laden.
6. Die Schlauchklemme nahe dem (am) Cell Preparation Bag Nr. 1 öffnen. Den Überstand vollständig abnehmen, wobei darauf zu achten ist, dass dabei das Zellpellet nicht resuspendiert wird. Wenn der Überstand entfernt ist, die Schlauchklemme nahe dem (am) Cell Preparation Bag Nr. 1 schließen, um den Durchfluss zu stoppen.
7. Den Schlauch mit dem Schweißgerät fest verschließen und dabei mindestens 15 cm Schlauch am Cell Preparation Bag Nr. 1 für weitere Verbindungen belassen. Den Plasma Waste Bag Nr. 1 trennen.
8. Die Verdünnung und Zentrifugation mit dem zweiten, mit kaltem Medium vorbereiteten Mediumbeutel und dem Plasma Waste Bag Nr. 2 wiederholen.
9. Die Plasma Waste Bags aufbewahren, bis die Separation und die Abschlussanalyse aller Zellen abgeschlossen ist.

Volumeneinstellung

1. Für die *In-vitro*-Restimulation der Zellen muss das Volumen der Zellprobe auf 100 mL eingestellt werden. Wenn der Überstand entfernt wurde, das Pellet vorsichtig resuspendieren.
2. Das Gewicht des Cell Preparation Bag Nr. 1 durch Zugabe von Kulturmedium einstellen. Das Gewicht des Mediumzusatzes nach folgender Gleichung berechnen:

Gewicht des gefüllten Cell Preparation Bag Nr. 1 nach Volumeneinstellung (g)	=	100 g	+	Gewicht des leeren Cell Preparation Bag Nr. 1 (g)

3. Mithilfe des Schweißgerätes für sterile Schläuche den Cell Preparation Bag Nr. 1 mit dem vorbereiteten Mediumbeutel 10% (der 600 mL vorgewärmtes Kulturmedium, supplementiert mit 10% AB-Serum, enthält) verbinden. Den Mediumbeutel 10% an einen Beutelhalter hängen.
4. Die Waage tarieren. Den Cell Preparation Bag Nr. 1 mit dem Zellpellet auf die Waage legen.

5. Die Schlauchklemme nahe dem (am) Cell Preparation Bag Nr. 1 öffnen. Den Cell Preparation Bag Nr. 1 mit Medium füllen, bis das berechnete „Gewicht des gefüllten Cell Preparation Bag Nr. 1 nach Volumeneinstellung" erreicht ist. Die Schlauchklemme nahe dem (am) Cell Preparation Bag Nr. 1 schließen, um den Durchfluss zu stoppen.
6. Den Schlauch mit dem Schweißgerät fest verschließen und dabei mindestens 15 cm Schlauch am Cell Preparation Bag für weitere Verbindungen belassen. Den Mediumbeutel 10% trennen.
7. Mithilfe des Schweißgerätes für sterile Schläuche den gefüllten Cell Preparation Bag Nr. 1 mit einem gasdurchlässigen 100-mL-Kulturbeutel verbinden. Die Schlauchklemme nahe dem (am) Cell Preparation Bag Nr. 1 öffnen und den Inhalt vollständig transferieren.

   ⚠ VORSICHT

   Risiko einer verminderten Leistung. Wenn die Beutel nicht für die Zellpräparation geeignet sind, besteht Kontaminationsgefahr durch Beschädigung eines Beutels. Verwenden Sie gasdurchlässige Kulturbeutel, die für die Zellpräparation geeignet sind.

Markierung der Zellen

Ein CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma), bestehend aus zwei Fläschchen (je 7,5 mL), ist gebrauchsfertig und genügt für eine wie unten beschriebene Anwendung. Die Reagenzien sind nicht zur parenteralen Verabreichung bestimmt.

Zielprobe und Kontrollprobe

Das Protokoll beschreibt das Markierungsverfahren der „Zielprobe" und der „Kontrollprobe". Beide Proben werden parallel verarbeitet, wobei die Kontrollprobe genau gleich wie die Zielprobe behandelt wird, nur ohne Zugabe von Antigen. Deshalb gibt die Analyse der Kontrollprobe Auskunft über die spontane Zytokinsekretion.

In-vitro-Restimulation

WICHTIG

- *Eine kleine negative Kontrollprobe (Kontrollprobe), die genau gleich wie die antigenstimulierte Zielprobe behandelt wird, nur ohne Zugabe von Antigen, sollte zur Messung der spontanen Zytokinsekretion mitgeführt werden.*
- *Die optimale Zelldichte für die In-vitro-Restimulation beträgt 0,5–1×10^9 Zellen/cm^2 und 1×10^9 Zellen/mL.*

1. Mithilfe einer sterilen Spritze (1 mL) mit 20-G-Nadel ein kleines Aliquot (z.B. 1 mL = ca. 1×10^9 Zellen) der Zellen als **Kontrollprobe (unstimuliert)** entnehmen.

2. Das Aliquot unter optimalen Bedingungen in einem Well einer 24-Well-Kulturschale kultivieren.
3. Das Antigen mit einer Spritze über einen der Zugänge zu den Zellen im gasdurchlässigen Zellkulturbeutel **(Zielprobe)** in der vorgegebenen Konzentration injizieren.
4. Beide Proben bei +37 °C (+99 °F) und 5–7,5% CO^2 für eine entsprechende Dauer im Inkubator inkubieren. Werden Proteine oder Zelllysate als Antigene verwendet, liegt die Inkubationszeit zwischen 4 und 16 Stunden. Bei Peptiden beträgt die Inkubationszeit 3 bis 6 Stunden. Da die optimale Stimulationsdauer von bestimmten Merkmalen des Antigens abhängt, empfiehlt Miltenyi Biotec, spezielle Validierungsverfahren durchzuführen, um bestmögliche Ergebnisse zu erzielen.

Markierung mit dem CliniMACS IFN-gamma Catchmatrix Reagent

Die Chargennummer und das Verfalldatum des CliniMACS IFN-gamma Catchmatrix Reagent notieren.

Zielprobe

WICHTIG

Für die Sekretionsphase muss das gewählte Gefäß groß genug sein, um die Zugabe von mindestens 1 Volumen kaltem Puffer am Ende der Sekretionsphase zu ermöglichen. Die Zelldichte darf 1×10^6 Zellen/mL nicht überschreiten. Deshalb müssen 1×10^9 Zellen für die Sekretion in insgesamt 1.000 mL warmem Kulturmedium inkubiert werden.

1. Mithilfe des Schweißgerätes für sterile Schläuche den Kulturbeutel mit dem Cell Preparation Bag Nr. 2 (Sekretion) verbinden und die Zellen transferieren. Sicherstellen, dass die Zellen vollständig in den Cell Preparation Bag Nr. 2 transferiert werden. Die Schlauchklemme nahe dem (am) Cell Preparation Bag Nr. 2 schließen, um den Durchfluss zu stoppen.
2. Den Schlauch mit dem Schweißgerät fest verschließen und dabei mindestens 15 cm Schlauch am Cell Preparation Bag Nr. 2 für weitere Verbindungen belassen. Den leeren Kulturbeutel trennen.
3. Mithilfe des Schweißgerätes für sterile Schläuche den vorbereiteten Mediumbeutel 2% (der 500 mL kaltes (+2 bis +8 °C [+36 °F bis +46 °F]) Kulturmedium, supplementiert mit 2% AB-Serum, enthält) mit dem Cell Preparation Bag Nr. 2 verbinden.
4. Die Schlauchklemme nahe dem (am) Cell Preparation Bag Nr. 2 öffnen. Den Cell Preparation Bag Nr. 2 auf 600 mL auffüllen. Wenn das korrekte Gewicht an Medium transferiert wurde, die Schlauchklemme nahe dem (am) Cell Preparation Bag Nr. 2 schließen, um den Durchfluss zu stoppen.
5. Den Schlauch mit dem Schweißgerät fest verschließen und dabei mindestens 15 cm Schlauch am Cell Preparation Bag Nr. 2 für weitere Verbindungen belassen. Den Mediumbeutel 2% trennen.
6. Mit dem Schweißgerät den leeren Wash Waste Bag Nr. 1 mit dem Cell Preparation Bag Nr. 2 verbinden.

7. Lose Teile des Beutels oder Schläuche nach unten knicken. Die zwei Beutel sicher in den Zentrifugenbecher platzieren.
8. Den beladenen Becher mit einem entsprechend beschwerten Becher ausbalancieren. Es ist wichtig, dass die Zentrifuge genau ausbalanciert ist.
9. Die Zellen mit 300×g (ohne Bremse) für 10 Minuten bei +4 °C bis +8 °C [+39 °F bis+46 °F) zentrifugieren.
10. Den Cell Preparation Bag Nr. 2 auf den Plasmaextraktor platzieren. Die Schlauchklemme nahe dem (am) Cell Preparation Bag Nr. 2 öffnen. Den Überstand vollständig abnehmen, wobei darauf zu achten ist, dass das Zellpellet nicht zerstört wird. Die Schlauchklemme nahe dem (am) Cell Preparation Bag Nr. 2 schließen, um den Durchfluss zu stoppen.
11. Den Schlauch mit dem Schweißgerät fest verschließen und dabei mindestens 15 cm Schlauch am Cell Preparation Bag Nr. 2 für weitere Verbindungen belassen. Den Wash Waste Bag Nr. 1 trennen.
12. Das Zellpellet im restlichen Volumen nach Entfernung des Überstands resuspendieren.
13. Einen Sampling Site Coupler am Cell Preparation Bag Nr. 2 anbringen und das Septum desinfizieren. Mit einer geeigneten sterilen Spritze und Nadel 7,425 mL aus dem Fläschchen mit CliniMACS IFN-gamma Catchmatrix Reagent entnehmen. Eine 10-mL-Spritze ist ausreichend, um den Inhalt eines Reagenzfläschchens zu entnehmen. Die Spritze sollte mit einer 20-G-Nadel ausgestattet sein.
14. Den Cell Preparation Bag Nr. 2 mit beiden Händen halten und den Inhalt mit einer sanften Rotationsbewegung gründlich mischen.
15. Durch den Injektionszugang am Sampling Site Coupler das gesamte Volumen des Reagenzes in den Cell Preparation Bag Nr. 2 injizieren. Darauf achten, dass der Beutel nicht durchstoßen wird.
16. Die Zellen resuspendieren und für 5 Minuten auf Eis inkubieren. Die Inkubationszeit notieren.

Kontrollprobe (unstimuliert)

1. Die Zellen in ein verschließbares 15-mL-Röhrchen transferieren.
2. Kaltes (+2 °C bis +8 °C [+36 °F bis +46 °F]) Kulturmedium, supplementiert mit 2% AB-Serum, bis 15 mL zugeben.
3. Die Zellen mit 300×g (ohne Bremse) für 10 Minuten bei +4 °C bis +8 °C (+39 °F bis +46 °F) zentrifugieren und den Überstand vorsichtig vollständig abnehmen.
4. Das Zellpellet in 100 µL kaltem (+2 °C bis +8 °C [+36 °F bis +46 °F]) Kulturmedium, supplementiert mit 2% AB-Serum, resuspendieren.
5. Die restlichen 75 µL des CliniMACS IFN-gamma Catchmatrix Reagent zufügen und die Suspension für 5 Minuten auf Eis inkubieren.

Sekretionsphase

Zielprobe

1. Die vier vorgefüllten Transferbeutel (einschließlich des gekennzeichneten Cell Preparation Bag Nr. 3), die 125 mL warmes (+37 °C [+99 °F]) Kulturmedium, supplementiert mit 10% AB-Serum, enthalten, bereit halten.
2. Mithilfe des Schweißgerätes für sterile Schläuche den Cell Preparation Bag Nr. 2 mit dem vorbereiteten Mediumbeutel 10% (der vorgewärmtes (+37 °C [+99 °F]) Kulturmedium, supplementiert mit 10% AB-Serum, enthält) verbinden.
3. 500 mL des vorgewärmten Kulturmediums zur Zellprobe im Cell Preparation Bag Nr. 2 geben. Sofort mit der Messung der 45-minütigen Inkubationszeit beginnen.
4. Auf jeden der vier Transferbeutel 125 mL der resultierenden Zellsuspension verteilen; dies geschieht durch serielles Verbinden der Transferbeutel mit dem Cell Preparation Bag Nr. 2 mithilfe des Schweißgerätes für sterile Schläuche. Durch visuelle Kontrolle der Skala auf der Waage das entsprechende Gewicht an Zellsuspension transferieren. Dieses Verfahren führt zu insgesamt 250 g Zellsuspension in jedem der vier Transferbeutel. Nach dem Transfer den Schlauch mit dem Schweißgerät fest verschließen, um die Transferbeutel zu trennen.
5. Die Zellen bei (+37 °C [+99 °F]) für die restliche Dauer der 45 Minuten unter kontinuierlicher langsamer Rotation (max. 50 rpm) bis zum Ende der Inkubationszeit inkubieren. Die Inkubationszeit notieren.
6. Ein Plasma-Transferset nehmen und darauf achten, dass die Klemme geschlossen ist. Den Dorn des Plasma-Transfersets in einen Zugang des Pufferbeutels einstechen.
7. Nach Ablauf der 45 Minuten den Pufferbeutel mithilfe des Schweißgerätes für sterile Schläuche mit dem Cell Preparation Bag Nr. 3 verbinden. Kalten (+2 °C bis +8 °C [+36 °F bis +46 °F]) Puffer in jeden der vier Transferbeutel (mindestens ein Volumen von je 250 mL) geben, und zwar durch serielles Verbinden der Transferbeutel mit dem Pufferbeutel. Die Zellen abkühlen lassen, indem die Beutel für 10 Minuten auf Eis gelegt werden.
8. Mithilfe des Schweißgerätes für sterile Schläuche je einen Wash Waste Bag (Wash Waste Bags Nr. 2 bis 5) mit den vier Transferbeuteln verbinden.
9. Die Zellen mit 300×g (ohne Bremse) für 10 Minuten bei +4 °C zentrifugieren. Mithilfe des Plasmaextraktors den Überstand vollständig aus allen Beuteln entfernen.
10. Mithilfe des Schweißgerätes den Schlauch jedes Beutels fest verschließen. Die Wash Waste Bags trennen.
11. Ein Plasma-Transferset nehmen und darauf achten, dass die Klemme geschlossen ist. Den Dorn des Plasma-Transfersets in einen Zugang eines Pufferbeutels einstechen.

12. Mit dem Schweißgerät für sterile Schläuche den Pufferbeutel mit dem Cell Preparation Bag Nr. 3 verbinden.
13. Die Klemme am Plasma-Transferset öffnen und den Cell Preparation Bag Nr. 3 mit 200 mL Puffer füllen.
14. Wenn das entsprechende Gewicht an Puffer transferiert ist, die Klemme am Plasma-Transferset schließen, um den Durchfluss zu stoppen.
15. Den Schlauch mit dem Schweißgerät fest verschließen und dabei mindestens 15 cm Schlauch am Cell Preparation Bag Nr. 3 belassen. Den Pufferbeutel trennen.
16. Mithilfe des Schweißgerätes für sterile Schläuche einen der anderen drei Transferbeutel mit den Zellen am Cell Preparation Bag Nr. 3 anbringen und beide Suspensionen wieder zusammenführen.

    WICHTIG
    Vor der Zentrifugation müssen die geteilten Proben im Cell Preparation Bag Nr. 3 wieder zusammengeführt werden.

17. Dieses Verfahren wiederholen, bis die Zellsuspensionen aus allen vier Transferbeuteln im Cell Preparation Bag Nr. 3 rekombiniert sind.
18. Nachdem die Zellen wieder zusammengeführt sind, den Pufferbeutel mithilfe des Schweißgerätes für sterile Schläuche mit dem Cell Preparation Bag Nr. 3 verbinden.
19. Die Klemme am Plasma-Transferset öffnen. Den Cell Preparation Bag mit Puffer auf 500 mL auffüllen.
20. Wenn das entsprechende Gewicht an Puffer transferiert ist, die Klemme am Plasma-Transferset schließen, um den Durchfluss zu stoppen. Die Schlauchklemme nahe dem (am) Cell Preparation Bag Nr. 3 schließen.
21. Den Schlauch mit dem Schweißgerät zwischen beiden Klemmen fest verschließen und dabei mindestens 15 cm Schlauch am Cell Preparation Bag Nr. 3 für weitere Verbindungen belassen. Den Pufferbeutel trennen.
22. Mit dem Schweißgerät für sterile Schläuche den leeren Wash Waste Bag Nr. 6 mit dem Cell Preparation Bag Nr. 3 verbinden.
23. Lose Teile des Cell Preparation Bag Nr. 3 oder Schläuche nach unten knicken. Die zwei Beutel sicher in den Zentrifugenbecher platzieren.
24. Den beladenen Becher mit einem entsprechend beschwerten Becher ausbalancieren. Es ist wichtig, dass die Zentrifuge genau ausbalanciert ist.
25. Die Zellen mit 300×g (ohne Bremse) für 10 Minuten bei +4 °C (+39 °F) zentrifugieren.

Kontrollprobe (unstimuliert)

1. Warmes (+37 °C [+99 °F]) Kulturmedium, supplementiert mit 10% AB-Serum, zugeben, um die Probe auf maximal 1×10^6 Zellen/mL zu verdünnen, d. h. für die 1×10^9 Zellen muss ein Gesamtvolumen von 10 mL verwendet werden.

2. Die Zellen in einem geschlossenen Röhrchen für 45 Minuten bei +37 °C (+99 °F) unter langsamer kontinuierlicher Rotation mit dem MACSmix Tube Rotator (max. 50 rpm) inkubieren.
3. Nach 45 Minuten das Röhrchen mit kaltem (+4 °C [+39 °F]) Puffer auffüllen und für 5–10 Minuten auf Eis legen.
4. Die Zellen mit 300×g (ohne Bremse) für 10 Minuten bei +4 °C bis +8 °C (+39 °F bis +46 °F) zentrifugieren.

Magnetische Markierung von Zellen mit dem CliniMACS IFN-gamma Enrichment Reagent

Die Chargennummer und das Verfalldatum des CliniMACS IFN-gamma Enrichment Reagent notieren.

Zielprobe

1. Nach dem Zentrifugationsschritt vorsichtig den Überstand mit dem Plasmaextraktor abnehmen, wie oben beschrieben, und im restlichen Volumen resuspendieren. Nach der Entfernung des Überstands die Schlauchklemme nahe dem (am) Cell Preparation Bag Nr. 3 schließen.
2. Den Schlauch mit dem Schweißgerät fest verschließen und dabei mindestens 15 cm Schlauch am Cell Preparation Bag Nr. 3 für weitere Verbindungen belassen. Den Wash Waste Bag Nr. 6 trennen.
3. Einen Sampling Site Coupler am Cell Preparation Bag Nr. 3 anbringen und das Septum desinfizieren. Mit einer geeigneten sterilen Spritze und Nadel 7,425 mL aus dem Fläschchen mit CliniMACS IFN-gamma Enrichment Reagent entnehmen. Eine 10-mL-Spritze ist ausreichend, um den Inhalt eines Reagenzfläschchens zu entnehmen. Die Spritze sollte mit einer 20-G-Nadel ausgestattet sein.
4. Durch den Injektionszugang am Sampling Site Coupler das Reagenz in den Cell Preparation Bag Nr. 3 injizieren. Darauf achten, dass der Beutel nicht durchstoßen wird. Sofort mit der Messung der 45-minütigen Inkubationszeit beginnen. Die Startzeit der Inkubation notieren.
5. Den Cell Preparation Bag mit beiden Händen halten und den Inhalt mit einer sanften Rotationsbewegung gründlich mischen.
6. Die Zellen für 15 Minuten auf Eis inkubieren. Die Stoppzeit der Inkubation notieren.
7. Mit dem Schweißgerät für sterile Schläuche den Pufferbeutel mit dem Cell Preparation Bag Nr. 3 verbinden.
8. Die Schlauchklemme nahe dem (am) Cell Preparation Bag Nr. 3 öffnen. Die Klemme am Plasma-Transferset öffnen. Den Cell Preparation Bag Nr. 3 mit kaltem Puffer (+2 °C bis +8 °C [+36 °F bis +46 °F]) auf 500 mL auffüllen.

9. Wenn das entsprechende Gewicht an Puffer transferiert ist, die Klemme am Plasma-Transferset schließen. Die Schlauchklemme nahe dem (am) Cell Preparation Bag Nr. 3 schließen. Mithilfe des Schweißgerätes den Schlauch zwischen beiden Klemmen fest verschließen. Den Pufferbeutel trennen.
10. Mit dem Schweißgerät für sterile Schläuche den leeren Wash Waste Bag Nr. 7 mit dem Cell Preparation Bag Nr. 3 verbinden.
11. Lose Teile des Beutels oder Schläuche nach unten knicken. Die zwei Beutel sicher in den Zentrifugenbecher platzieren.
12. Den beladenen Becher mit einem entsprechend beschwerten Becher ausbalancieren. Es ist wichtig, dass die Zentrifuge genau ausbalanciert ist.
13. Die Zellen mit 300×g (ohne Bremse) für 10 Minuten bei +4 °C zentrifugieren.
14. Vorsichtig den Überstand abnehmen, wie oben beschrieben, und die Zellen in 100 mL kaltem (+2 °C bis +8 °C [+36 °F bis +46 °F]) Puffer resuspendieren.
15. Das Septum des Sampling Site Couplers desinfizieren. Eine Nadel auf einer geeigneten Spritze in den Sampling Site Coupler des Cell Preparation Bag einführen und ein Volumen von 0,5 mL des markierten Produktes entnehmen. Darauf achten, dass der Beutel nicht durchstoßen wird. Die Probe in ein Probenröhrchen transferieren. Das Röhrchen als ORIGINAL-ZIELPROBE (sollte die Patienten-ID beinhalten) kennzeichnen.

    WICHTIG
    Vor der Entnahme der Probe darauf achten, dass die Zellen gründlich gemischt werden. Um eine repräsentative Probe zu erhalten, eine Spritze mit einem Fassungsvermögen von mindestens 5 mL verwenden.

16. Die Zellprobe für die Zellanalyse kalt (+2 °C bis +8 °C [+36 °F bis +46 °F]) aufbewahren.

Kontrollprobe (unstimuliert)

1. Nach der Zentrifugation vorsichtig den Überstand abnehmen.
2. Die Zellen in 100 µL kaltem Puffer (+2 °C bis +8 °C [+36 °F bis +46 °F]) resuspendieren.
3. 75 µL des restlichen CliniMACS IFN-gamma Enrichment Reagent zugeben.
4. Die Zellen für 15 Minuten auf Eis inkubieren.
5. Das Gefäß mit kaltem Puffer (+2 °C bis +8 °C [+36 °F bis +46 °F]) füllen und mit 300×g (ohne Bremse) für 10 Minuten bei +4 °C (+39 °F) zentrifugieren.
6. Vorsichtig den Überstand abnehmen und die Zellen in 1 mL kaltem (+2 °C bis +8 °C [+36 °F bis +46 °F]) Puffer resuspendieren.
7. Eine kleine Probe (ca. 100 µL) der Zellsuspension entnehmen und in ein Röhrchen transferieren, das vor der Separation als Fraktion der ORIGINAL-KONTROLLPROBE gekennzeichnet wird. Bis zur Analyse kalt lagern.

Magnetische Separation

Zielprobe

Die magnetische Separation der Zielprobe wird mit dem CliniMACS Plus Instrument durchgeführt. Nach dem Separationsverfahren die Kontrollprobe wie unten beschrieben verarbeiten.

Kontrollprobe (unstimuliert)

1. Zwei MS-Säulen durch Spülen mit 500 µL kaltem (+2 °C bis +8 °C [+36 °F bis +46 °F]) Puffer vorbereiten und den Auslauf verwerfen.
2. Die erste Säule in das Magnetfeld des MiniMACS Separator stellen.
3. Die Zellen durch einen Pre-Separation Filter laufen lassen, um Klumpen zu entfernen.
4. Die Zellsuspension auf die Säule auftragen.
5. Den gesamten Auslauf (der die nicht markierte Zellfraktion enthält) auffangen. Die Säule durch Auftragen von 500 µL kaltem Puffer auf die Säule waschen. Insgesamt drei Spülschritte durch fortlaufendes Auftragen von 500 µL Puffer auf die Säule, sobald das Säulenreservoir leer ist, durchführen.
6. Die Säule aus dem Separator nehmen, die zweite Säule in den Separator stellen und die erste Säule auf die zweite stellen.
7. 1 mL kalten Puffer auf die erste Säule pipettieren. Durch festes Aufsetzen des mit der Säule mitgelieferten Kolbens direkt auf die zweite Säule sofort die Fraktion mit den magnetisch markierten Zellen herausspülen.
8. Die durchlaufenden nicht markierten Zellen auffangen, und die Säule mit 500 µL kaltem Puffer waschen. Insgesamt drei Spülschritte durch fortlaufendes Auftragen von 500 µL Puffer auf die Säule, sobald das Säulenreservoir leer ist, durchführen.
9. Die zweite Säule aus dem Separator nehmen und auf ein geeignetes, als positive Fraktion gekennzeichnetes Sammelröhrchen stellen.
10. 0,5 mL kalten Puffer auf die Säule pipettieren. Durch festes Aufsetzen des mit der Säule mitgelieferten Kolbens sofort die Fraktion mit den magnetisch markierten Zellen herausspülen.
11. Die Zielzellfraktion bis zur Analyse kalt aufbewahren.

6.17.2 SCHRITT 2: Wahl des Separationsprogramms

▶ **Wahl des Separationsprogramms ENRICHMENT 3.2**

Siehe Abschnitt 7.2.4 auf Seite 143.

6.17.3 SCHRITT 3: Installation von CliniMACS Schlauchsets

- **CliniMACS Tubing Set und CliniMACS Tubing Set LS**

Siehe Abschnitt 7.3.1 auf Seite 157.

6.17.4 SCHRITT 4: CliniMACS Plus Separation

- **Separationsverfahren**
- **Trennen der Beutel und Notieren des Prozesscodes**
- **Deinstallieren des Schlauchsets und Abschalten**
- **Analyse der Zellen**

Siehe Abschnitt 7.4.3 auf Seite 202.

7 Genaue Erklärung von SCHRITT 1–4

7.1 SCHRITT 1: Zellpräparation und magnetische Markierung

Dieses Kapitel enthält ausführliche Erklärungen der erforderlichen Verfahren zur Zellseparation mit dem CliniMACS Plus System.

7.1.1 Erste erforderliche Aktionen

Auflistungen der Materialien, die für eine bestimmte Anwendung benötigt werden, finden Sie im anwendungsspezifischen Abschnitt (siehe Abschnitt 5.2 auf Seite 39).

Vorbereitung des CliniMACS PBS/EDTA Buffer

Stellen Sie den CliniMACS PBS/EDTA Buffer mit HSA auf eine Endkonzentration von 0,5% (w/v) ein.

Vorbereitung der Beutel

Welche Beutel benötigt werden, ist dem anwendungsspezifischen Abschnitt zu entnehmen:

- **Cell Preparation Bag:** Führen Sie einen Sampling Site Coupler (oder gleichwertig) in den äußeren Zugang des Cell Preparation Bag ein. Bringen Sie eine Schlauchklemme am Schlauch nahe des Beutels an und schließen Sie die Schlauchklemme. Wiegen Sie den leeren Cell Preparation Bag, wobei die Schlauchklemme nahe am Beutel positioniert ist und der Schlauch neben der Waage auf den Tisch hängt. Das Gewicht notieren.

  WICHTIG
  Da die Länge des Schlauchs während des Vorbereitungsverfahrens variieren kann, ist beim Bestimmen des Gewichts des Cell Preparation Bag sorgfältig vorzugehen. Um eine genaue Messung zu erhalten, ist darauf zu achten, dass die Schlauchklemmen immer nahe am Beutel platziert sind und auf der Waage liegen und der Rest des Schlauchs neben der Waage auf dem Tisch liegt.

- **Cell Collection Bag:**
  - CliniMACS Tubing Set/CliniMACS Tubing Set LS: Führen Sie einen Luer/Spike Interconnector (oder gleichwertig) in den äußeren Zugang des Cell Collection Bag ein. Bringen Sie eine Schlauchklemme am Schlauch nahe des Beutels an und schließen Sie die Schlauchklemme. Wiegen Sie den leeren Cell Collection Bag, wobei die Schlauchklemme nahe am Beutel positioniert ist und der Schlauch neben der Waage auf den Tisch hängt. Das Gewicht notieren.

- CliniMACS Depletion Tubing Set: Ein Cell Collection Bag ist bereits am Schlauchset angebracht. Führen Sie einen Luer/Spike Interconnector (oder gleichwertig) in den äußeren Zugang des Cell Collection Bag ein. Bringen Sie eine Schlauchklemme am Schlauch nahe des Beutels an und schließen Sie die Schlauchklemme. Wiegen Sie den leeren Cell Collection Bag, wobei die Schlauchklemme nahe am Beutel positioniert ist und der Schlauch neben der Waage auf den Tisch hängt. Das Gewicht notieren.

7.1.2 Magnetische Markierung von Zellen

Die folgenden Abschnitte beschreiben das empfohlene Beutelverfahren für die Präparation des Zellproduktes unter Verwendung des Schweißgerätes für sterile Schläuche.

- Der Anwender muss mit der Bedienung und Verwendung des Schweißgerätes für sterile Schläuche vertraut sein.
- Vor Beginn des Zellmarkierungs- und Zellseparationsverfahrens ist sicherzustellen, dass sämtliches benötigtes Verbrauchsmaterial und die gesamte benötigte Ausrüstung verfügbar sind.

WICHTIG

- *Jegliche Beutelhandhabung sollte in einer sterilen Umgebung (z.B. in einer sterilen Werkbank) mit aseptischen Techniken erfolgen. Die Verbindung von Schläuchen mit dem Schweißgerät für sterile Schläuche kann außerhalb der sterilen Werkbank erfolgen.*
- *Die Probenvorbereitung und die Zellseparation sind unter den im anwendungsspezifischen Abschnitt angegebenen Temperaturbedingungen durchzuführen. Niedrigere oder höhere Umgebungstemperaturen führen zu geringerer Reinheit und Ausbeute der Zielzellen.*

Die magnetische Markierung des Zellprodukts umfasst folgende Schritte:

1. Analyse des zellulären Ausgangsmaterials
2. Transfer des zellulären Ausgangsmaterials in den Cell Preparation Bag
3. Verdünnung des zellulären Ausgangsmaterials
4. Zentrifugation
5. Nur für das CliniMACS Plus Anti-Biotin System und das CliniMACS Plus TCRα/β-Biotin System: Markierung der Zellen (Inkubation mit dem primären Antikörper/CliniMACS TCRα/β-Biotin) und Entfernung von überschüssigem Konjugat (1. Spülen)
6. Volumeneinstellung
7. Nur für das CliniMACS Plus CD3 und das CD3/CD19 System: Inkubation mit Immunglobulin in klinischer Qualität
8. Magnetische Markierung der Zellen (Inkubation mit CliniMACS Reagent)

9. Entfernung von überschüssigem Reagenz
10. Volumeneinstellung für die Zellseparation

Analyse des zellulären Ausgangsmaterials

Vor Beginn der Präparation des zellulären Ausgangsmaterials sind die folgenden Parameter zu bestimmen:

- Gesamtzahl der Leukozyten
- Anteil der zu markierenden Zellen
- Gesamtzahl der zu markierenden Leukozyten
- Viabilität

Stellen Sie sicher, dass Sie innerhalb der Anwendungsspezifikation arbeiten.

Überprüfen Sie die Parameter nach dem Markierungsverfahren nochmals. Dies ist für die Staged Loading Programme (ENRICHMENT 1.1/DEPLETION 2.1/ DEPLETION 3.1) erforderlich, weil die folgenden drei Probenparameter beim Setup des CliniMACS Plus Instruments vor der Installation des Schlauchsets auf dem Instrument in die Software eingegeben werden müssen:

- Konzentration von Leukozyten pro mL
- Anteil der zu markierenden Zellen
- Endvolumen der Zellprobe (Auftragsvolumen)

Je nach Zweckbestimmung der Zellen (z.B. Anzahl an T-Zellen, Phänotyp) können weitere Tests erforderlich sein. Notieren Sie alle Daten.

Transfer des zellulären Ausgangsmaterials in den Cell Preparation Bag

1. Das Datum und die Uhrzeit des Beginns notieren, bevor Sie mit der Vorbereitung des zellulären Ausgangsmaterials beginnen.
2. Das Volumen des zellulären Ausgangsmaterials bestimmen, indem davon ausgegangen wird, dass 1 mL Ausgangsmaterial 1 g entspricht (1 g ≙ 1 mL).
3. Den Beutel mit dem zellulären Ausgangsmaterial mit beiden Händen halten und den Inhalt mit einer sanften Rotationsbewegung gründlich mischen.
4. Mithilfe des Schweißgerätes für sterile Schläuche den Cell Preparation Bag mit dem Beutel mit zellulärem Ausgangsmaterial verbinden.
5. Die Schlauchklemme öffnen, um das zelluläre Ausgangsmaterial in den Cell Preparation Bag zu transferieren. Mit einem Tubing Stripper eventuelle Blutreste aus dem Schlauch entfernen. Die Schlauchklemme so nahe wie möglich am Beutel schließen.

6. Den Schlauch verschließen und die Beutel trennen; dabei mindestens 15 cm Schlauch am Cell Preparation Bag für weitere Verbindungen belassen (siehe Abbildung 7.1). Mit dem Schweißgerät drei nebeneinander liegende Verschlüsse im Schlauch anlegen. Darauf achten, dass die Verschlüsse vollständig sind. Am mittleren Verschluss abtrennen. Den Original-Leukapherese-Beutel bzw. den Ausgangsbeutel aufbewahren, bis die Separation und die Abschlussanalyse aller Zellen abgeschlossen ist.

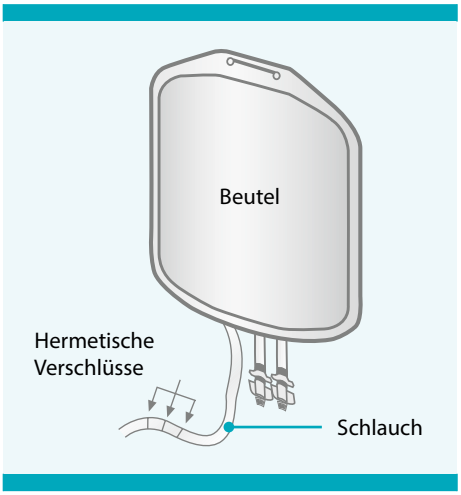


Abbildung 7.1: Verschließen eines Beutels.

7. Zur Entnahme einer Probe das Septum des Sampling Site Couplers desinfizieren. Den Inhalt des Beutels mischen. Eine Nadel auf einer geeigneten Spritze in den Sampling Site Coupler des Cell Preparation Bag einführen und ein Volumen von 0,5 mL entnehmen. Die Probe in ein Probenröhrchen transferieren. Das Röhrchen als LEUKAPHERESE-/ZELLULÄRES AUSGANGSMATERIAL (sollte die Patienten-ID beinhalten) kennzeichnen und für die Zellanalyse aufbewahren.

   WICHTIG
   Vor der Entnahme der Probe sicherstellen, dass das zelluläre Ausgangsmaterial gründlich gemischt wird. Um eine repräsentative Probe zu erhalten, eine Spritze mit einem Fassungsvermögen von mindestens 5 mL verwenden.

8. Die Waage tarieren. Den gefüllten Cell Preparation Bag auf die Waage legen, und den Schlauch auf dem Tisch liegen lassen. Das Gewicht notieren.

9. Das Gewicht des zellulären Ausgangsmaterials durch Subtrahieren des Gewichts des leeren Cell Preparation Bag vom Gewicht des mit dem zellulären Ausgangsmaterial gefüllten Cell Preparation Bag bestimmen. Das berechnete Gewicht notieren.

Gewicht des zellulären Ausgangsmaterials (g)	=	Gewicht des gefüllten Cell Preparation Bag (g)	–	Gewicht des leeren Cell Preparation Bag (g)

Verdünnung des zellulären Ausgangsmaterials

Das erforderliche Verdünnungsverhältnis ist dem anwendungsspezifischen Abschnitt zu entnehmen.

Das zelluläre Ausgangsmaterial muss vor der magnetischen Markierung mit CliniMACS PBS/EDTA Buffer (supplementiert mit HSA bis zu einer Endkonzentration von 0,5% (w/v)) verdünnt werden. Berechnen Sie das Gewicht des Pufferzusatzes nach einer der folgenden Gleichungen (1 oder 2, je nach Anwendung) und notieren Sie das Gewicht.

(1) Gewicht des Pufferzusatzes (g)	=	600 g	–	Gewicht des zellulären Ausgangsmaterials (g)
(2) Gewicht des Pufferzusatzes (g)	=	Gewicht des zellulären Ausgangsmaterials (g)	×	2

1. Ein Plasma-Transferset nehmen und darauf achten, dass die Klemme geschlossen ist. Den Dorn des Plasma-Transfersets in einen Zugang des Pufferbeutels einstechen.
2. Mit dem Schweißgerät für sterile Schläuche den Pufferbeutel mit dem Cell Preparation Bag verbinden. Den Pufferbeutel an einen Beutelhalter hängen.
3. Den Cell Preparation Bag auf die Waage legen und die Waage tarieren.
4. Die Schlauchklemme nahe dem (am) Cell Preparation Bag öffnen. Die Klemme am Plasma-Transferset öffnen. Durch visuelle Kontrolle der Skala auf der Waage das berechnete Gewicht an Puffer in den Cell Preparation Bag transferieren.
5. Wenn das entsprechende Gewicht an Puffer transferiert ist, die Klemme am Plasma-Transferset schließen, um den Durchfluss zu stoppen. Die Schlauchklemme so nahe wie möglich am Beutel schließen.
6. Den Schlauch mit dem Schweißgerät zwischen der Klemme und der Schlauchklemme fest verschließen und dabei mindestens 15 cm Schlauch am Cell Preparation Bag für weitere Verbindungen belassen. Den Pufferbeutel trennen.
7. Den Cell Preparation Bag mit beiden Händen halten und den Inhalt mit einer sanften Rotationsbewegung gründlich mischen. Intensives Mischen der Zellen vermeiden.
8. Die Waage tarieren und den gefüllten Cell Preparation Bag wiegen. Das Gewicht notieren.
9. Das Gewicht des verdünnten zellulären Ausgangsmaterials durch Subtrahieren des Gewichts des leeren Cell Preparation Bag vom Gewicht des gefüllten Cell Preparation Bag bestimmen. Das berechnete Gewicht notieren.

Gewicht des verdünnten zellulären Ausgangsmaterials (g)	=	Gewicht des gefüllten Cell Preparation Bag (g)	–	Gewicht des leeren Cell Preparation Bag (g)

Zentrifugation

⚠ WARNUNG

Kontaminationsgefahr. Wenn die Beutel nicht für die Zellpräparation geeignet sind oder nicht korrekt in den Zentrifugenbecher platziert werden, besteht Kontaminationsgefahr durch Beschädigung eines Beutels. Verwenden Sie geeignete Beutel, knicken Sie lose Teile der Beutel oder Schläuche nach unten, wobei darauf zu achten ist, dass der Beutel unversehrt bleibt, und platzieren Sie die Beutel sicher in den Zentrifugenbecher.

⚠ VORSICHT

Risiko einer verminderten Zellseparationsleistung. Wenn die Beutel nicht korrekt in den Zentrifugenbecher platziert werden, besteht das Risiko eines Zellverlustes beim Abnehmen des Überstands. Knicken Sie lose Teile der Beutel oder Schläuche nach unten und platzieren Sie die Beutel sicher in den Zentrifugenbecher.

1. Mit dem Schweißgerät für sterile Schläuche den leeren Plasma Waste Bag mit dem Cell Preparation Bag verbinden.
2. Lose Teile des Cell Preparation Bag oder Schläuche nach unten knicken. Die zwei Beutel sicher in den Zentrifugenbecher platzieren.
3. Den beladenen Becher mit einem entsprechend beschwerten Becher ausbalancieren. Es ist wichtig, dass die Zentrifuge genau ausbalanciert ist.
4. Die Zellen unter den im anwendungsspezifischen Abschnitt angegebenen Bedingungen zentrifugieren. Die Zentrifugationsbedingungen notieren.
5. Die Beutel aus der Zentrifuge nehmen und dabei darauf achten, dass das Zellpellet nicht zerstört wird. Den Cell Preparation Bag auf den Plasmaextraktor laden, und den angeschlossenen Waste Bag auf die Tischwaage legen.

Volumeneinstellung

Für die magnetische Markierung der Zellen variiert das optimale Gewicht des Zellprodukts je nach Anwendung. Das jeweilige Markierungsvolumen ist dem anwendungsspezifischen Abschnitt zu entnehmen.

Je nach Anwendung kann es notwendig sein, entweder nur eine bestimmte Menge des Überstands abzunehmen, um das Markierungsvolumen zu erreichen (bedarfsgerechte Entfernung des Überstands), oder den Überstand vollständig abzunehmen und Puffer zuzugeben, um das Markierungsvolumen zu erreichen (vollständige Entfernung des Überstands). Die jeweils anwendbare Option ist dem anwendungsspezifischen Abschnitt zu entnehmen.

WICHTIG

- *Beim Einsatz des Plasmaextraktors ist auf eine konstante Kontrolle des Extraktor-Entriegelungsgriffs zu achten und sicherzustellen, dass die Schlauchklemme nahe dem (am) Cell Preparation Bag vor Beginn des Transfers offen ist. Den Extraktorgriff langsam entriegeln.*
- *Bei der Entfernung des Überstands sorgfältig darauf achten, dass keine Zellen verloren gehen.*

Bedarfsgerechte Entfernung des Überstands

Berechnen Sie nach folgender Gleichung das Gewicht des abzunehmenden Überstands, um die Probe auf das Markierungsvolumen einzustellen:

Gewicht des abzunehmenden Überstands (g)	=	Gewicht des Zellprodukts nach dem Spülen (g)	–	Markierungsvolumen (g)

Notieren Sie das Gewicht des abzunehmenden Überstands.

1. Den leeren Plasma Waste Bag oder Wash Waste Bag Nr. 1 auf die Waage legen und die Waage tarieren.
2. Die Schlauchklemme nahe dem (am) Cell Preparation Bag öffnen. Durch visuelle Kontrolle der Skala auf der Waage den Überstand mithilfe des Plasmaextraktors entnehmen. Überschüssigen Überstand vorsichtig herauspressen, bis das berechnete „Gewicht des abzunehmenden Überstands" erreicht ist.
3. Wenn das entsprechende Gewicht an Überstand entfernt wurde, die Schlauchklemme nahe dem (am) Cell Preparation Bag schließen, um den Durchfluss zu stoppen. Das Gewicht des entfernten Überstands notieren.
4. Den Schlauch mit dem Schweißgerät fest verschließen und dabei mindestens 15 cm Schlauch am Cell Preparation Bag für weitere Verbindungen belassen. Den Plasma Waste Bag bzw. Wash Waste Bag Nr. 1 trennen.
5. Die Zellen im Cell Preparation Bag vorsichtig resuspendieren. Intensives Mischen der Zellen vermeiden. Darauf achten, dass alle Zellen resuspendiert sind.
6. Die Waage tarieren und den gefüllten Cell Preparation Bag wiegen. Das Gewicht notieren.
7. Das Gewicht des Zellprodukts nach Volumeneinstellung durch Subtrahieren des Gewichts des leeren Cell Preparation Bag vom Gewicht des gefüllten Cell Preparation Bag bestimmen. Das berechnete Gewicht notieren.

