Miltenyi Biotec

Aplikacje CliniMACS® Plus

Podręcznik użytkownika



Komponenty systemu CliniMACS, w tym odczynniki, zestawy drenów, aparaty i bufor PBS/EDTA, są zaprojektowane, wyprodukowane i testowane w ramach systemu jakości posiadającego świadectwo ISO 13485. W UE komponenty systemu CliniMACS są dostępne jako wyrób medyczny oznaczony znakiem CE dla odpowiednich zastosowań zgodnie z ich przeznaczeniem, o ile nie podano inaczej. W USA system CliniMACS CD34 Reagent, w tym CliniMACS Plus Instrument, CliniMACS CD34 Reagent, CliniMACS Tubing Set TS i CliniMACS Tubing Set LS oraz CliniMACS PBS/EDTA Buffer, jest zatwierdzony przez FDA jako aparat do stosowania u ludzi (Humanitarian Use Device, HUD), dopuszczony przez prawo federalne USA do stosowania w leczeniu pacjentów z ostrą białaczką szpikową (AML) w pierwszej całkowitej remisji. Nie wykazano skuteczności urządzenia do tego wskazania. Inne produkty z linii CliniMACS są dostępne do użytku wyłącznie na podstawie zatwierdzonego zgłoszenia badanego nowego leku (Investigational New Drug, IND), zwolnienia badanego wyrobu (Investigational Device Exemption, IDE) lub zatwierdzenia FDA. W Australii następujące komponenty systemu CliniMACS Plus są wpisane do Australijskiego Rejestru Produktów Terapeutycznych (Australian Register of Therapeutic Goods, ARTG) i w związku z tym są dopuszczone do sprzedaży: CliniMACS Plus Instrument, CliniMACS CD34 Reagent, CliniMACS Tubing Set, CliniMACS Tubing Set LS, CliniMACS Depletion Tubing Set i CliniMACS PBS/EDTA Buffer. W Australii można stosować tylko te produkty, które są wpisane do ARTG.

O ile nie wskazano inaczej, produkty i usługi Miltenyi Biotec są przeznaczone wyłącznie do użytku badawczego, a nie do użytku terapeutycznego lub diagnostycznego.

Copyright © 2023 Miltenyi Biotec i (lub) podmiotów zależnych. Wszelkie prawa zastrzeżone.

Żadna część niniejszej publikacji nie może być powielana, przechowywana w systemie wyszukiwania, przekazywana, publikowana ani dystrybuowana w jakiejkolwiek formie lub w jakikolwiek sposób, elektronicznie, mechanicznie, poprzez fotokopiowanie, mikrofilmowanie, nagrywanie lub w inny sposób, bez uprzedniej pisemnej zgody firmy Miltenyi Biotec; jednak niezależnie od powyższego właściciele systemu CliniMACS Plus mogą wykonywać kopie wyłącznie w celu szkolenia personelu w zakresie użytkowania i serwisowania urządzenia w ramach swojej działalności lub organizacji.

CliniMACS, MACS, MACSmix, logo Miltenyi Biotec oraz MiniMACS są zarejestrowanymi znakami towarowymi lub znakami towarowymi firmy Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG i (lub) jej podmiotów zależnych w różnych krajach na całym świecie. Wszystkie inne znaki towarowe wymienione w tym dokumencie są własnością ich odpowiednich właścicieli i zostały użyte wyłącznie do celów identyfikacyjnych.

Aplikacje CliniMACS® Plus

Podręcznik użytkownika

Wersja oprogramowania 2.4x

Wydany: 2023-09
210-003-248/01

MD CE 0123

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

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

www.miltenyibiotec.com

Ważne informacje

Niniejszy podręcznik użytkownika zawiera informacje dotyczące korzystania z aplikacji CliniMACS Plus. Instrukcje, ostrzeżenia, środki ostrożności i inne ważne informacje dotyczące użytkowania aparatu CliniMACS Plus Instrument są zawarte w podręczniku użytkownika CliniMACS Plus Instrument.

⚠ OSTRZEŻENIE

System CliniMACS Plus może być obsługiwany wyłącznie przez przeszkolonych operatorów. Przed uruchomieniem systemu należy dokładnie przeczytać i zrozumieć informacje dotyczące bezpieczeństwa, ostrzeżenia, środki ostrożności i instrukcje dotyczące prawidłowej obsługi aparatu CliniMACS Plus Instrument, zawarte w Podręczniku użytkownika system CliniMACS Plus (w tym między innymi informacje dotyczące bezpieczeństwa zawarte w podręczniku użytkownika urządzenia CliniMACS Plus oraz w rozdziale 3 „Ostrzeżenia i środki ostrożności" na stronie 29 niniejszego podręcznika użytkownika), jak również we wszelkich związanych z bezpieczeństwem zaleceniach wydanych przez firmę Miltenyi Biotec. Należy zwracać szczególną uwagę na wszystkie ostrzeżenia wyświetlane na aparacie lub dostarczone razem z materiałami eksploatacyjnymi, akcesoriami, dodatkowymi materiałami i sprzętem. Operator musi stosować się do wszystkich informacji dotyczących bezpieczeństwa, ostrzeżeń, środków ostrożności i instrukcji przez cały czas pracy aparatu oraz potwierdzać, że przestrzegane są wszystkie informacje dotyczące bezpieczeństwa, ostrzeżenia, środki ostrożności i instrukcje. Nieprzestrzeganie informacji dotyczących bezpieczeństwa, ostrzeżeń, środków ostrożności i instrukcji zawartych w instrukcji używania może spowodować nieprawidłowe działanie aparatu, uszkodzenie mienia, utratę komórek docelowych, obrażenia ciała i (lub) śmierć.