Gewicht des Zellprodukts nach Volumeneinstellung (g)	=	Gewicht des gefüllten Cell Preparation Bag (g)	–	Gewicht des leeren Cell Preparation Bag (g)

8. Den Plasma Waste Bag bzw. Wash Waste Bag aufbewahren, bis die endgültige Separation und die Analyse aller Zellen abgeschlossen ist.

Vollständige Entfernung des Überstands

Den Überstand vollständig abnehmen, wobei darauf zu achten ist, dass dabei das Zellpellet nicht resuspendiert wird. Wenn der Überstand entfernt ist, die Schlauchklemme nahe dem (am) Cell Preparation Bag schließen, um den Durchfluss zu stoppen. Den Schlauch mit dem Schweißgerät fest verschließen und dabei mindestens 15 cm Schlauch am Cell Preparation Bag für weitere Verbindungen belassen. Den Plasma Waste Bag trennen. Das Pellet vorsichtig resuspendieren.

Das Gewicht des Cell Preparation Bag durch Zugabe von Puffer einstellen. Das Zielgewicht des mit verdünntem Zellprodukt gefüllten Cell Preparation Bag (CPB) nach folgender Gleichung berechnen:

Zielgewicht des mit gespültem Zellprodukt gefüllten CPB (g)	=	Markierungsvolumen (g)	+	Gewicht des leeren CPB (g)

1. Den Dorn eines Plasma-Transfersets in einen Zugang eines Pufferbeutels einstechen. Darauf achten, dass die Klemme am Plasma-Transferset geschlossen ist.
2. Mit dem Schweißgerät für sterile Schläuche den Pufferbeutel mit dem Cell Preparation Bag verbinden. Den Pufferbeutel an einen Beutelhalter hängen.
3. Die Waage tarieren. Den Cell Preparation Bag mit dem Zellpellet auf die Waage legen.
4. Die Schlauchklemme nahe dem (am) Cell Preparation Bag öffnen. Die Klemme am Plasma-Transferset öffnen. Den Cell Preparation Bag mit Puffer füllen, bis das berechnete „Zielgewicht des mit gespültem Zellprodukt gefüllten CPB“ erreicht ist. Die Klemme am Plasma-Transferset schließen, um den Durchfluss zu stoppen. Die Schlauchklemme nahe dem (am) Cell Preparation Bag schließen.
5. Den Schlauch mit dem Schweißgerät fest verschließen und dabei mindestens 15 cm Schlauch am Cell Preparation Bag für weitere Verbindungen belassen. Den Pufferbeutel trennen.
6. Die Zellen im Cell Preparation Bag vorsichtig resuspendieren. Intensives Mischen der Zellen vermeiden. Darauf achten, dass alle Zellen resuspendiert sind.
7. Die Waage tarieren und den gefüllten Cell Preparation Bag wiegen. Das Gewicht notieren.
8. Das Gewicht des Zellprodukts nach Volumeneinstellung durch Subtrahieren des Gewichts des leeren Cell Preparation Bag vom Gewicht des gefüllten Cell Preparation Bag bestimmen. Das berechnete Gewicht notieren.

Gewicht des Zellprodukts nach Volumeneinstellung (g)	=	Gewicht des gefüllten Cell Preparation Bag (g)	–	Gewicht des leeren Cell Preparation Bag (g)

9. Den Plasma Waste Bag aufbewahren, bis die Separation und die Abschlussanalyse aller Zellen abgeschlossen ist.

Markierung der Zellen (nur für das CliniMACS Plus Anti-Biotin System und das CliniMACS Plus TCRα/β-Biotin System)

Inkubation mit dem CliniMACS TCRα/β-Biotin

Das Fläschchen CliniMACS TCRα/β-Biotin ist gebrauchsfertig und ausreichend für die unten beschriebene Anwendung. Das Konjugat ist nicht zur parenteralen Verabreichung bestimmt.

Lagern Sie das Konjugat bei +2 °C bis +8 °C (+36 °F bis +46 °F). NICHT einfrieren. Das Konjugat muss direkt aus dem Kühlschrank kalt verwendet werden. Vor Gebrauch NICHT aufwärmen. Die Chargennummer und das Verfalldatum des Konjugats sind auf dem Etikett des Fläschchens aufgedruckt. Das Konjugat nach Ablauf des Verfalldatums NICHT mehr verwenden.

1. Die Chargennummer und das Verfalldatum des CliniMACS TCRα/β-Biotin notieren.
2. Das Septum des Sampling Site Couplers desinfizieren. Mit einer geeigneten sterilen Spritze und Nadel das gesamte Volumen aus einem Fläschchen (7,5 mL) entnehmen. Eine 10-mL-Spritze ist ausreichend, um den Inhalt eines Fläschchens zu entnehmen. Die Spritze sollte mit einer 20-G-Nadel ausgestattet sein.
3. Durch den Injektionszugang am Sampling Site Coupler das gesamte Volumen des Konjugats in den Cell Preparation Bag injizieren (optional den Inhalt des Cell Preparation Bag in einen neuen Transferbeutel transferieren, um eine hohe Depletionseffizienz zu gewährleisten). Sofort die 30-minütige Inkubationszeit beginnen.
4. Den Cell Preparation Bag mit beiden Händen halten und den Inhalt mit einer sanften Rotationsbewegung gründlich mischen. Die Startzeit der Inkubation notieren.
5. Den Cell Preparation Bag flach auf den Taumelschüttler legen, eine Drehzahl von ca. 25 rpm einstellen und darauf achten, dass der Beutel nicht zerknittert oder abgeknickt ist. Den Beutel für insgesamt 30 Minuten bei kontrollierter Raumtemperatur (RT: +19 °C bis +25 °C [+66 °F bis +77 °F]). inkubieren. Die Stoppzeit der Inkubation notieren.

Inkubation mit dem primären Antikörper (biotinylierter Antikörper eines anderen Herstellers)

1. Das Zellpellet resuspendieren und die Zellen mit dem primären biotinylierten Antikörper unter Beachtung der vom Hersteller des Antikörpers angegebenen Dauer und des Titers markieren. Darauf achten, dass alle Zellen resuspendiert sind. (Der primäre Antikörper sollte in seinem optimalen Titer verwendet werden, d. h. mit optimaler Färbedichte und ohne Hintergrundfärbung. Befolgen Sie die Gebrauchsanweisung des Herstellers des primären Antikörpers.)
2. Den Cell Preparation Bag auf einem Taumelschüttler bei 25 rpm inkubieren. Die Gebrauchsanweisung des Herstellers des primären Antikörpers beachten.

Entfernung von überschüssigem Konjugat (1. Spülen) (nur für das CliniMACS Plus Anti-Biotin System und das CliniMACS Plus TCRα/β-Biotin System)

Das Zellprodukt mit Puffer auf ein Gesamtgewicht von 600 g verdünnen. Das Gewicht des Pufferzusatzes nach folgender Gleichung berechnen und notieren.

Gewicht des Pufferzusatzes (g)	=	600 g	–	Gewicht des markierten Zellprodukts (g)

1. Das Zellprodukt wie im Schritt„Verdünnung des zellulären Ausgangsmaterials“ (Schritte 1–8) beschrieben auf ein Gesamtgewicht von 600 g verdünnen.
2. Das Gewicht des Zellprodukts nach Entfernung von überschüssigem Konjugat (1. Spülen) durch Subtrahieren des Gewichts des leeren Cell Preparation Bag vom Gewicht des gefüllten Cell Preparation Bag bestimmen. Das berechnete Gewicht notieren.

Gewicht des Zellprodukts nach Entfernung von überschüssigem Konjugat (1. Spülen) (g)	=	Gewicht des gefüllten Cell Preparation Bag (g)	–	Gewicht des leeren Cell Preparation Bag (g)

3. Mit dem Schweißgerät für sterile Schläuche den leeren Wash Waste Bag mit dem Cell Preparation Bag verbinden.
4. Lose Teile des Cell Preparation Bag oder Schläuche nach unten knicken. Die zwei Beutel sicher in den Zentrifugenbecher platzieren.
5. Den beladenen Becher mit einem entsprechend beschwerten Becher ausbalancieren. Es ist wichtig, dass die Zentrifuge genau ausbalanciert ist.
6. Die Zellen unter den im anwendungsspezifischen Abschnitt angegebenen Bedingungen zentrifugieren.
7. Die Beutel aus der Zentrifuge nehmen und dabei darauf achten, dass das Zellpellet nicht resuspendiert wird. Den Cell Preparation Bag auf den Plasmaextraktor laden, und den angeschlossenen Waste Bag auf die Tischwaage legen.

8. Wie oft die Zellen gespült werden müssen, ist dem anwendungsspezifischen Abschnitt zu entnehmen.
9. Für die magnetische Markierung der Zellen mit dem CliniMACS Anti-Biotin Reagent das Gewicht der Zellsuspension wie im Abschnitt „Volumeneinstellung" beschrieben auf ca. 190 g einstellen.

Inkubation mit Immunglobulin in klinischer Qualität (nur für die CliniMACS Plus CD3 und CD3/CD19 Systeme)

WICHTIG

Humanes IgG ist kein Bestandteil des CliniMACS Systems. Verwenden Sie nur humanes IgG in Pharmaqualität, das in Ihrem Land zugelassen ist. Lesen Sie die Packungsbeilage des verwendeten humanen IgG genau, insbesondere den Abschnitt zu Überempfindlichkeitsreaktionen und zum Infektionsrisiko, das humanes IgG als Blutprodukt für alle Patienten mit sich bringt. Sämtliche Risiken dieser Materialien müssen vom Anwender beurteilt werden.

Das Septum des Sampling Site Couplers am Cell Preparation Bag desinfizieren. Mit einer geeigneten sterilen Spritze und Nadel 1,5 mg humanes IgG pro mL Zellprodukt (z.B. 1,6 mL Gamunex 10% für 95 mL Zellprodukt) zufügen. Den Inhalt gründlich mischen. Für 5 Minuten bei kontrollierter Raumtemperatur mit einer sanften Rotationsbewegung (z.B. 25 rpm auf einem Taumelschüttler) inkubieren.

Magnetische Markierung der Zellen: Inkubation mit dem CliniMACS Reagent

Die Fläschchen CliniMACS Reagent sind gebrauchsfertig und ausreichend für die unten beschriebene Anwendung. Die Reagenzien sind nicht zur parenteralen Verabreichung bestimmt.

Lagern Sie die Reagenzien bei +2 °C bis +8 °C (+36 °F bis +46 °F). NICHT einfrieren. Die Reagenzien müssen direkt aus dem Kühlschrank kalt verwendet werden. Vor Gebrauch NICHT aufwärmen. Die Chargennummer und das Verfalldatum der Reagenzien sind auf dem Etikett des Fläschchens aufgedruckt. Die Reagenzien nach Ablauf des Verfalldatums NICHT mehr verwenden.

1. Die Chargennummer und das Verfalldatum des/der CliniMACS Reagenz(ien) notieren.
2. Das Septum des Sampling Site Couplers desinfizieren. Mit einer geeigneten sterilen Spritze und Nadel das gesamte Volumen aus a) einem Fläschchen oder b) zwei Reagenzfläschchen (je 7,5 mL) entnehmen. Eine 10-mL-Spritze ist ausreichend, um den Inhalt eines Fläschchens zu entnehmen, bzw. eine 20-mL-Spritze ist ausreichend, um den Inhalt von zwei Fläschchen zu entnehmen. Die Spritze sollte mit einer 20-G-Nadel ausgestattet sein.
3. Durch den Injektionszugang des Sampling Site Couplers das gesamte Volumen des Reagenzes in den Cell Preparation Bag injizieren (optional bei Depletionsanwendungen den Inhalt des Cell Preparation Bag in einen neuen Transferbeutel transferieren, um eine hohe Depletionseffizienz zu gewährleisten). Zu diesem Zeitpunkt beginnt die Inkubationszeit.
4. Den Cell Preparation Bag mit beiden Händen halten und den Inhalt mit einer sanften Rotationsbewegung gründlich mischen.
5. Den Cell Preparation Bag flach auf den Taumelschüttler legen, eine Drehzahl von ca. 25 rpm einstellen und darauf achten, dass der Beutel nicht zerknittert oder abgeknickt ist. Den Beutel unter den Bedingungen und für die Dauer, die im anwendungsspezifischen Abschnitt angegeben sind, inkubieren.

Entfernung von überschüssigem Reagenz

Zur Entfernung des ungebundenen Reagenzes nach Ende der Inkubation müssen die Zellen gespült werden. Wie oft die Zellen gespült werden müssen, ist dem anwendungsspezifischen Abschnitt zu entnehmen.

1. Den Dorn eines Plasma-Transfersets in einen Zugang eines Pufferbeutels, der mindestens 500 mL Puffer enthält, einstechen. Darauf achten, dass die Klemme am Plasma-Transferset geschlossen ist.
2. Mit dem Schweißgerät für sterile Schläuche den Pufferbeutel mit dem Cell Preparation Bag verbinden. Den Pufferbeutel an einen Beutelhalter hängen.
3. Den Cell Preparation Bag auf die Waage legen und die Waage tarieren.
4. Die Schlauchklemme nahe dem (am) Cell Preparation Bag öffnen. Die Klemme am Plasma-Transferset öffnen. Den Cell Preparation Bag mit Puffer auf 600 mL füllen. Die Klemme am Plasma-Transferset schließen, um den Durchfluss zu stoppen. Die Schlauchklemme nahe dem (am) Cell Preparation Bag schließen. Das Gewicht des gefüllten Cell Preparation Bag notieren.
5. Den Schlauch zwischen beiden Klemmen verschließen; dabei mindestens 15 cm Schlauch am Cell Preparation Bag für weitere Verbindungen belassen. Den Pufferbeutel trennen.
6. Den Cell Preparation Bag mit beiden Händen halten und den Inhalt mit einer sanften Rotationsbewegung gründlich mischen.
7. Mit dem Schweißgerät für sterile Schläuche den leeren Wash Waste Bag mit dem Cell Preparation Bag verbinden.
8. Lose Teile der Beutel oder Schläuche nach unten knicken. Den Cell Preparation Bag und den Wash Waste Bag sicher in den Zentrifugenbecher überführen.
9. Die Zellen unter den Bedingungen und für die Dauer, die im anwendungsspezifischen Abschnitt angegeben sind, zentrifugieren.
10. Die Beutel aus der Zentrifuge nehmen und dabei darauf achten, dass das Zellpellet nicht zerstört wird.
11. Den Cell Preparation Bag vorsichtig auf den Plasmaextraktor hängen.
12. Den Wash Waste Bag auf die Waage legen und die Waage tarieren.
13. Die Schlauchklemme nahe dem (am) Cell Preparation Bag öffnen. Mithilfe des Plasmaextraktors so viel Überstand wie möglich aus dem Cell Preparation Bag entnehmen. Die Schlauchklemme nahe dem (am) Cell Preparation Bag schließen, um den Durchfluss zu stoppen.
14. Den Schlauch mit dem Schweißgerät fest verschließen und dabei mindestens 15 cm Schlauch am Cell Preparation Bag für weitere Verbindungen belassen. Den Wash Waste Bag trennen.
15. Den Wash Waste Bag aufbewahren, bis die Separation und die Abschlussanalyse aller Zellen abgeschlossen ist.

16. Das Zellpellet im Cell Preparation Bag resuspendieren. Intensives Mischen der Zellen vermeiden. Darauf achten, dass alle Zellen resuspendiert sind.

17. Wenn weitere Spülschritte erforderlich sind (z.B. zur Anreicherung CD34-positiver Zellen), die Schritte 1–16 wiederholen.

18. Die Waage tarieren und den gefüllten Cell Preparation Bag wiegen. Das Gewicht notieren.

19. Das Gewicht des Zellprodukts nach dem Spülen durch Subtrahieren des Gewichts des leeren Cell Preparation Bag vom Gewicht des gefüllten Cell Preparation Bag bestimmen. Das berechnete Gewicht notieren.

Gewicht des Zellprodukts nach dem Spülen (g)	=	Gewicht des gefüllten Cell Preparation Bag (g)	–	Gewicht des leeren Cell Preparation Bag (g)

20. Das Auftragsvolumen einstellen: Das erforderliche Gewicht an Puffer zur Einstellung des Gewichts der Zellsuspension auf das entsprechende Auftragsvolumen entsprechend der Anwendung nach folgender Gleichung berechnen. Zum Laden der markierten und gespülten Zellen auf das Schlauchset wird eine maximale Zellkonzentration von $0{,}4\times10^9$ Zellen pro mL empfohlen.

Gewicht des Pufferzusatzes (g)	=	Auftragsvolumen (entsprechend der Anwendung)	–	Gewicht des Zellprodukts nach dem Spülen (g)

21. Mit dem Schweißgerät für sterile Schläuche den Pufferbeutel mit dem Cell Preparation Bag verbinden. Den Pufferbeutel an einen Beutelhalter hängen.

22. Den Cell Preparation Bag auf die Waage legen und die Waage tarieren.

23. Die Schlauchklemme nahe dem (am) Cell Preparation Bag öffnen. Die Klemme am Plasma-Transferset öffnen. Durch visuelle Kontrolle der Skala auf der Waage das berechnete Gewicht an Puffer in den Cell Preparation Bag transferieren.

24. Wenn das entsprechende Gewicht an Puffer transferiert ist, die Klemme am Plasma-Transferset schließen, um den Durchfluss zu stoppen. Die Schlauchklemme nahe dem (am) Cell Preparation Bag schließen.

25. Mithilfe des Schweißgerätes den Schlauch zwischen beiden Klemmen fest verschließen. Den Pufferbeutel trennen.

26. Das Zellpellet im Cell Preparation Bag resuspendieren. Intensives Mischen der Zellen vermeiden. Darauf achten, dass alle Zellen resuspendiert sind.

27. Das Septum des Sampling Site Couplers desinfizieren. Eine Nadel auf einer geeigneten Spritze in den Sampling Site Coupler des Cell Preparation Bag einführen und ein Volumen von 0,5 mL des markierten Produktes entnehmen. Die Probe in ein Probenröhrchen transferieren. Das Röhrchen als ORIGINAL (sollte die Patienten-ID beinhalten) kennzeichnen und für die Analyse aufbewahren.

28. Die Waage tarieren und den gefüllten Cell Preparation Bag wiegen. Das Gewicht notieren.

29. Das Gewicht des Zellprodukts nach der Pufferzugabe (Auftragsvolumen) durch Subtrahieren des Gewichts des leeren Cell Preparation Bag vom Gewicht des gefüllten Cell Preparation Bag bestimmen. Das berechnete Gewicht notieren.

Gewicht des Zellprodukts nach Pufferzugabe (g)	=	Gewicht des gefüllten Cell Preparation Bag (g)	–	Gewicht des leeren Cell Preparation Bag (g)

▶ **Mit SCHRITT 2 fortfahren.**

Den Cell Preparation Bag erst dann mit dem Schlauchset verbinden, wenn Sie auf dem Bildschirm des Instruments dazu aufgefordert werden.

7.2 SCHRITT 2: Wahl des Separationsprogramms

7.2.1 Einschalten des CliniMACS Plus Instruments

Schalten Sie das CliniMACS Plus Instrument mit dem EIN/AUS-Schalter an der Rückseite des Instruments ein. Die Startzeit des Instrumentenlaufs notieren.

Das Bildschirmfenster zeigt den Hauptbildschirm an, wie im Abschnitt „Installation" des CliniMACS Plus Instrument Benutzerhandbuchs beschrieben.

Um zum Programm-Menü zu gelangen, **ENT** drücken.

7.2.2 CD34 SELECTION 1/2

WICHTIG

- *CD34 SELECTION 1 darf nur in Kombination mit dem CliniMACS Tubing Set (REF 161-01) verwendet werden, während CD34 SELECTION 2 nur in Kombination mit dem CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01) verwendet werden darf. Überprüfen Sie das Schlauchset vor der Installation sorgfältig.*
- *Im Bildschirmfenster werden Anweisungen und Diagramme als Verfahrensanleitungen angezeigt. Führen Sie jeden Schritt entsprechend den Anweisungen im Benutzerhandbuch durch und überprüfen Sie den Schritt, bevor Sie zum nächsten Schritt weitergehen. Um Fehler bei der Dateneingabe zu korrigieren, drücken Sie die Taste „Zurück" (siehe Abschnitt „Beschreibung" im CliniMACS Plus Instrument Benutzerhandbuch).*

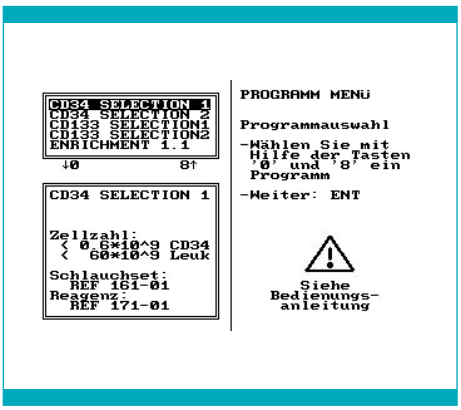
Wahl des Separationsprogramms CD34 SELECTION 1/2

Das Bildschirmfenster zeigt Bildschirm 7.1 an.

Wählen Sie je nach gewünschter Anwendung CD34 SELECTION 1 oder CD34 SELECTION 2.

Um ein Separationsprogramm zu wählen, markieren Sie den Namen des Programms mit dem schwarzen Balken. Mit den Tasten **0** und **8** können Sie den Balken nach oben oder unten bewegen.

Um mit dem markierten Programm fortzufahren, **ENT** drücken.



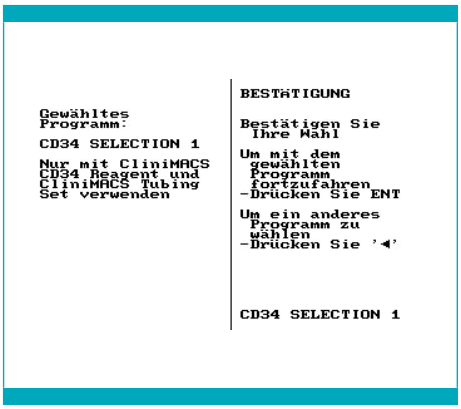
Bildschirm 7.1: Wahl des Separationsprogramms

Bestätigung

Das Bildschirmfenster zeigt Bildschirm 7.2 an.

Um das Separationsprogramm zu bestätigen und fortzufahren, ENT drücken.

Oder drücken Sie ◀, um zum vorherigen Schritt zurückzukehren und die Auswahl zu ändern.



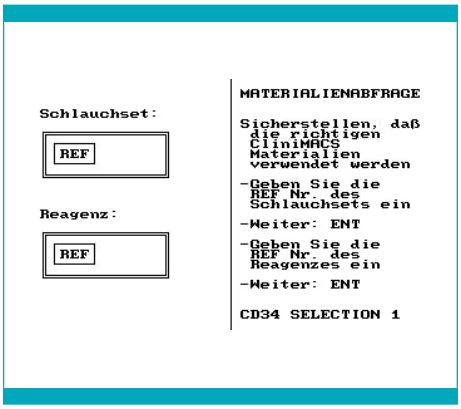
Bildschirm 7.2: Bestätigung

Materialkontrolle

Das Bildschirmfenster zeigt Bildschirm 7.3 an.

CD34 SELECTION 1 und CD34 SELECTION 2 sind optimiert für die Anreicherung von CD34-positiven Zellen.

Um zu bestätigen, dass das geeignete Schlauchset vorhanden und das richtige Reagenz für die Zellmarkierung verwendet wurde, geben Sie die jeweilige Artikelnummer (REF) in das Eingabefeld ein. Die Software des Instruments überprüft, ob die Materialien in Kombination mit dem gewählten Programm verwendet werden können.



Bildschirm 7.3: Materialkontrolle

1. Die Artikelnummer (REF) des Schlauchsets eingeben, das für die automatische Zellseparation verwendet werden soll. Um die Eingabe zu bestätigen und fortzufahren, ENT drücken.
2. Die Artikelnummer (REF) des Reagenzes eingeben, das für die Zellmarkierung verwendet wurde. Um die Eingabe zu bestätigen und fortzufahren, ENT drücken.

Wenn die Artikelnummer eines Schlauchsets oder eines Reagenzes eingegeben wird, der/das für das gewählte Separationsprogramm nicht spezifiziert ist, erscheint eine entsprechende Meldung. Drücken Sie zur Bestätigung ENT und geben Sie die korrekte Artikelnummer ein. Wenn die Artikelnummer immer noch falsch ist, erscheint die Meldung ein zweites Mal. Nach Drücken von ENT kehrt das Programm zum Programm-Menü zurück (siehe Bildschirm 7.1).

WICHTIG

- *CD34 SELECTION 1 darf nur in Kombination mit dem CliniMACS Tubing Set (REF 161-01) verwendet werden, während CD34 SELECTION 2 nur in Kombination mit dem CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01) verwendet werden darf. Überprüfen Sie das Schlauchset vor der Installation sorgfältig.*
- *Um Fehler bei der Dateneingabe zu korrigieren, drücken Sie die Taste „Zurück“ (siehe Abschnitt „Beschreibung“ im CliniMACS Plus Instrument Benutzerhandbuch).*

Wenn die Materialkontrolle erfolgreich war, fährt das Programm automatisch mit den Anweisungen zur Installation des Schlauchsets fort.

▶ **Mit SCHRITT 3 fortfahren.**

7.2.3 ENRICHMENT 1.1

WICHTIG

- *Das Separationsprogramm ENRICHMENT 1.1 darf nur mit dem CliniMACS Tubing Set (REF 161-01) durchgeführt werden.*
- *Im Bildschirmfenster werden Anweisungen und Diagramme als Verfahrensanleitungen angezeigt. Führen Sie jeden Schritt entsprechend den Anweisungen im Benutzerhandbuch durch und überprüfen Sie den Schritt, bevor Sie zum nächsten Schritt weitergehen. Um Fehler bei der Dateneingabe zu korrigieren, drücken Sie die Taste „Zurück“ (siehe Abschnitt „Beschreibung“ im CliniMACS Plus Instrument Benutzerhandbuch).*

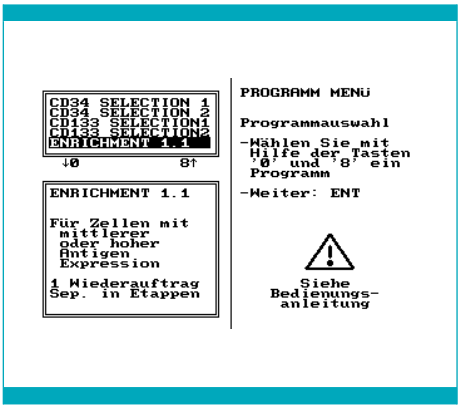
Wahl des Separationsprogramms ENRICHMENT 1.1

Das Bildschirmfenster zeigt Bildschirm 7.4 an.

Wählen Sie ENRICHMENT 1.1.

Um ein Separationsprogramm zu wählen, markieren Sie den Namen des Programms mit dem schwarzen Balken. Mit den Tasten **0** und **8** können Sie den Balken nach oben oder unten bewegen.

Um mit dem markierten Programm fortzufahren, **ENT** drücken.



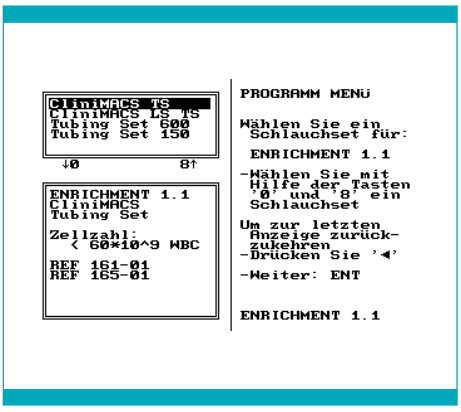
Bildschirm 7.4: Wahl des Separationsprogramms

Wahl des Schlauchsets

Das Bildschirmfenster zeigt Bildschirm 7.5 an.

Überprüfen Sie, ob das korrekte Programm gewählt wurde. Wenn nicht, drücken Sie ◀, um zum vorherigen Schritt zurückzukehren und die Auswahl zu ändern.

Wählen Sie das Schlauchset, indem Sie es mit dem schwarzen Balken im Feld links oben hervorheben. Mit den Tasten **0** und **8** können Sie den Balken nach oben oder unten bewegen.



Bildschirm 7.5: Wahl des Schlauchsets

Das Fenster darunter zeigt die relevanten Daten wie Kapazität und Artikelnummer des gewählten Schlauchsets an.

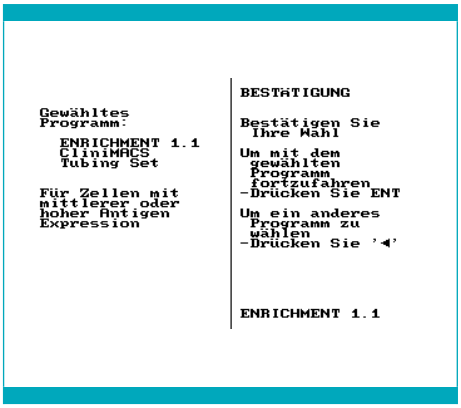
Um mit der gewählten Kombination aus Separationsprogramm und Schlauchset fortzufahren, ENT drücken.

Bestätigung

Das Bildschirmfenster zeigt Bildschirm 7.6 an.

Um die Kombination aus Separationsprogramm und Schlauchset zu bestätigen und fortzufahren, ENT drücken.

Anderenfalls drücken Sie ◄, um zum vorherigen Schritt zurückzukehren und die Auswahl zu ändern.



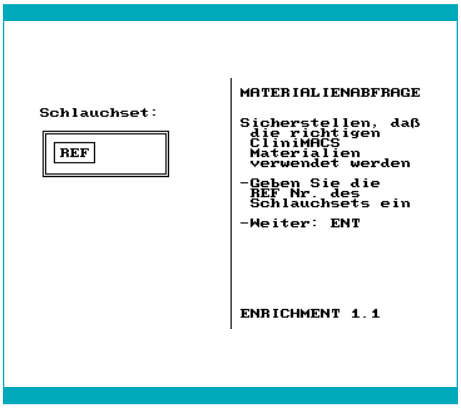
Bildschirm 7.6: Bestätigung

Materialkontrolle

Das Bildschirmfenster zeigt Bildschirm 7.7 an.

Die Abfrage der Artikelnummer (REF) des Schlauchsets dient als Sicherheitskontrolle, um zu gewährleisten, dass das gewählte Schlauchset mit dem gewählten Programm verwendet werden kann.

Artikelnummer des gewählten Schlauchsets eingeben und ENT drücken, um fortzufahren.



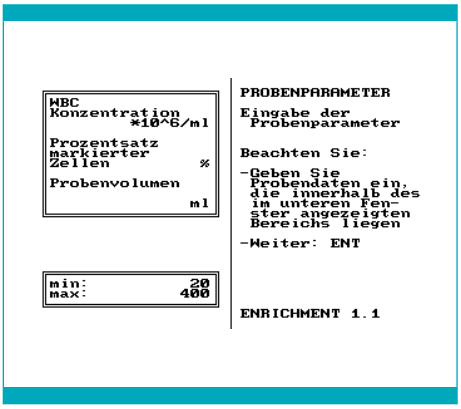
Bildschirm 7.7: Materialkontrolle

Wenn eine nicht kompatible Artikelnummer eingegeben wird, erscheint eine entsprechende Fehlermeldung. Drücken Sie zur Bestätigung ENT und geben Sie die korrekte Artikelnummer ein. Wenn die eingegebene Artikelnummer immer noch falsch ist, erscheint die Meldung ein zweites Mal. Nach Drücken von ENT kehrt das Programm zum Programm-Menü zurück (siehe Bildschirm 7.4).

Eingabe der Probenparameter

Wenn die Materialkontrolle erfolgreich war, fährt das Programm automatisch mit der Abfrage der Probenparameter fort, die benötigt werden, um die Separation auf jede einzelne Probe einzustellen und dem Anwender wichtige Informationen zu den benötigten Puffer- und Beutelvolumina zu geben.

Das Bildschirmfenster zeigt Bildschirm 7.8 an.



Bildschirm 7.8: Eingabe der Probenparameter

1. Geben Sie zuerst die WBC-Konzentration der Probe ein. Der zulässige Bereich wird im Feld unten links angezeigt. Drücken Sie ◀, um eine falsche Eingabe zu korrigieren.

   Kontrollieren Sie, ob der eingegebene Wert dem Wert der Probe entspricht. Anderenfalls wird die Probe unter Umständen nicht optimal verarbeitet. Um mit der nächsten Eingabe fortzufahren, **ENT** drücken.

WICHTIG

Alle erforderlichen Probenparameter beziehen sich auf die Probe nach dem Zellmarkierungs- und Spülverfahren. Der im Feld unten links angezeigte zulässige Bereich berücksichtigt immer die vorherige Eingabe. Nach jeder Eingabe berechnet die Software den zulässigen Bereich für den nächsten abgefragten Parameter neu.

⚠ VORSICHT

Die Eingabe falscher Parameter kann zu nicht optimaler Probenverarbeitung führen und die Wahrscheinlichkeit eines Zielzellverlust erhöhen. Die Eingabe von Werten für WBC-Konzentration und/oder Anteil der markierten Zellen, die niedriger als die tatsächlichen Probenwerte sind, kann einen Zellverlust durch Überladung des Systems zur Folge haben. Die Eingabe eines niedrigeren Probenvolumens kann zum Zellverlust durch Überladung oder zu unvollständiger Probenverarbeitung führen. Wenn die Angabe eines der drei Parameter zu hoch ist, führt dies zu einer verlängerten Verarbeitungszeit und vergrößertem Volumen der Zielzellenfraktion. Stellen Sie stets sicher, dass Sie die richtigen Parameter eingeben.

2. Den Anteil der markierten Zellen eingeben. Kontrollieren Sie, ob der eingegebene Wert dem Wert der Probe entspricht. Anderenfalls wird die Probe unter Umständen nicht optimal verarbeitet (siehe „Wichtig"). Um mit der nächsten Eingabe fortzufahren, **ENT** drücken.

3. Das Endvolumen der Zellprobe eingeben. Kontrollieren Sie, ob der eingegebene Wert dem Wert der Probe entspricht. Anderenfalls wird die Probe unter Umständen nicht optimal verarbeitet (siehe „Wichtig").

Um fortzufahren, **ENT** drücken.

Berechnung

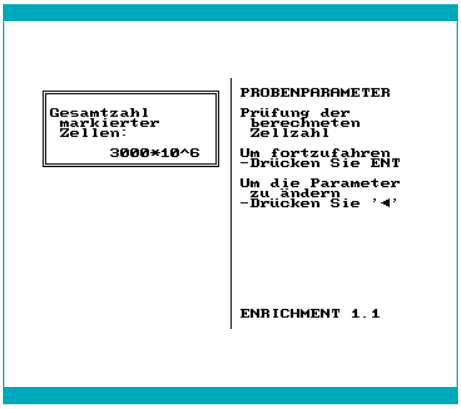
Die CliniMACS Plus Software berechnet die Gesamtzahl der markierten Zellen, um zu überprüfen, ob die Separationskapazität ausreicht.

Das Ergebnis erscheint in einer von zwei möglichen Bildschirmanzeigen:

- Das Ergebnis der Berechnung wird in einem ähnlichen Bildschirm wie Bildschirm 7.9 angezeigt. Überprüfen Sie, ob die berechnete Anzahl an markierten Zellen korrekt ist.

  Um fortzufahren, ENT drücken.

  Eine Korrektur der Daten ist möglich. Drücken Sie ◄, um zur Korrektur zum vorherigen Bildschirm zurückzukehren.



Bildschirm 7.9: Berechnung

- Wenn die berechnete Anzahl an markierten Zellen die Separationskapazität des CliniMACS Plus Systems überschreitet, erscheint eine ähnliche Bildschirmanzeige wie Bildschirm 7.10. Überprüfen Sie, ob die korrekten Probenparameter eingegeben wurden und die berechnete Anzahl an Zellen korrekt ist. Drücken Sie ◄, um zum vorherigen Bildschirm 7.8 zurückzukehren und die Probenparameter zu korrigieren.

  Um eine Überladung des Systems zu vermeiden, teilen Sie die Probe und bestimmen Sie das Volumen jeder Portion. Drücken Sie ◄, um zum vorherigen Bildschirm 7.8 zurückzukehren. Geben Sie die Probenparameter für das erste Aliquot der Probe ein und fahren Sie mit der Separation dieses Aliquots fort. Nach Abschluss der Separation starten Sie eine zweite Separation mit dem zweiten Aliquot unter Verwendung eines neuen Schlauchsets.

  Um fortzufahren, ENT drücken.



Bildschirm 7.10: Berechnung: Zellzahl übersteigt die Separationskapazität

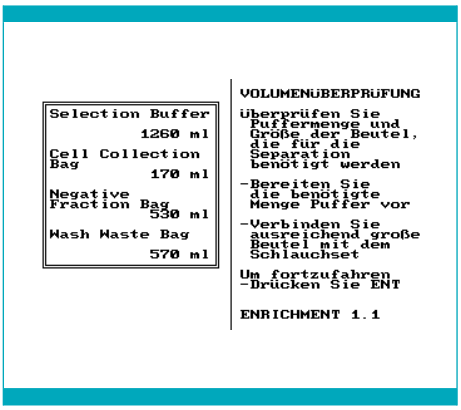
Volumenangaben

Aus der Gesamtzahl der markierten Zellen (siehe Abschnitt „Berechnung“) berechnet die Software die Anzahl der Separationszyklen, die benötigte Puffermenge für die gesamte Separation und die Flüssigkeitsvolumina, die im Negative Fraction Bag, Buffer Waste Bag und Cell Collection Bag gesammelt werden.

Die Standardwerte sind:

- CliniMACS PBS/EDTA Buffer: 1.000 mL
- Negative Fraction Bag: 500 mL
- Buffer Waste Bag: 500 mL
- Cell Collection Bag: 150 mL

Wenn einer der berechneten Werte diese Standardwerte überschreitet, erscheint Bildschirm 7.11 und gibt die Menge an Flüssigkeiten an, die beim Separationsprozess benötigt und angesammelt werden. Ersetzen Sie die mit dem Schlauchset bereitgestellten Beutel (Fassungsvermögen ca. 500 mL) durch andere Beutel von entsprechender Größe, falls ein Austausch erforderlich ist. Die ursprünglich am Schlauchset angebrachten Beutel sind mittels Luer-Verbindungen angeschlossen. Beutel, die als Ersatz für die Originalbeutel verwendet werden, sollten eine weibliche Luer-Verbindung haben. Standardbeutel können mit einem Luer/Spike Interconnector angeschlossen werden.



Bildschirm 7.11: Überprüfen der Volumina

1. Bestätigen Sie, dass die benötigte Puffermenge verfügbar ist. Bringen Sie nicht mehr als drei Liter Puffer am Beutelhalter an.

   HINWEIS

   Risiko einer Beschädigung des Instruments. Eine Überlastung der Beutelhalter kann das Instrument beschädigen. Die Tragfähigkeit eines einzelnen Beutelhalters beträgt 3 kg. Überlasten Sie die Beutelhalter nicht.

2. Öffnen Sie die Transportschale des Schlauchsets unter sterilen Bedingungen und ersetzen Sie die Originalbeutel bei Bedarf durch größere. Achten Sie darauf, dass der Durchfluss zu diesen Beuteln nicht eingeschränkt ist.

3. Bringen Sie einen Cell Collection Bag von ausreichender Größe an der freien Luer-Verbindung an. Falls im Bildschirm 7.11 nichts angegeben ist, beträgt das maximale Elutionsvolumen der Zielzellfraktion 150 mL. Stellen Sie sicher, dass der Durchfluss zum Cell Collection Bag nicht eingeschränkt ist.

WICHTIG

- *Stellen Sie sicher, dass die benötigte Puffermenge verfügbar und das im Bildschirm 7.11 angegebene Volumen der Beutel ausreichend ist. Anderenfalls ist die Leistung der Separation beeinträchtigt.*
- *Jegliche Modifikationen der CliniMACS Schlauchsets sollten unter sterilen Bedingungen, z.B. in einer sterilen Werkbank, durchgeführt werden.*
- *Bei der weiteren Analyse und Zellverarbeitung ist zu beachten, dass die im Bildschirm 7.11 angegebenen Volumina nicht die genauen Volumina sind, sondern Volumina innerhalb der Sicherheitsanforderungen.*

4. Überprüfen Sie die Luer-Lock-Verbindungen an den Säulen. Die Luer-Lock-Verbindungen müssen fest geschlossen sein.

Um fortzufahren, **ENT** drücken.

Das Programm fährt automatisch mit den Anweisungen zur Installation des Schlauchsets auf dem Instrument fort.

▶ **Mit SCHRITT 3 fortfahren.**

7.2.4 ENRICHMENT 3.2

WICHTIG

- *Das Separationsprogramm ENRICHMENT 3.2 darf nur mit dem CliniMACS Tubing Set (REF 161-01) durchgeführt werden.*
- *Im Bildschirmfenster werden Anweisungen und Diagramme als Verfahrensanleitungen angezeigt. Führen Sie jeden Schritt entsprechend den Anweisungen im Benutzerhandbuch durch und überprüfen Sie den Schritt, bevor Sie zum nächsten Schritt weitergehen. Um Fehler bei der Dateneingabe zu korrigieren, drücken Sie die Taste „Zurück“ (siehe Abschnitt „Beschreibung“ im CliniMACS Plus Instrument Benutzerhandbuch).*

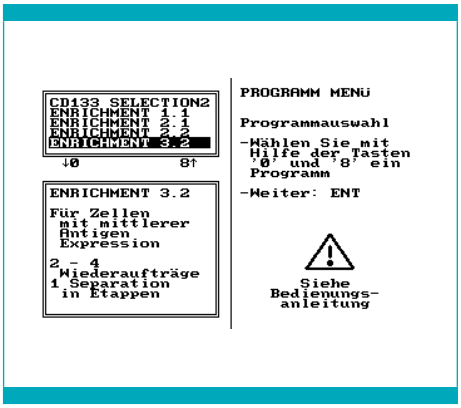
Wahl des Separationsprogramms ENRICHMENT 3.2

Das Bildschirmfenster zeigt Bildschirm 7.12 an.

Wählen Sie ENRICHMENT 3.2.

Um ein Separationsprogramm zu wählen, markieren Sie den Namen des Programms mit dem schwarzen Balken. Mit den Tasten **0** und **8** können Sie den Balken nach oben oder unten bewegen.

Um mit dem markierten Programm fortzufahren, **ENT** drücken.



Bildschirm 7.12: Wahl des Separationsprogramms

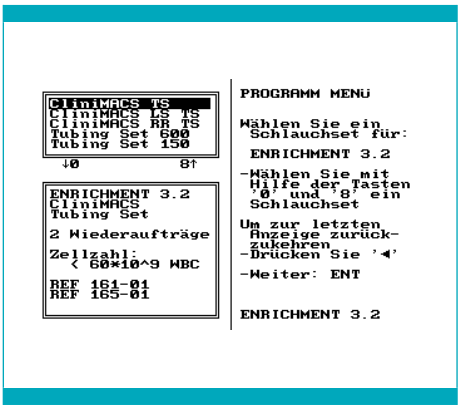
Wahl des Schlauchsets

Das Bildschirmfenster zeigt Bildschirm 7.13 an.

Überprüfen Sie, ob das korrekte Programm gewählt wurde. Wenn nicht, drücken Sie ◀, um zum vorherigen Schritt zurückzukehren und die Auswahl zu ändern.

Wählen Sie das Schlauchset, indem Sie es mit dem schwarzen Balken im Feld links hervorheben. Mit den Tasten 0 und 8 können Sie den Balken nach oben oder unten bewegen.

Das Fenster darunter zeigt die relevanten Daten wie Kapazität und Artikelnummer des gewählten Schlauchsets an.



Bildschirm 7.13: Wahl des Schlauchsets

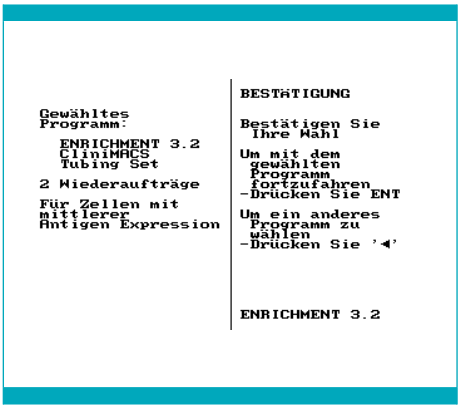
Um mit der gewählten Kombination aus Separationsprogramm und Schlauchset fortzufahren, ENT drücken.

Bestätigung

Das Bildschirmfenster zeigt Bildschirm 7.14 an.

Um die Kombination aus Separationsprogramm und Schlauchset zu bestätigen und fortzufahren, ENT drücken.

Oder drücken Sie ◀, um zum vorherigen Schritt zurückzukehren und die Auswahl zu ändern.



Bildschirm 7.14: Bestätigung

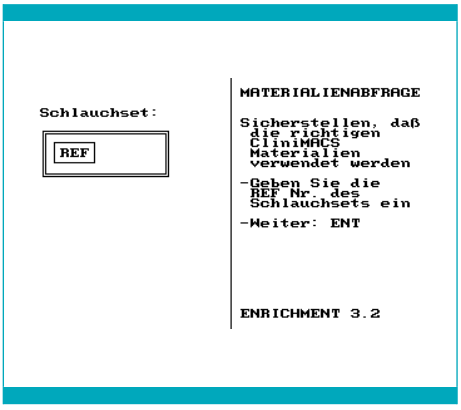
Materialkontrolle

Das Bildschirmfenster zeigt Bildschirm 7.15 an.

Die Abfrage der Artikelnummer (REF) des Schlauchsets dient als Sicherheitskontrolle, um zu gewährleisten, dass das gewählte Schlauchset mit dem gewählten Programm verwendet werden kann.

Artikelnummer des gewählten Schlauchsets eingeben und ENT drücken, um fortzufahren.

Wenn eine nicht kompatible Artikelnummer eingegeben wird, erscheint eine entsprechende Fehlermeldung.



Bildschirm 7.15: Materialkontrolle

Drücken Sie zur Bestätigung ENT und geben Sie die korrekte Artikelnummer ein. Wenn die eingegebene Artikelnummer immer noch falsch ist, erscheint die Meldung ein zweites Mal. Nach Drücken von ENT kehrt das Programm zum Programm-Menü zurück (siehe Bildschirm 7.12).

Wenn die Materialkontrolle erfolgreich war, fährt das Programm automatisch mit den Anweisungen zur Installation des Schlauchsets fort.

▶ **Mit SCHRITT 3 fortfahren.**

7.2.5 DEPLETION 2.1

WICHTIG

- *Das Separationsprogramm DEPLETION 2.1 darf nur mit dem CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01) durchgeführt werden.*
- *Im Bildschirmfenster werden Anweisungen und Diagramme als Verfahrensanleitungen angezeigt. Führen Sie jeden Schritt entsprechend den Anweisungen im Benutzerhandbuch durch und überprüfen Sie den Schritt, bevor Sie zum nächsten Schritt weitergehen. Um Fehler bei der Dateneingabe zu korrigieren, drücken Sie die Taste „Zurück“ (siehe Abschnitt „Beschreibung“ im CliniMACS Plus Instrument Benutzerhandbuch).*

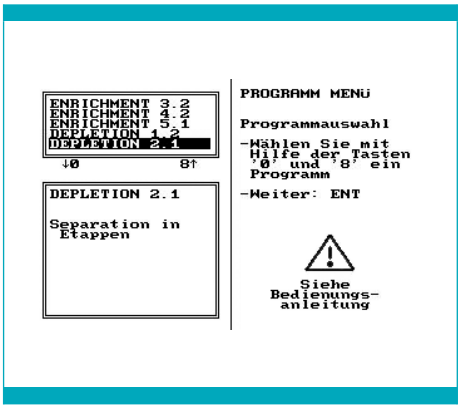
Wahl des Separationsprogramms DEPLETION 2.1

Das Bildschirmfenster zeigt Bildschirm 7.16 an.

Wählen Sie DEPLETION 2.1.

Um ein Separationsprogramm zu wählen, markieren Sie den Namen des Programms mit dem schwarzen Balken. Mit den Tasten 0 und 8 können Sie den Balken nach oben oder unten bewegen.

Um mit dem markierten Programm fortzufahren, ENT drücken.



Bildschirm 7.16: Wahl des Separationsprogramms

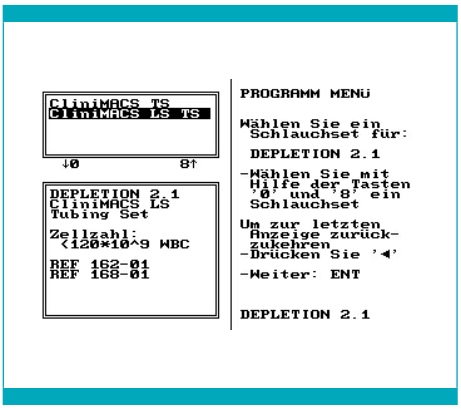
Wahl des Schlauchsets

Das Bildschirmfenster zeigt Bildschirm 7.17 an.

Überprüfen Sie, ob das korrekte Programm gewählt wurde.

Wenn nicht, drücken Sie ◄, um zum vorherigen Schritt zurückzukehren und die Auswahl zu ändern.

Wählen Sie das Schlauchset, indem Sie es mit dem schwarzen Balken im Feld links oben hervorheben. Mit den Tasten 0 und 8 können Sie den Balken nach oben oder unten bewegen.



Bildschirm 7.17: Wahl des Schlauchsets

Das Fenster darunter zeigt die relevanten Daten wie Kapazität und Artikelnummer des gewählten Schlauchsets an.

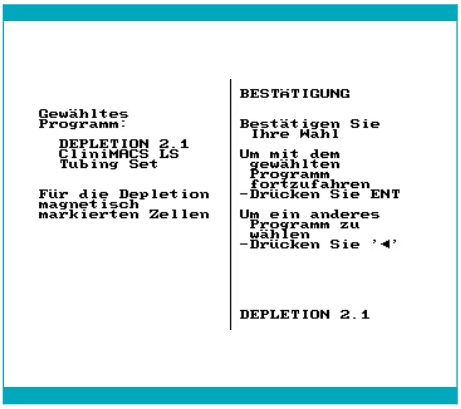
Um mit der gewählten Kombination aus Separationsprogramm und Schlauchset fortzufahren, ENT drücken.

Bestätigung

Das Bildschirmfenster zeigt Bildschirm 7.18 an.

Um die Kombination aus Separationsprogramm und Schlauchset zu bestätigen und fortzufahren, ENT drücken.

Oder drücken Sie ◄, um zum vorherigen Schritt zurückzukehren und die Auswahl zu ändern.



Bildschirm 7.18: Bestätigung

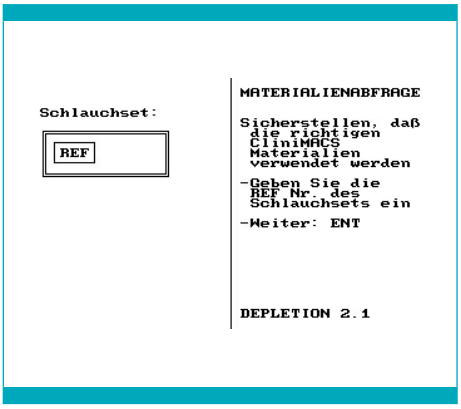
Materialkontrolle

Das Bildschirmfenster zeigt Bildschirm 7.19 an.

Die Abfrage der Artikelnummer (REF) des Schlauchsets dient als Sicherheitskontrolle, um zu gewährleisten, dass das gewählte Schlauchset verwendet werden kann.

Geben Sie die Artikelnummer des gewählten Schlauchsets ein und drücken Sie ENT, um fortzufahren.

Wenn eine nicht kompatible Artikelnummer eingegeben wird, erscheint eine entsprechende Fehlermeldung.



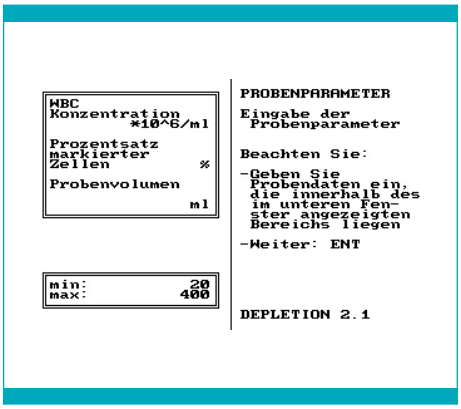
Bildschirm 7.19: Materialkontrolle

Drücken Sie zur Bestätigung ENT und geben Sie die korrekte Artikelnummer ein. Wenn die eingegebene Artikelnummer immer noch falsch ist, erscheint die Meldung ein zweites Mal. Nach Drücken von ENT kehrt das Programm zum Programm-Menü zurück (siehe Bildschirm 7.16).

Eingabe der Probenparameter

Wenn die Materialkontrolle erfolgreich war, fährt das Programm automatisch mit der Abfrage der Probenparameter fort, die benötigt werden, um die Separation auf jede einzelne Probe einzustellen und dem Anwender wichtige Informationen zu den benötigten Puffer- und Beutelvolumina zu geben.

Das Bildschirmfenster zeigt Bildschirm 7.20 an.



Bildschirm 7.20: Eingabe der Probenparameter

1. Geben Sie zuerst die WBC-Konzentration der Probe ein. Der zulässige Bereich wird im Feld unten links angezeigt. Drücken Sie ◄, um eine falsche Eingabe zu korrigieren.

   Kontrollieren Sie, ob der eingegebene Wert dem Wert der Probe entspricht. Anderenfalls wird die Probe unter Umständen nicht optimal verarbeitet.

   WICHTIG
   Alle erforderlichen Probenparameter beziehen sich auf die Probe nach dem Zellmarkierungs- und Spülverfahren. Der im Feld unten links angezeigte zulässige Bereich berücksichtigt immer die vorherige Eingabe. Nach jeder Eingabe berechnet die Software den zulässigen Bereich für den nächsten abgefragten Parameter neu.

   ⚠ VORSICHT

   Die Eingabe falscher Parameter kann zu nicht optimaler Probenverarbeitung führen und die Wahrscheinlichkeit eines Zielzellverlust erhöhen. Die Eingabe von Werten für WBC-Konzentration und/oder Anteil der markierten Zellen, die niedriger als die tatsächlichen Probenwerte sind, kann einen Zellverlust durch Überladung des Systems zur Folge haben. Die Eingabe eines niedrigeren Probenvolumens kann zum Zellverlust durch Überladung oder zu unvollständiger Probenverarbeitung führen. Wenn die Angabe eines der drei Parameter zu hoch ist, führt dies zu einer verlängerten Verarbeitungszeit und vergrößertem Volumen der Zielzellenfraktion. Stellen Sie stets sicher, dass Sie die richtigen Parameter eingeben.

   Um mit der nächsten Eingabe fortzufahren, ENT drücken.

2. Den Anteil der markierten Zellen eingeben. Kontrollieren Sie, ob der eingegebene Wert dem Wert der Probe entspricht. Anderenfalls wird die Probe unter Umständen nicht optimal verarbeitet (siehe „Wichtig").

   Um mit der nächsten Eingabe fortzufahren, ENT drücken.

3. Das Endvolumen der Zellprobe eingeben. Kontrollieren Sie, ob der eingegebene Wert dem Wert der Probe entspricht. Anderenfalls wird die Probe unter Umständen nicht optimal verarbeitet (siehe „Wichtig").

Um fortzufahren, ENT drücken.

Berechnung

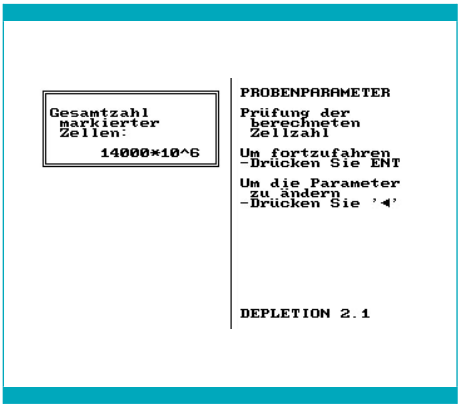
Die CliniMACS Plus Software berechnet die Gesamtzahl der markierten Zellen, um zu überprüfen, ob die Separationskapazität ausreicht.

Das Ergebnis erscheint in einer von zwei möglichen Bildschirmanzeigen:

- Das Ergebnis der Berechnung wird in einem ähnlichen Bildschirm wie Bildschirm 7.21 angezeigt. Überprüfen Sie, ob die berechnete Anzahl an markierten Zellen korrekt ist.

  Um fortzufahren, ENT drücken.

  Eine Korrektur der Daten ist möglich. Drücken Sie ◄, um zur Korrektur zum vorherigen Bildschirm zurückzukehren.

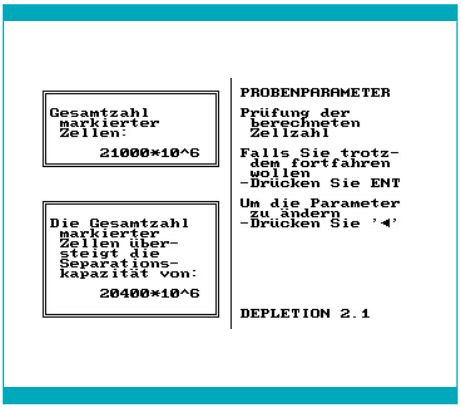


Bildschirm 7.21: Berechnung

- Wenn die berechnete Anzahl an markierten Zellen die Separationskapazität des CliniMACS Plus Systems überschreitet, erscheint eine ähnliche Bildschirmanzeige wie Bildschirm 7.22. Überprüfen Sie, ob die korrekten Probenparameter eingegeben wurden und die berechnete Anzahl an Zellen korrekt ist. Drücken Sie ◄, um zum vorherigen Bildschirm zurückzukehren und die Probenparameter zu korrigieren.

  Um eine Überladung des Systems zu vermeiden, teilen Sie die Probe und bestimmen Sie das Volumen jeder Portion. Drücken Sie ◄, um zum vorherigen Bildschirm 7.20 zurückzukehren. Geben Sie die Probenparameter für das erste Aliquot der Probe ein und fahren Sie mit der Separation dieses Aliquots fort. Nach Abschluss der Separation starten Sie eine zweite Separation mit dem zweiten Aliquot unter Verwendung eines neuen Schlauchsets.

  Um fortzufahren, ENT drücken.



Bildschirm 7.22: Berechnung: Zellzahl übersteigt die Separationskapazität

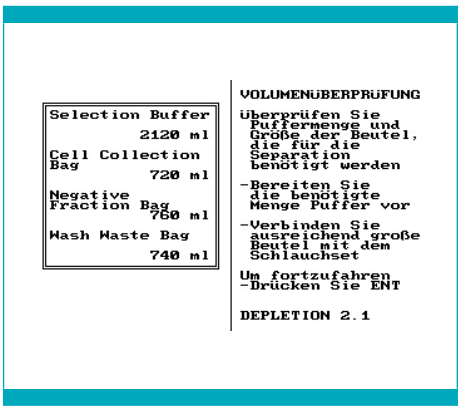
Volumenangaben

Aus der Gesamtzahl der markierten Zellen (siehe Abschnitt „Berechnung“) berechnet die Software die Anzahl der Separationszyklen, die benötigte Puffermenge für die gesamte Separation und die Flüssigkeitsvolumina, die im Negative Fraction Bag, Buffer Waste Bag und Cell Collection Bag gesammelt werden.

Die Standardwerte sind:

- CliniMACS PBS/EDTA Buffer: 1.000 mL
- Negative Fraction Bag: 500 mL
- Buffer Waste Bag: 500 mL
- Cell Collection Bag: 150 mL

Wenn einer der berechneten Werte diese Standardwerte überschreitet, erscheint Bildschirm 7.23 und gibt die Menge an Flüssigkeiten an, die beim Separationsprozess benötigt und angesammelt werden. Ersetzen Sie die mit dem Schlauchset bereitgestellten Beutel (Fassungsvermögen ca. 500 mL) durch andere Beutel von entsprechender Größe, falls ein Austausch erforderlich ist. Die ursprünglich am Schlauchset angebrachten Beutel sind mittels Luer-Verbindungen angeschlossen. Beutel, die als Ersatz für die Originalbeutel verwendet werden, sollten eine weibliche Luer-Verbindung haben. Standardbeutel können mit einem Luer/Spike Interconnector angeschlossen werden.



Bildschirm 7.23: Überprüfen der Volumina

1. Bestätigen Sie, dass die benötigte Puffermenge verfügbar ist. Bringen Sie nicht mehr als drei Liter Puffer am Beutelhalter an.

   HINWEIS

   Risiko einer Beschädigung des Instruments. Eine Überlastung der Beutelhalter kann das Instrument beschädigen. Die Tragfähigkeit eines einzelnen Beutelhalters beträgt 3 kg. Überlasten Sie die Beutelhalter nicht.

2. Öffnen Sie die Transportschale des Schlauchsets unter sterilen Bedingungen und ersetzen Sie die Originalbeutel bei Bedarf durch größere. Achten Sie darauf, dass der Durchfluss zu diesen Beuteln nicht eingeschränkt ist.

3. Bringen Sie einen Cell Collection Bag von ausreichender Größe an der freien Luer-Verbindung an. Falls im Bildschirm 7.23 nichts angegeben ist, beträgt das maximale Elutionsvolumen der Zielzellfraktion 150 mL. Stellen Sie sicher, dass der Durchfluss zum Cell Collection Bag nicht eingeschränkt ist.

WICHTIG

- *Stellen Sie sicher, dass die benötigte Puffermenge verfügbar und das im Bildschirm 7.23 angegebene Volumen der Beutel ausreichend ist. Anderenfalls ist die Leistung der Separation beeinträchtigt.*
- *Jegliche Modifikationen der CliniMACS Schlauchsets sollten unter sterilen Bedingungen, z.B. in einer sterilen Werkbank, durchgeführt werden.*
- *Bei der weiteren Analyse und Zellverarbeitung ist zu beachten, dass die im Bildschirm 7.23 angegebenen Volumina nicht die genauen Volumina sind, sondern Volumina innerhalb der Sicherheitsanforderungen.*

4. Überprüfen Sie die Luer-Lock-Verbindungen an den Säulen. Die Luer-Lock-Verbindungen müssen fest geschlossen sein.

Um fortzufahren, **ENT** drücken.

Das Programm fährt automatisch mit den Anweisungen zur Installation des Schlauchsets auf dem Instrument fort.

▶ **Mit SCHRITT 3 fortfahren.**

7.2.6 DEPLETION 3.1

WICHTIG

- *Das Separationsprogramm DEPLETION 3.1 darf nur mit dem CliniMACS Depletion Tubing Set (REF 261-01) durchgeführt werden.*
- *Im Bildschirmfenster werden Anweisungen und Diagramme als Verfahrensanleitungen angezeigt. Führen Sie jeden Schritt entsprechend den Anweisungen im Benutzerhandbuch durch und überprüfen Sie den Schritt, bevor Sie zum nächsten Schritt weitergehen. Um Fehler bei der Dateneingabe zu korrigieren, drücken Sie die Taste „Zurück" (siehe Abschnitt „Beschreibung" im CliniMACS Plus Instrument Benutzerhandbuch).*

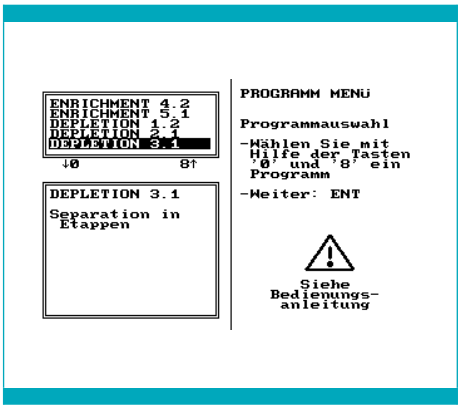
Wahl des Separationsprogramms DEPLETION 3.1

Das Bildschirmfenster zeigt Bildschirm 7.24 an.

Wählen Sie DEPLETION 3.1.

Um ein Separationsprogramm zu wählen, markieren Sie den Namen des Programms mit dem schwarzen Balken. Mit den Tasten **0** und **8** können Sie den Balken nach oben oder unten bewegen.

Um mit dem markierten Programm fortzufahren, **ENT** drücken.



Bildschirm 7.24: Wahl des Separationsprogramms

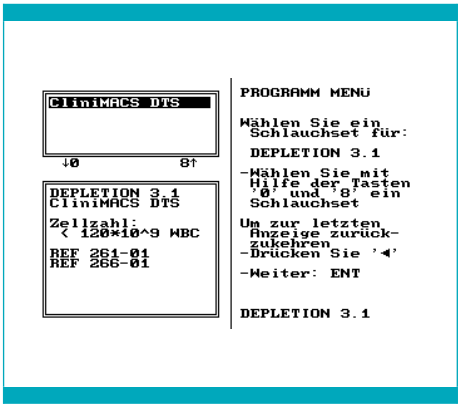
Wahl des Schlauchsets

Das Bildschirmfenster zeigt Bildschirm 7.25 an.

Überprüfen Sie, ob das korrekte Programm gewählt wurde. Oder drücken Sie ◀, um zum vorherigen Schritt zurückzukehren und die Auswahl zu ändern.

Wählen Sie das Schlauchset, indem Sie es mit dem schwarzen Balken im Feld links oben hervorheben. Mit den Tasten **0** und **8** können Sie den Balken nach oben oder unten bewegen.

Das Fenster darunter zeigt die relevanten Daten wie Kapazität und Artikelnummer des gewählten Schlauchsets an.



Bildschirm 7.25: Wahl des Schlauchsets

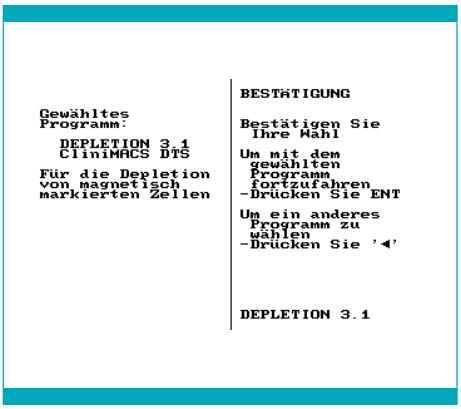
Um mit der gewählten Kombination aus Separationsprogramm und Schlauchset fortzufahren, **ENT** drücken.

Bestätigung

Das Bildschirmfenster zeigt Bildschirm 7.26 an.

Um die Kombination aus Separationsprogramm und Schlauchset zu bestätigen und fortzufahren, ENT drücken.

Oder drücken Sie ◄, um zum vorherigen Schritt zurückzukehren und die Auswahl zu ändern.



Bildschirm 7.26: Bestätigung

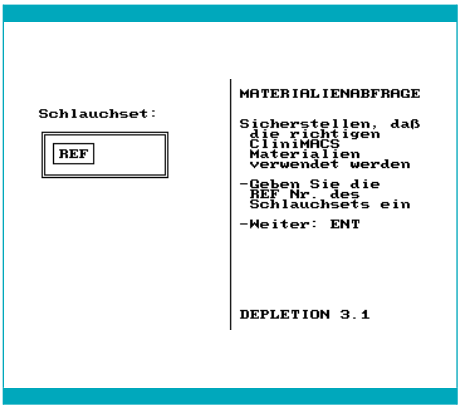
Materialkontrolle

Das Bildschirmfenster zeigt Bildschirm 7.27 an.

Die Abfrage der Artikelnummer (REF) des Schlauchsets dient als Sicherheitskontrolle, um zu gewährleisten, dass das gewählte Schlauchset verwendet werden kann.

Geben Sie die Artikelnummer des gewählten Schlauchsets ein und drücken Sie ENT, um fortzufahren.

Wenn eine nicht kompatible Artikelnummer eingegeben wird, erscheint eine entsprechende Fehlermeldung.



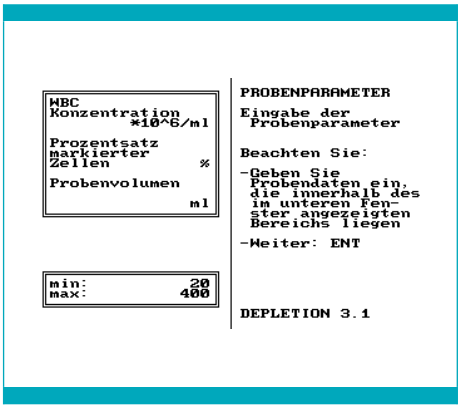
Bildschirm 7.27: Materialkontrolle

Drücken Sie zur Bestätigung ENT und geben Sie die korrekte Artikelnummer ein. Wenn die eingegebene Artikelnummer immer noch falsch ist, erscheint die Meldung ein zweites Mal. Nach Drücken von ENT kehrt das Programm zum Programm-Menü zurück (siehe Bildschirm 7.25).

Eingabe der Probenparameter

Wenn die Materialkontrolle erfolgreich war, fährt das Programm automatisch mit der Abfrage von Probenparametern fort, die benötigt werden, um die Separation auf jede einzelne Probe einzustellen und dem Anwender wichtige Informationen zu den benötigten Puffer- und Beutelvolumina zu geben.

Das Bildschirmfenster zeigt Bildschirm 7.28 an.



Bildschirm 7.28: Eingabe der Probenparameter

1. Geben Sie zuerst die WBC-Konzentration der Probe ein. Der zulässige Bereich wird im Feld unten links angezeigt. Drücken Sie ◄, um eine falsche Eingabe zu korrigieren.

   Kontrollieren Sie, ob der eingegebene Wert dem Wert der Probe entspricht. Anderenfalls wird die Probe unter Umständen nicht optimal verarbeitet.

   WICHTIG
   Alle erforderlichen Probenparameter beziehen sich auf die Probe nach dem Zellmarkierungs- und Spülverfahren. Der im Feld unten links angezeigte zulässige Bereich berücksichtigt immer die vorherige Eingabe. Nach jeder Eingabe berechnet die Software den zulässigen Bereich für den nächsten abgefragten Parameter neu.

   ⚠ VORSICHT

   Die Eingabe falscher Parameter kann zu nicht optimaler Probenverarbeitung führen und die Wahrscheinlichkeit eines Zielzellverlust erhöhen. Die Eingabe von Werten für WBC-Konzentration und/oder Anteil der markierten Zellen, die niedriger als die tatsächlichen Probenwerte sind, kann einen Zellverlust durch Überladung des Systems zur Folge haben. Die Eingabe eines niedrigeren Probenvolumens kann zum Zellverlust durch Überladung oder zu unvollständiger Probenverarbeitung führen. Wenn die Angabe eines der drei Parameter zu hoch ist, führt dies zu einer verlängerten Verarbeitungszeit und vergrößertem Volumen der Zielzellenfraktion. Stellen Sie stets sicher, dass Sie die richtigen Parameter eingeben.

   Um mit der nächsten Eingabe fortzufahren, ENT drücken.

2. Den Anteil der markierten Zellen eingeben. Kontrollieren Sie, ob der eingegebene Wert dem Wert der Probe entspricht. Anderenfalls wird die Probe unter Umständen nicht optimal verarbeitet (siehe „Wichtig").

   Um mit der nächsten Eingabe fortzufahren, ENT drücken.

3. Das Endvolumen der Zellprobe eingeben. Kontrollieren Sie, ob der eingegebene Wert dem Wert der Probe entspricht. Anderenfalls wird die Probe unter Umständen nicht optimal verarbeitet (siehe „Wichtig").

Um fortzufahren, ENT drücken.

Berechnung

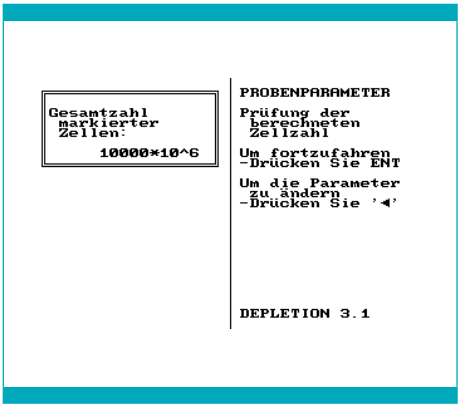
Die CliniMACS Plus Software berechnet die Gesamtzahl der markierten Zellen, um zu überprüfen, ob die Separationskapazität ausreicht.

Das Ergebnis erscheint in einer von zwei möglichen Bildschirmanzeigen:

- Das Ergebnis der Berechnung wird in einem ähnlichen Bildschirm wie Bildschirm 7.29 angezeigt. Überprüfen Sie, ob die berechnete Anzahl an markierten Zellen korrekt ist.

  Um fortzufahren, ENT drücken.

  Eine Korrektur der Daten ist möglich. Drücken Sie ◄, um zur Korrektur zum vorherigen Bildschirm zurückzukehren.



Bildschirm 7.29: Wahl des Schlauchsets

- Wenn die berechnete Anzahl an markierten Zellen die Separationskapazität des CliniMACS Plus Systems überschreitet, erscheint eine ähnliche Bildschirmanzeige wie Bildschirm 7.30. Überprüfen Sie, ob die korrekten Probenparameter eingegeben wurden und die berechnete Anzahl an Zellen korrekt ist. Drücken Sie ◄, um zum vorherigen Bildschirm zurückzukehren und die Probenparameter zu korrigieren.

  Um eine Überladung des Systems zu vermeiden, teilen Sie die Probe und bestimmen Sie das Volumen jeder Portion. Drücken Sie ◄, um zum vorherigen Bildschirm 7.28 zurückzukehren. Geben Sie die Probenparameter für das erste Aliquot der Probe ein und fahren Sie mit der Separation dieses Aliquots fort. Nach Abschluss der Separation starten Sie eine zweite Separation mit dem zweiten Aliquot unter Verwendung eines neuen Schlauchsets.

  Um fortzufahren, ENT drücken.



Bildschirm 7.30: Berechnung: Zellzahl übersteigt die Separationskapazität

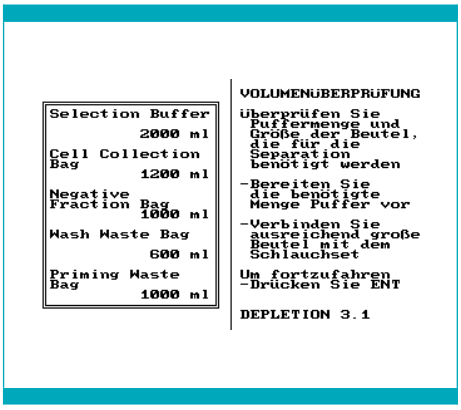
Volumenangaben

Aus der Gesamtzahl der markierten Zellen (siehe Abschnitt „Berechnung“) berechnet die Software die Anzahl der Separationszyklen, die benötigte Puffermenge für die gesamte Depletion und die Flüssigkeitsvolumina, die im Cell Collection Bag, Non-Target Cell Bag und Reapplication Bag gesammelt werden.

WICHTIG

- *Der Negative Fraction Bag entspricht dem Non-Target Cell Bag.*
- *Der Priming Waste Bag entspricht dem Reapplication Bag.*

Wenn einer der berechneten Werte diese Standardwerte überschreitet, erscheint eine Bildschirmanzeige wie Bildschirm 7.31 und gibt die Menge an Flüssigkeiten an, die beim Separationsprozess benötigt und angesammelt werden. Ersetzen Sie die mit dem Schlauchset bereitgestellten Beutel durch andere Beutel von entsprechender Größe, falls ein Austausch erforderlich ist. Die ursprünglich am Schlauchset angebrachten Beutel sind mittels Luer-Verbindungen angeschlossen. Beutel, die als Ersatz für die Originalbeutel verwendet werden, sollten eine weibliche Luer-Verbindung haben. Standardbeutel können mit einem Luer/Spike Interconnector angeschlossen werden.



Bildschirm 7.31: Überprüfen der Volumina

1. Bestätigen Sie, dass die benötigte Puffermenge verfügbar ist. Bringen Sie nicht mehr als drei Liter Puffer am Beutelhalter an.

   HINWEIS

   Risiko einer Beschädigung des Instruments. Eine Überlastung der Beutelhalter kann das Instrument beschädigen. Die Tragfähigkeit eines einzelnen Beutelhalters beträgt 3 kg. Überlasten Sie die Beutelhalter nicht.

2. Öffnen Sie die Transportschale des Schlauchsets unter sterilen Bedingungen und ersetzen Sie die Originalbeutel bei Bedarf durch größere. Achten Sie darauf, dass der Durchfluss zu diesen Beuteln nicht eingeschränkt ist.

3. Falls ein Austausch erforderlich ist, ersetzen Sie den Cell Collection Bag des Schlauchsets durch einen Transferbeutel von ausreichender Größe. Bestimmen Sie das Gewicht des neuen, leeren Cell Collection Bag und notieren Sie dieses. Stellen Sie sicher, dass der Durchfluss zum Cell Collection Bag nicht eingeschränkt ist. Alternativ kann ein zusätzlicher 600-mL-Transferbeutel am ersten Cell Collection Bag angebracht werden, z.B. unter Verwendung eines Plasma-Transfersets.

   WICHTIG

   - *Vergewissern Sie sich, dass die benötigte Puffermenge verfügbar und das im Bildschirm 7.31 angegebene Volumen der Beutel ausreichend ist. Anderenfalls ist die Leistung der Separation beeinträchtigt.*
   - *Jegliche Modifikationen der CliniMACS Schlauchsets sollten unter sterilen Bedingungen, z.B. in einer sterilen Werkbank, durchgeführt werden.*

- *Bei der weiteren Analyse und Zellverarbeitung ist zu beachten, dass die im Bildschirm 7.31 angegebenen Volumina nicht die genauen Volumina sind, sondern Volumina innerhalb der Sicherheitsanforderungen.*

4. Überprüfen Sie die Luer-Lock-Verbindungen an den Säulen. Die Luer-Lock-Verbindungen müssen fest geschlossen sein.

Um fortzufahren, **ENT** drücken.

Das Programm fährt automatisch mit den Anweisungen zur Installation des Schlauchsets auf dem Instrument fort.

▶ **Mit SCHRITT 3 fortfahren.**

7.3 SCHRITT 3: Installation von CliniMACS Schlauchsets

7.3.1 CliniMACS Tubing Set und CliniMACS Tubing Set LS

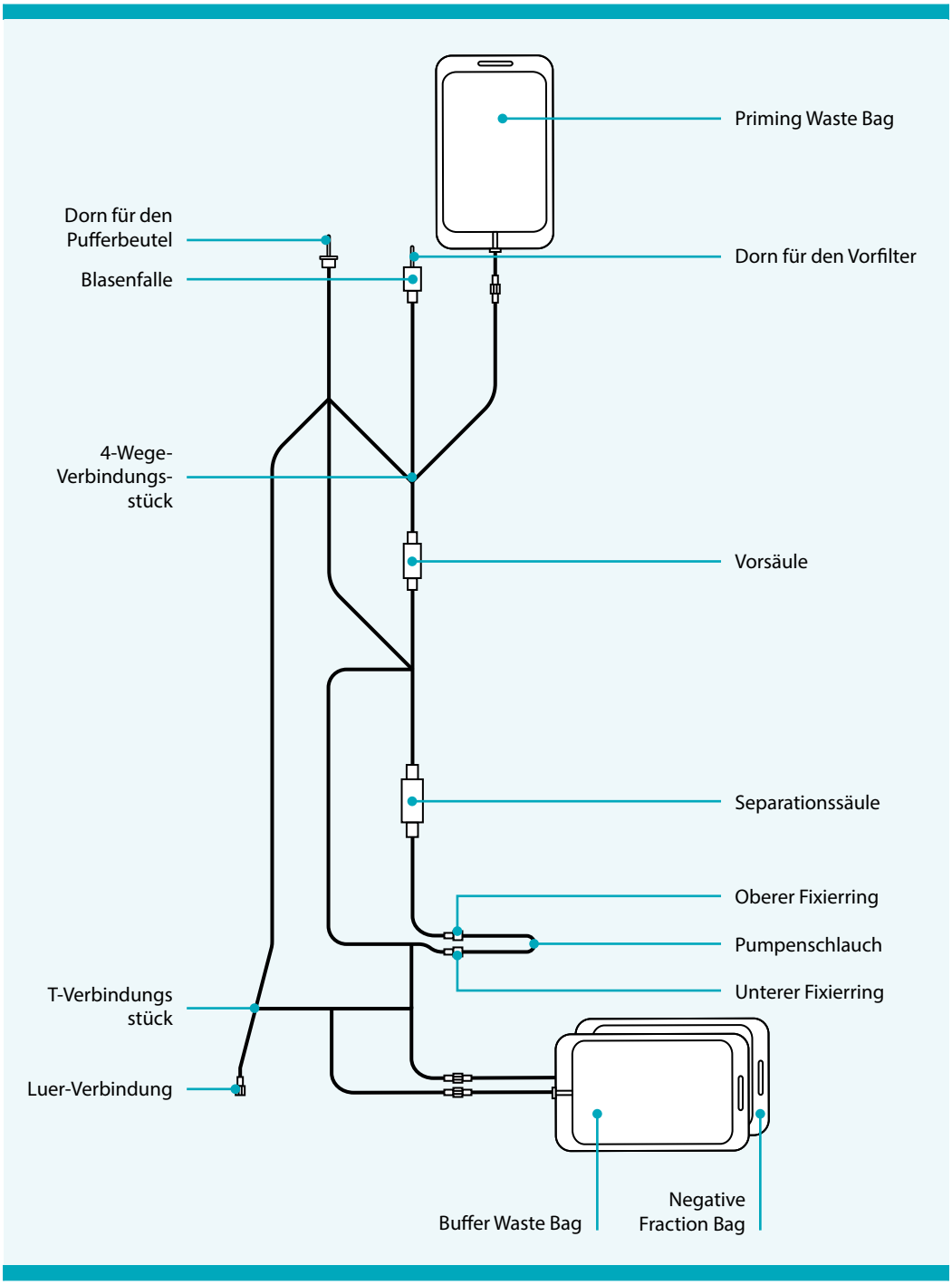
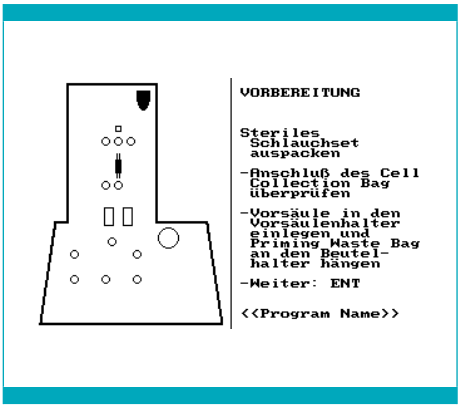


Abbildung 7.2: Allgemeiner Aufbau eines CliniMACS Schlauchsets (z.B. CliniMACS Tubing Set)

Vorbereitung der Installation des Schlauchsets

Das Bildschirmfenster zeigt Bildschirm 7.32 an.

Auf der rechten Seite des Bildschirms wird die Anleitung angezeigt und links daneben ein entsprechendes Diagramm. Die blinkenden Elemente zeigen die Bereiche an, die jeweils beschrieben werden.



Bildschirm 7.32: Auspacken des Schlauchsets

Das CliniMACS Tubing Set und das CliniMACS Tubing Set LS werden in versiegelten, sterilisierten Verpackungen geliefert. Jedes Schlauchset umfasst vormontierte Schläuche und Säulen für eine Zellseparation (siehe Abbildung 7.2). Wenn die Verpackung unversehrt ist, besteht ein steriler Flüssigkeitsweg.

⚠ WARNUNG

Kontaminationsgefahr. Eine beschädigte Verpackung weist darauf hin, dass das Schlauchset möglicherweise nicht mehr steril ist und daher nicht verwendet werden darf. Inspizieren Sie die Verpackung sorgfältig auf Beschädigungen, Löcher oder Risse. Verwenden Sie das Schlauchset nur, wenn die Verpackung unbeschädigt und versiegelt ist.

Hinweis: Das CliniMACS Plus Instrument zeigt die Bezeichnung des gewählten Programms, z.B. CD34 SELECTION 1, am unteren Bildschirmrand an. Bei jedem Schritt der Installation des Schlauchsets kann die Taste „Zurück“ (siehe Abschnitt „Beschreibung“ im CliniMACS Plus Instrument Benutzerhandbuch) gedrückt werden, um zum vorherigen Schritt zurückzukehren.

1. Die Chargennummer und das Verfalldatum des Schlauchsets notieren.

   Das sterile Schlauchset unter sterilen Bedingungen (z.B. in einer sterilen Werkbank) auspacken. Vor Gebrauch des CliniMACS Tubing Set LS die zur Verpackung angebrachte Federklemme entfernen. Die Klemme trägt die Aufschrift „Klemme vor der Montage in das CliniMACS Plus Instrument entfernen“.