Spis treści

1	**Wprowadzenie**	**11**
1.1	Ogólne informacje	11
1.2	Znakowanie komórek odczynnikami CliniMACS	12
1.3	Wysokogradientowa magnetyczna separacja komórek	14
1.4	Strategie separacji	14
1.4.1	Strategia wzbogacania	15
1.4.2	Strategia deplecji	16
2	**Słownik**	**19**
2.1	Prezentacja graficzna	19
2.2	Słownik symboli	19
2.3	Słownik terminów	20
3	**Ostrzeżenia i środki ostrożności**	**29**
3.1	Związane z procesem	29
3.2	Odczynniki CliniMACS i koniugaty biotyny	30
3.3	Postępowanie z materiałami biologicznie niebezpiecznymi	31
3.4	Początkowy produkt komórkowy	32
4	**System CliniMACS Plus**	**33**
4.1	CliniMACS Plus Instrument	33
4.2	Odczynniki CliniMACS i koniugaty biotyny	33
4.3	Zestawy Przewodów CliniMACS	33
4.4	CliniMACS PBS/EDTA Buffer	33
4.5	Wymagane dodatkowe materiały	34
4.6	Akcesoria CliniMACS	34
4.7	Wymagane wyposażenie	35
5	**Przegląd zastosowań**	**37**
5.1	Four STEPS to your target cells	37
5.2	Tabela poglądowa	39

6	**Przegląd KROKÓW 1–4 dla konkretnego zastosowania**	**43**
6.1	Wzbogacanie komórek CD34-dodatnich	43
6.1.1	KROK 1: Przygotowanie komórek i znakowanie magnetyczne	43
6.1.2	KROK 2: Wybór programu separacji	45
6.1.3	KROK 3: Instalacja zestawów przewodów CliniMACS	46
6.1.4	KROK 4: Separacja CliniMACS Plus	46
6.2	Wzbogacanie komórek CD14-dodatnich	46
6.2.1	KROK 1: Przygotowanie komórek i znakowanie magnetyczne	46
6.2.2	KROK 2: Wybór programu separacji	49
6.2.3	KROK 3: Instalacja zestawów przewodów CliniMACS	49
6.2.4	KROK 4: Separacja CliniMACS Plus	50
6.3	Wzbogacanie/deplecja przy użyciu CliniMACS Anti-Biotin Reagent	51
6.3.1	KROK 1: Przygotowanie komórek i znakowanie magnetyczne	51
6.3.2	KROK 2: Wybór programu separacji	55
6.3.3	KROK 3: Instalacja zestawów przewodów CliniMACS	55
6.3.4	KROK 4: Separacja CliniMACS Plus	55
6.4	Wzbogacanie komórek CD56-dodatnich	56
6.4.1	KROK 1: Przygotowanie komórek i znakowanie magnetyczne	56
6.4.2	KROK 2: Wybór programu separacji	59
6.4.3	KROK 3: Instalacja zestawów przewodów CliniMACS	59
6.4.4	KROK 4: Separacja CliniMACS Plus	59
6.5	Deplecja komórek CD3-dodatnich	60
6.5.1	KROK 1: Przygotowanie komórek i znakowanie magnetyczne	60
6.5.2	KROK 2: Wybór programu separacji	64
6.5.3	KROK 3: Instalacja zestawów przewodów CliniMACS	64
6.5.4	KROK 4: Separacja CliniMACS Plus	64
6.6	Deplecja komórek CD19-dodatnich	65
6.6.1	KROK 1: Przygotowanie komórek i znakowanie magnetyczne	65
6.6.2	KROK 2: Wybór programu separacji	67
6.6.3	KROK 3: Instalacja zestawów przewodów CliniMACS	67
6.6.4	KROK 4: Separacja CliniMACS Plus	67

6.7	Deplecja komórek CD3-dodatnich i CD19-dodatnich	68
6.7.1	KROK 1: Przygotowanie komórek i znakowanie magnetyczne	68
6.7.2	KROK 2: Wybór programu separacji	71
6.7.3	KROK 3: Instalacja zestawów przewodów CliniMACS	71
6.7.4	KROK 4: Separacja CliniMACS Plus	71
6.8	Wzbogacanie/deplecja komórek CD8-dodatnich	72
6.8.1	KROK 1: Przygotowanie komórek i znakowanie magnetyczne	72
6.8.2	KROK 2: Wybór programu separacji	76
6.8.3	KROK 3: Instalacja zestawów przewodów CliniMACS	76
6.8.4	KROK 4: Separacja CliniMACS Plus	76
6.9	Wzbogacanie/deplecja komórek CD25-dodatnich	77
6.9.1	KROK 1: Przygotowanie komórek i znakowanie magnetyczne	77
6.9.2	KROK 2: Wybór programu separacji	82
6.9.3	KROK 3: Instalacja zestawów przewodów CliniMACS	82
6.9.4	KROK 4: Separacja CliniMACS Plus	82
6.10	Wzbogacanie/deplecja komórek CD4-dodatnich	83
6.10.1	KROK 1: Przygotowanie komórek i znakowanie magnetyczne	83
6.10.2	KROK 2: Wybór programu separacji	87
6.10.3	KROK 3: Instalacja zestawów przewodów CliniMACS	87
6.10.4	KROK 4: Separacja CliniMACS Plus	87
6.11	Deplecja komórek CD4-dodatnich i CD8-dodatnich	88
6.11.1	KROK 1: Przygotowanie komórek i znakowanie magnetyczne	88
6.11.2	KROK 2: Wybór programu separacji	91
6.11.3	KROK 3: Instalacja zestawów przewodów CliniMACS	92
6.11.4	KROK 4: Separacja CliniMACS Plus	92
6.12	Wzbogacanie komórek CD1c (BDCA-1)-dodatnich – część 1: Deplecja komórek CD19-dodatnich i znakowanie komórek CD1c (BDCA-1)-dodatnich	93
6.12.1	KROK 1: Przygotowanie komórek i znakowanie magnetyczne	93
6.12.2	KROK 2: Wybór programu separacji	95
6.12.3	KROK 3: Instalacja zestawów przewodów CliniMACS	95
6.12.4	KROK 4: Separacja CliniMACS Plus	96