2. Die Luer-Lock-Verbindungen zu den Beuteln überprüfen. Die Luer-Lock-Verbindungen müssen fest geschlossen sein.

Cell Collection Bag verbinden

1. Das Gewicht des leeren Cell Collection Bag notieren.
2. In aseptischer Umgebung die Kappen entfernen und den sterilen Cell Collection Bag mit montiertem Luer/Spike Interconnector am Schlauchset anbringen, bevor das Schlauchset auf das CliniMACS Plus Instrument installiert wird. Darauf achten, dass der Originalschlauch des Cell Collection Bag entweder abgeklemmt oder fest verschlossen ist.

   Wenn mehr als ein Cell Collection Bag für eine Separation benötigt wird, die Beutel mithilfe eines Plasma-Transfersets verbinden. Darauf achten, dass alle Verbindungen fest geschlossen sind.
3. Stellen Sie sicher, dass der Durchfluss zum Cell Collection Bag nicht eingeschränkt ist.
4. Mit der Installation des Schlauchsets nach dem im folgenden beschriebenen Verfahren oder gemäß der Beschreibung unter „Alternative Installation der CliniMACS Tubing Sets“ fortfahren.

Anbringen des Priming Waste Bag und Einsetzen der Vorsäule

Das Bildschirmfenster zeigt Bildschirm 7.32 an.

1. Den Priming Waste Bag an den rechten Beutelhalter des Instruments hängen (siehe Abbildung 7.3).
2. Die Höhe des Beutelhalters anpassen. Den Beutelhalter entsprechend der Größe des Priming Waste Bag anheben oder absenken. Darauf achten, dass der Beutelhalter hoch genug positioniert ist, um starke Biegungen des Schlauchs, die den Durchfluss behindern können, zu vermeiden, und dass der Halter niedrig genug ist, um zu vermeiden, dass der Schlauch oder die Verbindungen übermäßig gespannt werden.
3. Die Vorsäule in den Halter einsetzen (siehe Abbildung 7.4).

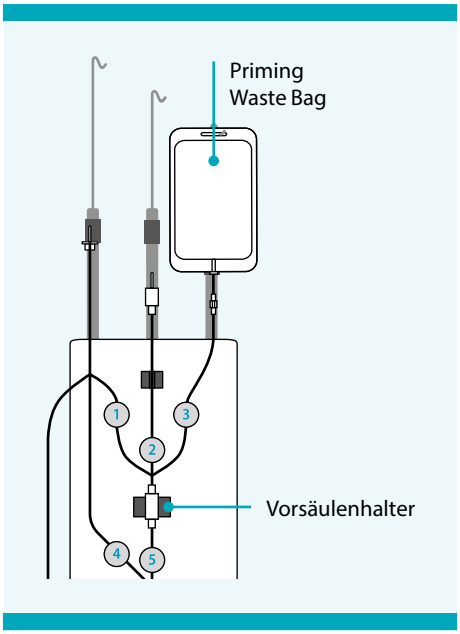


Abbildung 7.3: Anhängen des Priming Waste Bag an den Beutelhalter

Um fortzufahren, **ENT** drücken.

Einsetzen der Separationssäule und Bestücken von Ventil 5

Das Bildschirmfenster zeigt Bildschirm 7.33 an.

Die auf dem Bildschirm schwarz dargestellten Ventile werden automatisch geöffnet, um das Einführen des Schlauchs zu ermöglichen.

1. Die Separationssäule in den Separationssäulenhalter einsetzen (siehe Abbildung 7.4).

   ⚠ WARNUNG

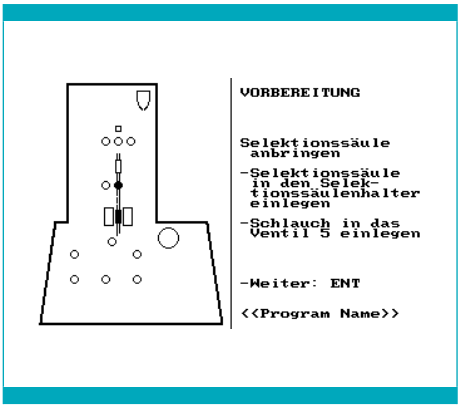
   Verletzungsgefahr. Wenn die Separationssäule bei eingeschalteter Magneteinheit eingesetzt oder entfernt wird, besteht Verletzungsgefahr. Installieren oder entfernen Sie dieSeparationssäulenurbeiausgeschalteter Magneteinheit.

2. Den Schlauch in das Ventil 5 einsetzen.

WICHTIG

- *Bei der Durchführung jedes Schrittes alle Schläuche und Verbindungen auf Knicke oder starke Biegungen, die den Durchfluss von Flüssigkeit behindern können, kontrollieren. An allen Ventilen überprüfen, ob der Schlauch passgenau sitzt.*
- *Das Schlauchset nur in offene Ventile einsetzen (wenn der Knopf gedrückt ist). Der Schlauch sitzt nicht korrekt, wenn er in ein geschlossenes Ventil eingesetzt wird.*
- *Wenn der Schlauch nach Schließen eines Ventils angepasst werden muss, nicht am Schlauch ziehen, ohne den Ventilknopf zum Öffnen des Ventils zu drücken (siehe Abbildung 7.5).*

Um fortzufahren, **ENT** drücken.



Bildschirm 7.33: Einsetzen der Separationssäule und Bestücken von Ventil 5

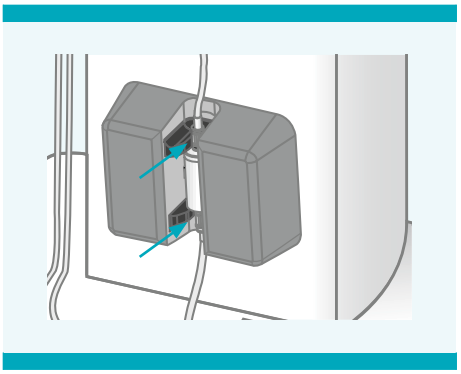


Abbildung 7.4: Separationssäule im Separationssäulenhalter

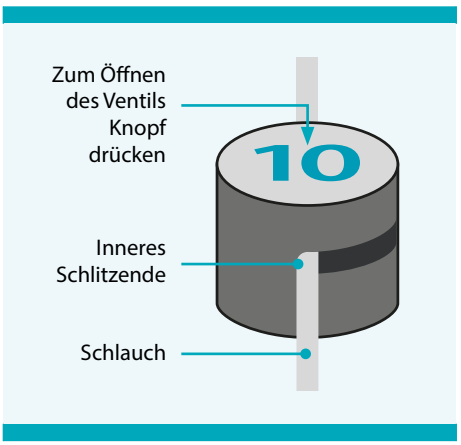
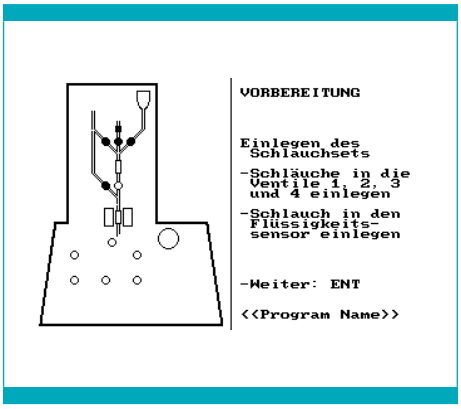


Abbildung 7.5: Korrektes Einsetzen des Schlauchs

Bestücken der Ventile 1, 2, 3 und 4

Das Bildschirmfenster zeigt Bildschirm 7.34 an.



Bildschirm 7.34: Bestücken der Ventile 1, 2, 3, 4 und des Flüssigkeitssensors

1. Den Schlauch in das Ventil 4 einsetzen. Darauf achten, dass der Schlauch vollständig in der Ventilöffnung sitzt (siehe Abbildung 7.5). Achten Sie besonders auf den Bereich zwischen den Ventilen 4 und 5 (siehe Abbildung 7.6) und halten Sie das Vier-Wege-Verbindungsstück aufrecht.
2. Den Schlauch in Ventil 1 einsetzen.
3. Das 4-Wege-Verbindungsstück direkt unter Ventil 2 positionieren. Besonders auf den Bereich unterhalb von Ventil 2 achten.
4. Den Schlauch in die Ventile 2 und 3 einsetzen.
5. Den Schlauch zwischen Ventil 2 und der Blasenfalle in den Flüssigkeitssensor einsetzen. Darauf achten, dass der Schlauch korrekt im Sensor-Verbindungsstück sitzt.

   WICHTIG

   Um einen ordnungsgemäßen Betrieb zu gewährleisten, müssen sowohl der Flüssigkeitssensor als auch der eingesetzte Schlauch trocken sein. Beide Teile sorgfältig inspizieren. Falls Flüssigkeit vorhanden ist, den Bereich mit einem weichen, fusselfreien Tuch trocknen.

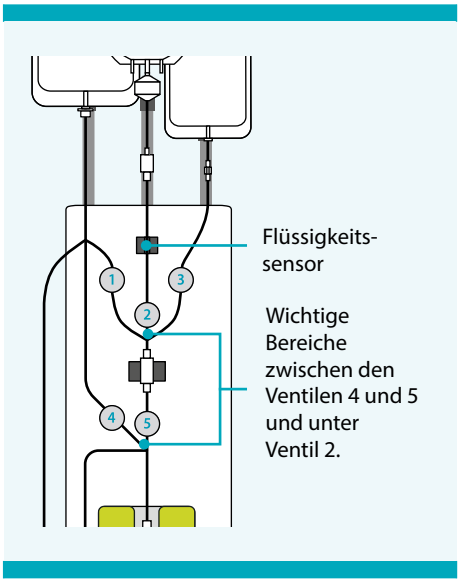
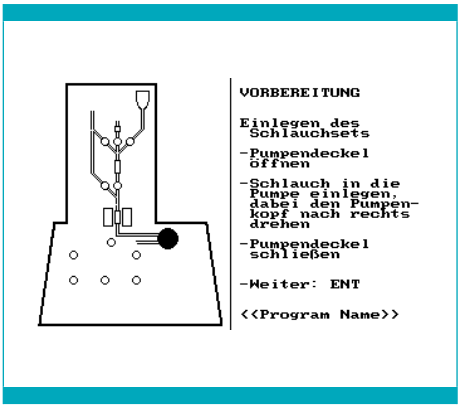


Abbildung 7.6: Schläuche in Ventilen

Um fortzufahren, **ENT** drücken.

Einlegen des Pumpenschlauchs

Das Bildschirmfenster zeigt Bildschirm 7.35 an.



Bildschirm 7.35: Einlegen des Pumpenschlauchs

1. Den Pumpendeckel am linken Rand anheben und öffnen.
2. Den oberen Fixierring über dem Pumpenschlauch in die Rille für den Fixierring am Pumpengehäuse einsetzen (siehe Abbildung 7.7).
3. Die Pumpenrolle im Uhrzeigersinn drehen, bis der Schlauch zwischen die beiden Führungsstiftpaare eingefädelt ist und passgenau um die Pumpenrolle verläuft. Darauf achten, dass der Schlauch am Ende der Führungsstifte nicht eingeklemmt ist. Falls eine Anpassung des Schlauchs in der Pumpe erforderlich ist, kann der Schlauch durch Anheben des unteren Endes und Drehen der Pumpenrolle gegen den Uhrzeigersinn ausgespannt werden.
4. Den unteren Fixierring über dem Pumpenschlauch in die Rille für den Fixierring am Pumpengehäuse einsetzen.
5. Die Pumpenrolle im Uhrzeigersinn und gegen den Uhrzeigersinn drehen, um sicherzustellen, dass die Pumpenrolle frei beweglich ist.
6. Den Pumpendeckel schließen.

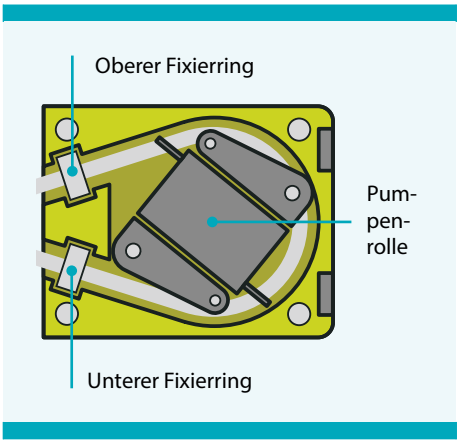


Abbildung 7.7: Einlegen des Pumpenschlauchs

WICHTIG

Im Verlauf des Separationsprogramms stoppt der Pumpenlauf sofort, wenn das Pumpengehäuse geöffnet wird. Falls dieses länger als 600 Sekunden offen bleibt, bricht das Instrument den im Gang befindlichen Lauf ab.

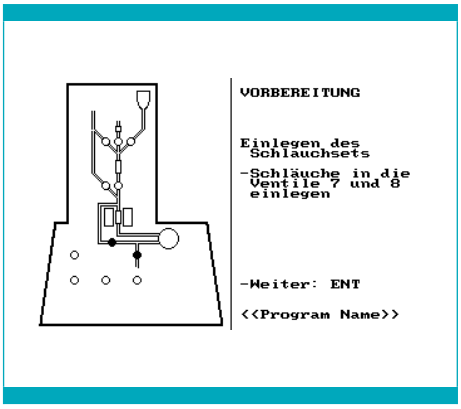
Um fortzufahren, **ENT** drücken.

Bestücken der Ventile 7 und 8

Das Bildschirmfenster zeigt Bildschirm 7.36 an.

1. Den Schlauch in das Ventil 7 einsetzen.
2. Den Schlauch in das Ventil 8 einsetzen.

Um fortzufahren, **ENT** drücken.



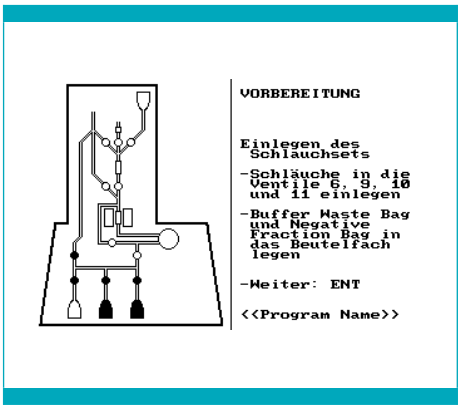
Bildschirm 7.36: Bestücken der Ventile 7 und 8

Bestücken der Ventile 6, 9, 10 und 11

Das Bildschirmfenster zeigt Bildschirm 7.37 an.

1. Den Schlauch in die Ventile 6, 9, 10 und 11 einsetzen.
2. Den Negative Fraction Bag und den Buffer Waste Bag in das Beutelfach platzieren. Darauf achten, dass der Schlauch nicht unter dem Deckel des Beutelfachs komprimiert wird.

Um fortzufahren, **ENT** drücken.



Bildschirm 7.37: Bestücken der Ventile 6, 9, 10 und 11

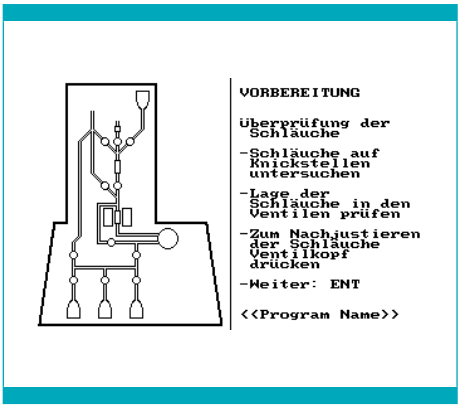
Nachprüfen aller Schläuche und Verbindungen

Das Bildschirmfenster zeigt Bildschirm 7.38 an.

Überprüfen Sie alle Schläuche und Verbindungen nochmals, bevor Sie mit der Zellseparation beginnen.

Hinweis: Überprüfen Sie, ob der Schlauch an allen Ventilen richtig eingesetzt ist. Achten Sie darauf, dass der Schlauch in gleichmäßigen Abständen verläuft und keine Knicke oder zu stark gespannten Bereiche aufweist. Achten Sie besonders auf den Bereich an der Vorsäule sowie den Bereich zwischen der Pumpe und den Ventilen 7 und 8 (siehe Abbildung 7.8) und zwischen den Ventilen 4 und 5 (siehe Abbildung 7.6). Wenn der Schlauch nach Schließen eines Ventils angepasst werden muss, nicht am Schlauch ziehen, ohne den Ventilknopf zum Öffnen des Ventils zu drücken. Nachdem der Schlauch angepasst wurde, müssen die entsprechenden Ventile unbedingt zweimal fest gedrückt werden.

Um fortzufahren, **ENT** drücken.



Bildschirm 7.38: Nachprüfen aller Schläuche und Verbindungen

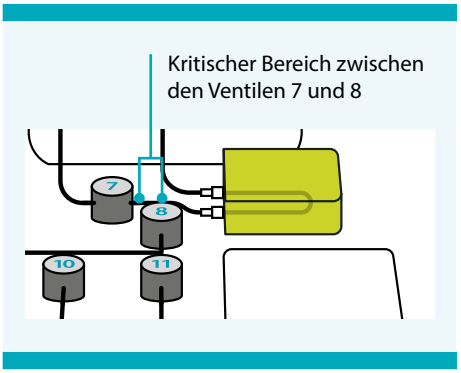


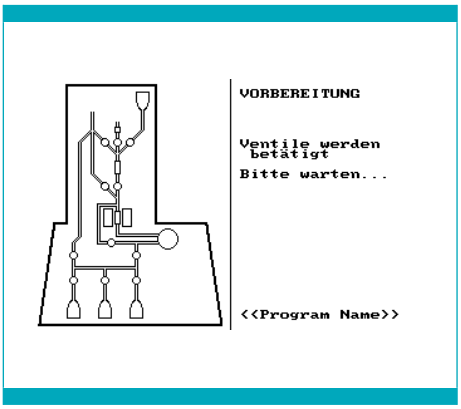
Abbildung 7.8: Schläuche in Ventilen

Anpassen der Ventile

Das Bildschirmfenster zeigt Bildschirm 7.39 an.

Um sicherzustellen, dass die Schläuche korrekt in den Ventilen sitzen, betätigt das Instrument alle Ventile zweimal nacheinander. Beobachten und horchen Sie, ob alle Ventile ordnungsgemäß arbeiten. Falls ein Ventil nicht korrekt arbeitet, siehe Kapitel 8 “Fehlerbehebung” auf Seite 215. Dieser Schritt kann durch Drücken von ◄ und anschließend **ENT** wiederholt werden (siehe Abschnitt „Beschreibung“ im Benutzerhandbuch des CliniMACS Plus Instruments).

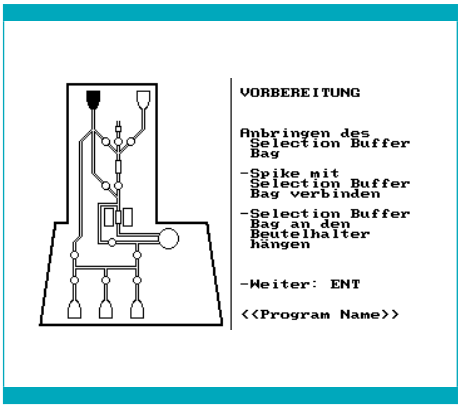
Auch der Magnetantrieb wird bei dieser Prüfsequenz getestet.



Bildschirm 7.39: Anpassen der Ventile

Anbringen des CliniMACS PBS/EDTA Buffer

Das Bildschirmfenster zeigt Bildschirm 7.40 an.



Bildschirm 7.40: Anhängen des Pufferbeutels

Der vorgeschriebene Puffer für CliniMACS Plus Separationen ist der CliniMACS PBS/EDTA Buffer supplementiert mit HSA bis zu einer Endkonzentration von 0,5% (w/v).

1. Mit aseptischen Techniken die Kappe vom Dorn für den Pufferbeutel am Schlauchset abnehmen (siehe Abbildung 7.2 auf Seite 157) und den Dorn mit dem Pufferbeutel verbinden. Darauf achten, dass das Septum durchstochen wird, um den Durchfluss von Flüssigkeit zu ermöglichen. Den Beutel behutsam zusammendrücken, um zu bestätigen, dass der Dorn das Beutelseptum durchstochen hat.

   Wenn mehr als ein Liter Puffer für eine Separation benötigt wird, zwei Pufferbeutel mithilfe eines Plasma-Transfersets verbinden.

2. Den Pufferbeutel an den Haken des Beutelhalters hängen (siehe Abbildung 7.9).

3. Die Höhe des Pufferbeutelhalters anpassen. Den Beutelhalter entsprechend der Größe des Pufferbeutels anheben oder absenken. Darauf achten, dass der Beutelhalter hoch genug positioniert ist, um starke Biegungen des Schlauchs, die den Durchfluss behindern können, zu vermeiden, und dass der Halter niedrig genug ist, um zu vermeiden, dass der Schlauch oder die Verbindungen übermäßig gespannt werden.

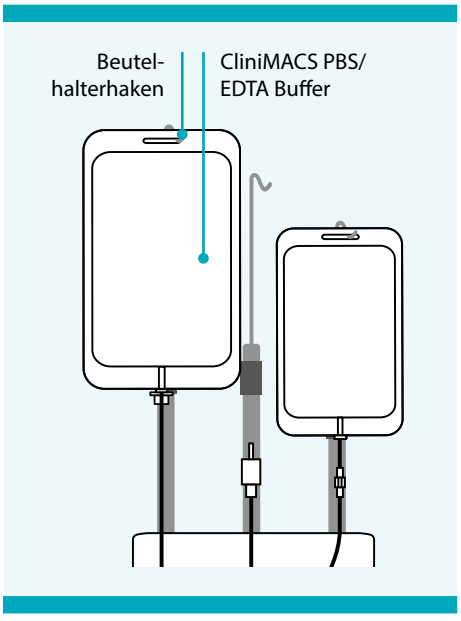


Abbildung 7.9: Anhängen des Pufferbeutels

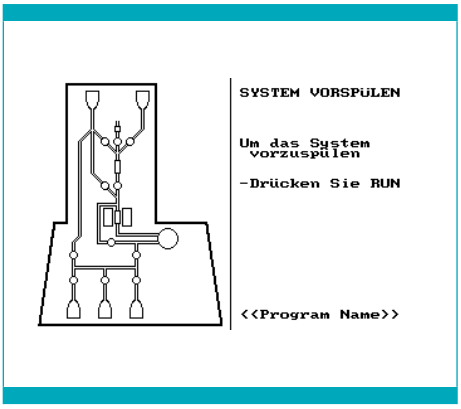
HINWEIS

Risiko einer Beschädigung des Instruments. Eine Überlastung der Beutelhalter kann das Instrument beschädigen. Die Tragfähigkeit eines einzelnen Beutelhalters beträgt 3 kg. Überlasten Sie die Beutelhalter nicht.

Um fortzufahren, **ENT** drücken.

Vorspülen

Das Bildschirmfenster zeigt Bildschirm 7.41 an.



Bildschirm 7.41: Vorspülen

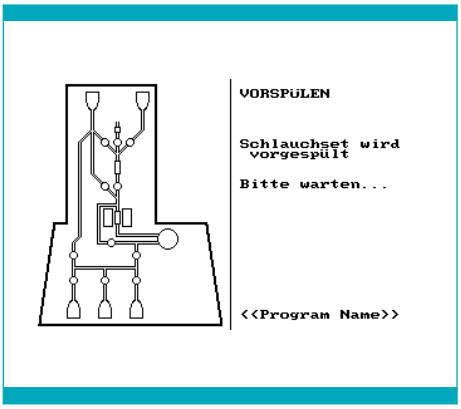
Um das Vorspülen zu starten, **RUN** drücken.

Das Bildschirmfenster zeigt Bildschirm 7.42 an.

Während der Vorspülphase wird das Schlauchset mit Puffer gefüllt. Der Puffer zirkuliert durch das Schlauchset einschließlich der Vorsäule und der Separationssäule. Der Spülabfall wird im Priming Waste Bag und im Buffer Waste Bag gesammelt (siehe Abbildung 7.2 auf Seite 157). Die Vorspülzyklen werden mehrmals wiederholt. Die Vorspülphase dauert ca. 1 Minute. Der Vorspülstatus wird auf dem Bildschirm laufend aktualisiert.

Prüfung während des Vorspülens

Während der Vorspülphase sollten Sie alle Schläuche, Verbindungsstücke, Ventile und Säulen auf Lecks oder Knicke, die den Durchfluss behindern können, überprüfen.



Bildschirm 7.42: Vorspülen läuft

Falls Lecks oder Funktionsstörungen beobachtet werden, drücken Sie **STOP**, um den Lauf zu stoppen.

Sie haben 600 Sekunden Zeit, um das Problem zu beheben.

Setzen Sie den Prozess durch Drücken von **OK** fort.

Nach 600 Sekunden wird die Separation abgebrochen. Wenn das Problem nicht behoben werden kann oder das Schlauchset defekt ist, das Schlauchset entfernen und durch ein neues ersetzen.

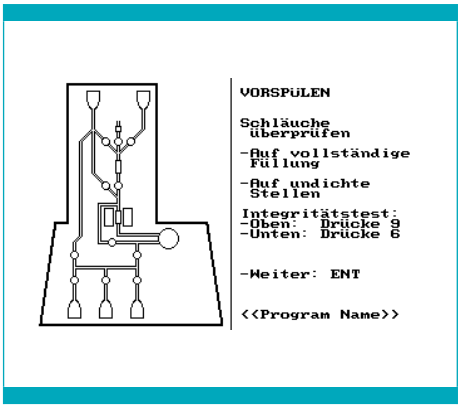
Hinweis: Nachdem das Vorspülen gestartet wurde, kann nicht mehr zum Setup-Verfahren zurückgekehrt werden.

Endkontrolle aller Schläuche und Verbindungen

Das Bildschirmfenster zeigt Bildschirm 7.43 an.

Bevor Sie das Programm fortsetzen, überprüfen Sie Folgendes:

- Flüssigkeit in allen Teilen des Schlauchsets (außer dem Vorfilter)
- Keine Luft im Schlauchset
- Flüssigkeit im Priming Waste Bag und im Buffer Waste Bag
- Keine Flüssigkeit im Negative Fraction Bag oder im Cell Collection Bag



Bildschirm 7.43: Endkontrolle der Schläuche

Drücken Sie noch nicht ENT.

Integritätstest

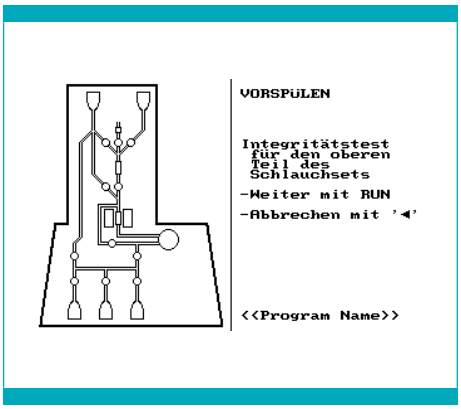
Als zusätzliche Sicherheitsmaßnahme muss ein Integritätstest durchgeführt werden, um das Schlauchset auf Lecks zu überprüfen. Die Prüfsequenz besteht aus zwei automatischen Subsequenzen, mit denen der obere und der untere Teil des Schlauchsets separat druckbeaufschlagt und beobachtet werden können.

Integritätstest des oberen Teils des Schlauchsets

1. Bei der „Endkontrolle aller Schläuche und Verbindungen“ zeigt das Bildschirmfenster Bildschirm 7.43 an.
2. Nach Durchführung der „Endkontrolle aller Schläuche und Verbindungen“ mit der Durchführung des Integritätstests fortfahren. **Drücken Sie nicht** ENT.
3. Zur Durchführung des Integritätstests des oberen Teils drücken Sie 9.

   Das Bildschirmfenster zeigtBildschirm 7.44 an.
4. Um die Prüfsequenz zu starten, drücken Sie RUN.

   Um zu Bildschirm 7.43 zurückzukehren, drücken Sie ◄.



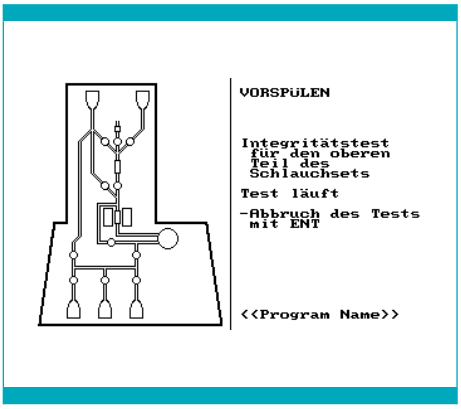
Bildschirm 7.44: Starten des Integritätstests des oberen Teils

5. Nach Drücken von RUN startet das Instrument die automatische Prüfsequenz für den oberen Teil des Schlauchsets.

   Das Bildschirmfenster zeigt Bildschirm 7.45 an.

   Ein Überdruck wird aufgebaut und zwei Minuten aufrechterhalten. Beobachten Sie während dieser Zeit alle Verbindungen über dem oberen Anschluss des Pumpenschlauchs.

   Die Prüfsequenz kann an jedem Punkt durch Drücken von ENT beendet werden.



Bildschirm 7.45: Laufender Integritätstest des oberen Teils

6. Nach zwei Minuten wird der Druck automatisch abgelassen, und das Bildschirmfenster zeigt Bildschirm 7.43 an.

   Überprüfen Sie, ob Lecks während der Prüfsequenz aufgetreten sind. Wenn an einer Verbindung des Schlauchsets ein Leck beobachtet wird, muss das Schlauchset entfernt und durch ein neues ersetzt werden. Wenden Sie sich an den Miltenyi Biotec Technical Support, um Anweisungen zur Rücksendung des defekten Schlauchsets zu erhalten.

7. Wenn keine Lecks beobachtet werden, mit dem Integritätstest des unteren Teils des Schlauchsets fortfahren.

Integritätstest des unteren Teils des Schlauchsets

Das Bildschirmfenster zeigt Bildschirm 7.46 an.

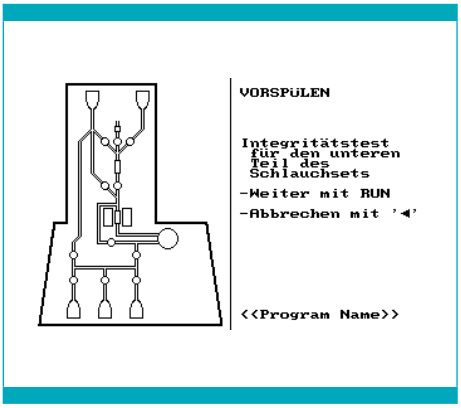
1. Zur Durchführung des Integritätstests des unteren Teils drücken Sie 6.
   Drücken Sie nicht ENT.

   Das Bildschirmfenster zeigt Bildschirm 7.46 an.

2. Um die Prüfsequenz zu starten, drücken Sie RUN.

   Um zu Bildschirm 7.43 zurückzukehren, drücken Sie ◄.

3. Nach Drücken von RUN startet das Instrument die automatische Prüfsequenz für den unteren Teil des Schlauchsets.

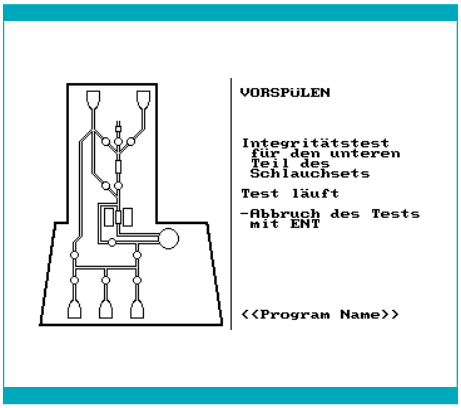


Bildschirm 7.46: Starten des Integritätstests des unteren Teils

Das Bildschirmfenster zeigt Bildschirm 7.47 an.

Ein Überdruck wird aufgebaut und 30 Sekunden aufrechterhalten. Beobachten Sie während dieser Zeit den unteren Anschluss des Pumpenschlauchs und die T-Verbindungsstücke zwischen den Ventilen 6, 8, 9, 10 und 11.

Die Prüfsequenz kann an jedem Punkt durch Drücken von **ENT** beendet werden.



Bildschirm 7.47: Laufender Integritätstest des unteren Teils

4. Nach 30 Sekunden wird der Druck automatisch abgelassen, und das Bildschirmfenster zeigt Bildschirm 7.43 an.

   Überprüfen Sie, ob Lecks während der Prüfsequenz aufgetreten sind. Wenn an einer Verbindung des Schlauchsets ein Leck beobachtet wird, muss das Schlauchset entfernt und durch ein neues ersetzt werden. Wenden Sie sich an den Miltenyi Biotec Technical Support, um Anweisungen zur Rücksendung des defekten Schlauchsets zu erhalten.

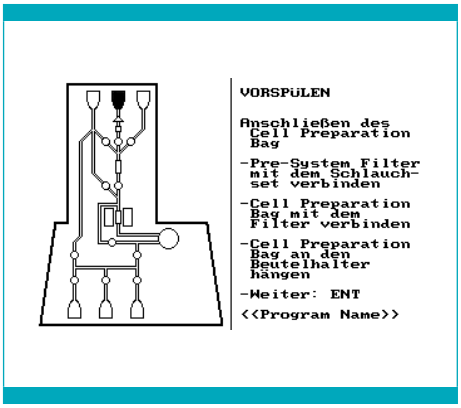
5. Wenn keine Lecks beobachtet werden, können Sie mit dem nächsten Schritt fortfahren, indem Sie **ENT** drücken.

Verbinden des Cell Preparation Bag

Das Bildschirmfenster zeigt Bildschirm 7.48 an.

Verbinden Sie den Cell Preparation Bag, der das fertig markierte Zellprodukt enthält:

1. Die Kappe vom Dorn für die Blasenfalle des Schlauchsets abnehmen (siehe Abbildung 7.2).
2. Die Kappe vom stumpfen Ende des Vorfilters abnehmen (siehe Abbildung 7.10). Den Dorn fest in den Vorfilter einstechen.
3. Die Kappe vom Dorn des Vorfilters abnehmen.



Bildschirm 7.48: Verbinden des Cell Preparation Bag

4. Den Dorn des Vorfilters in einen freien Zugang des Cell Preparation Bag einstechen und darauf achten, dass das Septum durchstochen wird, um den Durchfluss von Flüssigkeit zu ermöglichen. Den Beutel behutsam zusammendrücken, um zu bestätigen, dass der Dorn das Beutelseptum durchstochen hat.
5. Die Verbindung zwischen dem Vorfilter und dem Schlauchset sorgfältig daraufhin überprüfen, ob sie fest und sicher ist.

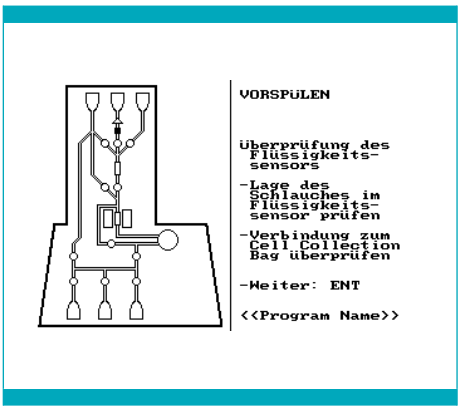
6. Den Cell Preparation Bag an den mittleren Beutelhalter hängen.
7. Den Beutelhalter für den Cell Preparation Bag so anpassen, dass der Cell Preparation Bag aufrecht gehalten wird.

Um fortzufahren, **ENT** drücken.

Endkontrolle des Flüssigkeitssensors

Das Bildschirmfenster zeigt Bildschirm 7.49 an.

1. Den Schlauch des Flüssigkeitssensors überprüfen. Darauf achten, dass der Schlauch korrekt eingesetzt ist, außen keine Flüssigkeit aufweist und beim Einsetzen nicht verrutscht ist.
2. Darauf achten, dass ein ungehinderter Durchfluss zum Cell Collection Bag möglich ist (z.B. die Klemme unterhalb von Ventil 9 öffnen).



Bildschirm 7.49: Endkontrolle des Flüssigkeitssensors

Um fortzufahren, **ENT** drücken.

▶ **Mit SCHRITT 4 fortfahren.**

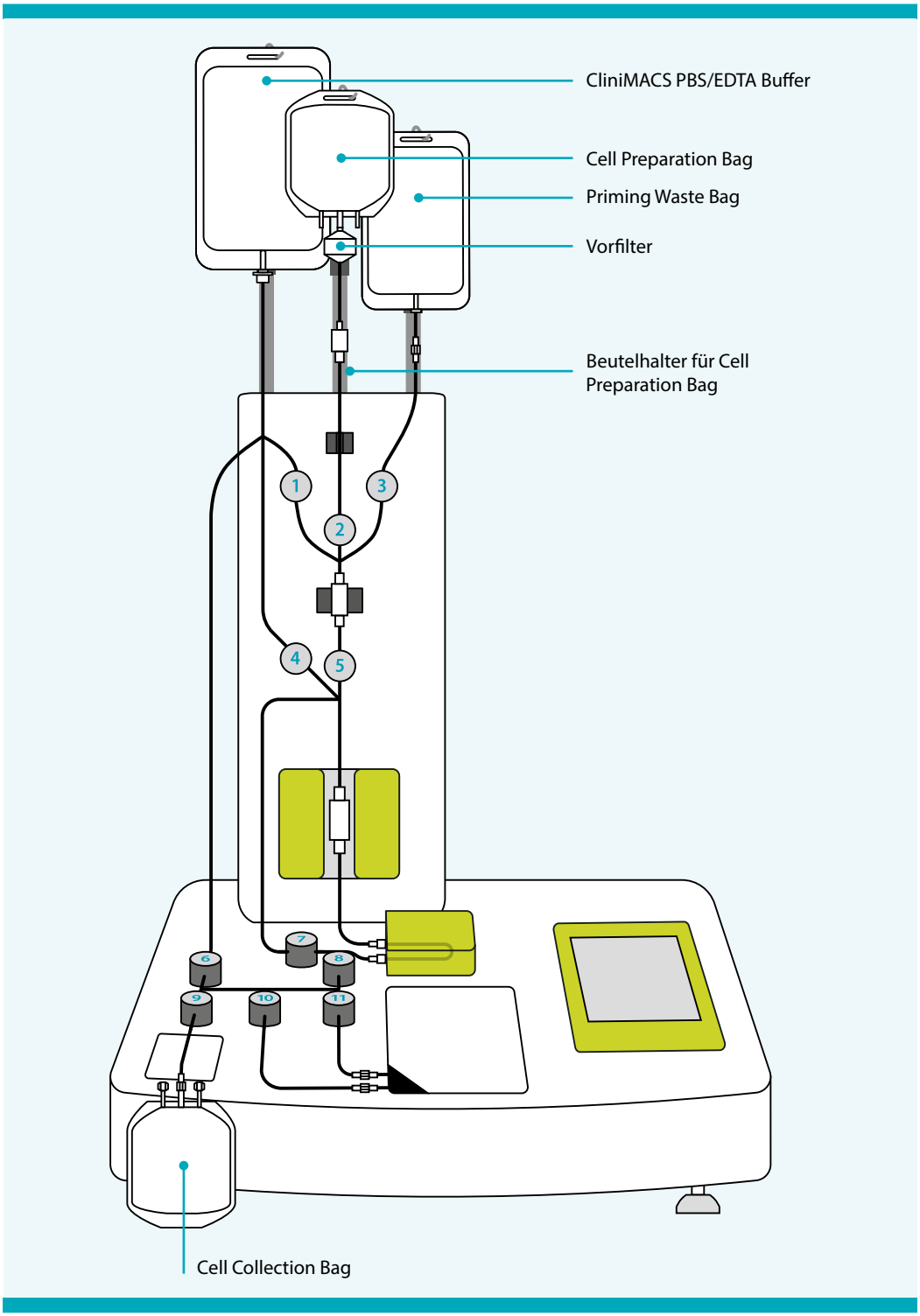


Abbildung 7.10: CliniMACS Plus Instrument mit CliniMACS Tubing Set, CliniMACS PBS/EDTA Buffer, Cell Preparation Bag und Cell Collection Bag

7.3.2 Alternative Installation von CliniMACS Schlauchsets

Die Anweisungen in SCHRITT 3 und die Bildschirmanzeigen am CliniMACS Plus Instrument beschreiben die Installation der CliniMACS Schlauchsets unter sterilen Bedingungen (Reinraum).

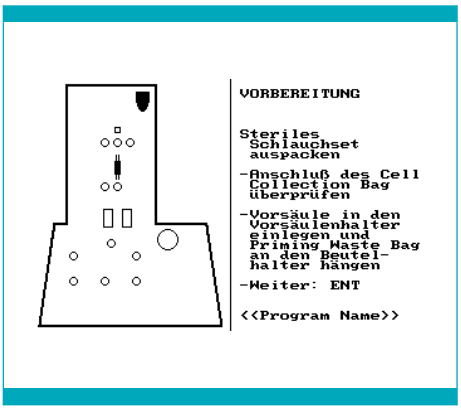
Das CliniMACS Plus System selbst ist ein geschlossenes System, das nicht notwendigerweise in einem Reinraum betrieben werden muss. Wenn das System jedoch außerhalb eines Reinraums betrieben wird, muss das Installationsverfahren des Schlauchsets angepasst werden, um sicherzustellen, dass die Sterilität des Zellseparationsprozesses gewährleistet ist.

Die Sterilität des Zellseparationsprozesses kann beim Anbringen des Cell Collection Bag, des CliniMACS PBS/EDTA Buffer, des Vorfilters und des Cell Preparation Bag beeinträchtigt werden. Um sicherzustellen, dass das System steril bleibt, müssen diese Komponenten unter sterilen Bedingungen (z.B. in einer sterilen Werkbank) mit dem Schlauchset verbunden werden. Wenn die Komponenten am Schlauchset angebracht werden, bevor dieses auf das CliniMACS Plus Instrument installiert wird, muss die Reihenfolge der Anweisungen des Instruments und der Anweisungen in SCHRITT 3 geändert werden, und es sind weitere Aktionen erforderlich.

Befolgen Sie beim Betrieb des CliniMACS Plus Instruments außerhalb eines Reinraums die folgenden zusätzlichen Anweisungen, die das Vorgehen gemäß SCHRITT 3 verändern.

Vorbereitung der Installation des Schlauchsets

Das Bildschirmfenster zeigt Bildschirm 7.50 an.



Bildschirm 7.50: Auspacken des Schlauchsets

Wie bereits beschrieben, müssen der Cell Collection Bag, der CliniMACS PBS/EDTA Buffer, der Vorfilter und der Cell Preparation Bag am Schlauchset angebracht werden, bevor dieses unter sterilen Bedingungen auf das Instrument installiert wird.

Packen Sie das Schlauchset unter sterilen Bedingungen aus und bringen Sie die folgenden Komponenten unter sterilen Bedingungen an:

- **Cell Collection Bag verbinden**

  Siehe Seite 159.

Anbringen des CliniMACS PBS/EDTA Buffer

WICHTIG

Vor dem Verbinden des CliniMACS PBS/EDTA Buffer mit dem Schlauchset den Schlauch unterhalb des Dorns für den Pufferbeutel mit einer Schlauchklemme abklemmen, um zu verhindern, dass vor der Installation des Schlauchsets Puffer in das Schlauchset läuft (siehe Klemme1, Abbildung 7.11 auf Seite 177).

Mit aseptischen Techniken die Kappe des Dorns für den Pufferbeutel am Schlauchset abnehmen und den Dorn mit dem Pufferbeutel verbinden. Darauf achten, dass das Septum durchstochen wird, um den Durchfluss von Flüssigkeit zu ermöglichen. Den Beutel behutsam zusammendrücken, um zu bestätigen, dass der Dorn das Beutelseptum durchstochen hat.

Anbringen des Vorfilters

Die Kappe des Dorns der Blasenfalle abnehmen. Die Kappe von der unteren Öffnung des Vorfilters abnehmen.

Den Dorn fest in den Vorfilter einstechen. Die obere Kappe des Vorfilters NICHT abnehmen. Den Schlauch direkt unterhalb der Blasenfalle mit einer Schlauchklemme schließen (siehe Klemme 2, Abbildung 7.11 auf Seite 177). Dies verhindert, dass die vorbereitete Zellsuspension im Cell Preparation Bag in den Vorfilter und das Schlauchset gelangt.

Anbringen des Cell Preparation Bag

Den Cell Preparation Bag, der die magnetisch markierten und gespülten Zellen enthält, mit dem Schlauchset verbinden. Den Dorn des Vorfilters in den Cell Preparation Bag einstechen und darauf achten, dass das Septum durchstochen wird, um den freien Durchfluss zu ermöglichen. Den Beutel behutsam zusammendrücken, um zu bestätigen, dass der Dorn das Beutelseptum durchstochen hat.

Installation auf dem CliniMACS Plus Instrument

Den Pufferbeutel an den linken Beutelhalter, den Cell Preparation Bag an den mittleren Beutelhalter und den Priming Waste Bag an den rechten Beutelhalter auf dem Instrument hängen.

Um fortzufahren, **ENT** drücken.

▶ Anbringen des Priming Waste Bag und Einsetzen der Vorsäule

Siehe Seite 159.

▶ Einsetzen der Separationssäule und Bestücken von Ventil 5

Siehe Seite 160.

- **Bestücken der Ventile 1, 2, 3 und 4**

  Siehe Seite 161.

- **Einlegen des Pumpenschlauchs**

  Siehe Seite 162.

- **Bestücken der Ventile 7 und 8**

  Siehe Seite 163.

- **Bestücken der Ventile 6, 9, 10 und 11**

  Siehe Seite 163.

- **Nachprüfen aller Schläuche und Verbindungen**

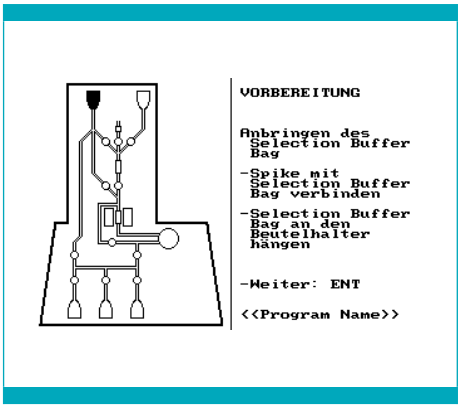
  Siehe Seite 164.

- **Anpassen der Ventile**

  Siehe Seite 164.

Anbringen des CliniMACS PBS/EDTA Buffer

Das Bildschirmfenster zeigt Bildschirm 7.51 an.



Bildschirm 7.51: Anhängen des Pufferbeutels

1. Der Pufferbeutel wurde bei der „Vorbereitung der Installation des Schlauchsets“ angebracht. Deshalb muss gegebenenfalls nur noch die Höhe des Pufferbeutelhalters angepasst werden. Den Beutelhalter entsprechend der Größe des Pufferbeutels anheben oder absenken. Der Beutelhalter sollte hoch genug sein, um starke Biegungen des Schlauchs, die den Durchfluss behindern können, zu vermeiden, und er sollte niedrig genug sein, um eine übermäßige Spannung des Schlauchs oder der Verbindungen zu vermeiden.
2. Die Schlauchklemme vom Schlauch direkt unterhalb des Dorns für den Pufferbeutel entfernen.

Um fortzufahren, **ENT** drücken.

▶ Vorspülen

Siehe Seite 166

▶ Prüfung während des Vorspülens

Siehe Seite 166.

▶ Endkontrolle aller Schläuche und Verbindungen

Siehe Seite 167.

▶ Integritätstest

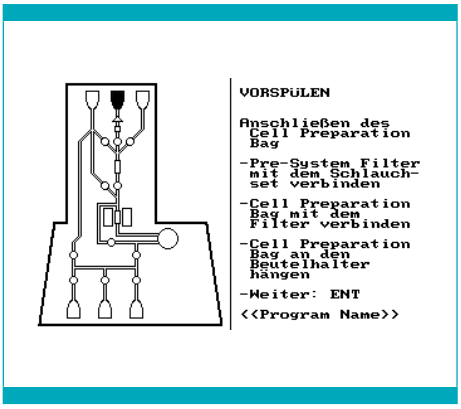
Siehe Seite 167.

Verbinden des Cell Preparation Bag (und des Vorfilters)

Das Bildschirmfenster zeigt Bildschirm 7.52 an.

1. Der Cell Preparation Bag und der Vorfilter werden bei der „Vorbereitung der Installation des Schlauchsets“ angebracht.
2. Die Schlauchklemme unterhalb der Blasenfalle entfernen.

Um fortzufahren, **ENT** drücken.



Bildschirm 7.52: Verbinden des Cell Preparation Bag

▶ Endkontrolle des Flüssigkeitssensors

Siehe Seite 170.

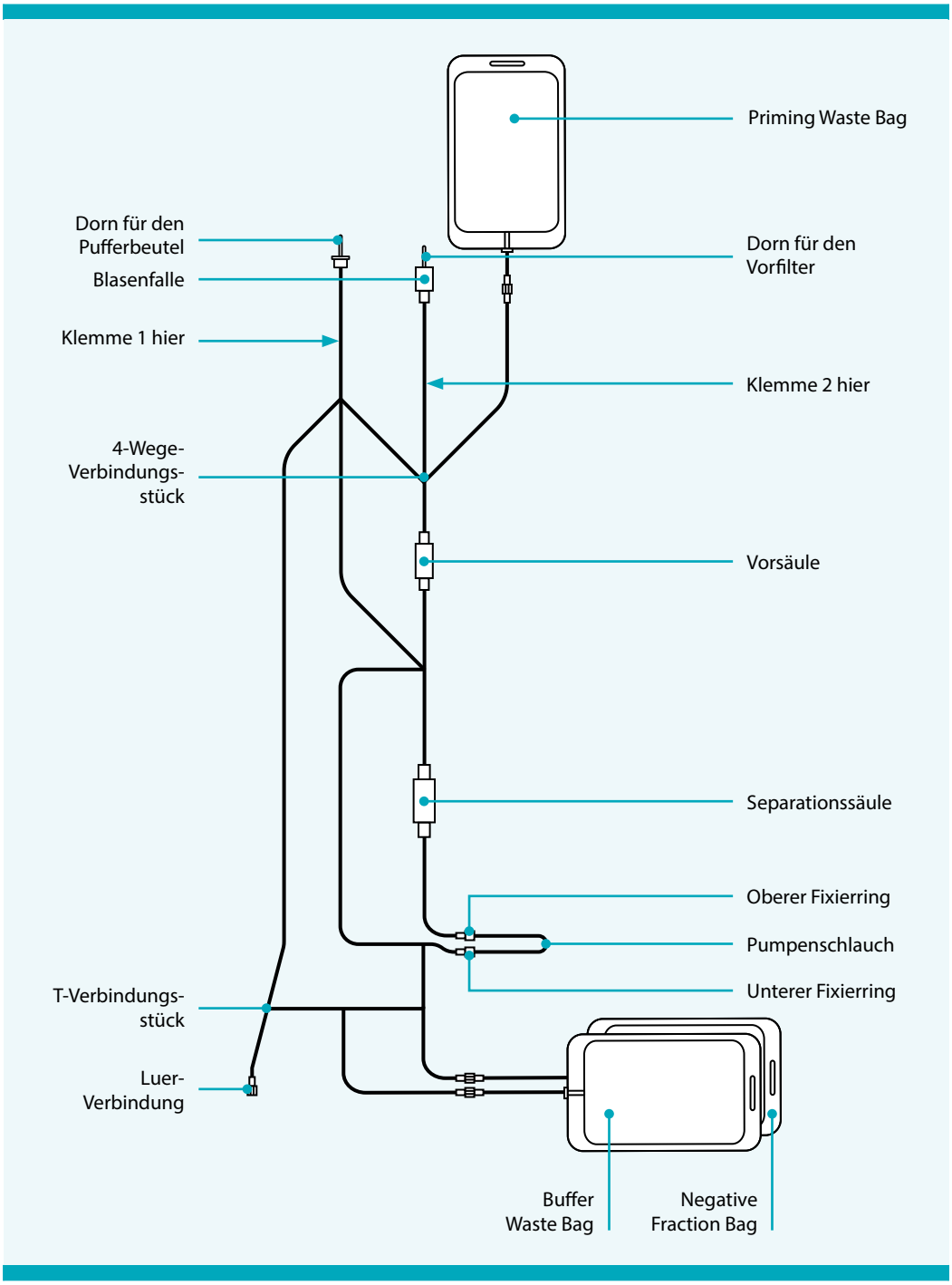


Abbildung 7.11: Allgemeiner Aufbau eines CliniMACS Schlauchsets (z.B. CliniMACS Schlauchset) mit Klemmpositionen 1 und 2

7.3.3 CliniMACS Depletion Tubing Set

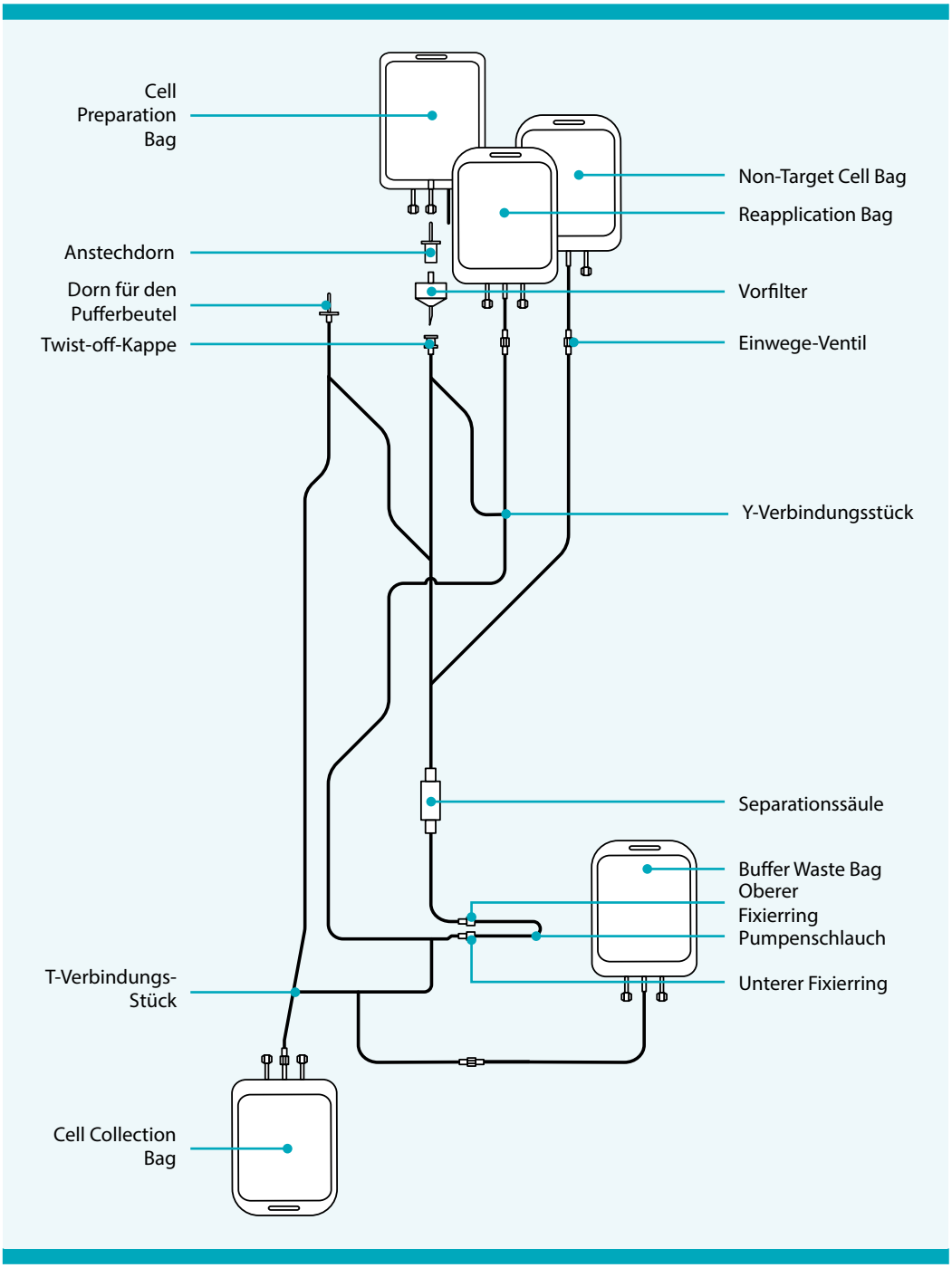


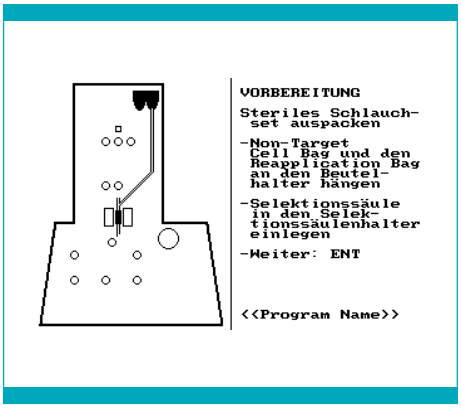
Abbildung 7.12: Allgemeiner Aufbau eines CliniMACS Depletion Tubing Set

Vorbereitung der Installation des Schlauchsets

Das Bildschirmfenster zeigt Bildschirm 7.53 an.

Auf der rechten Seite des Bildschirms wird die Anleitung angezeigt und links daneben ein entsprechendes Diagramm. Die blinkenden Elemente zeigen die Bereiche an, die jeweils beschrieben werden.

Das CliniMACS Depletion Tubing Set wird in einer versiegelten, sterilisierten Verpackung geliefert. Jedes Schlauchset umfasst vormontierte Schläuche, Säulen und Beutel für eine Zellseparation (siehe Abbildung 7.12). Wenn die Verpackung unversehrt ist, wird ein steriler Flüssigkeitsweg bereitgestellt.



Bildschirm 7.53: Auspacken des Schlauchsets

Hinweis: Das CliniMACS Plus Instrument zeigt die Bezeichnung des gewählten Programms, z.B. DEPLETION 3.1, am unteren Bildschirmrand an. Bei jedem Schritt der Installation des Schlauchsets kann die Taste „Zurück“ (siehe Abschnitt „Beschreibung“ im CliniMACS Plus Instrument Benutzerhandbuch) gedrückt werden, um zum vorherigen Schritt zurückzukehren.

1. Die Chargennummer und das Verfalldatum des Schlauchsets notieren.

   Das sterile Schlauchset unter sterilen Bedingungen (z.B. in einer sterilen Werkbank) auspacken. Vor Gebrauch des Schlauchsets die als Verpackung angebrachte Federklemme entfernen. Die Klemme trägt die Aufschrift „Remove before assembly bis CliniMACS Plus Instrument" (Klemme vor der Montage an das CliniMACS Plus Instrument entfernen).

2. Die Luer-Lock-Verbindungen zu den Beuteln überprüfen. Die Luer-Lock-Verbindungen müssen fest geschlossen sein.

Cell Collection Bag

Das CliniMACS Depletion Tubing Set wird mit einem angebrachten Cell Collection Bag geliefert. Das Gewicht des leeren Cell Collection Bag notieren. Wenn mehr als ein Cell Collection Bag für eine Separation benötigt wird, die Beutel mithilfe eines Plasma-Transfersets verbinden. Darauf achten, dass alle Verbindungen fest geschlossen sind. Das Gewicht des/der leeren Cell Collection Bag(s) notieren.

Anbringen des Non-Target Cell Bag und des Reapplication Bag und Einsetzen der Separationssäule

1. Den Non-Target Cell Bag und den Reapplication Bag an den rechten Beutelhalter des Instruments hängen (siehe Abbildung 7.13).

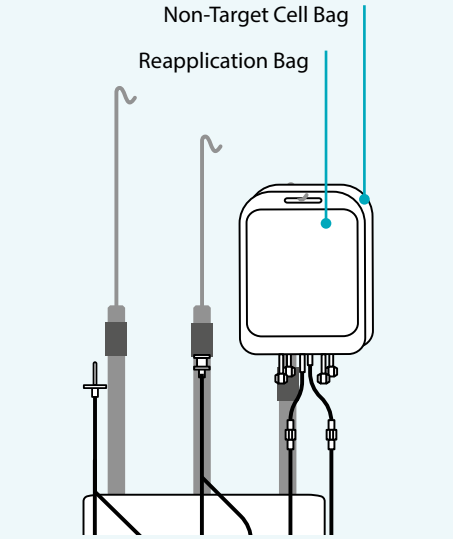


Abbildung 7.13: Anhängen des Non-Target Cell Bag und des Reapplication Bag

2. Die Höhe der Beutelhalter anpassen. Die Beutelhalter entsprechend der Größe des Non-Target Cell Bag bzw. des Reapplication Bag anheben oder absenken. Darauf achten, dass die Beutelhalter hoch genug positioniert sind, um starke Biegungen des Schlauchs, die den Durchfluss behindern können, zu vermeiden, und dass die Halter niedrig genug sind, um zu vermeiden, dass der Schlauch oder die Verbindungen übermäßig gespannt werden.

HINWEIS

Risiko einer Beschädigung des Instruments. Eine Überlastung der Beutelhalter kann das Instrument beschädigen. Die Tragfähigkeit eines einzelnen Beutelhalters beträgt 3 kg. Überlasten Sie die Beutelhalter nicht.

3. Die Separationssäule in den Separationssäulenhalter einsetzen (siehe Abbildung 7.14).

⚠ WARNUNG

Verletzungsgefahr. Wenn die Separationssäule bei eingeschalteter Magneteinheit eingesetzt oder entfernt wird, besteht Verletzungsgefahr. Installieren oder entfernen Sie dieSeparationssäulenurbeiausgeschalteter Magneteinheit.

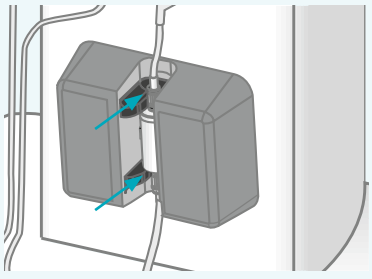


Abbildung 7.14: Separationssäule im Separationssäulenhalter

Um fortzufahren, **ENT** drücken.

Bestücken der Ventile 1, 2, 3, 4 und 5

Das Bildschirmfenster zeigt Bildschirm 7.54 an.

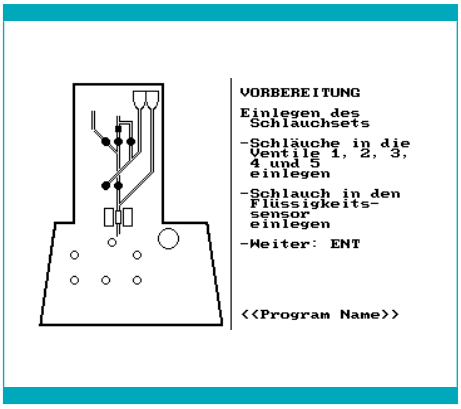
Die auf dem Bildschirm dargestellten Ventile werden automatisch geöffnet.

1. Den Schlauch in die Ventile 1, 2, 3, 4 und 5 einsetzen.
2. Den Schlauch oberhalb von Ventil 2 in den Flüssigkeitssensor einsetzen (siehe Abbildung 7.15).

WICHTIG

- *Um einen ordnungsgemäßen Betrieb zu gewährleisten, müssen sowohl der Flüssigkeitssensor als auch der eingesetzte Schlauch trocken sein. Beide Teile sorgfältig inspizieren. Falls Flüssigkeit vorhanden ist, den Bereich mit einem weichen, fusselfreien Tuch trocknen.*
- *Bei der Durchführung jedes Schrittes alle Schläuche und Verbindungen auf Knicke oder starke Biegungen, die den Durchfluss von Flüssigkeit behindern können, kontrollieren. An allen Ventilen überprüfen, ob der Schlauch passgenau sitzt.*
- *Das Schlauchset nur in offene Ventile einsetzen (wenn der Knopf gedrückt ist). Der Schlauch sitzt nicht korrekt, wenn er in ein geschlossenes Ventil eingesetzt wird.*
- *Wenn der Schlauch nach Schließen eines Ventils angepasst werden muss, nicht am Schlauch ziehen, ohne den Ventilknopf zum Öffnen des Ventils zu drücken (siehe Abbildung 7.16).*

Um fortzufahren, **ENT** drücken.



Bildschirm 7.54: Bestücken der Ventile 1, 2, 3, 4 und 5

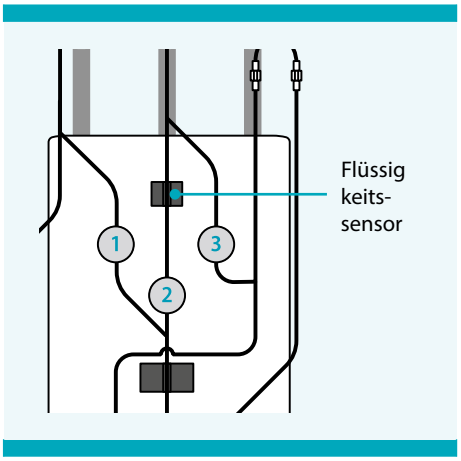


Abbildung 7.15: Schläuche in Ventilen

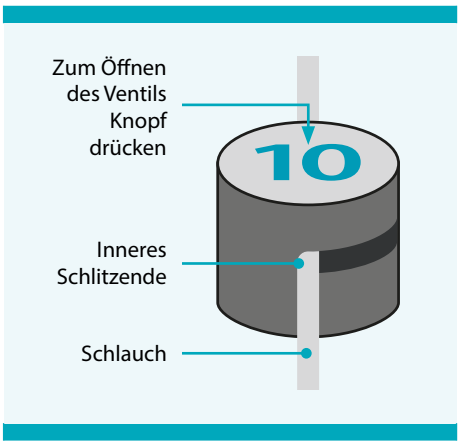
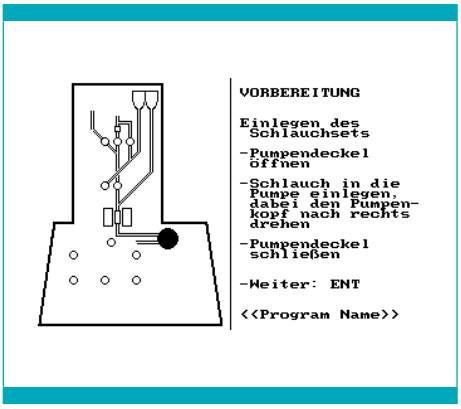


Abbildung 7.16: Korrektes Einsetzen des Schlauchs

Einlegen des Pumpenschlauchs

Das Bildschirmfenster zeigt Bildschirm 7.55 an.



Bildschirm 7.55: Einlegen des Pumpenschlauchs

1. Den Pumpendeckel am linken Rand anheben und öffnen.
2. Den oberen Fixierring über dem Pumpenschlauch in die Rille für den Fixierring am Pumpengehäuse einsetzen (siehe Abbildung 7.17).
3. Die Pumpenrolle im Uhrzeigersinn drehen, bis der Schlauch zwischen die beiden Führungsstiftpaare eingefädelt ist und passgenau um die Pumpenrolle verläuft. Darauf achten, dass der Schlauch am Ende der Führungsstifte nicht eingeklemmt ist. (Falls eine Anpassung des Schlauchs in der Pumpe erforderlich ist, kann der Schlauch durch Anheben des unteren Endes und Drehen der Pumpenrolle gegen den Uhrzeigersinn ausgespannt werden.)
4. Den unteren Fixierring über dem Pumpenschlauch in die Rille für den Fixierring am Pumpengehäuse einsetzen.
5. Die Rotation der Pumpenrolle im Uhrzeigersinn wiederholen, um sicherzugehen, dass die Pumpenrolle frei beweglich ist.
6. Den Pumpendeckel schließen.

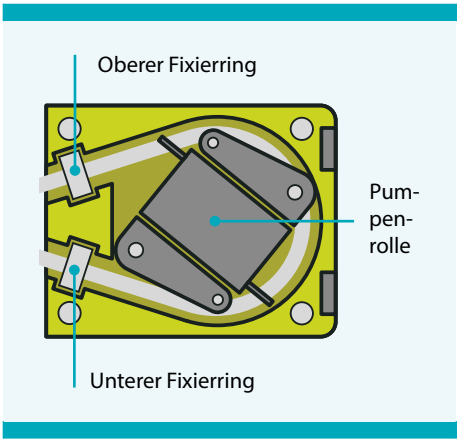


Abbildung 7.17: Einlegen des Pumpenschlauchs

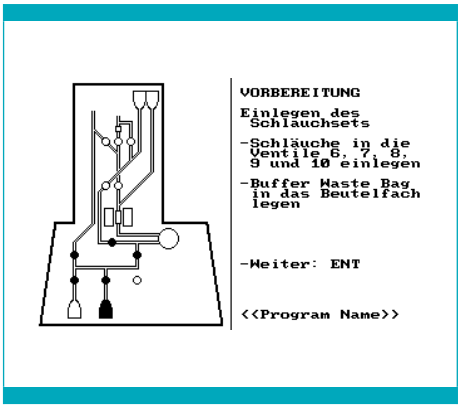
WICHTIG

Im Verlauf der Zellseparation stoppt der Pumpenlauf sofort, wenn das Pumpengehäuse geöffnet wird. Falls dieses länger als 600 Sekunden offen bleibt, bricht das Instrument den im Gang befindlichen Lauf ab.

Um fortzufahren, **ENT** drücken.

Bestücken der Ventile 6, 7, 8, 9 und 10

Das Bildschirmfenster zeigt Bildschirm 7.56 an.



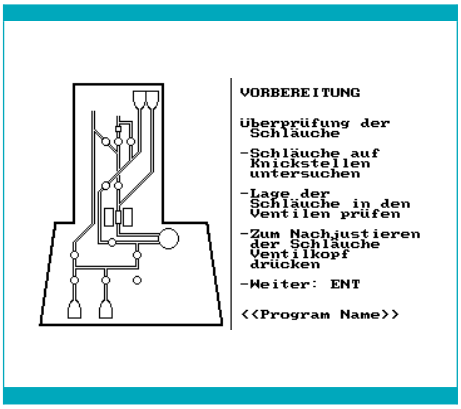
Bildschirm 7.56: Bestücken der Ventile 6, 7, 8, 9 und 10

1. Den Schlauch in die Ventile 6, 7, 8, 9 und 10 einsetzen. Darauf achten, dass der Schlauch vollständig in der Ventilöffnung sitzt.
2. Den Buffer Waste Bag in das Beutelfach einlegen. Darauf achten, dass der Schlauch nicht unter dem Deckel des Beutelfachs komprimiert wird.
3. Stellen Sie sicher, dass der Durchfluss zum Cell Collection Bag nicht eingeschränkt ist.

Um fortzufahren, **ENT** drücken.

Nachprüfen aller Schläuche und Verbindungen

Das Bildschirmfenster zeigt Bildschirm 7.57 an.



Bildschirm 7.57: Nachprüfen aller Schläuche und Verbindungen

1. Beginnend mit Ventil 1 überprüfen, ob der Schlauch korrekt sitzt und in jedem Ventil richtig positioniert ist.

   Den Schlauch in jedem Ventil nachprüfen. Darauf achten, dass der Schlauch in jedem Ventil durch die Erweiterung am inneren Ende des Schlitzes ein- und austritt (siehe Abbildung 7.16).
2. Darauf achten, dass der Schlauch nicht abgeknickt oder verdreht ist.

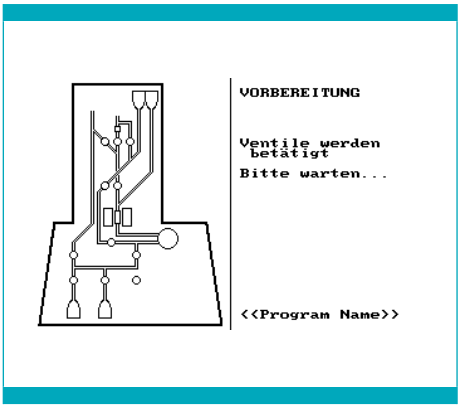
Hinweis: Wenn der Schlauch nach Schließen eines Ventils angepasst werden muss, nicht am Schlauch ziehen, ohne den Ventilknopf zum Öffnen des Ventils zu drücken.

Um fortzufahren, **ENT** drücken.

Anpassen der Ventile

Das Bildschirmfenster zeigt Bildschirm 7.58 an.

Um sicherzustellen, dass die Schläuche korrekt in den Ventilen sitzen, betätigt das Instrument alle Ventile zweimal nacheinander. Beobachten und horchen Sie, ob alle Ventile ordnungsgemäß arbeiten. Falls ein Ventil nicht korrekt arbeitet, siehe Kapitel 8 “Fehlerbehebung” auf Seite 215. Dieser Schritt kann durch Drücken von ◄ und anschließend **ENT** wiederholt werden (siehe Abschnitt „Beschreibung“ im Benutzerhandbuch des CliniMACS Plus Instruments).



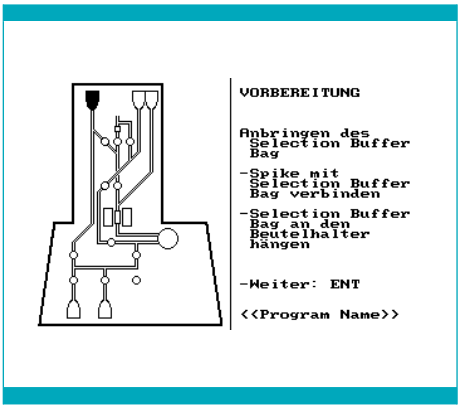
Bildschirm 7.58: Anpassen der Ventile

Auch der Magnetantrieb wird bei dieser Prüfsequenz getestet.

Anbringen des CliniMACS PBS/EDTA Buffer

Das Bildschirmfenster zeigt Bildschirm 7.59 an.

Der vorgeschriebene Puffer für CliniMACS Plus Separationen ist der CliniMACS PBS/EDTA Buffer supplementiert mit HSA bis zu einer Endkonzentration von 0,5% (w/v).



Bildschirm 7.59: Anhängen des Pufferbeutels

1. Mit aseptischen Techniken die Kappe des Dorns für den Pufferbeutel (siehe Abbildung 7.12 auf Seite 178) am Schlauchset abnehmen und den Dorn mit dem Pufferbeutel verbinden. Darauf achten, dass das Septum durchstochen wird, um den Durchfluss von Flüssigkeit zu ermöglichen. Den Beutel behutsam zusammendrücken, um zu bestätigen, dass der Dorn das Beutelseptum durchstochen hat und keine Flüssigkeit austritt.
2. Den Pufferbeutel an den Haken des Beutelhalters hängen (siehe Abbildung 7.18).
3. Die Höhe des Pufferbeutelhalters anpassen. Den Beutelhalter entsprechend der Größe des Pufferbeutels anheben oder absenken. Darauf achten, dass der Beutelhalter hoch genug positioniert ist, um starke Biegungen des Schlauchs, die den Durchfluss behindern können, zu vermeiden, und dass der Halter niedrig genug ist, um zu vermeiden, dass der Schlauch oder die Verbindungen übermäßig gespannt werden.

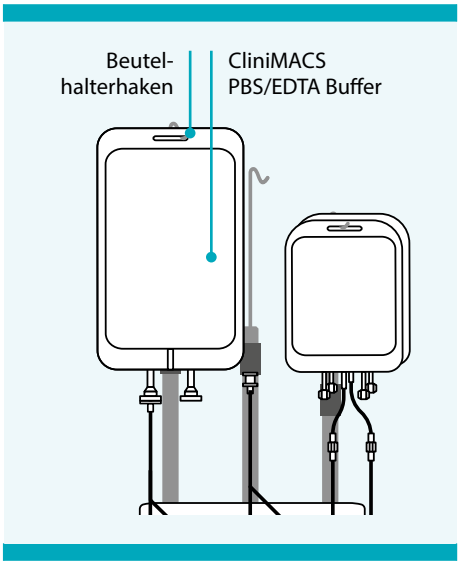


Abbildung 7.18: Anhängen des Pufferbeutels

WICHTIG

Aufgrund einiger gravimetrischer Vorspül- und Spülschritte ist es wichtig, dass der Pufferbeutel so hoch wie möglich positioniert ist, und zwar höher als der Reapplication Bag und der Non-Target Cell Bag (siehe Abbildung 7.20 auf Seite 190).

Um fortzufahren, **ENT** drücken.

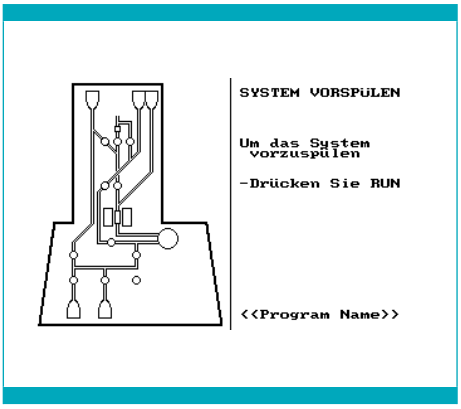
Vorspülen

Das Bildschirmfenster zeigt Bildschirm 7.60 an.

Um das Vorspülen zu starten, drücken Sie **RUN**.

Das Bildschirmfenster zeigt Bildschirm 7.61 an.

Während der Vorspülphase wird das Schlauchset mit CliniMACS PBS/EDTA Buffer gefüllt. Der Puffer zirkuliert durch das Schlauchset einschließlich der Separationssäule. Die Spüllösung wird im Buffer Waste Bag, Reapplication Bag und Non-Target Cell Bag gesammelt, während der Cell Collection Bag leer bleibt (siehe Abbildung 7.12 auf Seite 178). Die Vorspülzyklen werden mehrmals wiederholt.



Bildschirm 7.60: Vorspülen

Die Vorspülphase dauert ca. 2,5 Minuten. Der Vorspülstatus wird auf dem Bildschirm laufend aktualisiert.

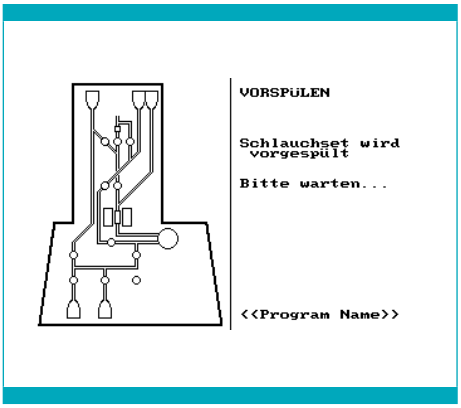
Prüfung während des Vorspülens

Während der Vorspülphase sollten Sie alle Schläuche, Verbindungsstücke, Ventile und die Separationssäule auf Lecks oder Knicke, die den Durchfluss behindern können, überprüfen.

Falls Lecks oder Funktionsstörungen beobachtet werden, drücken Sie **STOP**, um den Lauf zu stoppen.

Sie haben 600 Sekunden Zeit, um das Problem zu beheben.

Setzen Sie den Prozess durch Drücken von **OK** fort.



Bildschirm 7.61: Vorspülen läuft

Nach 600 Sekunden wird die Separation abgebrochen. Wenn das Problem nicht behoben werden kann oder das Schlauchset defekt ist, das Schlauchset entfernen und durch ein neues ersetzen.

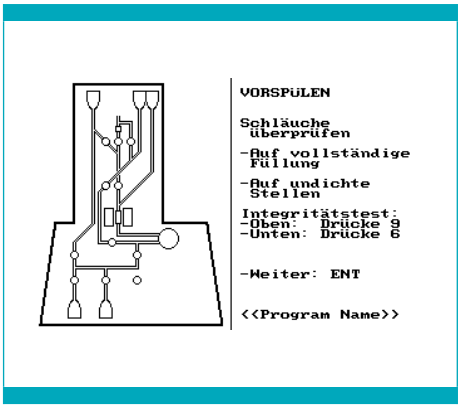
Hinweis: Nachdem das Vorspülen gestartet wurde, kann nicht mehr zum Setup-Verfahren zurückgekehrt werden.

Endkontrolle aller Schläuche und Verbindungen

Das Bildschirmfenster zeigt Bildschirm 7.62 an.

Bevor Sie den Lauf starten, überprüfen Sie Folgendes:

- Flüssigkeit in allen Teilen des Schlauchsets außer dem Schlauch oberhalb der Ventile 2 und 3
- Keine Luft im Schlauchset
- Flüssigkeit im Reapplication Bag, Buffer Waste Bag und Non-Target Cell Bag
- Keine Flüssigkeit im Cell Collection Bag



Bildschirm 7.62: Endkontrolle der Schläuche und Verbindungen

Drücken Sie noch nicht **ENT**.

Integritätstest

Als zusätzliche Sicherheitsmaßnahme muss ein Integritätstest durchgeführt werden, um das Schlauchset auf Lecks zu überprüfen. Die Prüfsequenz besteht aus zwei automatischen Sequenzen, mit denen der obere und der untere Teil des Schlauchsets separat druckbeaufschlagt und getestet werden können.

⚠ VORSICHT

Risiko einer Prozessverzögerung. Wenn die Klemme unterhalb des Non-Target Cell Bag nach Abschluss des Integritätstests nicht entfernt wurde, können Nicht-Zielzellen (markierte Zellen) während der Elution nicht aus der Separationssäule entfernt werden. Eine weitere Bindung von Nicht-Zielzellen ist dann nicht möglich. Das Separationsverfahren muss wiederholt werden. Entfernen Sie daher die Klemme nach Abschluss des Integritätstests.

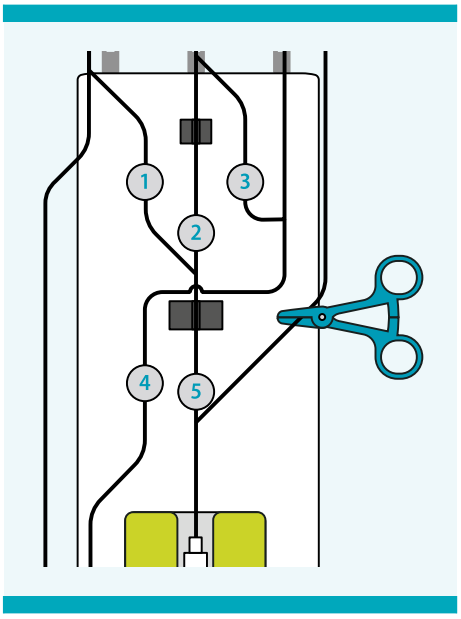


Abbildung 7.19: Vorbereiten des Integritätstests

WICHTIG

Der Integritätstest funktioniert nur korrekt, wenn der Schlauch unterhalb des Non-Target Cell Bag abgeklemmt wird. Klemmen Sie den Schlauch unterhalb des Non-Target Cell Bag ab, bevor Sie den Integritätstest starten. Nach Abschluss des Integritätstests die Klemme wieder entfernen.

Integritätstest des oberen Teils des Schlauchsets

1. Bei der „Endkontrolle aller Schläuche und Verbindungen“ zeigt das Bildschirmfenster Bildschirm 7.63 an.
2. Nach Durchführen der „Endkontrolle aller Schläuche und Verbindungen“ **nicht** ENT drücken.
3. Zur Durchführung des Integritätstests des oberen Teils drücken Sie 9.

   Das Bildschirmfenster zeigt Bildschirm 7.64 an.

   WICHTIG
   Den Schlauch unterhalb des Einwege-Ventils des Non-Target Cell Bag abklemmen.
4. Um die Prüfsequenz zu starten, drücken Sie RUN.

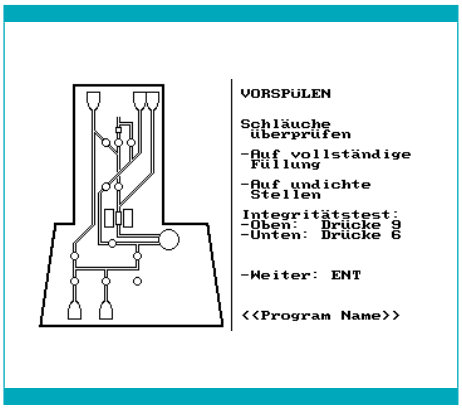
   Um zu Bildschirm 7.63 zurückzukehren drücken Sie ◄.
5. Nach Drücken von RUN startet das Instrument die automatische Prüfsequenz für den oberen Teil des Schlauchsets.

   Das Bildschirmfenster zeigt Bildschirm 7.65 an.

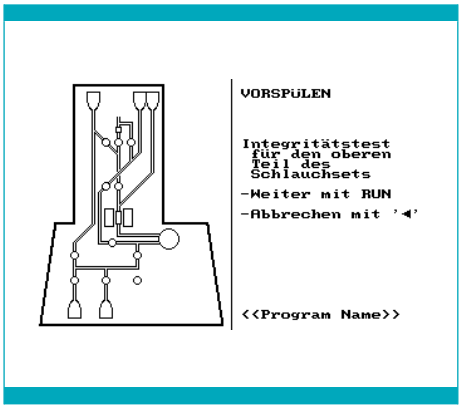
   Ein Überdruck wird aufgebaut und zwei Minuten aufrechterhalten. Beobachten Sie während dieser Zeit alle Verbindungen über dem oberen Anschluss des Pumpenschlauchs.

   Die Prüfsequenz kann an jedem Punkt durch Drücken von ENT beendet werden.
6. Nach zwei Minuten wird der Druck automatisch abgelassen, und das Bildschirmfenster zeigt Bildschirm 7.63an.

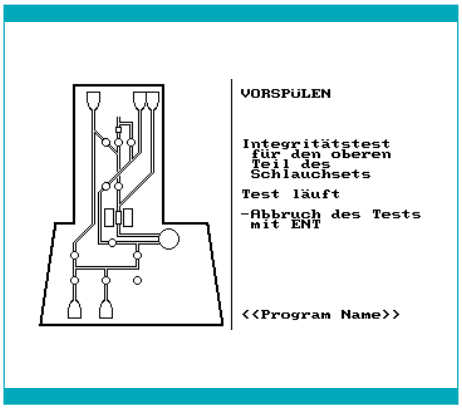
   Überprüfen Sie, ob Lecks während der Prüfsequenz aufgetreten sind. Wenn an einer Verbindung des Schlauchsets ein Leck beobachtet wird, muss das Schlauchset entfernt und durch ein neues ersetzt werden.