6.13 Wzbogacanie komórek CD1c (BDCA-1)-dodatnich – część 2: Flexible Labeling System 97
6.13.1 KROK 1: Przygotowanie komórek i znakowanie magnetyczne 97
6.13.2 KROK 2: Wybór programu separacji 99
6.13.3 KROK 3: Instalacja zestawów przewodów CliniMACS 99
6.13.4 KROK 4: Separacja CliniMACS Plus 99
6.14 Wzbogacanie komórek CD304 (BDCA-4)-dodatnich 100
6.14.1 KROK 1: Przygotowanie komórek i znakowanie magnetyczne 100
6.14.2 KROK 2: Wybór programu separacji 102
6.14.3 KROK 3: Instalacja zestawów przewodów CliniMACS 102
6.14.4 KROK 4: Separacja CliniMACS Plus 103
6.15 Deplecja komórek TCRα/β-dodatnich 104
6.15.1 KROK 1: Przygotowanie komórek i znakowanie magnetyczne 104
6.15.2 KROK 2: Wybór programu separacji 107
6.15.3 KROK 3: Instalacja zestawów przewodów CliniMACS 107
6.15.4 KROK 4: Separacja CliniMACS Plus 107
6.16 Deplecja komórek CD45RA-dodatnich 108
6.16.1 KROK 1: Przygotowanie komórek i znakowanie magnetyczne 108
6.16.2 KROK 2: Wybór programu separacji 111
6.16.3 KROK 3: Instalacja zestawów przewodów CliniMACS 111
6.16.4 KROK 4: Separacja CliniMACS Plus 111
6.17 Wzbogacanie ludzkich komórek wydzielających IFN-gamma przy użyciu CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma) 112
6.17.1 KROK 1: Przygotowanie komórek i znakowanie magnetyczne 112
6.17.2 KROK 2: Wybór programu separacji 125
6.17.3 KROK 3: Instalacja zestawów przewodów CliniMACS 125
6.17.4 KROK 4: Separacja CliniMACS Plus 125

7 Szczegółowe objaśnienie KROKU 1–4 127

7.1 KROK 1: Przygotowanie komórek i znakowanie magnetyczne 127
7.1.1 Pierwsze wymagane działania 127
7.1.2 Znakowanie magnetyczne komórek 128

7.2 KROK 2: Wybór programu separacji 140
7.2.1 Włączenie aparatu CliniMACS Plus Instrument 140
7.2.2 CD34 SELECTION 1/2 140
7.2.3 ENRICHMENT 1.1 142
7.2.4 ENRICHMENT 3.2 147
7.2.5 DEPLETION 2.1 149
7.2.6 DEPLETION 3.1 154
7.3 KROK 3: Instalacja zestawów przewodów CliniMACS 160
7.3.1 CliniMACS Tubing Set i CliniMACS Tubing Set LS 160
7.3.2 Alternatywa instalacja zestawów przewodów CliniMACS 175
7.3.3 CliniMACS Depletion Tubing Set 180
7.4 KROK 4: Separacja CliniMACS Plus 194
7.4.1 CD34 SELECTION 1/2 194
7.4.2 ENRICHMENT 1.1 198
7.4.3 ENRICHMENT 3.2 202
7.4.4 DEPLETION 2.1 206
7.4.5 DEPLETION 3.1 210

8 Rozwiązywanie problemów 215

8.1 Miltenyi Biotec Technical Support 215
8.2 Przygotowanie produktu leukaferezy 215
8.3 CliniMACS Plus Instrument i zestawy przewodów CliniMACS 216
8.3.1 Komunikaty o błędach 216
8.3.2 Ładowanie i płukanie zestawu drenów 216
8.4 Automatyczna separacja komórek 218
8.4.1 Komunikaty ostrzegawcze 218
8.4.2 Niespodziewane zdarzenia: wszystkie programy separacji 218
8.4.3 Niespodziewane zdarzenia: tylko programy wzbogacania 220
8.4.4 Niespodziewane zdarzenia: CD34 SELECTION 1/2 221
8.4.5 Niespodziewane zdarzenia: ENRICHMENT 1.1 222
8.4.6 Niespodziewane zdarzenia: ENRICHMENT 3.2 223
8.4.7 Program awaryjny (do stosowania tylko z programami wzbogacania) 224
8.4.8 Niespodziewane zdarzenia: DEPLETION 2.1 225
8.4.9 Niespodziewane zdarzenia: DEPLETION 3.1 225

8.5 Wydajność separacji komórek 228
8.5.1 Niespodziewane zdarzenia: tylko programy wzbogacania 228
8.5.2 Niespodziewane zdarzenia: CD34 SELECTION 1/2 i ENRICHMENT 1.1 230
8.5.3 Niespodziewane zdarzenia: CD34 SELECTION 1/2 231
8.5.4 Niespodziewane zdarzenia: ENRICHMENT 1.1 231
8.5.5 Niespodziewane zdarzenia: DEPLETION 2.1 i DEPLETION 3.1 231

9 Informacje prawne 233
9.5.1 Ograniczona gwarancja 233
9.5.2 Znaki towarowe 234

1 Wprowadzenie

1.1 Ogólne informacje

System CliniMACS Plus oferuje zestaw narzędzi, które umożliwiają wysokiej jakości znormalizowane procedury separacji komórek dla zastosowań terapeutycznych.

System CliniMACS Plus opiera się na technologii magnetycznej separacji komórek (technologia MACS®) opracowanej przez firmę Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG. Firma Miltenyi Biotec udostępniła te produkty do zastosowań klinicznych spełniających wymagania europejskich norm rejestracyjnych.

Odczynniki CliniMACS i koniugaty biotyny są przeznaczone wyłącznie do stosowania *in vitro* i nie są przeznaczone do stosowania terapeutycznego ani bezpośredniej infuzji u pacjentów.

Odczynniki CliniMACS w połączeniu z systemem CliniMACS Plus przeznaczone są do separacji komórek ludzkich.

Firma Miltenyi Biotec jako producent systemu CliniMACS Plus nie wydaje żadnych zaleceń dotyczących stosowania odseparowanych komórek do celów terapeutycznych i nie twierdzi, żeprzyniesie to korzyść kliniczną.

W przypadku produkcji i stosowania komórek docelowych u ludzi należy przestrzegać krajowych przepisów ustawowych i wykonawczych – np. w przypadku UE dyrektywy 2004/23/WE (tkanki i komórki ludzkie) lub dyrektywy 2002/98/WE (krew ludzka i składniki krwi). Zatem wszelkie zastosowania kliniczne komórek docelowych należą wyłącznie do zakresu odpowiedzialności użytkownika systemu CliniMACS Plus.

OGRANICZONA GWARANCJA
Jeśli system CliniMACS Plus będzie używany w sposób, który nie został wyraźnie opisany w niniejszym podręczniku, wszystkie gwarancje zostaną unieważnione.