Bildschirm 7.63: Starten des Integritätstests des oberen Teils



Bildschirm 7.64: Starten des Integritätstests des oberen Teils



Bildschirm 7.65: Starten des Integritätstests des oberen Teils

Wenden Sie sich an den Miltenyi Biotec Technical Support, um Anweisungen zur Rücksendung des defekten Schlauchsets zu erhalten.

7. Wenn keine Lecks beobachtet werden, mit dem Integritätstest des unteren Teils des Schlauchsets fortfahren.

Integritätstest des unteren Teils des Schlauchsets

Das Bildschirmfenster zeigt Bildschirm 7.63 an.

1. Zum Starten des Integritätstests **6** drücken.
   Drücken Sie nicht ENT.

   Das Bildschirmfenster zeigt Bildschirm 7.66 an.

2. Um die Prüfsequenz zu starten, drücken Sie **RUN**.

   Um zu Bildschirm 7.63 zurückzukehren drücken Sie ◄.

3. Nach Drücken von **RUN** startet das Instrument die automatische Prüfsequenz für den unteren Teil des Schlauchsets.

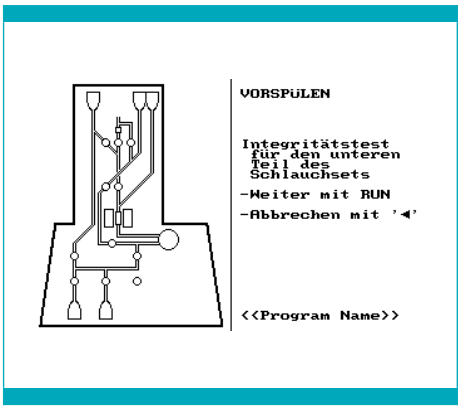
   Das Bildschirmfenster zeigt Bildschirm 7.67 an.

   Ein Überdruck wird aufgebaut und 30 Sekunden aufrechterhalten.

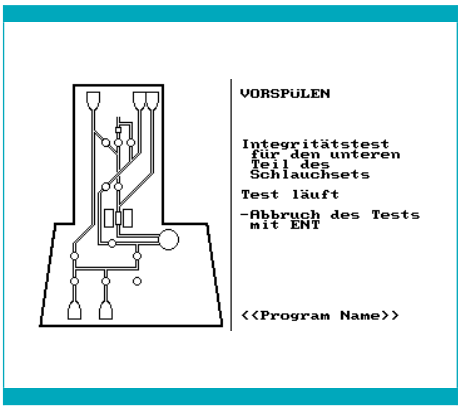
   Beobachten Sie während dieser Zeit den unteren Anschluss des Pumpenschlauchs und die T-Verbindungsstücke zwischen den Ventilen 6, 8, 9 und 10.

   Die Prüfsequenz kann an jedem Punkt durch Drücken von **ENT** beendet werden.

4. Nach 30 Sekunden wird der Druck automatisch abgelassen, und das Bildschirmfenster zeigt Bildschirm 7.63 an.



Bildschirm 7.66: Starten des Integritätstests des unteren Teils



Bildschirm 7.67: Laufender Integritätstest des unteren Teils

Überprüfen Sie, ob Lecks während der Prüfsequenz aufgetreten sind. Wenn an einer Verbindung des Schlauchsets ein Leck beobachtet wird, muss das Schlauchset entfernt und durch ein neues ersetzt werden.

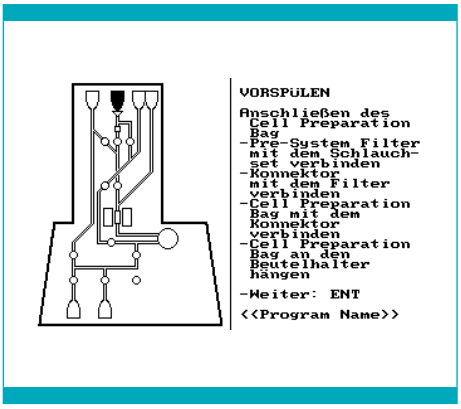
Wenden Sie sich an den Miltenyi Biotec Technical Support, um Anweisungen zur Rücksendung des defekten Schlauchsets zu erhalten.

5. **Den Durchfluss zum Non-Target Cell Bag durch Entfernen der Klemme unterhalb des Einwege-Ventils öffnen.**

6. Wenn keine Lecks beobachtet werden, können Sie mit dem nächsten Schritt fortfahren, indem Sie **ENT** drücken.

Verbinden des Cell Preparation Bag

Das Bildschirmfenster zeigt Bildschirm 7.68 an.



Bildschirm 7.68: Verbinden des Cell Preparation Bag

Verbinden Sie den Cell Preparation Bag (der die magnetisch markierten Zellen enthält) mit dem Schlauchset:

1. Die Twist-off-Kappe (siehe Abbildung 7.12 auf Seite 178) vom Schlauchset abnehmen.
2. Die Kappe vom Dorn des Vorfilters abnehmen. Den Anstechdorn des Vorfilters fest in das Schlauchset einstechen und dabei darauf achten, dass das Septum durchstochen wird.
3. Die Kappen vom Vorfilter und vom stumpfen Ende des Anstechdornverbinders abnehmen und beide Teile miteinander verbinden.
4. Die andere Kappe vom Anstechdornverbinder abnehmen und den Dorn mit dem Cell Preparation Bag verbinden und dabei darauf achten, dass das Septum durchstochen wird, um den freien Durchfluss von Flüssigkeit zu ermöglichen. Den Beutel behutsam zusammendrücken, um zu bestätigen, dass der Dorn das Beutelseptum durchstochen hat.
5. Die Verbindung zwischen dem Cell Preparation Bag, dem Anstechdornverbinder, dem Vorfilter und dem Schlauchset daraufhin überprüfen, ob sie fest und sicher ist.
6. Den Cell Preparation Bag an den Beutelhalter hängen (siehe Abbildung 7.21).
7. Darauf achten, dass die am Beutelhalter hängenden Beutel und Schläuche weder zu stark gespannt noch gekrümmt sind.

   Aufgrund der gravimetrischen Vorspül- und Spülschritte, die bei der automatischen Separation durchgeführt werden, ist es sehr wichtig, dass die Beutel korrekt gerade hängen. Um die vollständige Verarbeitung der Probe sicherzustellen, ist es außerdem wichtig, den Reapplication und Non-Target Cell Bag höher als den Cell Prepration Bag zu hängen (siehe Abbildung 7.20):

   - **Höchste Position:** Pufferbeutel
   - **Mittlere Position:** Reapplication und Non-Target Cell Bag
   - **Niedrigste Position:** Cell Preparation Bag

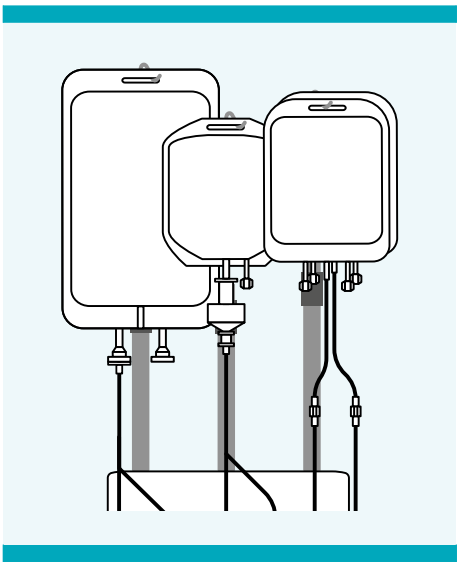


Abbildung 7.20: Korrekt gerade hängende Beutel

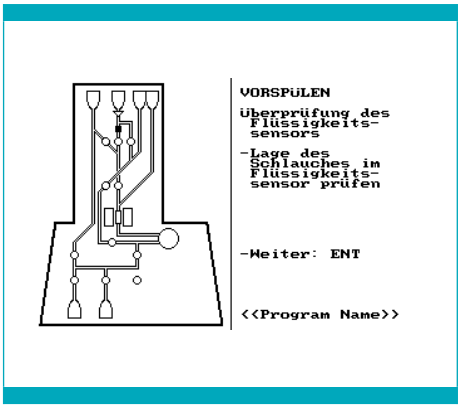
Um fortzufahren, **ENT** drücken.

Endkontrolle des Flüssigkeitssensors

Das Bildschirmfenster zeigt Bildschirm 7.69 an.

1. Den Schlauch des Flüssigkeitssensors überprüfen. Darauf achten, dass der Schlauch korrekt eingesetzt ist, außen keine Flüssigkeit aufweist und beim Einsetzen nicht verrutscht ist.
2. Sicherstellen, dass ein ungehinderter Durchfluss von Flüssigkeit zu jedem Beutel möglich ist.

Um fortzufahren, **ENT** drücken.



Bildschirm 7.69: Endkontrolle des Flüssigkeitssensors

▶ **Mit SCHRITT 4 fortfahren.**

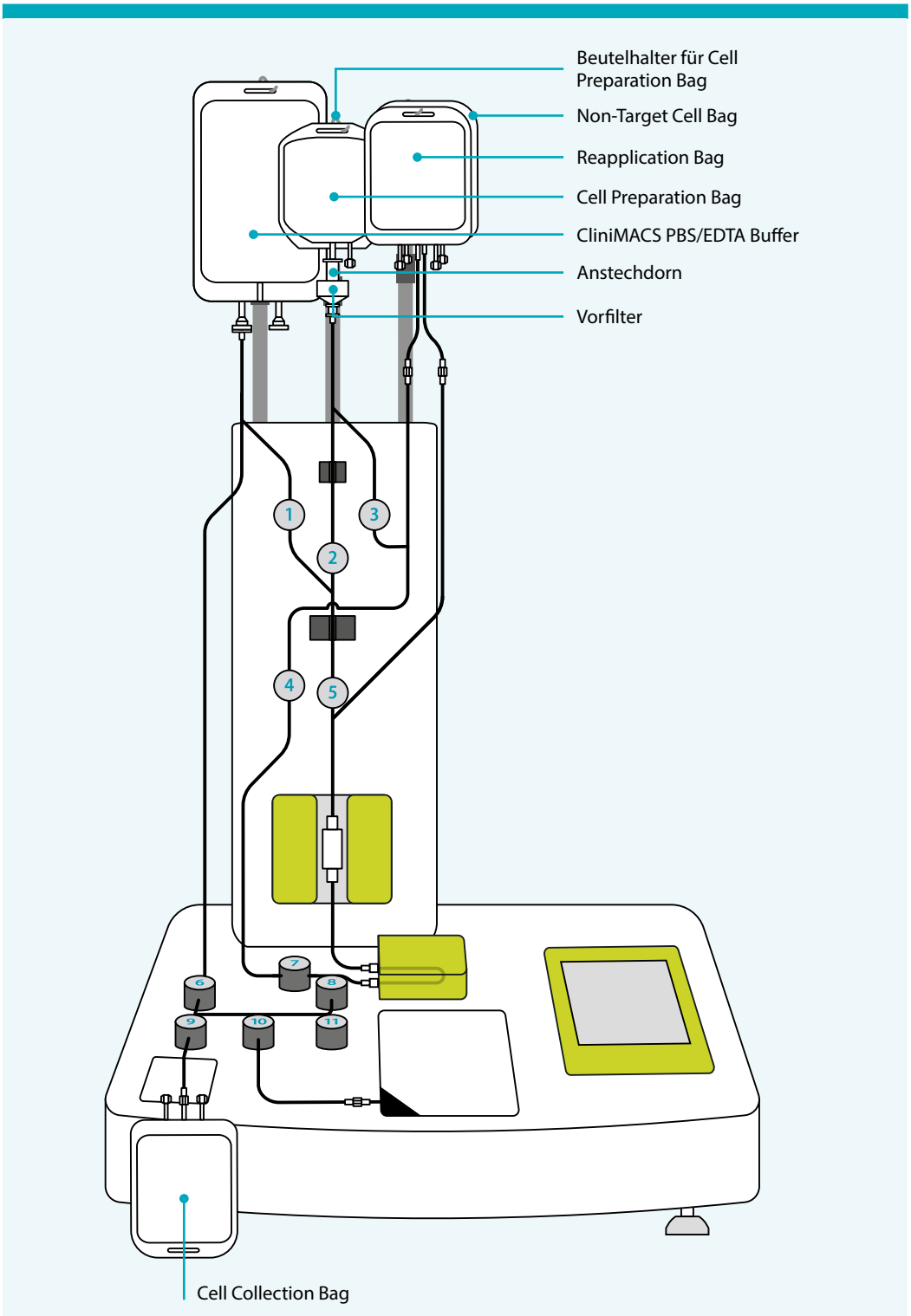
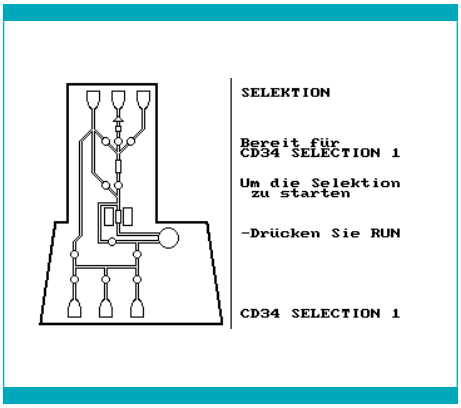


Abbildung 7.21: CliniMACS Plus Instrument mit CliniMACS Depletion Tubing Set, CliniMACS PBS/EDTA Buffer, Cell Preparation Bag und Cell Collection Bag

7.4 SCHRITT 4: CliniMACS Plus Separation

7.4.1 CD34 SELECTION 1/2

Nach Abschluss der Endkontrolle ist das CliniMACS Plus Instrument bereit zum Starten der Separation. Das Bildschirmfenster zeigt Bildschirm 7.70 an.

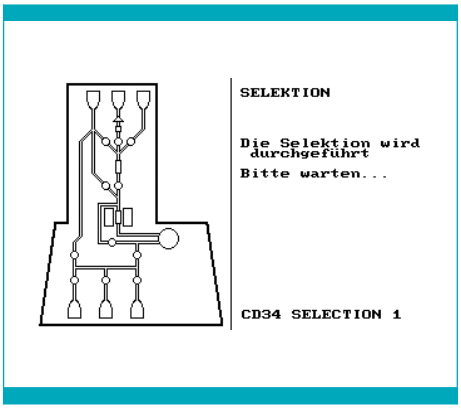


Bildschirm 7.70: Starten der Separation

Um fortzufahren, drücken Sie **RUN**.

Nach Drücken von **RUN** führt das Instrument automatisch das gewählte Separationsverfahren durch.

In jeder Phase des Separationslaufs erscheint ein ähnlicher Bildschirm wie Bildschirm 7.71 und zeigt den Status des Separationsverfahrens an.



Bildschirm 7.71: Laufende Separation

Die Magnetpositionsanzeige erscheint als zwei schwarze Kästchen neben der Separationssäule, wenn der Magnet in der „ON"-Position steht, d. h. nach vorne geschoben wurde, um die Separationssäule zu magnetisieren. Wenn die Magnetpositionsanzeige transparent ist (wie z.B. in Bildschirm 7.70), steht der Magnet in der „OFF"-Position, d. h. er wurde in den hinteren Teil des Instruments geschoben. Bei zurückgezogenem Magneten befindet sich die Separationssäule außerhalb des Magnetfelds und wird nicht mehr magnetisiert.

Hinweis: Auf dem Bildschirm kann ein anderer Programmname angezeigt werden, je nachdem, welches Separationsprogramm gewählt wurde (CD34 SELECTION 1 oder 2).

Separationsverfahren

Auftragen der Zellen

Das Separationsverfahren beginnt mit dem Füllen des Vorfilters, um restliche Luft aus dem Vorfilter zu entfernen.

Anschließend beginnt die Separation der markierten Zellen. Die Pumpe zieht den Inhalt des Cell Preparation Bag in das Schlauchset und trägt das Zellprodukt über die Vorsäule auf die Separationssäule auf. Die magnetisch markierten Zellen (Zielzellen) werden in der im Magnetfeld platzierten Separationssäule zurückgehalten, während die nicht markierten Zellen (Nicht-Zielzellen)

hindurchlaufen und im Negative Fraction Bag gesammelt werden. Wenn der Cell Preparation Bag leer ist (automatisch vom Flüssigkeitssensor detektiert), wird der Vorfilter zweimal mit Puffer gespült.

Spülen I der Säule

Die Vorsäule und die Separationssäule werden eingehend gespült, um alle nicht markierten Zellen zu entfernen. Der Waschpuffer wird im Buffer Waste Bag gesammelt. Wenn „Spülen I der Säule" beginnt, wird die verbleibende Gesamtzeit bis zum Ende des Separationsverfahrens angezeigt.

WICHTIG

Am Anfang der Separation wird Puffer aufwärts zum Cell Preparation Bag gepumpt, um den Vorfilter zu füllen. Klopfen Sie mehrmals vorsichtig an die Seite des Filters, um Blasen zu beseitigen, die sich eventuell im Filter angesammelt haben.

Freisetzung der Zellen I

Der Magnet wird in den hinteren Teil des Instruments versetzt („OFF"-Position). Die zurückgehaltenen Zellen werden im Schnelldurchfluss freigesetzt, bleiben aber in einem internen Schlauchzyklus.

Wiederauftragen I der Zellen

Der Magnet wird wieder in die „ON"-Position versetzt, um die Separationssäule zu magnetisieren, und die Zellen werden erneut auf die Separationssäule aufgetragen.

Spülen II der Säule

Auf das Wiederauftragen der Zellen folgt ein zweiter Spülschritt, um restliche nicht markierte Zellen zu entfernen. Außerdem werden alle Schläuche mehrmals gespült.

Freisetzung der Zellen II, Wiederauftragen II der Zellen, Spülen III der Säule

Die Zellen werden freigesetzt und erneut auf die Separationssäule aufgetragen, um nicht markierte Zellen zu entfernen, die unspezifisch an der Säulenmatrix haften. Danach wird die Separationssäule nochmals gespült.

Freisetzung der Zellen III, Wiederauftragen III der Zellen, Spülen IV der Säule

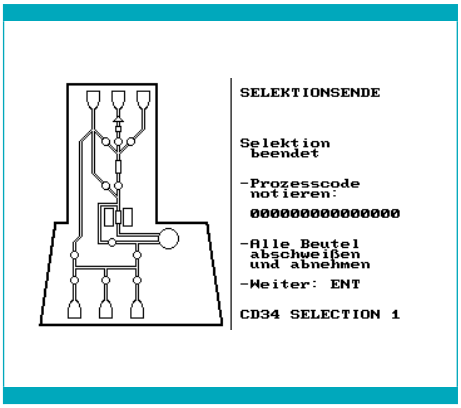
Das Separationsprogramm CD34 SELECTION 2 umfasst zusätzlich einen dritten Freisetzungs- und Wiederauftragsschritt.

Abschließende Elution der Zellen

Der Magnet wird auf „OFF" gestellt, und die magnetisch markierten Zellen werden von der Separationssäule gelöst und im angebrachten Cell Collection Bag gesammelt.

Trennen der Beutel und Notieren des Prozesscodes

Nach Abschluss des Separationslaufs erscheint auf dem Bildschirm Bildschirm 7.72.



Bildschirm 7.72: Trennen der Beutel und Notieren des Prozesscodes

1. Den Prozesscode notieren.
2. Den Schlauch oberhalb des Luer-Lock, der den Cell Collection Bag mit dem Schlauchset verbindet, abklemmen oder fest verschließen (siehe Abbildung 7.22).

   Drei hermetische Verschlüsse im Schlauch direkt unterhalb von Ventil 9 anlegen. Den mittleren Verschluss vorsichtig durchtrennen, um den Cell Collection Bag vom Schlauchset zu trennen.
3. Den gefüllten Cell Collection Bag wiegen. Das Gewicht notieren.

   Das Gewicht der Zielzellfraktion durch Subtrahieren des Gewichts des leeren Cell Collection Bag vom Gewicht des Cell Collection Bag, der die Zielzellen enthält, bestimmen. Das Gewicht notieren.
4. Die Zielzellsuspension durch Rotieren des Beutels gründlich mischen. Eine geeignete Menge, z.B. 0,5 mL, zur Analyse zurückbehalten.
5. Mithilfe des Schweißgerätes den Schlauch oberhalb des Luer-Locks des Negative Fraction Bag fest verschließen. Drei hermetische Verschlüsse im Schlauch anlegen. Den mittleren Verschluss durchtrennen, um den Negative Fraction Bag zu trennen.
6. Den Buffer Waste Bag auf dieselbe Weise trennen.

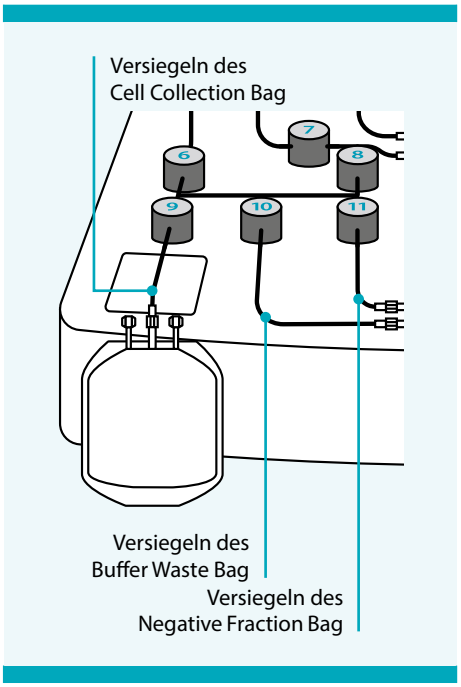


Abbildung 7.22: Trennen der Beutel

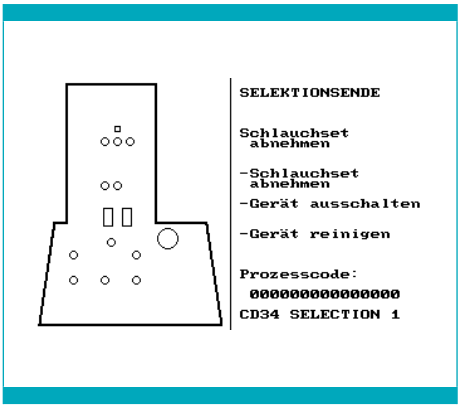
7. Den Negative Fraction Bag und den Buffer Waste Bag entfernen. Alle Beutel aufbewahren, bis die Abschlussanalyse aller Zellen durchgeführt wurde.

Die Zielzellen können jetzt entsprechend den klinischen Protokollen verarbeitet werden.

Um fortzufahren, drücken Sie **RUN**.

Deinstallieren des Schlauchsets und Abschalten

Das Bildschirmfenster zeigt Bildschirm 7.73 an.



Bildschirm 7.73: Deinstallieren des Schlauchsets und Abschalten

1. Das Schlauchset wie folgt entfernen: Beginnend mit den Ventilen 6, 9, 10 und 11 und aufwärts arbeitend, den Schlauch vom Flüssigkeitssensor und von den Ventilen durch Drücken der Ventile lösen. Die Säulen aus den Säulenhaltern lösen. Das Schlauchset als infektiösen Abfall gemäß den Standardverfahren des Krankenhauses entsorgen.
2. Das CliniMACS Plus Instrument ausschalten.
3. Das Instrument entsprechend der Reinigungsanleitung im Abschnitt „Reinigung und Desinfektion“ im Benutzerhandbuch des CliniMACS Plus Instruments reinigen. Die Standardverfahren für die Behandlung von infektiösem Material beachten.

Analyse der Zellen

WICHTIG

- *Der CliniMACS PBS/EDTA Buffer muss vor der Verabreichung der separierten Zielzellen nicht entfernt werden, wenn das Volumen 100 mL je Transplantation mit entsprechenden Infusionsgeschwindigkeiten nicht überschreitet. Der Nierenstatus des Patienten und Wirkungen auf die Elektrolyte im Blut müssen berücksichtigt werden. Besonders bei Kindern müssen die Infusionsgeschwindigkeiten entsprechend angepasst werden.*
- *Wenn das Volumen der Zielzellfraktion 100 mL überschreitet, muss es durch geeignete Maßnahmen, z.B. durch Zentrifugation oder Pufferaustausch, auf eine Infusionslösung reduziert werden, die im Land des Anwenders zulässig ist.*

⚠ VORSICHT

Risiko einer verminderten Qualität von Zielzellen. Die Zielzellen müssen analysiert werden und spezifische Anforderungen erfüllen, da anderenfalls die Eignung für die klinische Anwendung eingeschränkt sein kann. Untersuchen Sie die Zielzellen auf ihre Qualität und Quantität entsprechend ihrer bestimmungsgemäßen Verwendung.

Die Analyse muss folgende Parameter umfassen:

- Gesamtzahl der Leukozyten
- Viabilität und Gesamtzahl der Zielzellen
- Reinheit und Wiedergewinnung der Zielzellen

Es wird außerdem empfohlen, die Gesamtzahl der Leukozyten und die Viabilität der Nicht-Zielzellen-Fraktion zu bestimmen. Diese Auflistung ist nur ein Beispiel, und es sollten, abhängig von der bestimmungsgemäßen Verwendung und den klinischen Protokollen, weitere Tests einbezogen werden. Die Analysedaten notieren.

7.4.2 ENRICHMENT 1.1

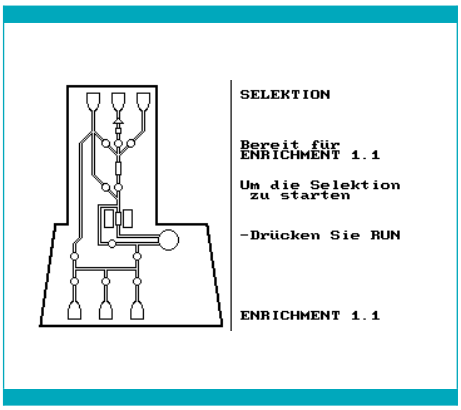
Nach Abschluss der Endkontrolle ist das CliniMACS Plus Instrument bereit zum Starten der Separation. Das Bildschirmfenster zeigt Bildschirm 7.74 an.

Um fortzufahren, drücken Sie **RUN**.

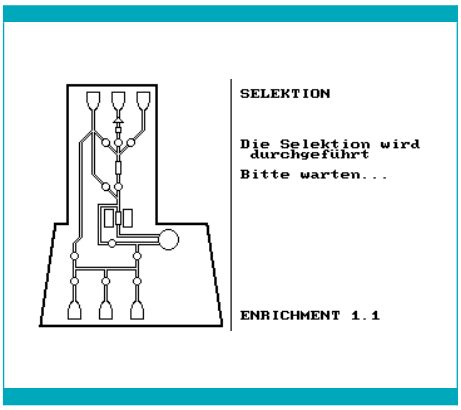
Nach Drücken von **RUN** führt das Instrument automatisch das gewählte Separationsverfahren durch.

In jeder Phase des Separationslaufs erscheint ein ähnlicher Bildschirm wie Bildschirm 7.75 und zeigt den Status des Separationsverfahrens an.

Die Magnetpositionsanzeige erscheint als zwei schwarze Kästchen neben der Separationssäule, wenn der Magnet in der „ON"-Position steht, d. h. nach vorne verlagert wurde, um die Separationssäule zu magnetisieren. Wenn die Magnetpositionsanzeige transparent ist (wie z.B. in Bildschirm 7.74), steht der Magnet in der „OFF"-Position, d. h. er wurde in den hinteren Teil des Instruments geschoben. Bei zurückgezogenem Magneten befindet sich die Separationssäule außerhalb des Magnetfelds und wird nicht magnetisiert.



Bildschirm 7.74: Starten der Separation



Bildschirm 7.75: Laufende Separation

Separationsverfahren

Auftragen der Zellen

Das Separationsverfahren beginnt mit dem Füllen des Vorfilters, um restliche Luft aus dem Vorfilter zu entfernen. Anschließend beginnt die Separation der markierten Zellen. Die Pumpe zieht den Inhalt des Cell Preparation Bag in das Schlauchset und trägt das Zellprodukt über die Vorsäule auf die Separationssäule auf. Die magnetisch markierten Zellen (Zielzellen) werden in der im Magnetfeld platzierten Separationssäule zurückgehalten, während die nicht markierten Zellen (Nicht-Zielzellen) hindurchlaufen und im Negative Fraction Bag gesammelt werden.

WICHTIG

Am Anfang der Separation wird Puffer aufwärts zum Cell Preparation Bag gepumpt, um den Vorfilter zu füllen. Klopfen Sie mehrmals vorsichtig an die Seite des Filters, um Blasen zu beseitigen, die sich eventuell im Filter angesammelt haben.

Hinweis:

- Wenn die durch die CliniMACS Software berechnete Anzahl an magnetisch markierten Zellen die Bindungskapazität der Separationssäule übersteigt, lädt und separiert das Separationsprogramm die Zellprobe automatisch in geeigneten Portionen („Staged Loading“).
- Das Auftragen wird gestoppt, wenn die Kapazität der Separationssäule erreicht ist, und das Separationsprogramm fährt mit dem nächsten Schritt der Separation fort. Nachdem der letzte Schritt (abschließende Elution der Zellen) abgeschlossen ist, wird die nächste Portion der Probe auf die Säule aufgetragen und entsprechend verarbeitet.

Spülen I der Säule

Die Vorsäule und die Separationssäule werden eingehend gespült, um alle nicht markierten Zellen zu entfernen. Der Waschpuffer wird im Buffer Waste Bag gesammelt.

Freisetzung der Zellen

Der Magnet wird in den hinteren Teil des Instruments versetzt („OFF“-Position). Die zurückgehaltenen Zellen werden im Schnelldurchfluss freigesetzt, bleiben aber in einem internen Schlauchzyklus.

Wiederauftragen der Zellen

Der Magnet wird wieder in die „ON“-Position versetzt, um die Separationssäule zu magnetisieren, und die Zellen werden erneut auf die Separationssäule aufgetragen.

Spülen II der Säule

Auf das Wiederauftragen der Zellen folgt eine zweite Säulenspülsequenz, um restliche nicht markierte Zellen zu entfernen. Außerdem werden alle Schläuche mehrmals gespült.

Abschließende Elution der Zellen

Der Magnet wird auf „OFF“ gestellt, und die magnetisch markierten Zellen (Zielzellen) werden von der Separationssäule gelöst und im Cell Collection Bag gesammelt.

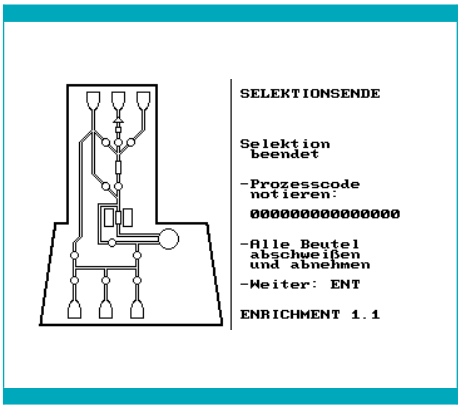
Trennen der Beutel und Notieren des Prozesscodes

Nach Abschluss des Separationslaufs erscheint auf dem Bildschirm Bildschirm 7.76.

1. Den Prozesscode notieren.
2. Den Schlauch oberhalb des Luer-Lock, der den Cell Collection Bag mit dem Schlauchset verbindet, abklemmen oder fest verschließen (siehe Abbildung 7.23).

   Drei hermetische Verschlüsse im Schlauch direkt unterhalb von Ventil 9 anlegen. Den mittleren Verschluss vorsichtig durchtrennen, um den Cell Collection Bag vom Schlauchset zu trennen.
3. Den gefüllten Cell Collection Bag wiegen. Das Gewicht notieren.

   Das Gewicht der Zielzellfraktion durch Subtrahieren des Gewichts des leeren Cell Collection Bag vom Gewicht des Cell Collection Bag, der die Zielzellen enthält, bestimmen. Das Gewicht notieren.
4. Die Zielzellsuspension durch Rotieren des Beutels gründlich mischen. Eine geeignete Menge, z.B. 0,5 mL, zur Analyse zurückbehalten.
5. Mithilfe des Schweißgerätes den Schlauch oberhalb des Luer-Locks des Negative Fraction Bag fest verschließen. Drei hermetische Verschlüsse im Schlauch anlegen. Den mittleren Verschluss durchtrennen, um den Negative Fraction Bag zu trennen.



Bildschirm 7.76: Trennen der Beutel und Notieren des Prozesscodes

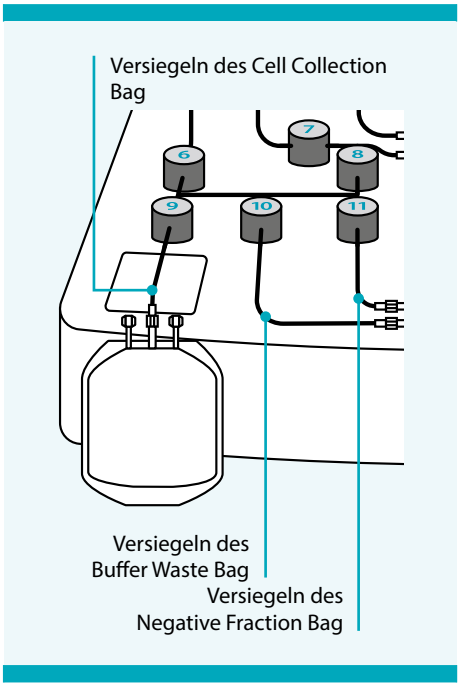


Abbildung 7.23: Trennen der Beutel

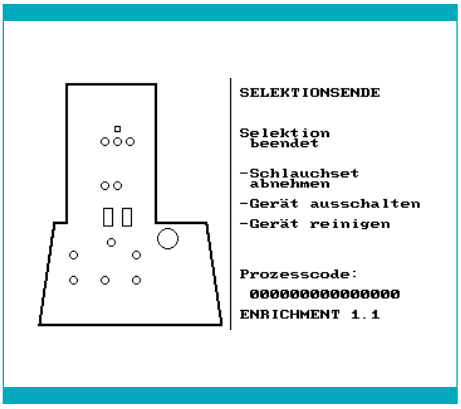
6. Den Buffer Waste Bag auf dieselbe Weise trennen.
7. Den Negative Fraction Bag und den Buffer Waste Bag entfernen. Alle Beutel aufbewahren, bis die Abschlussanalyse aller Zellen durchgeführt wurde.

Die Zielzellen können jetzt entsprechend den klinischen Protokollen verarbeitet werden.

Um fortzufahren, **ENT** drücken.

Deinstallieren des Schlauchsets und Abschalten

Das Bildschirmfenster zeigt Bildschirm 7.77 an.



Bildschirm 7.77: Deinstallieren des Schlauchsets und Abschalten

1. Das Schlauchset wie folgt entfernen: Beginnend mit den Ventilen 6, 9, 10 und 11 und aufwärts arbeitend, den Schlauch vom Flüssigkeitssensor und von den Ventilen durch Drücken der Ventile lösen. Die Säulen aus den Säulenhaltern lösen. Das Schlauchset als infektiösen Abfall gemäß den Standardverfahren des Krankenhauses entsorgen.
2. Das CliniMACS Plus Instrument ausschalten.
3. Das Instrument entsprechend der Reinigungsanleitung im Abschnitt „Reinigung und Desinfektion“ im Benutzerhandbuch des CliniMACS Plus Instruments reinigen. Die Standardverfahren für die Behandlung von infektiösem Material beachten.

Analyse der Zellen

WICHTIG

- *Der CliniMACS PBS/EDTA Buffer muss vor der Verabreichung der separierten Zielzellen nicht entfernt werden, wenn das Volumen 100 mL je Transplantation mit entsprechenden Infusionsgeschwindigkeiten nicht überschreitet. Der Nierenstatus des Patienten und Wirkungen auf die Elektrolyte im Blut müssen berücksichtigt werden. Besonders bei Kindern müssen die Infusionsgeschwindigkeiten entsprechend angepasst werden.*
- *Wenn das Volumen der Zielzellfraktion 100 mL überschreitet, muss es durch geeignete Maßnahmen, z.B. durch Zentrifugation oder Pufferaustausch, auf eine Infusionslösung reduziert werden, die im Land des Anwenders zulässig ist.*

⚠ VORSICHT

Risiko einer verminderten Qualität von Zielzellen. Die Zielzellen müssen analysiert werden und spezifische Anforderungen erfüllen, da anderenfalls die Eignung für die klinische Anwendung eingeschränkt sein kann. Untersuchen Sie die Zielzellen auf ihre Qualität und Quantität entsprechend ihrer bestimmungsgemäßen Verwendung.

Die Analyse muss folgende Parameter umfassen:

- Gesamtzahl der Leukozyten
- Viabilität und Gesamtzahl der Zielzellen
- Reinheit (Depletionseffizienz) und Wiedergewinnung der Zielzellen

Es wird außerdem empfohlen, die Gesamtzahl der Leukozyten und die Viabilität der Nicht-Zielzellen-Fraktion zu bestimmen. Diese Auflistung ist nur ein Beispiel, und es sollten, abhängig von der bestimmungsgemäßen Verwendung und den klinischen Protokollen, weitere Tests einbezogen werden. Die Analysedaten notieren.

7.4.3 ENRICHMENT 3.2

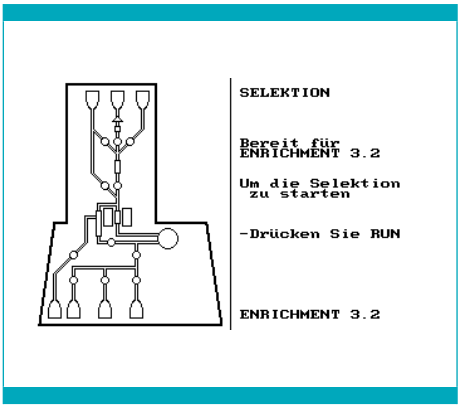
Nach Abschluss der Endkontrolle ist das CliniMACS Plus Instrument bereit zum Starten der Separation. Das Bildschirmfenster zeigt Bildschirm 7.78 an.

Um fortzufahren, drücken Sie **RUN**.

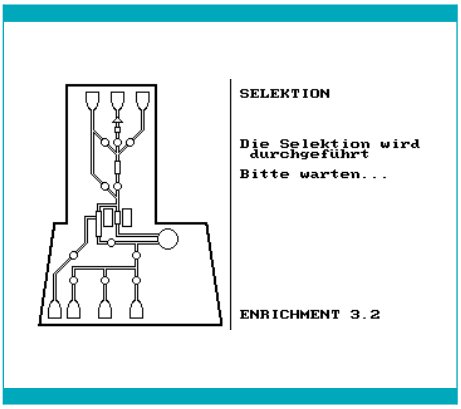
Nach Drücken von **RUN** führt das Instrument automatisch das gewählte Separationsverfahren durch.

In jeder Phase des Separationslaufs erscheint ein ähnlicher Bildschirm wie Bildschirm 7.79 und zeigt den Status des Separationsverfahrens an.

Die Magnetpositionsanzeige erscheint als zwei schwarze Kästchen neben der Separationssäule, wenn der Magnet in der „ON"-Position steht, d. h. nach vorne verlagert wurde, um die Separationssäule zu magnetisieren. Wenn die Magnetpositionsanzeige transparent ist (wie z.B. in Bildschirm 7.78), steht der Magnet in der „OFF"-Position, d. h. er wurde in den hinteren Teil des Instruments geschoben. Bei zurückgezogenem Magneten befindet sich die Separationssäule außerhalb des Magnetfelds und wird nicht magnetisiert.



Bildschirm 7.78: Starten der Separation



Bildschirm 7.79: Laufende Separation

Separationsverfahren

Auftragen der Zellen

Das Separationsverfahren beginnt mit dem Füllen des Vorfilters, um restliche Luft aus dem Vorfilter zu entfernen. Anschließend beginnt die Separation der markierten Zellen. Die Pumpe zieht den Inhalt des Cell Preparation Bag in das Schlauchset und trägt das Zellprodukt über die Vorsäule auf die Separationssäule auf. Die magnetisch markierten Zellen (Zielzellen) werden in der im Magnetfeld platzierten Separationssäule zurückgehalten, während die nicht markierten Zellen (Nicht-Zielzellen) hindurchlaufen und im Negative Fraction Bag gesammelt werden. Wenn der Cell Preparation Bag leer ist (automatisch vom Flüssigkeitssensor detektiert), wird der Vorfilter zweimal mit Puffer gespült.

WICHTIG

Am Anfang der Separation wird Puffer aufwärts zum Cell Preparation Bag gepumpt, um den Vorfilter zu füllen. Klopfen Sie mehrmals vorsichtig an die Seite des Filters, um Blasen zu beseitigen, die sich eventuell im Filter angesammelt haben.

Spülen I der Säule

Die Vorsäule und die Separationssäule werden eingehend gespült, um alle nicht markierten Zellen zu entfernen. Der Waschpuffer wird im Buffer Waste Bag gesammelt.

Freisetzung der Zellen I

Der Magnet wird in den hinteren Teil des Instruments versetzt („OFF"-Position). Die zurückgehaltenen Zellen werden im Schnelldurchfluss freigesetzt, bleiben aber in einem internen Schlauchzyklus.

Wiederauftragen I der Zellen

Der Magnet wird wieder in die „ON"-Position versetzt, um die Separationssäule zu magnetisieren, und die Zellen werden erneut auf die Separationssäule aufgetragen.

Spülen II der Säule

Auf das Wiederauftragen der Zellen folgt ein zweiter Spülschritt, um restliche nicht markierte Zellen zu entfernen. Außerdem werden alle Schläuche mehrmals gespült.

Freisetzung der Zellen II, Wiederauftragen II der Zellen, Spülen III der Säule

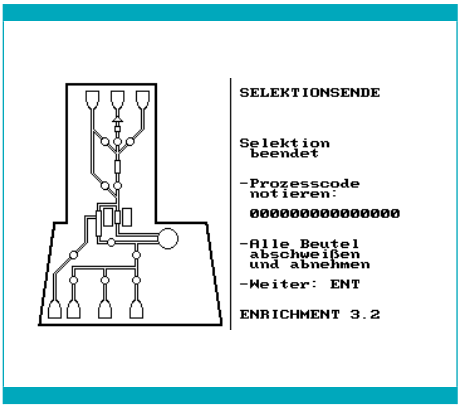
Die Zellen werden freigesetzt und erneut auf die Separationssäule aufgetragen, um nicht markierte Zellen zu entfernen, die unspezifisch an der Säulenmatrix haften. Danach wird die Separationssäule nochmals gespült.

Abschließende Elution der Zellen

Der Magnet wird auf „OFF" gestellt, und die magnetisch markierten Zellen (Zielzellen) werden von der Separationssäule gelöst und im Cell Collection Bag gesammelt.

Trennen der Beutel und Notieren des Prozesscodes

Nach Abschluss des Separationslaufs erscheint auf dem Bildschirm Bildschirm 7.80.



Bildschirm 7.80: Trennen der Beutel und Notieren des Prozesscodes

1. Den Prozesscode notieren.
2. Den Schlauch oberhalb des Luer-Lock, der den Cell Collection Bag mit dem Schlauchset verbindet, abklemmen oder fest verschließen (siehe Abbildung 7.24).

   Drei hermetische Verschlüsse im Schlauch direkt unterhalb von Ventil 9 anlegen. Den mittleren Verschluss vorsichtig durchtrennen, um den Cell Collection Bag vom Schlauchset zu trennen.
3. Den gefüllten Cell Collection Bag wiegen. Das Gewicht notieren.

   Das Gewicht der Zielzellfraktion durch Subtrahieren des Gewichts des leeren Cell Collection Bag vom Gewicht des Cell Collection Bag, der die Zielzellen enthält, bestimmen. Das Gewicht notieren.
4. Die Zielzellsuspension durch Rotieren des Beutels gründlich mischen. Eine geeignete Menge, z.B. 0,5 mL, zur Analyse zurückbehalten.
5. Mithilfe des Schweißgerätes den Schlauch oberhalb des Luer-Locks des Negative Fraction Bag fest verschließen. Drei hermetische Verschlüsse im Schlauch anlegen. Den mittleren Verschluss durchtrennen, um den Negative Fraction Bag zu trennen.
6. Den Buffer Waste Bag auf dieselbe Weise trennen.

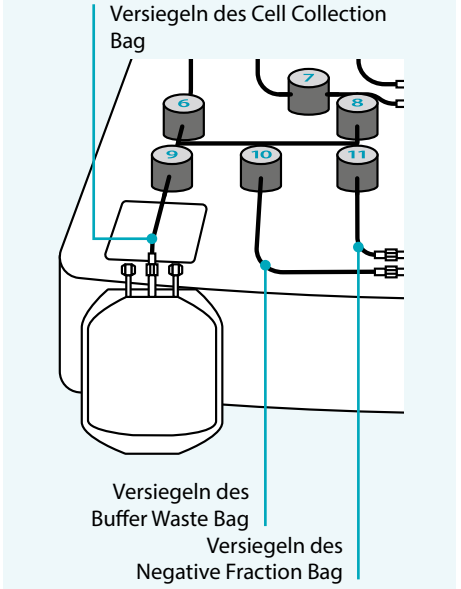


Abbildung 7.24: Trennen der Beutel

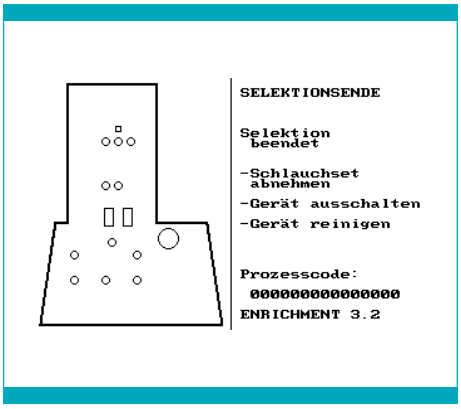
7. Den Negative Fraction Bag und den Buffer Waste Bag entfernen. Alle Beutel aufbewahren, bis die Abschlussanalyse aller Zellen durchgeführt wurde.

Die Zielzellen können jetzt entsprechend den klinischen Protokollen verarbeitet werden.

Um fortzufahren, **ENT** drücken.

Deinstallieren des Schlauchsets und Abschalten

Das Bildschirmfenster zeigt Bildschirm 7.81 an.



Bildschirm 7.81: Deinstallieren des Schlauchsets und Abschalten

1. Das Schlauchset wie folgt entfernen: Beginnend mit den Ventilen 6, 9, 10 und 11 und aufwärts arbeitend, den Schlauch vom Flüssigkeitssensor und von den Ventilen durch Drücken der Ventile lösen. Die Säulen aus den Säulenhaltern lösen. Das Schlauchset als infektiösen Abfall gemäß den Standardverfahren des Krankenhauses entsorgen.
2. Das CliniMACS Plus Instrument ausschalten.
3. Das Instrument entsprechend der Reinigungsanleitung im Abschnitt „Reinigung und Desinfektion“ im Benutzerhandbuch des CliniMACS Plus Instruments reinigen. Die Standardverfahren für die Behandlung von infektiösem Material beachten.

Analyse der Zellen

WICHTIG

- *Der CliniMACS PBS/EDTA Buffer muss vor der Verabreichung der separierten Zielzellen nicht entfernt werden, wenn das Volumen 100 mL je Transplantation mit entsprechenden Infusionsgeschwindigkeiten nicht überschreitet. Der Nierenstatus des Patienten und Wirkungen auf die Elektrolyte im Blut müssen berücksichtigt werden. Besonders bei Kindern müssen die Infusionsgeschwindigkeiten entsprechend angepasst werden.*
- *Wenn das Volumen der Zielzellfraktion 100 mL überschreitet, muss es durch geeignete Maßnahmen, z.B. durch Zentrifugation oder Pufferaustausch, auf eine Infusionslösung reduziert werden, die im Land des Anwenders zulässig ist.*

⚠ VORSICHT

Risiko einer verminderten Qualität von Zielzellen. Die Zielzellen müssen analysiert werden und spezifische Anforderungen erfüllen, da anderenfalls die Eignung für die klinische Anwendung eingeschränkt sein kann. Untersuchen Sie die Zielzellen auf ihre Qualität und Quantität entsprechend ihrer bestimmungsgemäßen Verwendung.

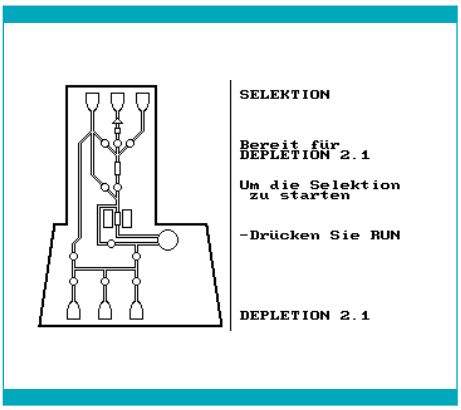
Die Analyse muss folgende Parameter umfassen:

- Gesamtzahl der Leukozyten
- Viabilität und Gesamtzahl der Zielzellen
- Reinheit und Wiedergewinnung der Zielzellen

Es wird außerdem empfohlen, die Gesamtzahl der Leukozyten und die Viabilität der Nicht-Zielzellen-Fraktion zu bestimmen. Diese Auflistung ist nur ein Beispiel, und es sollten, abhängig von der bestimmungsgemäßen Verwendung und den klinischen Protokollen, weitere Tests einbezogen werden. Die Analysedaten notieren.

7.4.4 DEPLETION 2.1

Nach Abschluss der Endkontrolle ist das CliniMACS Plus Instrument bereit zum Starten der Separation. Das Bildschirmfenster zeigt Bildschirm 7.82 an.

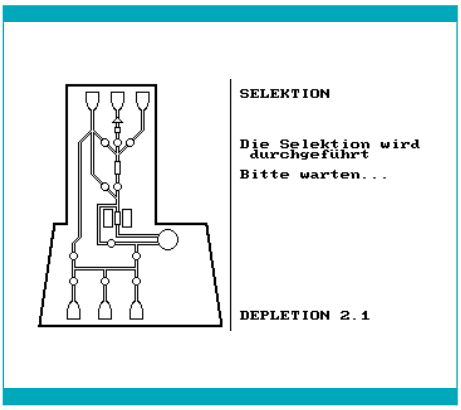


Bildschirm 7.82: Starten der Separation

Um fortzufahren, drücken Sie **RUN**.

Nach Drücken von **RUN** führt das Instrument automatisch das gewählte Separationsverfahren durch.

In jeder Phase des Separationslaufs erscheint ein ähnlicher Bildschirm wie Bildschirm 7.83 und zeigt den Status des Separationsverfahrens an.



Bildschirm 7.83: Laufende Separation

Die Magnetpositionsanzeige erscheint als zwei schwarze Kästchen neben der Separationssäule, wenn der Magnet in der „ON"-Position steht, d. h. nach vorne verlagert wurde, um die Separationssäule zu magnetisieren. Wenn die Magnetpositionsanzeige transparent ist (wie z.B. in Bildschirm 7.82), steht der Magnet in der „OFF"-Position, d. h. er wurde in den hinteren Teil des Instruments geschoben. Bei zurückgezogenem Magneten befindet sich die Separationssäule außerhalb des Magnetfelds und wird nicht magnetisiert.

Separationsverfahren

Auftragen der Zellen

Das Separationsverfahren beginnt mit dem Füllen des Vorfilters, um das System zu entlüften. Anschließend beginnt die Separation der markierten Zellen. Die Pumpe zieht den Inhalt des Cell Preparation Bag in das Schlauchset. Die magnetisch markierten Zellen (Nicht-Zielzellen) werden in der im Magnetfeld platzierten Separationssäule zurückgehalten, während die nicht markierten Zellen (Zielzellen) hindurchlaufen und im Cell Collection Bag gesammelt werden.

WICHTIG

Am Anfang der Separation wird Puffer aufwärts zum Cell Preparation Bag gepumpt, um den Vorfilter zu füllen. Klopfen Sie mehrmals vorsichtig an die Seite des Filters, um Blasen zu beseitigen, die sich eventuell im Filter angesammelt haben.

Spülen des Vorfilters

Nachdem die Zellprobe vollständig in das Schlauchset geladen wurde, wird der Vorfilter zweimal mit Puffer gespült, um den Zellverlust im Filter zu reduzieren.

Hinweis:

- Wenn die durch die CliniMACS Software berechnete Anzahl an magnetisch markierten Zellen die Bindungskapazität der Separationssäule übersteigt, lädt und separiert das Separationsprogramm die Zellprobe automatisch in kleineren Portionen („Staged Loading“).
- Das Auftragen wird gestoppt, wenn die Kapazität der Separationssäule erreicht ist, und das Separationsprogramm fährt mit dem nächsten Schritt der Separation fort. Nachdem der letzte Schritt (abschließende Elution der Zellen) abgeschlossen ist, wird die nächste Portion der Probe auf die Säule aufgetragen.

Spülen der Säulen

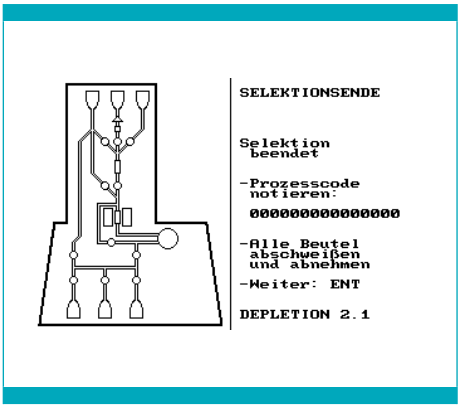
Die Vorsäule und die Separationssäule werden eingehend gespült, um alle nicht markierten Zellen zu entfernen. Der Waschpuffer wird im Buffer Waste Bag gesammelt.

Abschließende Elution der Zellen

Der Magnet wird in die „OFF“-Position versetzt. Zuerst werden die magnetisch markierten Zellen in den Priming Waste Bag eluiert. Erst nachdem die letzte Beladungsstufe beendet ist, werden alle magnetisch markierten Zellen (Nicht-Zielzellen) von der Separationssäule gelöst und im Negative Fraction Bag gesammelt, um die Verschleppung mit markierten Zellen im Pumpenschlauch zu reduzieren.

Trennen der Beutel und Notieren des Prozesscodes

Nach Abschluss des Separationslaufs erscheint auf dem Bildschirm Bildschirm 7.84.



Bildschirm 7.84: Trennen der Beutel und Notieren des Prozesscodes

1. Den Prozesscode notieren.
2. Den Schlauch oberhalb des Luer-Lock, der den Cell Collection Bag mit dem Schlauchset verbindet, abklemmen oder fest verschließen (siehe Abbildung 7.25).

   Drei hermetische Verschlüsse im Schlauch direkt unterhalb von Ventil 9 anlegen. Den mittleren Verschluss vorsichtig durchtrennen, um den Cell Collection Bag vom Schlauchset zu trennen.
3. Den gefüllten Cell Collection Bag wiegen. Das Gewicht notieren.

   Das Gewicht der Zielzellfraktion durch Subtrahieren des Gewichts des leeren Cell Collection Bag vom Gewicht des Cell Collection Bag, der die Zielzellen enthält, bestimmen. Das Gewicht notieren.
4. Die Zielzellsuspension durch Rotieren des Beutels gründlich mischen. Eine geeignete Menge, z.B. 0,5 mL, zur Analyse zurückbehalten.
5. Mithilfe des Schweißgerätes den Schlauch oberhalb des Luer-Locks des Negative Fraction Bag fest verschließen. Drei hermetische Verschlüsse im Schlauch anlegen. Den mittleren Verschluss durchtrennen, um den Negative Fraction Bag zu trennen.
6. Den Buffer Waste Bag auf dieselbe Weise trennen.

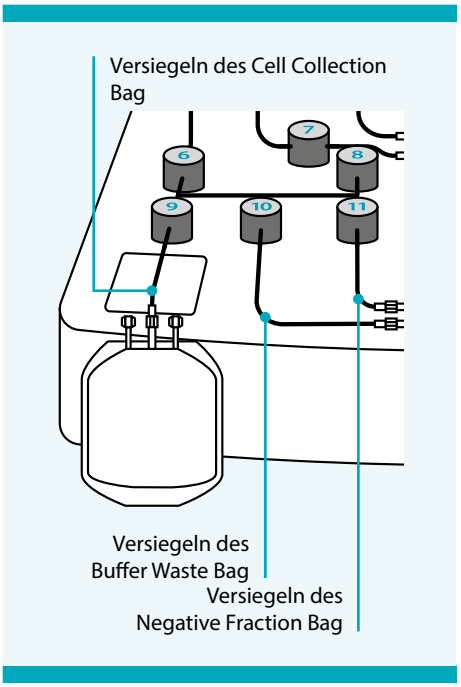


Abbildung 7.25: Trennen der Beutel

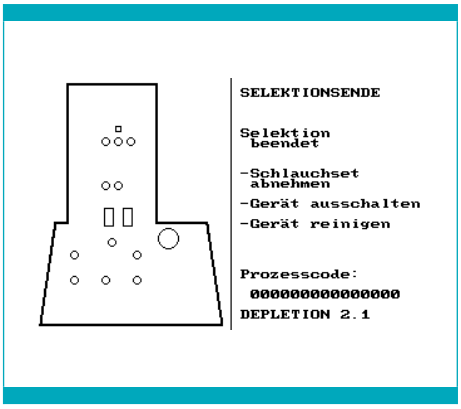
7. Den Negative Fraction Bag und den Buffer Waste Bag entfernen. Alle Beutel aufbewahren, bis die Abschlussanalyse aller Zellen durchgeführt wurde.

Die Zielzellen können jetzt entsprechend den klinischen Protokollen verarbeitet werden.

Um fortzufahren, **ENT** drücken.

Deinstallieren des Schlauchsets und Abschalten

Das Bildschirmfenster zeigt Bildschirm 7.85 an.



Bildschirm 7.85: Deinstallieren des Schlauchsets und Abschalten

1. Das Schlauchset wie folgt entfernen: Beginnend mit den Ventilen 6, 9 und 10 und aufwärts arbeitend, den Schlauch vom Flüssigkeitssensor und von den Ventilen durch Drücken der Ventile lösen. Die Säule aus dem Säulenhalter lösen. Das Schlauchset als infektiösen Abfall gemäß den Standardverfahren des Krankenhauses entsorgen.
2. Das CliniMACS Plus Instrument ausschalten.
3. Das Instrument entsprechend der Reinigungsanleitung im Abschnitt „Reinigung und Desinfektion“ im Benutzerhandbuch des CliniMACS Plus Instruments reinigen. Die Standardverfahren für die Behandlung von infektiösem Material beachten.

Analyse der Zellen

WICHTIG

- *Der CliniMACS PBS/EDTA Buffer muss vor der Verabreichung der separierten Zielzellen nicht entfernt werden, wenn das Volumen 100 mL je Transplantation mit entsprechenden Infusionsgeschwindigkeiten nicht überschreitet. Der Nierenstatus des Patienten und Wirkungen auf die Elektrolyte im Blut müssen berücksichtigt werden. Besonders bei Kindern müssen die Infusionsgeschwindigkeiten entsprechend angepasst werden.*
- *Wenn das Volumen der Zielzellfraktion 100 mL überschreitet, muss es durch geeignete Maßnahmen, z.B. durch Zentrifugation oder Pufferaustausch, auf eine Infusionslösung reduziert werden, die im Land des Anwenders zulässig ist.*

⚠ VORSICHT

Risiko einer verminderten Qualität von Zielzellen. Die Zielzellen müssen analysiert werden und spezifische Anforderungen erfüllen, da anderenfalls die Eignung für die klinische Anwendung eingeschränkt sein kann. Untersuchen Sie die Zielzellen auf ihre Qualität und Quantität entsprechend ihrer bestimmungsgemäßen Verwendung.

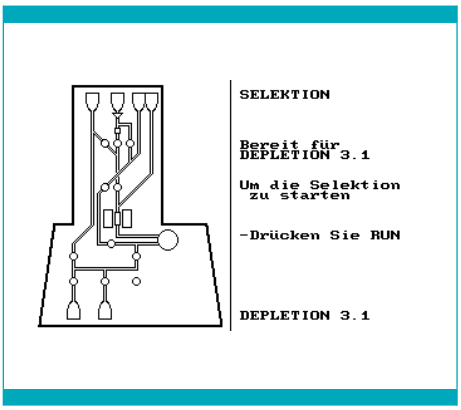
Die Analyse muss folgende Parameter umfassen:

- Gesamtzahl der Leukozyten
- Viabilität und Gesamtzahl der Zielzellen
- Depletionseffizienz

Es wird außerdem empfohlen, die Gesamtzahl der Leukozyten und die Viabilität der Nicht-Zielzellen-Fraktion zu bestimmen. Diese Auflistung ist nur ein Beispiel, und es sollten, abhängig von der bestimmungsgemäßen Verwendung und den klinischen Protokollen, weitere Tests einbezogen werden. Die Analysedaten notieren.

7.4.5 DEPLETION 3.1

Nach Abschluss der Endkontrolle ist das CliniMACS Plus Instrument bereit zum Starten der Separation. Das Bildschirmfenster zeigt Bildschirm 7.86 an.

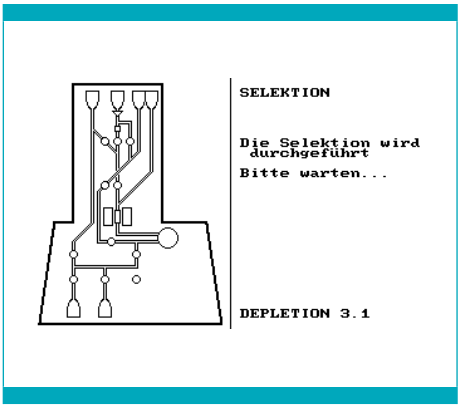


Bildschirm 7.86: Starten der Separation

Um fortzufahren, drücken Sie **RUN**.

Nach Drücken von **RUN** führt das Instrument automatisch das gewählte Separationsverfahren durch.

In jeder Phase des Separationslaufs erscheint ein ähnlicher Bildschirm wie Bildschirm 7.87 und zeigt den Status des Separationsverfahrens an.



Bildschirm 7.87: Laufende Separation

Die Magnetpositionsanzeige erscheint als zwei schwarze Kästchen neben der Separationssäule, wenn der Magnet in der „ON"-Position steht, d. h. nach vorne verlagert wurde, um die Separationssäule zu magnetisieren. Wenn die Magnetpositionsanzeige transparent ist (wie z.B. in Bildschirm 7.86), steht der Magnet in der „OFF"-Position, d. h. er wurde in den hinteren Teil des Instruments geschoben. Bei zurückgezogenem Magneten befindet sich die Separationssäule außerhalb des Magnetfelds und wird nicht magnetisiert.

Separationsverfahren

Depletion 3.1 ist ein Depletionsprogramm mit zwei Schritten, d. h. die Zellen werden zweimal auf die Separationssäule aufgetragen.

Im ersten Teil des Prozesses wird der Großteil der markierten Zellen depletiert (Staged Cell Loading [Bulk Loading Stage]). Im zweiten Teil des Prozesses werden die wenigen restlichen markierten Zellen depletiert (Sensitive Sample Loading [Sensitive Loading Stage]).

WICHTIG

Am Anfang der Separation wird Puffer aufwärts zum Cell Preparation Bag gepumpt, um den Vorfilter zu füllen. Klopfen Sie mehrmals vorsichtig an die Seite des Filters, um Blasen zu beseitigen, die sich eventuell im Filter angesammelt haben.

Hinweis: Wenn die durch die CliniMACS Software berechnete Anzahl an magnetisch markierten Zellen die Bindungskapazität der Separationssäule übersteigt, lädt und separiert das Separationsprogramm die Zellprobe automatisch in kleineren Portionen („Staged Loading"). Zwischen jeder Beladungsstufe wird die Separationssäule gespült, um alle markierten Zellen zu entfernen. Die markierten Zellen werden eluiert und im Non-Target Cell Bag gesammelt. Der Waschpuffer wird im Reapplication Bag gesammelt.

Staged Cell Loading (Bulk Loading Stage)

Das Separationsverfahren beginnt mit dem Füllen des Vorfilters, um das System zu spülen. Anschließend beginnt die Separation der markierten Zellen. Die Pumpe zieht den Inhalt des Cell Preparation Bag in das Schlauchset. Die magnetisch markierten Zellen (Nicht-Zielzellen) werden in der im Magnetfeld platzierten Separationssäule zurückgehalten, während die nicht markierten Zellen (Zielzellen) hindurchlaufen und im Reapplication Bag gesammelt werden.

Sensitive Sample Loading (Sensitive Loading Stage)

Zur weiteren Depletion werden die Zellen im Reapplication Bag mit geringerer Geschwindigkeit erneut auf die Separationssäule aufgetragen. Während die wenigen verbliebenen markierten Zellen jetzt in der Separationssäule zurückgehalten werden, fließen die nicht markierten Zellen (Zielzellen) durch das Magnetfeld und werden im Cell Collection Bag gesammelt.

Spülen des Vorfilters und des Reapplication Bag

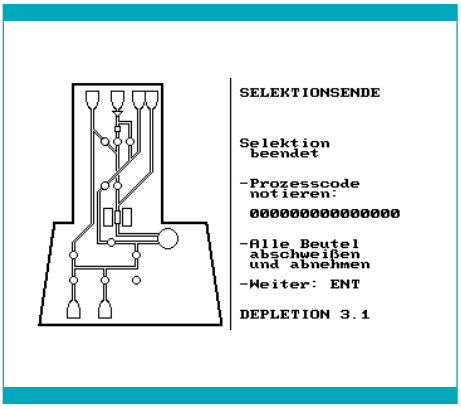
Nachdem die Zellprobe sowohl der Bulk als auch der Sensitive Depletion unterzogen wurden, werden der Vorfilter und der Reapplication Bag zweimal mit Puffer gespült, um Zellverluste im System zu reduzieren.

Entfernung von Nicht-Zielzellen

Der Magnet wird in die „OFF"-Position versetzt. Die magnetisch markierten Zellen (Nicht-Zielzellen) werden nach jeder Beladungsstufe von der Separationssäule gelöst und im Non-Target Cell Bag gesammelt.

Trennen der Beutel und Notieren des Prozesscodes

Nach Abschluss des Separationslaufs erscheint auf dem Bildschirm Bildschirm 7.88.



Bildschirm 7.88: Trennen der Beutel und Notieren des Prozesscodes

1. Den Prozesscode notieren.
2. Den Schlauch oberhalb des Luer-Lock, der den Cell Collection Bag mit dem Schlauchset verbindet, abklemmen oder fest verschließen (siehe Abbildung 7.26).

   Drei hermetische Verschlüsse im Schlauch direkt unterhalb von Ventil 9 anlegen. Den mittleren Verschluss vorsichtig durchtrennen, um den Cell Collection Bag vom Schlauchset zu trennen.
3. Den gefüllten Cell Collection Bag wiegen. Das Gewicht notieren.

   Das Gewicht der Zielzellfraktion durch Subtrahieren des Gewichts des leeren Cell Collection Bag vom Gewicht des Cell Collection Bag, der die Zielzellen enthält, bestimmen. Das Gewicht notieren.
4. Die Zielzellsuspension durch Rotieren des Beutels gründlich mischen. Eine geeignete Menge, z.B. 0,5 mL, zur Analyse zurückbehalten.
5. Mithilfe des Schweißgerätes den Schlauch oberhalb des Luer-Locks des Buffer Waste Bag fest verschließen. Drei hermetische Verschlüsse im Schlauch anlegen. Den mittleren Verschluss durchtrennen, um den Buffer Waste Bag zu trennen.
6. Den Non-Target-Cell Bag auf dieselbe Weise trennen.

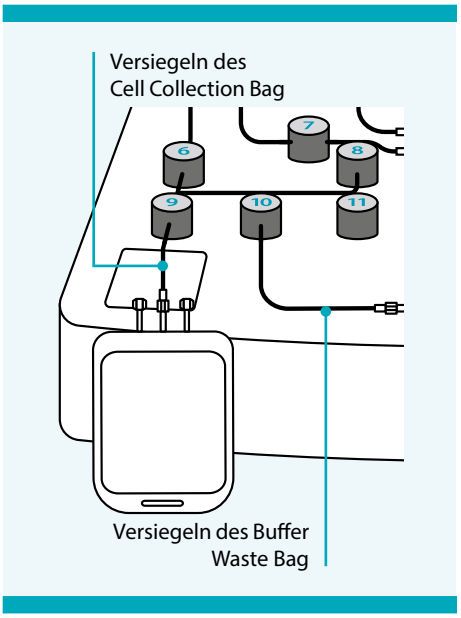


Abbildung 7.26: Trennen der Beutel

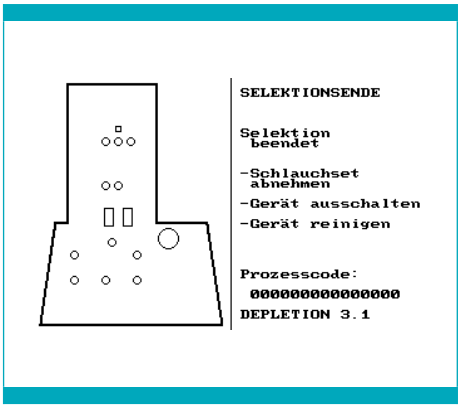
7. Den Non-Target Cell Bag und den Buffer Waste Bag entfernen. Alle Beutel aufbewahren, bis die Abschlussanalyse aller Zellen durchgeführt wurde.

Die Zielzellen können jetzt entsprechend den klinischen Protokollen verarbeitet werden.

Um fortzufahren, **ENT** drücken.

Deinstallieren des Schlauchsets und Abschalten

Das Bildschirmfenster zeigt Bildschirm 7.89 an.



Bildschirm 7.89: Deinstallieren des Schlauchsets und Abschalten

1. Das Schlauchset wie folgt entfernen: Beginnend mit den Ventilen 6, 9 und 10 und aufwärts arbeitend, den Schlauch vom Flüssigkeitssensor und von den Ventilen durch Drücken der Ventile lösen. Die Säule aus dem Säulenhalter lösen. Das Schlauchset als infektiösen Abfall gemäß den Standardverfahren des Krankenhauses entsorgen.
2. Das CliniMACS Plus Instrument ausschalten.
3. Das Instrument entsprechend der Reinigungsanleitung im Abschnitt „Reinigung und Desinfektion“ im Benutzerhandbuch des CliniMACS Plus Instruments reinigen. Die Standardverfahren für die Behandlung von infektiösem Material beachten.

Analyse der Zellen

WICHTIG

- *Der CliniMACS PBS/EDTA Buffer muss vor der Verabreichung der separierten Zielzellen nicht entfernt werden, wenn das Volumen 100 mL je Transplantation mit entsprechenden Infusionsgeschwindigkeiten nicht überschreitet. Der Nierenstatus des Patienten und Wirkungen auf die Elektrolyte im Blut müssen berücksichtigt werden. Besonders bei Kindern müssen die Infusionsgeschwindigkeiten entsprechend angepasst werden.*
- *Wenn das Volumen der Zielzellfraktion 100 mL überschreitet, muss es durch geeignete Maßnahmen, z.B. durch Zentrifugation oder Pufferaustausch, auf eine Infusionslösung reduziert werden, die im Land des Anwenders zulässig ist.*

⚠ VORSICHT

Risiko einer verminderten Qualität von Zielzellen. Die Zielzellen müssen analysiert werden und spezifische Anforderungen erfüllen, da anderenfalls die Eignung für die klinische Anwendung eingeschränkt sein kann. Untersuchen Sie die Zielzellen auf ihre Qualität und Quantität entsprechend ihrer bestimmungsgemäßen Verwendung.

Die Analyse muss folgende Parameter umfassen:

- Gesamtzahl der Leukozyten
- Viabilität und Gesamtzahl der Zielzellen
- Depletionseffizienz

Es wird außerdem empfohlen, die Gesamtzahl der Leukozyten und die Viabilität der Nicht-Zielzellen-Fraktion zu bestimmen. Diese Auflistung ist nur ein Beispiel, und es sollten, abhängig von der bestimmungsgemäßen Verwendung und den klinischen Protokollen, weitere Tests einbezogen werden. Die Analysedaten notieren.

8 Fehlerbehebung

Dieses Kapitel dient zum Nachschlagen von Informationen über mögliche unerwartete Ereignisse, die auftreten könnten, und entsprechende empfohlene Abhilfemaßnahmen. Falls Sie Informationen benötigen, die nicht in diesem Kapitel behandelt werden, wenden Sie sich bitte umgehend an den Miltenyi Biotec Technical Support.

Hinweis: Die Reihenfolge der Beschreibungen in diesem Kapitel entspricht dem normalen Ablauf einer Separation.

8.1 Miltenyi Biotec Technical Support

Wenden Sie sich bei jeglichen Fehlfunktionen des Instruments oder Prozessstörungen, die vom Bediener nicht behoben werden können (Fehlermeldungen), an das Team des Miltenyi Biotec Technical Support:

+49 2204 8306-3803
technicalsupport@miltenyi.com

Die Kontaktdaten des örtlichen Miltenyi Biotec Technical Support finden Sie unter www.miltenyibiotec.com.

8.2 Vorbereitung des Leukapheresats

Die angelieferte Probe ist verdünnt

Im Idealfall wird die magnetische Markierung in verdünntem Leukapheresat durchgeführt. Stellen Sie das Leukapheresat auf eine Endverdünnung von ca. 1:3 ein. Wenn die angelieferte Probe stärker als 1:3 verdünnt oder die Konzentration des Plasmas in der Probe nicht genau bekannt ist, setzen Sie der Probe vor der Reagenzzugabe Immunglobulin zu (empfohlene Konzentration von Immunglobulin im Markierungsvolumen: 1,5 mg/mL). Es ist wichtig, dass die Probe während der Markierung eine bestimmte Menge an Immunglobulin enthält, um die unspezifische Bindung des Reagenzes zu minimieren.

Die Zahl der Zielzellen im Leukapheresat ist gering

Die Stammzellmobilisierung war unzureichend. Überprüfen Sie die Analyse des Leukapheresats.

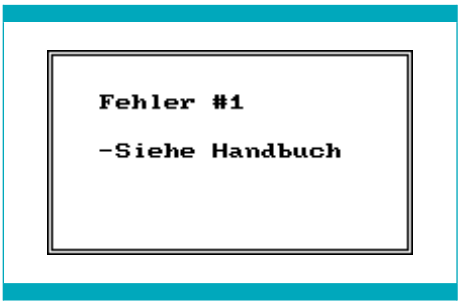
- Schlechte Viabilität der Zellen im Leukapheresat

  Das Leukapheresat ist möglicherweise unsachgemäß geerntet, gelagert oder transportiert worden. Um eine bessere Probenqualität zu gewährleisten, sollten die Vorbereitung und Separation des Leukapheresats unmittelbar nach der Leukapherese durchgeführt werden. Das Leukapheresat ist auf einer Leukozytenkonzentration von unter $0{,}2\times10^9$ pro mL zu halten. Falls erforderlich, das Leukapheresat mit autologem Plasma verdünnen. Das Leukapheresat sollte nicht älter als 24 Stunden sein, wenn das Markierungs- und Separationsverfahren begonnen wird. Wenn das Leukapheresat gelagert werden muss, z.B. über Nacht, sollte es auf kontrollierter Raumtemperatur (RT: +19 °C bis +25 °C [+66 °F bis +77 °F]). gehalten werden.

8.3 CliniMACS Plus Instrument und CliniMACS Schlauchsets

8.3.1 Fehlermeldungen

Beim Betrieb des Instruments können eine Reihe von Geräte- oder Softwarefunktionsstörungen auftreten. Diese sind als solche gekennzeichnet und werden auf dem Bildschirm angezeigt. Sie verweisen auf interne Fehler, die vom Bediener nicht behoben werden können. Notieren Sie die Fehlernummer und wenden Sie sich an den Miltenyi Biotec Technical Support.



Bildschirm 8.1: Fehlermeldung Nr. 1

Bildschirm 8.1 zeigt eine mögliche Fehlermeldung.

Im Gegensatz zu Fehlermeldungen sind Fehlfunktionen, die vom Anwender behoben werden können, als „Warnmeldungen“ gekennzeichnet (siehe Abschnitt 8.4.1).

8.3.2 Einsetzen und Vorspülen des Schlauchsets

- **Ventil öffnet sich nicht, wenn Benutzer aufgefordert wird, den Schlauch in ein Ventil einzusetzen**

  Die Ventile sind so konstruiert, dass sie nach Einsetzen des Schlauchs ordnungsgemäß funktionieren. Drücken Sie das Ventil manuell, um es zu öffnen. Beobachten Sie das Ventil während der Ventilbetätigungssequenz genau. Wenn sich das Ventil während der Ventilbetätigungssequenz nicht niederdrückt, siehe Abschnitt "Ventil drückt sich während der Ventilbetätigungssequenz nicht nieder".

- **Ventil drückt sich während der Ventilbetätigungssequenz nicht nieder**

  Stellen Sie sicher, dass der Schlauch korrekt eingesetzt ist. Überprüfen Sie, ob die Ventile gründlich gereinigt wurden. Ein Ventil, das mit Flüssigkeit kontaminiert ist, muss ausgetauscht werden. Wenden Sie sich an den Miltenyi Biotec Technical Support.

- **Während des Vorspülens tritt Puffer aus dem Schlauchset aus**

  Schlauchset ist defekt. Schalten Sie das CliniMACS Plus Instrument aus und starten Sie das Vorspülen nochmals mit einem neuen installierten Schlauchset und genügend neuem Puffer.

- **Zu viel Luft im Schlauchset nach dem Vorspülen**

  Pufferbeutel ist nicht korrekt mit dem Anstechdorn angestochen. Verwenden Sie ein neues Schlauchset und genügend neuen Puffer und starten Sie die CliniMACS Plus Separation neu. Achten Sie darauf, dass das Septum des Pufferbeutels korrekt durchstochen ist.

- **Unerwartetes Puffervolumen in Beuteln nach dem Vorspülen. Nach dem Vorspülen sollten nur der Priming Waste Bag und der Buffer Waste Bag Flüssigkeit enthalten**

  Schlauchset nicht korrekt montiert. Flüssigkeit kann hinter den Ventilen austreten, wenn das Schlauchset nicht korrekt installiert ist oder die Ventile nicht ordnungsgemäß funktionieren. Entfernen Sie das Schlauchset und ersetzen Sie es durch ein neues. Starten Sie das Vorspülverfahren mit genügend Puffer neu. Wenn das Schlauchset nicht korrekt installiert ist, kann es zu einer schlechten Leistung der CliniMACS Plus Separation kommen.

- **Pumpenmotor setzt während des Vorspülens aus**

  Pumpenschlauch ist nicht korrekt eingesetzt worden. Drücken Sie **STOP**, um das Vorspülen zu unterbrechen, und schalten Sie das Instrument aus („OFF“) und dann wieder ein („ON“). Klemmen Sie während des Installationsverfahrens die Pufferleitung mit einer Schlauchklemme ab, korrigieren Sie die Position des Pumpenschlauchs und entfernen Sie die Schlauchklemme, bevor Sie die Vorspülsequenz neu starten.

8.4 Automatische Zellseparation

8.4.1 Warnmeldungen

Im Gegensatz zu Fehlermeldungen (siehe Abschnitt 8.3.1) werden Warnmeldungen auf dem Bildschirm angezeigt, wenn die interne Steuerung des CliniMACS Plus Instruments eine Funktionsstörung feststellt, die vom Anwender behoben werden kann. Eine Warnmeldung erscheint in der Regel in Verbindung mit einem Signalton („Piepton“). Wenn während der CliniMACS Plus Separation eine Warnmeldung erscheint, befolgen Sie die Anweisungen auf dem Bildschirm, um mit der Zellseparation fortzufahren. Im Allgemeinen erscheinen Warnmeldungen, wenn **STOP** gedrückt wird, der Pumpendeckel geöffnet wird, die Pumpe aussetzt oder wenn der Flüssigkeitssensor einen Fehler feststellt.

Da im Verlauf unterschiedlicher Separationsprogramme verschiedene Arten von unerwarteten Ereignissen auftreten können, ist der folgende Abschnitt entsprechend unterteilt.

8.4.2 Unerwartete Ereignisse: Alle Separationsprogramme

■ Fehler vom Flüssigkeitssensor festgestellt

Warnmeldung 1 erscheint während der Startphase des Zellauftragsprozesses, wenn der Flüssigkeitssensor keine Flüssigkeit im Schlauch detektiert. Da der Vorfilter vor der Zellbeladung mit Puffer gespült wird, muss sich an diesem Punkt Flüssigkeit im Schlauch befinden.

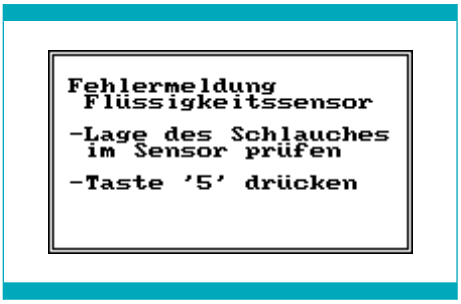


Abbildung 8.1: Fehlermeldung 1

Überprüfen Sie die folgenden Punkte:

1. Ist der Schlauch korrekt eingesetzt worden? In den Flüssigkeitssensor? Wenn nicht, den Schlauch korrekt einsetzen.
2. Ist der Schlauch mit Puffer gefüllt? Wenn nicht, siehe Punkt 3.
3. Wenn der Schlauch nicht mit Puffer gefüllt ist, den Schlauch auf Knicke überprüfen, die den Durchfluss von Puffer nach oben in den Vorfilter und den Cell Preparation Bag versperren. Die Positionierung des Schlauchsets korrigieren. Falls erforderlich, die Beutelhalter mit der Beutelhalterklemme anheben oder absenken. Die Positionierung des Schlauchs in den Ventilen korrigieren. Um die Position des Schlauchs zu ändern, das Ventil durch manuelles Drücken des Knopfs öffnen. Darauf achten, dass der Schlauch nicht abgeknickt, verdreht oder zu straff gespannt ist.

4. Ist der Cell Preparation Bag korrekt mit dem Anstechdorn angestochen? Achten Sie darauf, dass der Anstechdorn des Vorfilters das Septum des Zugangs zum Cell Preparation Bag durchstochen hat.

5. Wenn das Schlauchset nicht vollständig mit Puffer gefüllt wurde: Hat der Dorn für den Pufferbeutel des Schlauchsets den Pufferbeutel durchstochen? Zur Behebung siehe "Zu viel Luft im Schlauchset nach dem Vorspülen" in Abschnitt 8.3.2.

Fahren Sie nach der Korrekturmaßnahme mit der laufenden Separation fort und drücken Sie **5**. Falls die Warnmeldung 1 nach Behebung oder Ausschluss jeder der oben aufgelisteten möglichen Ursachen erneut erscheint, kann der Flüssigkeitssensor defekt sein. Wenden Sie sich an den Miltenyi Biotec Technical Support.

Zellen gelangen in den falschen Teil des Schlauchsets. Flüssigkeit tritt an Ventil(en) aus

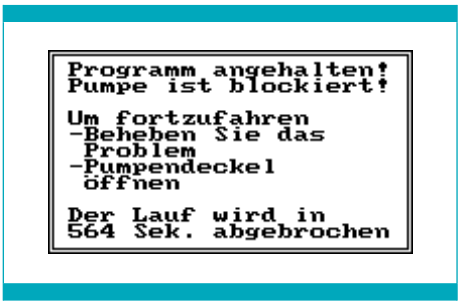
- Schlauchset wurde nicht korrekt eingesetzt. Wenn der Instrumentenlauf im Gang ist, drücken Sie **STOP** und klemmen Sie die Leitung mit einer Schlauchklemme ab. Korrigieren Sie die Positionierung des Schlauchs, indem Sie zuerst das entsprechende Ventil drücken. Entfernen Sie die Schlauchklemme und drücken Sie **RUN**, um die Separation fortzusetzen. Die Zellseparation wird abgebrochen, wenn **RUN** nicht innerhalb von 600 Sekunden gedrückt wird.
- Ventil funktioniert nicht ordnungsgemäß. Drücken Sie **STOP**. Klemmen Sie die Leitung mit einer Schlauchklemme ab. Drücken Sie das festsitzende Ventil mehrmals manuell, um es zu lösen. Entfernen Sie die Schlauchklemme und drücken Sie **RUN**, um die Separation fortzusetzen. Die Zellseparation wird abgebrochen, wenn **RUN** nicht innerhalb von 600 Sekunden gedrückt wird. Falls das festsitzende Ventil nicht gelöst werden kann, wenden Sie sich an den Miltenyi Biotec Technical Support.
- Falsches Softwareprogramm verwendet. Überprüfen Sie auf dem Bildschirm, welches Programm aktuell verwendet wird. Den Lauf durch Drücken von **STOP** abbrechen und unverzüglich den Miltenyi Biotec Technical Support kontaktieren.

Magnet bewegt sich nicht

Magnetantrieb funktioniert nicht. Ein Magnetantriebsfehler ist aufgetreten. Eine Fehlermeldung wird angezeigt (siehe Abschnitt 8.3.1). Notieren Sie die Nummer der Fehlermeldung und wenden Sie sich an den Miltenyi Biotec Technical Support.

Pumpenmotor setzt während der Zellseparation aus

Pumpenschlauch ist nicht korrekt eingesetzt, sodass die Pumpe möglicherweise nicht rotieren kann. In diesem Fall erscheint die Warnmeldung 2 im Bildschirmfenster. Der Anwender hat dann 600 Sekunden Zeit, um die Position des Pumpenschlauchs zu korrigieren.