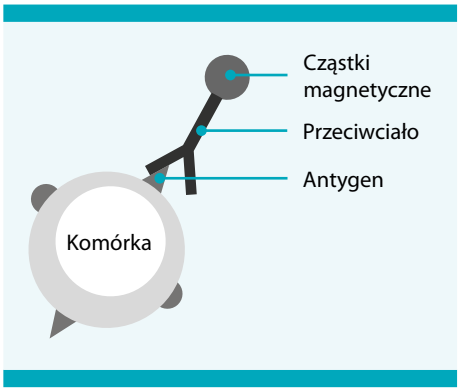
WAŻNE
Przed rozpoczęciem korzystania z systemu CliniMACS Plus lub jakichkolwiek komponentów spoza Europejskiego Obszaru Gospodarczego należy potwierdzić zarejestrowanie systemu CliniMACS Plus lub jakiegokolwiek komponentu CliniMACS w kraju.

1.2 Znakowanie komórek odczynnikami CliniMACS

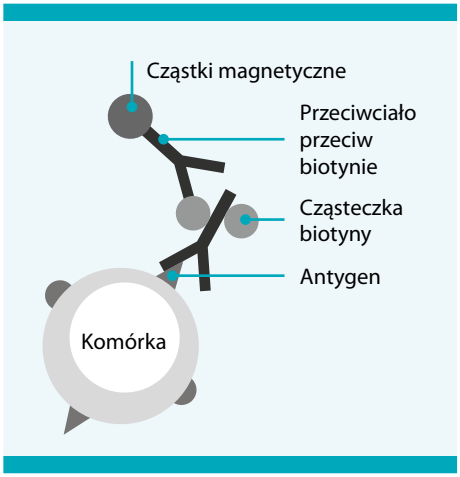
Magnetyczne sortowanie komórek MACS jest sprawdzonym, wydajnym narzędziem do separacji wielu typów komórek, zarówno w laboratoriach badawczych, jak i w zastosowaniach klinicznych. Mieszaniny komórek są separowane w polu magnetycznym przy użyciu znakowania immunomagnetycznego swoistego dla danego typu komórek, np. ludzkich CD34-dodatnich hematopoetycznych komórek progenitorowych z heterogennych populacji komórek hematologicznych.

Za pomocą systemu CliniMACS Plus komórki mogą być znakowane magnetycznie na trzy różne sposoby:

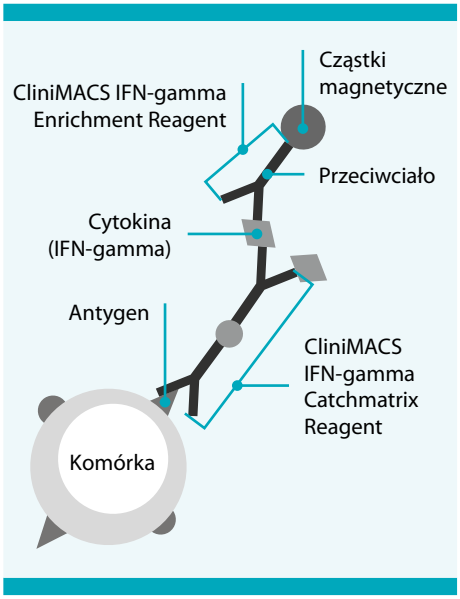
- Bezpośrednio w jednokierunkowej procedurze znakowania przez swoiste dla antygenu przeciwciała sprzężone z superparamagnetycznymi kulkami dekstranu żelaza (patrz Rysunek 1.1).
- Pośrednio w dwuetapowej procedurze znakowania o nazwie Flexible Labeling System. W pierwszym kroku komórki są znakowane przeciwciałami swoistymi dla antygenu, sprzężonymi z biotyną. W drugim kroku przeciwciała te są znakowane przeciwciałami swoistymi dla biotyny, sprzężonymi z superparamagnetycznymi kulkami dekstranu żelaza (patrz Rysunek 1.2).
- Pośrednio w dwuetapowej procedurze znakowania o nazwie CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma). Najpierw komórki są restymulowane *in vitro* do wydzielania cytokiny (np. IFN-gamma). W pierwszym kroku znakowania restymulowane komórki są znakowane hybrydową cząsteczką składającą się z przeciwciała swoistego dla leukocytów i przeciwciała swoistego dla cytokin, o nazwie CliniMACS IFN-gamma Catchmatrix Reagent. Następnie komórki są inkubowane, aby umożliwić wydzielanie cytokiny, która jest „wychwytywana" przez matrycę wychwytującą na powierzchni komórki. Następnie, w drugim kroku znakowania, komórki wydzielające cytokiny są



Rysunek 1.1: Znakowanie magnetyczne komórek



Rysunek 1.2: Flexible Labeling System



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

znakowane przeciwciałami swoistymi dla cytokin, sprzężonymi z superparamagnetycznymi kulkami dekstranu żelaza (CliniMACS IFN-gamma Enrichment Reagent), (patrz Rysunek 1.3).

1.3 Wysokogradientowa magnetyczna separacja komórek

Magnetycznie znakowana zawiesina komórek jest ładowana na aparat CliniMACS Plus Instrument przygotowany z zestawem drenów. Ta jednostka wysokogradientowej separacji magnetycznej komórek składa się ze specjalnie opracowanego, silnego magnesu stałego i kolumny separacyjnej z matrycą ferromagnetyczną.

Pole o wysokim gradiencie umożliwia wytworzenie silnych sił magnetycznych i szybkie rozmagnesowanie. Gdy małe struktury ferromagnetyczne, takie jak matryca kolumny, są umieszczone w obrębie pola magnetycznego, zaburzają jednorodność pola. Powoduje to generowanie wysokich gradientów magnetycznych. W swoim bezpośrednim otoczeniu struktury ferromagnetyczne generują siły magnetyczne 10 000-krotnie silniejsze niż w konwencjonalnych geometriach. Pole o wysokim gradiencie przyciąga oznakowane komórki do matrycy i skutecznie je zatrzymuje. Po wyjęciu kolumny z magnesu szybkie rozmagnesowanie matrycy kolumny pozwala na uwolnienie zatrzymanych komórek.

1.4 Strategie separacji

System CliniMACS Plus udostępnia użytkownikowi wiele programów separacji. Programy separacji można ogólnie podzielić na strategie wzbogacania (CD34 SELECTION 1 i 2, ENRICHMENT 1.1 i ENRICHMENT 3.2) i strategie deplecji (DEPLETION 2.1 i DEPLETION 3.1).