Bildschirm 8.2: Fehlermeldung 2

1. Den Pumpenschlauch vorsichtig von der Pumpe entfernen.
2. Sicherstellen, dass der Pumpenschlauch nicht durch falsches Einsetzen beschädigt worden ist. Wenn der Pumpenschlauch leckt, klemmen Sie den Schlauch oberhalb und unterhalb der Separationssäule ab, um die an der Säule zurückgehaltenen Zellen zu retten, und wenden Sie sich an den Miltenyi Biotec Technical Support.
3. Wenn der Pumpenschlauch nicht beschädigt ist, kann er wieder in das Pumpengehäuse eingesetzt werden.
4. Drücken Sie **RUN**, um die Separation innerhalb von 600 Sekunden neu zu starten; anderenfalls wird sie abgebrochen.

Wenn der Pumpenschlauch platt und eingefallen ist, deutet dies auf eine verstopfte Säule hin. Wenden Sie sich in diesem Fall an den Miltenyi Biotec Technical Support.

Probenauftrag stoppt nicht, obwohl der Cell Preparation Bag und der Vorfilter leer sind

Flüssigkeitssensor arbeitet nicht ordnungsgemäß, z.B. weil die Oberfläche des Schlauchs im Flüssigkeitssensor nass ist. Drücken Sie **STOP**, um die Separation zu unterbrechen. Entfernen Sie den Schlauch vom Flüssigkeitssensor. Trocknen Sie den Schlauch und die Kontaktfläche mit einem Papiertuch oder saugfähigem Material. Setzen Sie den Schlauch wieder in den Flüssigkeitssensor ein und drücken Sie **RUN**. Unterbrechen Sie die Sequenz für mehr als 600 Sekunden nicht; anderenfalls wird die Zellseparation abgebrochen.

Falls sich der Flüssigkeitssensor auf diese Weise nicht aktivieren lässt, drücken Sie **STOP**, dann **2** und bestätigen Sie mit **ENT**, um den Probenauftrag zu überspringen die Separation fortzusetzen.

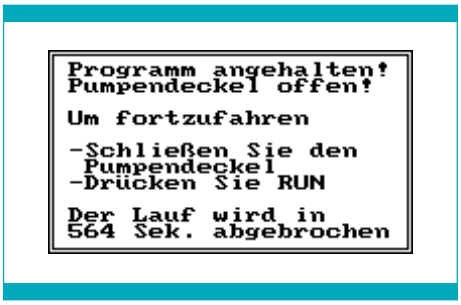
8.4.3 Unerwartete Ereignisse: Nur Anreicherungsprogramme

Lauf wird vor Abschluss des Zellseparationsprogramms abgebrochen

- Pumpendeckel offen: Aus Sicherheitsgründen stoppt die laufende Separation automatisch während des Instrumentenlaufs, wenn der Pumpendeckel geöffnet wird. Warnmeldung 5 erscheint im Bildschirmfenster.

  Schließen Sie den Pumpendeckel und drücken Sie **RUN**.

  Wird in diesem Fall **RUN** nicht innerhalb von 600 Sekunden gedrückt, wird der Lauf abgebrochen und die Zellseparation nicht abgeschlossen. Starten Sie das NOTFALLPROGRAMM, um möglichst viel Probe aus dem Schlauchset zurückzugewinnen.



Bildschirm 8.3: Fehlermeldung 5

- Stromausfall: Ein Stromausfall führt zur Beendigung der CliniMACS Plus Separation. Die Zellseparation wird nicht abgeschlossen, wenn die Stromversorgung wiederhergestellt ist. Starten Sie das NOTFALLPROGRAMM, um möglichst viel Probe aus dem Schlauchset zurückzugewinnen.

8.4.4 Unerwartete Ereignisse: CD34 SELECTION 1/2

Probenauftrag stoppte, bevor die Probe vollständig auf die Säulen aufgetragen wurde

Der Vorfilter ist durch große Menge von Zelltrümmern oder unvollständiges Füllen des Filters verstopft. Durch anhaltendes Pumpen ist ein Vakuum entstanden, das zur Bildung von Luftblasen geführt hat, die den Flüssigkeitssensor aktivierten. Deshalb wurde der Separationsprozess mit dem Spülen der Säulen fortgesetzt, bevor die gesamte Probe aufgebracht werden konnte. Der Probenauftrag kann nicht neu gestartet werden, nachdem die Auftragssequenz abgebrochen wurde.

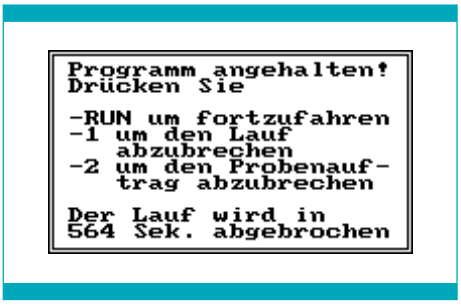
Warten Sie, bis das CliniMACS Plus Instrument das Separationsprogramm beendet hat. Brechen Sie den aktuellen Lauf nicht ab, da dies zu unnötigem Zellverlust führen kann. Wenn das Separationsprogramm beendet ist, filtrieren Sie die restliche Probe mit einem 200-µm-In-Line-Blutfilter und transferieren Sie diese in einen neuen Transferbeutel. Führen Sie sofort eine zweite Separation mit einem neuen Schlauchset und genügend neuem Puffer durch.

Pumpenschlauch eingefallen und/oder zu viel Luft im Schlauchset unterhalb der Vorsäule während der Zellbeladung

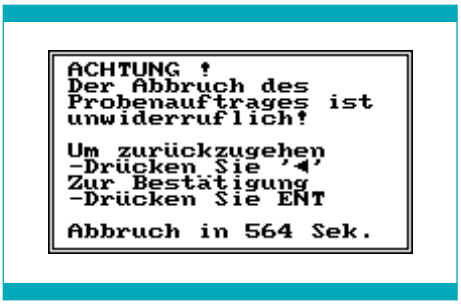
Die Vorsäule ist durch große Menge von Zelltrümmern im Cell Preparation Bag verstopft. Der Auftrag der restlichen Probe muss manuell übersprungen und die Separation mit den Zellen, die bereits auf das System aufgetragen wurden, fortgesetzt werden.

1. Drücken Sie **STOP**, um den Zellauftrag zu unterbrechen. Warnmeldung 3 wird angezeigt.
2. Drücken Sie **2**, um den Zellauftragsprozess zu überspringen.

   Warnmeldung 4 wird angezeigt und gibt dem Anwender die Möglichkeit, den Vorgang zu bestätigen oder die Entscheidung zu ändern, da das Überspringen des Probenauftrags nicht rückgängig gemacht werden kann.
3. Nach Drücken von **ENT** stoppt das Separationsprogramm den Probenauftrag und fährt mit dem Spülen der Säule fort.



Bildschirm 8.4: Fehlermeldung 3



Bildschirm 8.5: Fehlermeldung 4

Klemmen Sie den Schlauch unterhalb des Vorfilters ab, um zu verhindern, dass Zellen aus dem Cell Preparation Bag in das Schlauchset übertreten. Wenn das Separationsprogramm beendet ist, filtrieren Sie die restliche Probe mit einem 200-µm-In-Line-Blutfilter und transferieren Sie diese in einen neuen Transferbeutel.

Führen Sie sofort eine zweite Separation mit einem neuen Schlauchset und genügend neuem Puffer durch.

8.4.5 Unerwartete Ereignisse: ENRICHMENT 1.1

- Probenauftrag stoppte, bevor die Probe vollständig auf die Säulen aufgetragen wurde

  Der Vorfilter ist durch große Menge von Zelltrümmern oder unvollständiges Füllen des Filters verstopft. Durch anhaltendes Pumpen ist ein Vakuum entstanden, das zur Bildung von Luftblasen geführt hat. Diese haben den Flüssigkeitssensor aktiviert, und der Separationsprozess wurde direkt mit dem letzten Schritt des Probenauftrags fortgesetzt. Ein Teil der Probe kann nach Beendigung der Separation im Cell Preparation Bag zurückbleiben.

  Warten Sie, bis das CliniMACS Plus Instrument das Separationsprogramm beendet hat. Brechen Sie den aktuellen Lauf nicht ab, da dies zu unnötigem Zellverlust führen kann.

  Bestimmen Sie die Gesamtzellzahl, den Anteil der Zielzellen und das verbleibende Probenauftragsvolumen im Cell Preparation Bag und geben Sie diese Probenparameter beim Setup des Instruments ein (SCHRITT 2). Wenn das Separationsprogramm beendet ist, filtrieren Sie die restliche Probe mit einem 200-µm-In-Line-Blutfilter und transferieren Sie diese in einen neuen Transferbeutel. Führen Sie sofort eine zweite Separation mit einem neuen Schlauchset und genügend neuem Puffer durch.

- Falsche Probenparameterwerte wurden eingegeben

  Das eingegebene Probenauftragsvolumen war geringer als das tatsächliche Volumen im Cell Preparation Bag. Der Probenauftrag kann nicht neu gestartet werden, nachdem er abgebrochen wurde.

  Warten Sie, bis das CliniMACS Plus Instrument das Separationsprogramm beendet hat. Brechen Sie den aktuellen Lauf nicht ab, da dies zu unnötigem Zellverlust führen kann.

  Bestimmen Sie die Gesamtzellzahl, den Anteil der Zielzellen und das verbleibende Probenauftragsvolumen im Cell Preparation Bag und geben Sie diese Probenparameter beim Setup des Instruments ein (SCHRITT 2). Verarbeiten Sie die restliche Probe mit einem neuen Schlauchset, einem neuen Vorfilter und genügend neuem Puffer.

- Pumpenmotor setzt während der Elution von Zielzellen in den Cell Collection Bag aus

  Die Schlauchklemme nahe dem (am) Cell Collection Bag ist während der Elutionssequenz nicht offen. Deshalb ist der Durchfluss zum Cell Collection Bag blockiert.

  Drücken Sie **STOP** und öffnen Sie die Schlauchklemme nahe dem (am) Cell Collection Bag. Öffnen Sie den Pumpendeckel und überprüfen Sie, ob der Pumpenschlauch korrekt eingesetzt ist. Schließen Sie den Pumpendeckel und drücken Sie **RUN**, um die Elutionssequenz innerhalb von 600 Sekunden neu zu starten.

8.4.6 Unerwartete Ereignisse: ENRICHMENT 3.2

- **Probenauftrag stoppte, bevor die Probe vollständig auf die Säulen aufgetragen wurde**

  Der Vorfilter ist durch große Menge von Zelltrümmern oder unvollständiges Füllen des Filters verstopft. Durch anhaltendes Pumpen ist ein Vakuum entstanden, das zur Bildung von Luftblasen geführt hat. Diese haben den Flüssigkeitssensor aktiviert, und der Separationsprozess ist mit dem Spülen der Säule fortgesetzt worden, bevor die gesamte Probe aufgebracht wurde. Der Probenauftrag kann nicht neu gestartet werden, nachdem die Auftragssequenz abgebrochen wurde.

  Warten Sie, bis das CliniMACS Plus Instrument das Separationsprogramm beendet hat. Brechen Sie den aktuellen Lauf nicht ab, da dies zu unnötigem Zellverlust führen kann.

  Wenn das Separationsprogramm beendet ist, filtrieren Sie die restliche Probe mit einem 200-µm-In-Line-Blutfilter und transferieren Sie diese in einen neuen Transferbeutel. Führen Sie sofort eine zweite Separation mit einem neuen Schlauchset und genügend neuem Puffer durch.

- **Pumpenmotor setzt während der Elution von Zielzellen in den Cell Collection Bag aus**

  Die Schlauchklemme am Cell Collection Bag ist während der Elutionssequenz nicht offen. Deshalb ist der Durchfluss zum Cell Collection Bag blockiert.

  Drücken Sie **STOP** und öffnen Sie die Schlauchklemme nahe dem (am) Cell Collection Bag. Öffnen Sie den Pumpendeckel und überprüfen Sie, ob der Pumpenschlauch korrekt eingesetzt ist. Schließen Sie den Pumpendeckel und drücken Sie **RUN**, um die Elutionssequenz innerhalb von 600 Sekunden neu zu starten.

8.4.7 Notfallprogramm (nur für Anreicherungsprogramme)

Falls aus irgendeinem Grund ein Lauf irreversibel beendet wurde, bevor die Zielzellen von der Separationssäule eluiert wurden, kann das Notfallprogramm durchgeführt werden, um die Zellen von der Separationssäule zu eluieren. Dieses Programm wurde nur zur Verwendung mit allen Anreicherungsprogrammen zusammen mit einem CliniMACS Tubing Set (REF 161-01) oder einem CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01) entwickelt.

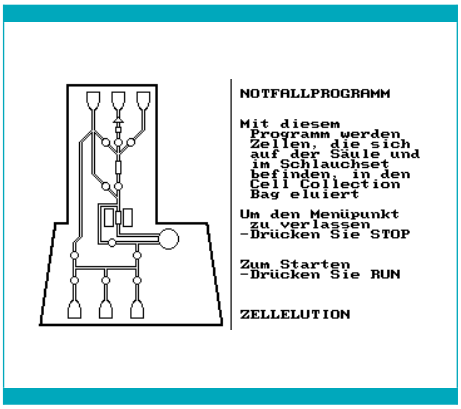
Das Notfallprogramm darf nicht mit Depletionsprogrammen verwendet werden.

Hinweis: Das Notfallprogramm eluiert ca. 75 mL Flüssigkeit. Achten Sie darauf, dass ein geeigneter Cell Collection Bag am Schlauchset angebracht ist.

1. Um sicherzustellen, dass die Separationssäule nicht magnetisiert ist, schalten Sie das Instrument aus, warten Sie 5 Sekunden, und schalten Sie dann das Instrument wieder ein. Der Magnet wird von der magnetischen Separationseinheit zurückgezogen (siehe Abschnitt „Beschreibung“ im Benutzerhandbuch des CliniMACS Plus Instruments). Sie können dies überprüfen, indem Sie einen kleinen magnetisierbaren Gegenstand an die magnetische Separationseinheit halten. Wenn der Magnet nicht zurückgezogen wird oder bei anhaltendem Stromausfall wenden Sie sich an den Miltenyi Biotec Technical Support.

2. Warten Sie, bis der Hauptbildschirm angezeigt wird (siehe Abschnitt „Installation“ im Benutzerhandbuch des CliniMACS Plus Instruments).

   Um das Notfallprogramm aufzurufen, drücken Sie **4**. Das Bildschirmfenster zeigt Bildschirm 8.6 an.



Bildschirm 8.6: Notfallprogramm

3. Um mit der Elution der zurückgehaltenen Zellen fortzufahren, drücken Sie **RUN**.

   Hinweis: Um das Notfallprogramm zu beenden, ohne die Elution der zurückgehaltenen Zellen zu starten, drücken Sie **STOP**.

4. Transferieren Sie die im Cell Collection Bag gesammelten eluierten Zellen in einen neuen 600-mL-Transferbeutel. Vereinigen Sie schließlich die restlichen Zellen im Cell Preparation Bag mit den im Notfallprogramm eluierten Zellen. Starten Sie ein neues Separationsverfahren mit einem neuen Schlauchset und genügend neuem Puffer.

8.4.8 Unerwartete Ereignisse: DEPLETION 2.1

- **Zielzellen gelangen nicht in den Cell Collection Bag**

  Die Pumpe kann das Produkt nicht aus dem Cell Preparation Bag laden, weil die Klemme am Cell Collection Bag während der Zellbeladungssequenz nicht offen ist. Drücken Sie **STOP** und öffnen Sie die Schlauchklemme am Cell Collection Bag. Setzen Sie den Depletionsprozess fort, indem Sie **RUN** drücken.

  Warten Sie, bis das CliniMACS Plus Instrument das Separationsprogramm beendet hat. Brechen Sie den aktuellen Lauf nicht ab, da dies zu unnötigem Zellverlust führen kann. Wenn ein Teil des Produkts nach Ende des Depletionsverfahrens im Cell Preparation Bag verbleibt, verarbeiten Sie die restlichen Zellen mit einem neuen Schlauchset, einem neuen Vorfilter und genügend neuem Puffer.

  Bestimmen Sie die Gesamtzellzahl, den Anteil der markierten Zellen und das Probenauftragsvolumen und geben Sie diese Probenparameter beim Setup des Instruments (SCHRITT 2) ein und starten Sie die neue Depletion.

- **Probenauftrag stoppte, bevor die Probe vollständig auf die Säulen aufgetragen wurde**

  Luftblasen aus der Probe und/oder dem Vorfilter aktivierten den Flüssigkeitssensor, bevor die gesamte Probe aufgetragen wurde. Brechen Sie den aktuellen Lauf ab und überprüfen Sie die Gesamtzellzahl und die Depletionseffizienz der Zellen im Cell Collection Bag. Falls erforderlich, verarbeiten Sie die restlichen Probe mit einem neuen Schlauchset, einem neuen Vorfilter und genügend neuem Puffer.

  Bestimmen Sie die Gesamtzellzahl, den Anteil der markierten Zellen und das Probenauftragsvolumen. Geben Sie diese Probenparameter beim Setup des Instruments (SCHRITT 2) ein und starten Sie die neue Depletion.

8.4.9 Unerwartete Ereignisse: DEPLETION 3.1

- Probenauftrag stoppte während des Staged Cell Loading, bevor die Probe vollständig auf die Säulen aufgetragen wurde

  - Vorfilter verkehrt herum eingesetzt. Deshalb ist die Tropfkammerfunktion nicht verfügbar und Luftblasen können zum Flüssigkeitssensor gelangen und zur Beendigung des Probenauftrags führen, bevor die Probe vollständig aufgetragen ist. Das Instrument setzt den Depletionsprozess fort, indem direkt der nächste Schritt begonnen wird. Der Probenauftrag kann nicht neu gestartet werden, nachdem er abgebrochen wurde.
  - Der Vorfilter ist durch große Menge von Zelltrümmern oder unvollständiges Füllen des Filters verstopft. Durch anhaltendes Pumpen ist ein Vakuum entstanden, das zur Bildung von Luftblasen geführt hat. Diese haben den Flüssigkeitssensor aktiviert, und der Separationsprozess wurde direkt mit dem letzten Schritt des Probenauftrags fortgesetzt. Ein Teil der Probe kann nach Beendigung der Separation im Cell Preparation Bag zurückbleiben.

  Brechen Sie den aktuellen Lauf ab und vereinigen Sie den Inhalt des Reapplication Bag und des Cell Preparation Bag. Verarbeiten Sie die restlichen Zellen mit einem neuen Schlauchset, einem neuen Vorfilter und genügend neuem Puffer.

- Probenauftrag stoppte während des Sensitive Sample Loadings (Sensitive Loading Stage)

  Der Reapplication Bag hängt niedriger als der Cell Preparation Bag. Während des sensitiven Probenauftrags läuft der Cell Preparation Bag leer, bevor das Volumen im Reapplication Bag vollständig aufgetragen ist. Es ist daher möglich, dass eine Luftblase den Flüssigkeitssensor aktiviert, bevor die Probe vollständig aus dem Reapplication Bag geladen wurde, nachdem der Depletionsprozess beendet ist. Der Probenauftrag kann nicht neu gestartet werden, nachdem er abgebrochen wurde.

  Warten Sie, bis das CliniMACS Plus Instrument das Separationsprogramm beendet hat. Brechen Sie den aktuellen Lauf nicht ab, da dies zu unnötigem Zellverlust führen kann. Verarbeiten Sie die restliche Probe mit einem neuen Schlauchset, einem neuen Vorfilter und genügend neuem Puffer.

  Bestimmen Sie die Gesamtzellzahl, den Anteil der markierten Zellen und das Probenauftragsvolumen. Geben Sie diese Probenparameter beim Setup des Instruments (SCHRITT 2) ein. Berücksichtigen Sie, dass für das Programm DEPLETION 3.1 drei große Beutelhalter zwingend erforderlich sind, und beachten Sie die entsprechenden Beutelhöhen in der Installationsanleitung (siehe Abschnitt 7.3.3).

- Zielzellen (nicht markierte Zellen) gelangen während des Staged Cell Loadings (Bulk Loading Stage) nicht in den Reapplication Bag

  Falscher Schlauch ist in Ventil 3 eingesetzt (rechter Zweig des Schlauchs des Reapplication Bag anstelle des linken Zweigs (Y-Verbindungsstück) des Schlauchs). Drücken Sie **STOP** und entfernen Sie den falschen Schlauch aus

Ventil 3. Setzen Sie den richtigen Schlauch (linker Zweig des Schlauchs des Reapplication Bag) manuell in Ventil 3 ein, wie in der Installationsanleitung beschrieben. Drücken Sie **RUN**, um das Depletionsverfahren innerhalb von 600 Sekunden fortzusetzen.

Warten Sie, bis das CliniMACS Plus Instrument das Separationsprogramm beendet hat. Brechen Sie den aktuellen Lauf nicht ab, da dies zu unnötigem Zellverlust führen kann. Überprüfen Sie die Depletionseffizienz der Zielfraktion im Cell Collection Bag. Wenn die Depletionseffizienz nicht ausreichend ist, wiederholen Sie das Depletionsverfahren mit einem neuen Schlauchset, einem neuen Vorfilter und genügend neuem Puffer.

Bestimmen Sie die Gesamtzellzahl, den Anteil der markierten Zellen und das Probenauftragsvolumen. Geben Sie diese Probenparameter beim Setup des Instruments (SCHRITT 2) ein und starten Sie die neue Depletion.

Zellen fließen während der gravimetischen Spülschritte in den Pufferbeutel

Pufferbeutel hängt zu niedrig (niedriger als der Cell Preparation Bag). Drücken Sie **STOP** und stellen Sie den Pufferbeutelhalter auf die richtige Höhe ein. Stellen Sie sicher, dass für das Programm DEPLETION 3.1 drei große Beutelhalter installiert sind, und beachten Sie die entsprechenden Beutelhöhen in der Installationsanleitung (siehe Abschnitt 7.3.3).

- Wenn noch keine Zellen in den Pufferbeutel gelangt sind, genügt es, die Ventile 1 und 2 manuell zu öffnen, um ein kurzes Zurückspülen von Zellen in den Cell Preparation Bag zu ermöglichen. Nachdem der Pufferbeutelschlauch wieder frei ist, schließen Sie die Ventile 1 und 2 und drücken Sie **RUN**, um das Depletionsverfahren innerhalb von 600 Sekunden fortzusetzen.
- Wenn Zellen bereits in den Pufferbeutel gelangt sind, tauschen Sie den Pufferbeutel aus, öffnen Sie manuell die Ventile 1 und 2 für eine kurze Spülung des Pufferbeutelschlauchs und drücken Sie **RUN**, um das Depletionsverfahren innerhalb von 600 Sekunden fortzusetzen. Falls erforderlich, verarbeiten Sie die restliche Probe im Pufferbeutel, (falls das Volumen über 300 mL beträgt, transferieren Sie die Probe zuerst in einen zentrifugierbaren Beutel zur Volumenreduktion) unter Verwendung eines neuen Schlauchsets, eines neuen Vorfilters und von genügend neuem Puffer.

Pumpenmotor setzt während der ersten Elution von markierten Zellen in den Non-Target Cell Bag aus

- Schlauchklemme ist nach dem Integritätstest nicht entfernt worden Drücken Sie **STOP** und entfernen Sie die Schlauchklemme. Öffnen Sie den Pumpendeckel und überprüfen Sie, ob der Pumpenschlauch korrekt eingesetzt ist. Schließen Sie den Pumpendeckel und drücken Sie **RUN**, um die Elutionssequenz innerhalb von 600 Sekunden neu zu starten.
- Falscher Schlauch ist in Ventil 3 eingesetzt (Schlauch des Non-Target Cell Bag anstelle des linken Zweigs (Y-Verbindungsstück) des Schlauchs des Reapplication Bag). Drücken Sie **STOP** und entfernen Sie den Schlauch des Non-Target Cell Bag aus Ventil 3. Setzen Sie den richtigen Schlauch (linker

Zweig des Schlauchs des Reapplication Bag) manuell in Ventil 3 ein, wie in der Installationsanleitung beschrieben. Drücken Sie **RUN**, um die Elutionssequenz innerhalb von 600 Sekunden zu starten.

8.5 Zellseparationsleistung

8.5.1 Unerwartete Ereignisse: Nur Anreicherungsprogramme

■ Die Ausbeute der Zielzellen ist gering

- Zielzellen wurden schlecht mit dem Reagenz markiert:
  - Verfalldatum des Reagenzes ist abgelaufen. Überprüfen Sie das Verfalldatum. Verwenden Sie kein Reagenz nach Ablauf des Verfalldatums.
  - Reagenz wurde nicht richtig gelagert. Überprüfen Sie die Lagerungstemperatur. Verwenden Sie kein Reagenz, das unsachgemäß gelagert wurde (siehe Gebrauchsanweisung des Reagenzes).
  - Das empfohlene Markierungsverfahren wurde nicht eingehalten. Siehe Abschnitte „Probenvorbereitung“ und „Separationsverfahren“ im Benutzerhandbuch.
- Zellen gingen während der Vorbereitungsschritte verloren.
  - Zellen wurden mit dem Überstand in den Plasma Waste Bag und Wash Waste Bags entfernt, und zwar aufgrund von unvollständiger Sedimentierung oder zu früher Suspension der Zellen, z.B. als die Zellen von der Zentrifuge genommen wurden. Vergleichen Sie den Leukozytengehalt des nicht markierten Zellprodukts und des markierten Zellprodukts. Überprüfen Sie die Zentrifugationseinstellungen auf korrekte Zentrifugation. Bestimmen Sie die Zellzahlen aus allen Abfallbeuteln.
  - Puffer enthielt kein HSA. Supplementieren Sie den Puffer mit HSA bis zu einer Endkonzentration von 0,5% (w/v) (siehe Abschnitt „Benötigte CliniMACS Materialien“ der betreffenden Anwendung).
  - Zentrifugeneinstellungen waren suboptimal. Überprüfen Sie die Zentrifugationseinstellungen.
  - Zentrifugenunwucht oder Verwendung der Bremse oder asymmetrische Beladung der Zentrifuge.
- Analyse war inkorrekt.
  - Fehler bei der Probenentnahme. Überprüfen Sie die Zellsuspension auf verklumpte oder sedimentierte Zellen. Vergewissern Sie sich, dass repräsentative Proben entnommen wurden, und wiederholen Sie die Analyse.

- Färbefehler. Überprüfen Sie die Reagenzien der Durchflusszytometrie. Wiederholen Sie die Färbung.
- Ungeeignete Einstellungen des Durchflusszytometers. Überprüfen Sie die Instrumenteneinstellungen.

Die Reinheit der Zellen ist gering.

- Das Zellprodukt wurde unsachgemäß gelagert. Die Vorbereitung und Separation des Zellprodukts sollte unmittelbar nach der Leukapherese durchgeführt werden. Halten Sie das Zellprodukt auf einer Leukozytenkonzentration von unter $0{,}2\times10^9$ pro mL. Falls erforderlich, das Zellprodukt mit autologem Plasma verdünnen. Das Zellprodukt sollte nicht älter als 24 Stunden sein, wenn das Markierungs- und Separationsverfahren begonnen wird. Wenn das Zellprodukt gelagert werden muss, z.B. über Nacht, sollte es auf kontrollierter Raumtemperatur (RT: +19 °C bis +25 °C [+66 °F bis +77 °F]). gehalten werden.
- Das Protokoll für die magnetische Markierung wurde nicht eingehalten (z.B. falsche Volumina während der magnetischen Markierung). Befolgen Sie die Anweisungen für die magnetische Markierung (siehe SCHRITT 1 im Abschnitt der betreffenden Anwendung). Bestimmen Sie zum Zweck der Fehlerbehebung die Leukozytensubpopulationen (B-Zellen, T-Zellen, Monozyten, Granulozyten) sowie Thrombozyten, die die Zielzellfraktion kontaminieren, und ziehen Sie den Miltenyi Biotec Technical Support zu Rate.
- Hohe Zahlen von Granulozyten kontaminierten das Ausgangsprodukt (suboptimale Apherese). Absterbende Granulozyten binden dann das CliniMACS Reagent unspezifisch, was zu verminderter Reinheit der Zielzellen führen kann.
- Ventilfunktionsstörung. Die eluierte Zielzellfraktion wurde mit einem Teil der Nicht-Zielzellen-Fraktion oder der Puffer-Abfallfraktion kontaminiert. Inspizieren Sie die Schlauchplatzierung in den Ventilen, um eine ordnungsgemäße Funktion sicherzustellen. Untersuchen Sie den Zielzellengehalt der Nicht-Zielzellen-Fraktion und des Pufferabfalls. Falls erforderlich, die Ziel- und Nicht-Zielzellen-Fraktion vereinigen, auf das geeignete Volumen reduzieren und die Separation mit einem neuen Schlauchset und genügend neuem Puffer wiederholen.

Unspezifische Bindung von abgestorbenen Zellen aus dem Zellprodukt oder hohe unspezifische Zellverluste im Verlauf des Verfahrens

- Puffer enthält kein HSA. Supplementieren Sie den Puffer mit HSA bis zu einer Endkonzentration von 0,5% (w/v) (siehe Abschnitt „Benötigte CliniMACS Materialien“ der betreffenden Anwendung).
- Das Zellprodukt wurde möglicherweise unsachgemäß gelagert. Die Vorbereitung und Separation des Zellprodukts sollte unmittelbar nach der Leukapherese durchgeführt werden. Halten Sie das Zellprodukt auf einer Leukozytenkonzentration von unter $0{,}2\times10^9$ pro mL. Falls erforderlich, das Leukapheresat mit autologem Plasma verdünnen. Das Zellprodukt sollte

nicht älter als 24 Stunden sein, wenn das Markierungs- und Separationsverfahren begonnen wird. Wenn das Zellprodukt gelagert werden muss, z.B. über Nacht, sollte es auf kontrollierter Raumtemperatur (RT: +19 °C bis +25 °C [+66 °F bis +77 °F]). gehalten werden.

- Unvollständiger Probenauftrag durch Verstopfung der Separationssäule, des Vorfilters oder der Vorsäule. Überprüfen Sie die Gesamtzellzahl und die Depletionseffizienz der restlichen Zellen.

8.5.2 Unerwartete Ereignisse: CD34 SELECTION 1/2, ENRICHMENT 1.1

Reinheit der Zielzellen ist gering

Die Elution aus der Separationssäule war unvollständig.

- Das Separationsprogramm wurde abgebrochen. Überprüfen Sie die Bildschirmanzeige auf Fehlermeldungen. Fahren Sie mit dem Abschnitt "Lauf wird vor Abschluss des Zellseparationsprogramms abgebrochen" fort (siehe Abschnitt 8.4.3 auf Seite 221).
- Pumpen- oder Ventilausfall. Gewinnen Sie mit dem in Abschnitt 8.4.7 beschriebenen Notfallprogramm die Zellen aus dem Schlauchset zurück. Überprüfen Sie die Volumina aller Fraktionen. Untersuchen Sie den Zielzellengehalt des Buffer Waste Bag und des Negative Fraction Bag.
- Schlauch zum Cell Collection Bag ist verstopft. Überprüfen Sie das Schlauchset auf geschlossene Klemmen, Verstopfungen oder Knicke.
- Kapazität des Reagenzes und/oder des Schlauchsets wurde überschritten. Siehe Kapazitätsgrenze der betreffenden Anwendung.
- Schlauch wurde nicht korrekt eingesetzt. Überprüfen Sie, ob der Schlauch an allen Ventilen richtig eingesetzt ist.

8.5.3 Unerwartete Ereignisse: CD34 SELECTION 1/2

Reinheit der Zielzellen ist gering

Nicht-Zielzellen wurden zurückgehalten.

- Mobilisierung der Zielzellen war schlecht. Sehr geringe Anzahl an Zielzellen aufgetreten. Daher kann eine geringe Anzahl an kontaminierenden Nicht-Zielzellen (z.B. Granulozyten, Monozyten, Thrombozyten) zu verminderter Reinheit führen.
- Bei der magnetischen Markierung waren zu wenig Plasma oder Immunglobuline vorhanden. Befolgen Sie die Anweisungen für die magnetische Markierung (siehe SCHRITT 1 der betreffenden Anwendung).

Wenn eine Endkonzentration von etwa 30% autologem Plasma in der Probe während der magnetischen Markierung nicht garantiert werden kann, setzen Sie der Probe Immunglobulin zu. Eine Endkonzentration von 1,5 mg/mL wird zur effizienten Blockade der unspezifischen Reagenzbindung während der magnetischen Markierung empfohlen.

8.5.4 Unerwartete Ereignisse: ENRICHMENT 1.1

■ Die Ausbeute der Zielzellen ist gering

Falsche Probenparameter eingegeben. Überprüfen Sie die Parametereingabe mit Analyseergebnissen.

8.5.5 Unerwartete Ereignisse: DEPLETION 2.1 und DEPLETION 3.1

■ Die Depletionseffizienz ist gering

Wenn die Depletionseffizienz ungenügend ist, verarbeiten Sie die restliche Probe mit einem neuen Schlauchset und genügend neuem Puffer. Eine neue Markierung der zu depletierenden Zellen sollte erwogen werden. Bestimmen Sie die Zellzahl und den Anteil der zu depletierenden Zellen und geben Sie diese Probenparameter beim Setup des Instruments (SCHRITT 2) ein. Falls Klumpen erkennbar sind, kann es hilfreich sein, die Zellen vor einem neuen Lauf zu filtrieren. Berücksichtigen Sie, dass Zellen durch Verklumpung und zusätzliche Filtration verloren gehen können.

- Kapazität des Reagenzes und/oder des Schlauchsets wurde überschritten. Siehe Kapazitätsgrenze der betreffenden Anwendung.
- Fehlerhafte Bestimmung der Zellen, die mit dem Reagenz markiert werden sollen.
- Falsche Probenparameter eingegeben. Überprüfen Sie die Parametereingabe mit Analyseergebnissen.
- Reduzierte Viabilität der Zellen. Abgestorbene Zellen können unspezifisch an die Separationssäule binden und dadurch die Markierungskapazität der Säule reduzieren, was möglicherweise zu einer geringeren Depletionseffizienz führt. Sorgen Sie für eine bessere Zellproduktqualität und verarbeiten Sie das Produkt so frisch wie möglich. Gelagerte Produkte, die älter als 24 Stunden sind, sollten nicht verwendet werden. Wenn eine Lagerung erforderlich ist, sollte das Zellprodukt auf kontrollierter Raumtemperatur (RT: +19 °C bis +25 °C [+66 °F bis +77 °F]). gehalten werden. Die Zellkonzentration sollte $0{,}2\times10^9$ Zellen pro mL nicht überschreiten. Falls erforderlich, das Zellprodukt mit autologem Plasma verdünnen, um eine optimale Zellkonzentration zu erhalten.

9 Rechtliche Hinweise

9.5.1 Eingeschränkte Garantie

Vorbehaltlich einer besonderen Garantieerklärung zu Ihrem Produkt und soweit nichts anderes schriftlich mit einem ordnungsgemäß bevollmächtigten Vertreter von Miltenyi Biotec vereinbart ist, unterliegt die Garantie von Miltenyi Biotec für Produkte, die direkt von Miltenyi Biotec bezogen wurden, den Verkaufsbedingungen, unter denen sie Ihnen von der jeweiligen Miltenyi Biotec Vertriebsorganisation geliefert wurden. Die geltenden Verkaufsbedingungen können sich je nach Land und Region unterscheiden. Diese Bedingungen sind auf Anfrage oder unter www.miltenyibiotec.com verfügbar. Aus dem vorliegenden Dokument sind keine zusätzlichen Gewährleistungsansprüche abzuleiten.

Für Produkte, die von Wiederverkäufern oder Einzelhändlern erworben wurden (z.B. von einem von Miltenyi Biotec autorisierten örtlichen Dienstleister), können andere Bedingungen gelten.

Die für Ihr Produkt geltenden Garantiebedingungen können Sie dem Lieferschein, der Rechnung, Empfangsbestätigung oder anderen Verkaufsunterlagen entnehmen. Für einige Komponenten einer Produktkombination, die Sie erworben haben, gilt möglicherweise ein kürzerer Gewährleistungszeitraum als auf dem Lieferschein, der Rechnung, Empfangsbestätigung oder anderen Verkaufsunterlagen angegeben (z.B. für Waren, die einer Haltbarkeitsdauer oder Obsoleszenz unterliegen).

Die Gewährleistung von Miltenyi Biotec für dieses Produkt gilt nur für Produktmängel während des normalen Gebrauchs infolge von Material- oder Verarbeitungsfehlern. Sie gilt nicht für Produktmängel, die auf eine andere Ursache zurückzuführen sind, einschließlich Mängel infolge der Verwendung des Produkts in einer anderen Weise als in diesem Handbuch ausdrücklich beschrieben, wie z.B. unangemessene oder unsachgemäße Verwendung, falsche Montage oder Installation durch einen Bediener oder Dritte, normaler Verschleiß, nachlässige oder falsche Bedienung, Handhabung, Lagerung, Instandhaltung oder Wartung, Nichtbeachtung der Gebrauchsanweisung, unautorisierte Modifikation eines Teils dieses Produkts oder Verwendung von ungeeignetem Verbrauchsmaterial, Zubehör oder Arbeitsmaterial.

Die Gewährleistung von Miltenyi Biotec erstreckt sich nicht auf Produkte, die „wie besehen“ und „mit allen eventuellen Mängeln“ verkauft werden, oder auf Verbrauchsmaterialien. Keine der Angaben in diesem Dokument ist als weitergehende Gewährleistung auszulegen.

Wird im Rahmen einer solchen Gewährleistung ein Anspruch geltend gemacht, ist Miltenyi Biotec umgehend zu benachrichtigen. Falls während des Gewährleistungszeitraums ein Material- oder Fabrikationsfehler auftritt, ergreift Miltenyi Biotec die notwendigen Schritte, um die vollständige Gebrauchstauglichkeit des Instruments wiederherzustellen.

Begrenzung der Schadenersatzleistung. Miltenyi Biotec haftet nicht für Schäden, die sich als direkte oder indirekte Folge der Verletzung einer für dieses Produkt geltenden ausdrücklichen oder stillschweigenden Gewährleistung oder Bedingung ergeben.

In einigen Ländern/Staaten oder Rechtssystemen ist die Beschränkung bzw. der Ausschluss der Haftung für zufällige Schäden oder Folgeschäden nicht erlaubt, sodass die vorgenannten Beschränkungen oder Ausschlüsse für Sie möglicherweise nicht gelten. Diese Gewährleistung gewährt Ihnen bestimmte Rechte, und möglicherweise haben Sie weitere Rechte, die je nach Land oder Rechtsordnung verschieden sein können.

9.5.2 Warenzeichen

CliniMACS, MACS, MACSmix, das Logo von Miltenyi Biotec und MiniMACS sind eingetragene Marken von Miltenyi Biotec und/oder deren verbundenen Unternehmen in verschiedenen Ländern weltweit. Alle anderen in diesem Dokument erwähnten Marken sind Eigentum ihrer jeweiligen Inhaber und dienen nur der Identifikation.

Miltenyi Biotec

Deutschland/Österreich
Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG
Friedrich-Ebert-Straße 68
51429 Bergisch Gladbach
Deutschland
+49 2204 8306-0
+49 2204 85197
macsde@miltenyi.com

USA/Kanada
Miltenyi Biotec Inc.
2303 Lindbergh Street
Auburn, CA 95602
USA
800 FOR MACS
+1 866 811 4466
+1 877 591 1060
macsus@miltenyi.com

Australien
Miltenyi Biotec
Australia Pty. Ltd.
Unit 11, 2 Eden Park Drive
Macquarie Park NSW 2113
Australien
+61 2 8877 7400
+61 2 9889 5044
macsau@miltenyi.com

Benelux
Miltenyi Biotec B.V.
Dellaertweg 9C
2316 WZ Leiden
Niederlande
macsnl@miltenyi.com
Kundenservice Niederlande
0800 4020120
0800 4020100
Kundenservice Belgien
0800 94016
0800 99626
Kundenservice Luxemburg
800 24971
800 24984

China
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

Frankreich
Miltenyi Biotec SAS
10 rue Mercoeur
75011 Paris
Frankreich
+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

Italien
Miltenyi Biotec S.r.l.
Via Paolo Nanni Costa, 30
40133 Bologna
Italien
+39 051 6 460 411
+39 051 6 460 499
macsit@miltenyi.com

Japan
Miltenyi Biotec K.K.
NEX-Eitai Building 5F
16-10 Fuyuki, Koto-ku
Tokyo 135-0041
Japan
+81 3 5646 8910
+81 3 5646 8911
macsjp@miltenyi.com

Schweiz
Miltenyi Biotec Swiss AG
Gibelinstrasse 27
4500 Solothurn
Schweiz
+41 32 623 08 47
+49 2204 85197
macsch@miltenyi.com

Singapur
Miltenyi Biotec Asia Pacific Pte Ltd.
438B Alexandra Road, Block B
Alexandra Technopark
#06-01
Singapur 119968
+65 6238 8183
+65 6238 0302
macssg@miltenyi.com

Skandinavien und Baltikum
Miltenyi Biotec Norden AB
Medicon Village
Scheeletorget 1
223 81 Lund
Schweden
macsse@miltenyi.com
Kundenservice Schweden
0200 111 800
+46 280 72 99

Kundenservice Dänemark
80 20 30 10
+46 46 280 72 99
Kundenservice Norwegen,
Finnland, Island und Baltikum
+46 46 280 72 80
+46 46 280 72 99

Spanien
Miltenyi Biotec S.L.
C/Luis Buñuel 2
Ciudad de la Imagen
28223 Pozuelo de Alarcón (Madrid)
Spanien
+34 91 512 12 90
+34 91 512 12 91
macses@miltenyi.com

Südkorea
Miltenyi Biotec Korea Co., Ltd.
Donggeuk 7F
562 Nonhyeon-ro
Gangnam-gu
Seoul 06136
Südkorea
+82 2 555 1988
+82 2 555 8890
macskr@miltenyi.com

Vereinigtes Königreich
Miltenyi Biotec Ltd.
Almac House, Church Lane
Bisley, Surrey GU24 9DR
Vereinigtes Königreich
+44 1483 799 800
+44 1483 799 811
macsuk@miltenyi.com

www.miltenyibiotec.com

Miltenyi Biotec vertreibt seine Produkte und Dienstleistungen weltweit. Den Kontakt für Ihr Land finden Sie unter **www.miltenyibiotec.com/local**.

CliniMACS, MACS, MACSmix, das Miltenyi Biotec Logo und MiniMACS sind eingetragene Warenzeichen oder Warenzeichen der Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG und/oder ihrer verbundenen Unternehmen in verschiedenen Ländern weltweit. Copyright © 2023 Miltenyi Biotec und/oder verbundene Unternehmen. Alle Rechte vorbehalten.

210-003-228/01 | Stand: 2023-02