Wzbogacanie komórek znakowanych magnetycznie

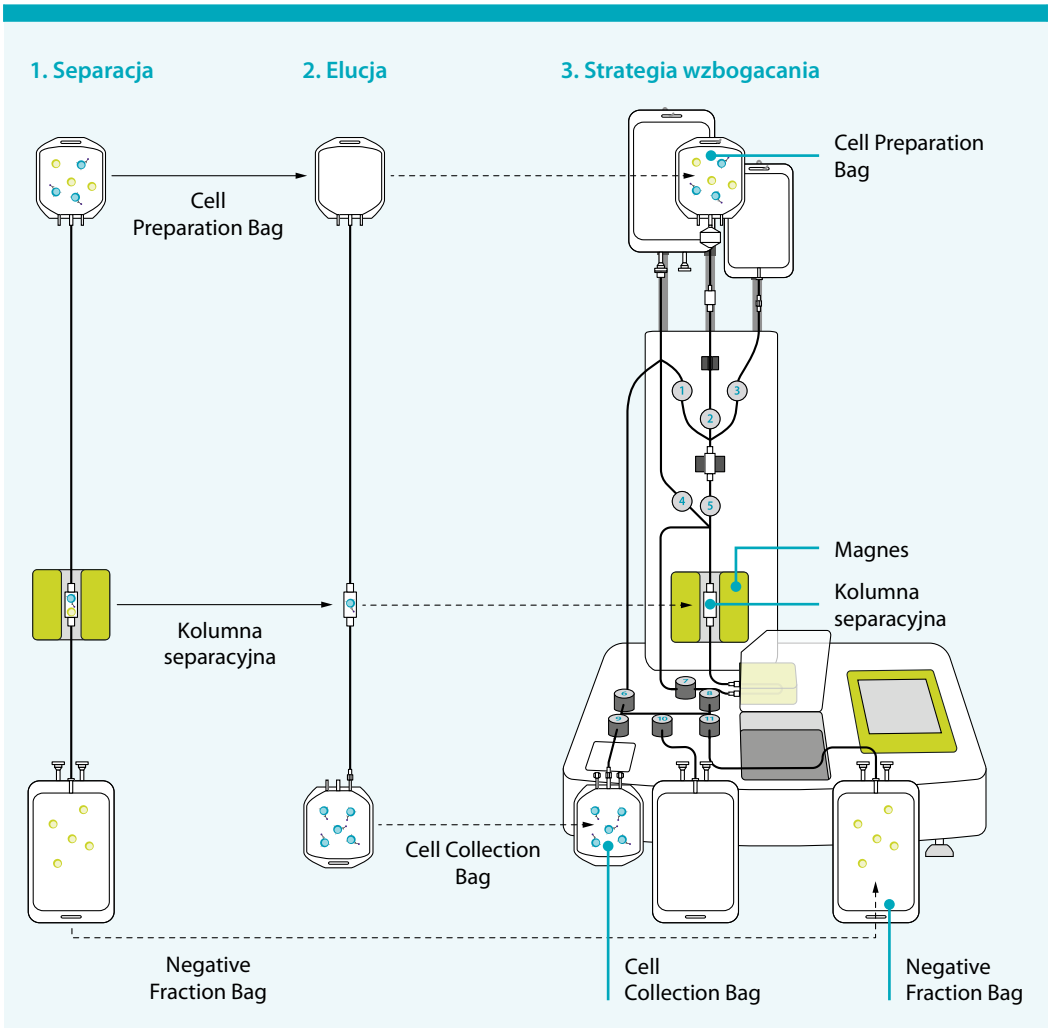
Przy wyborze strategii wzbogacania komórki znakowane magnetycznie (pierwotnie znakowane za pomocą CliniMACS Reagent) są zatrzymywane w kolumnie separacyjnej, a komórki nieznakowane przechodzą przez nią. Znakowane komórki (komórki docelowe) są zbierane w Cell Collection Bag, a komórki nieznakowane (komórki inne niż docelowe) w Negative Fraction Bag (patrz Rysunek 1.4).

Deplecja komórek znakowanych magnetycznie

Technologia MACS jest również bardzo skuteczna w deplecji określonych populacji komórek. Niepożądane komórki są swoiście znakowane super-paramagnetycznymi cząstkami i oddzielane od komórek docelowych po przejściu przez wysokogradientową kolumnę magnetyczną. W przeciwieństwie do strategii wzbogacania, komórki nieznakowane (komórki docelowe) są zbierane w Cell Collection Bag, a komórki znakowane (komórki inne niż docelowe) są zbierane odpowiednio w Negative Fraction Bag (patrz Rysunek 1.5) lub w Non-Target Cell Bag (patrz Rysunek 1.6 oraz Rysunek 1.7).

1.4.1 Strategia wzbogacania

Wzbogacanie komórek przy użyciu CliniMACS Tubing Set lub CliniMACS Tubing Set LS

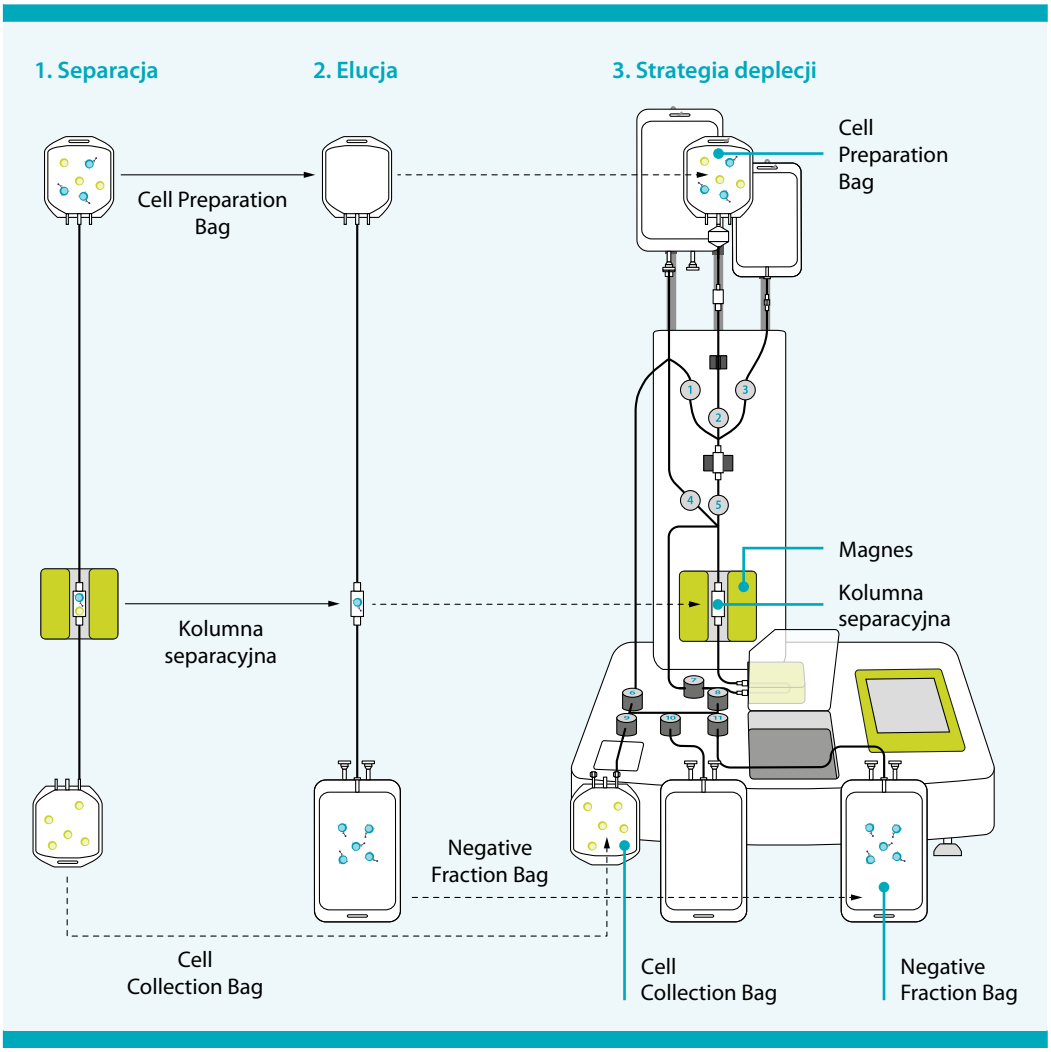


Rysunek 1.4: Strategia programów wzbogacania przy użyciu CliniMACS Tubing Set lub CliniMACS Tubing Set LS

1. Magnes jest w pozycji „ON". Komórki znakowane magnetycznie są zatrzymywane w kolumnie separacyjnej, podczas gdy inne komórki nieznakowane (komórki inne niż docelowe) przepływają przez kolumnę i są zbierane w Negative Fraction Bag.
2. Magnes jest w pozycji „OFF". Komórki znakowane magnetycznie (komórki docelowe) są uwalniane z kolumny separacyjnej i zbierane w Cell Collection Bag.
3. Program wzbogacania zatrzymuje komórki znakowane magnetycznie w kolumnie separacyjnej, komórki nieznakowane (komórki inne niż docelowe) przepływają przez kolumnę i są zbierane w Negative Fraction Bag. Gdy magnes zostanie przesunięty do pozycji „OFF", komórki znakowane magnetycznie (komórki docelowe) są uwalniane z kolumny i zbierane w Cell Collection Bag. **Wskazówka:** Frakcja komórek docelowych jest zawsze zbierana w Cell Collection Bag.

1.4.2 Strategia deplecji

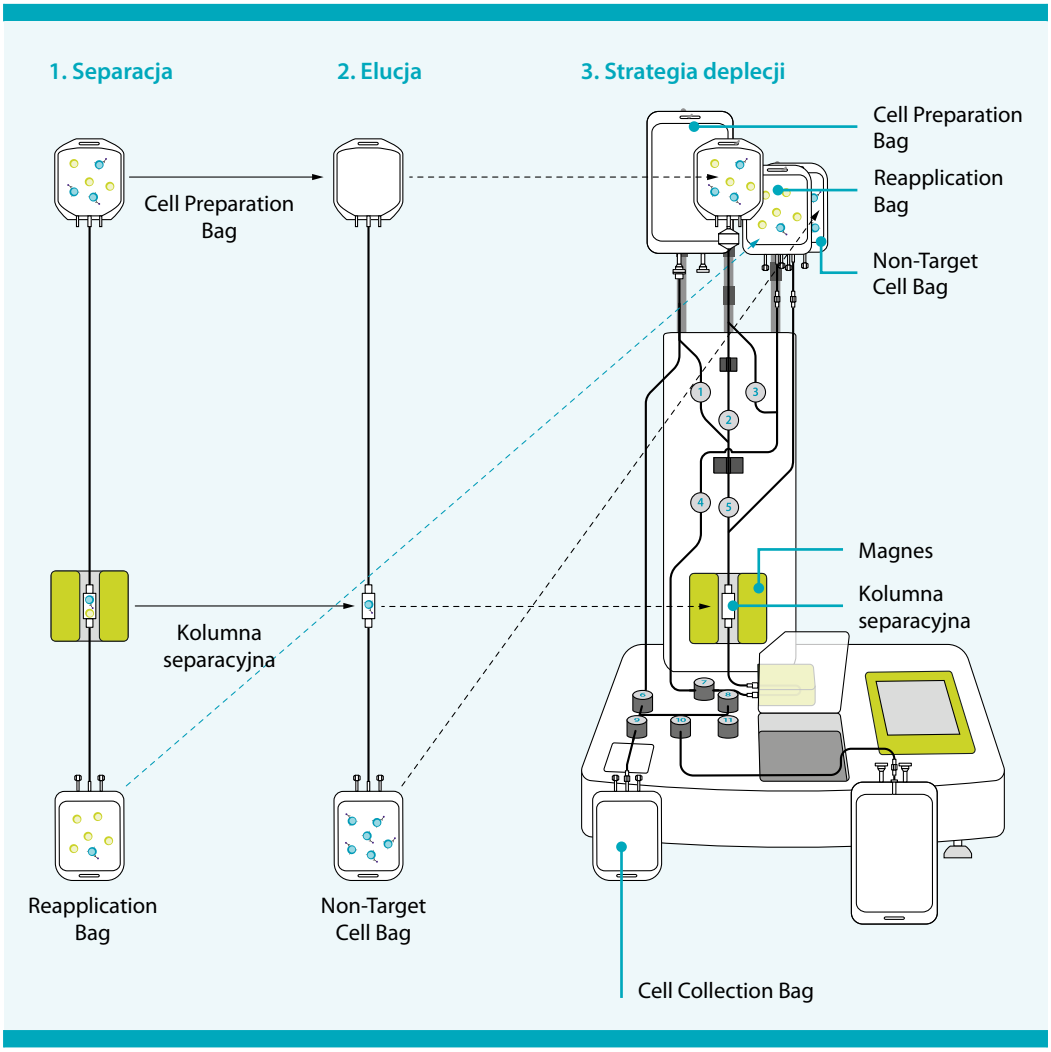
Deplecja komórek przy użyciu CliniMACS Tubing Set LS: DEPLETION 2.1



Rysunek 1.5: Strategia programu deplecji DEPLETION 2.1 przy użyciu CliniMACS Tubing Set LS

1. Magnes jest w pozycji „ON". Komórki znakowane magnetycznie są zatrzymywane w kolumnie separacyjnej, podczas gdy inne komórki nieznakowane (komórki docelowe) przepływają przez kolumnę i są zbierane w Cell Collection Bag.
2. Magnes jest w pozycji „OFF". Komórki znakowane magnetycznie (komórki inne niż docelowe) są uwalniane z kolumny separacyjnej i zbierane w Negative Fraction Bag.
3. Program deplecji (DEPLETION 2.1) zatrzymuje komórki znakowane magnetycznie w kolumnie separacyjnej, komórki nieznakowane (komórki docelowe) przepływają przez nią i są zbierane w Cell Collection Bag. Gdy magnes zostanie przesunięty do pozycji „OFF", komórki znakowane magnetycznie (komórki inne niż docelowe) są uwalniane z kolumny i zbierane w Negative Fraction Bag. **Wskazówka:** Frakcja komórek docelowych jest zawsze zbierana w Cell Collection Bag.

Deplecja komórek przy użyciu CliniMACS Depletion Tubing Set:
DEPLETION 3.1 (część 1: Staged Cell Loading [Bulk Loading Stage])



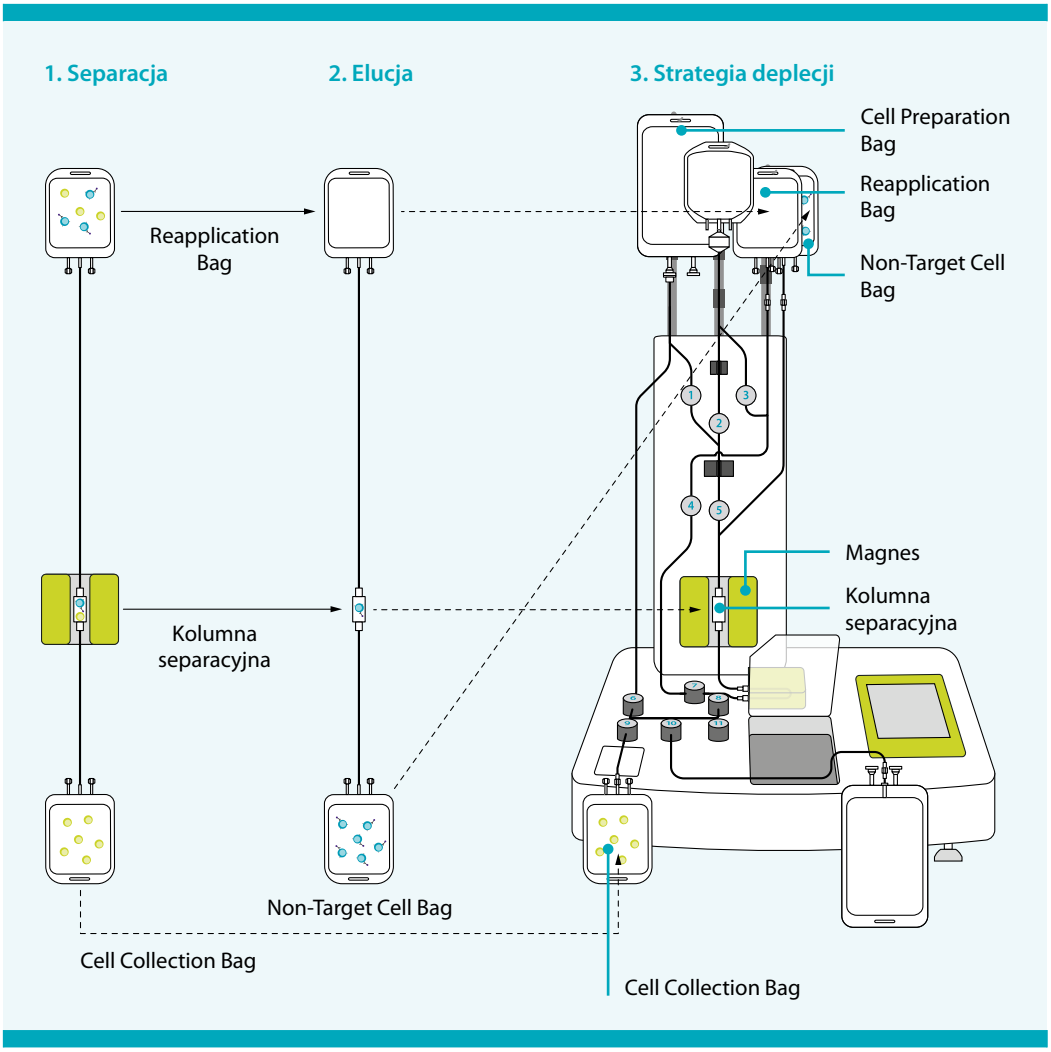
Rysunek 1.6: Strategia programu deplecji DEPLETION 3.1 przy użyciu CliniMACS Depletion Tubing Set (część 1)

1. Staged Cell Loading (Bulk Loading Stage): Magnes jest w pozycji „ON". Komórki znakowane magnetycznie są zatrzymywane w kolumnie separacyjnej, podczas gdy inne, nieznakowane komórki (komórki docelowe) przepływają przez nią i są zbierane w Reapplication Bag.

2. Magnes jest w pozycji „OFF". Komórki znakowane magnetycznie (komórki inne niż docelowe) są uwalniane z kolumny separacyjnej i zbierane w Non-Target Cell Bag.

3. Program deplecji (DEPLETION 3.1) zatrzymuje komórki znakowane magnetycznie w kolumnie separacyjnej, komórki nieznakowane (komórki docelowe) przepływają przez kolumnę i są zbierane w Reapplication Bag w celu ponownego załadowania na kolumnie separacyjnej w drugiej czułej deplecji (patrz Rysunek 1.7). Gdy magnes zostanie przesunięty do pozycji „OFF", komórki znakowane magnetycznie (komórki inne niż docelowe) są uwalniane z kolumny i zbierane w Non-Target Cell Bag.

Deplecja komórek przy użyciu CliniMACS Depletion Tubing Set:
DEPLETION 3.1 (część 2: Sensitive Sample Loading [Sensitive Loading Stage])



Rysunek 1.7: Strategia programu deplecji DEPLETION 3.1 przy użyciu CliniMACS Depletion Tubing Set (część 2)

4. Sensitive Sample Loading (Sensitive Loading Stage): Magnes jest w pozycji „ON". Komórki z Reapplication Bag są ponownie ładowane na kolumnę separacyjną. Nieliczne pozostałe komórki znakowane magnetycznie są zatrzymywane w kolumnie separacyjnej, podczas gdy komórki nieznakowane (komórki docelowe) przepływają przez kolumnę i są zbierane w Cell Collection Bag.
5. Magnes jest w pozycji „OFF". Komórki znakowane magnetycznie (komórki inne niż docelowe) są uwalniane z kolumny separacyjnej i zbierane w Non-Target Cell Bag.
6. Na koniec separacji komórki znakowane (komórki inne niż docelowe) znajdują się w Non-Target Cell Bag, a komórki nieznakowane (komórki docelowe) w Cell Collection Bag. **Wskazówka:** Frakcja komórek docelowych jest zawsze zbierana w Cell Collection Bag.

2 Słownik

2.1 Prezentacja graficzna

Poniższa tabela przedstawia oznaczenia użyte w niniejszym podręczniku użytkownika w celu poinformowania użytkownika o potencjalnych zagrożeniach w przypadku nieprzestrzegania przedstawionych ostrzeżeń i środków ostrożności. Poziom zagrożenia klasyfikuje zagrożenie zgodnie z poniższym opisem. Poziom, rodzaj i źródło zagrożenia, jak również potencjalne konsekwencje, zakazy i środki są oznaczone w następujący sposób. Ikony po lewej stronie określają ryzyko.

⚠ OSTRZEŻENIE

Wskazuje sytuację niebezpieczną, która może prowadzić do śmierci lub poważnych obrażeń, jeśli nie uda się jej uniknąć

⚠ PRZESTROGA

Wskazuje sytuację niebezpieczną, która może prowadzić do niewielkich lub umiarkowanych obrażeń, jeśli nie uda się jej uniknąć

NOTYFIKACJA

Wskazuje informacje uznane za ważne, ale niezwiązane z zagrożeniem (np. komunikaty związane ze szkodą materialną)

WAŻNE

Informuje użytkownika o ważnych praktykach lub informacjach, które nie są związane z obrażeniami ciała ani szkodami materialnymi

2.2 Słownik symboli

Przegląd symboli stosowanych w odniesieniu do systemu CliniMACS Plus można znaleźć w Podręczniku użytkownika CliniMACS Plus Instrument. Słownik symboli przedstawia symbole używane w podręcznikach użytkownika i na etykietach produktów CliniMACS.

2.3 Słownik terminów

Afereza	Metoda pobierania krwi, w której pobiera się krew pełną, wybiera i zatrzymuje pożądany składnik, a pozostałą część krwi zwraca się dawcy
Albumina ludzkiej surowicy	HSA klasy farmaceutycznej, dopuszczony do obrotu w kraju użytkownika, jest niezbędny jako dodatek do buforu w przypadku stosowania z systemem CliniMACS Plus.
Antygen CD14	Antygen CD14 jest glikoproteiną błony komórkowej o masie 53-55 kD, ulegającą ekspresji na monocytach. Antygen CD14 znany jest jako receptor dla kompleksu LPS i białka wiążącego LPS (LBP).
Antygen CD19	Antygen CD19 jest krytyczną cząsteczką transdukcji sygnału, która reguluje rozwój, aktywację i różnicowanie limfocytów B. Jako marker linii komórek B CD19 ulega ekspresji od wczesnego stadium komórek pro-B do stadium limfoblastów komórek B, ale ekspresja ta ulega redukcji w momencie dojrzewania komórek B do komórek plazmatycznych. Antygen CD19 ulega dalszej ekspresji na większości rakowych komórek B i subpopulacji folikularnych komórek dendrytycznych.
Antygen CD1c (BDCA-1)	CD1c jest częścią klastra genów CD1, które uważa się za związane z MHC. Geny CD1 są skupione w regionie 170 000 bp ludzkiego chromosomu 1q23.1. Kodowane w nich białka (CD1a-e) ulegają ekspresji jako heterodimery złożone z łańcucha ciężkiego CD1 sparowanego niekowalencyjnie z ß2-mikroglobuliną. CD1c bierze udział w prezentacji antygenów mikrobowych glikolipidów lub antygenów lipopeptydowych limfocytom T. W ludzkiej krwi obwodowej CD1c (BDCA-1) ulega ekspresji na mieloidalnych komórkach dendrytycznych typu-1 (MDC1) oraz na subpopulacji limfocytów B. Można je znaleźć w węzłach chłonnych, strefach płaszcza i ośrodkach rozmnażania, w strefie brzeżnej śledziony oraz we krwi obwodowej płodów i dorosłych.
Antygen CD25	Antygen CD25, łańcuch alfa receptora interleukiny-2 o niskim powinowactwie (IL-2Rα), ulega ekspresji na aktywowanych limfocytach T i B, komórkach NK i monocytach, a także na regulatorowych limfocytach T CD4-dodatnich. Antygen CD25 wykazuje trzy regiony epitopowe A, B i C. Przeciwciało CliniMACS CD25 Reagent rozpoznaje epitop A cząsteczki CD25.

Antygen CD3	Antygen CD3 jest obecny na dojrzałych ludzkich limfocytach T, tymocytach i subpopulacjach komórek NK. Wiąże się z receptorem limfocytów T (TCR) i jest odpowiedzialny za transdukcję sygnału z TCR. Antygen CD3 jest kompleksem pięciu niezmiennych łańcuchów: γ, δ, ε, ζ i η. Przeciwciało CD3 rozpoznaje wszystkie limfocyty T, tzn. reaguje z 70-80% limfocytów ludzkiej krwi obwodowej i z 65-85% tymocytów. Epitop rozpoznawany przez przeciwciało znajduje się na łańcuchu ε kompleksu CD3.
Antygen CD304 (BDCA-4)	Antygen CD304 (BDCA-4) jest glikoproteiną powierzchniową komórek o masie 130-140 kDa, ulegającą ekspresji w świeżej krwi i szpiku kostnym wyłącznie na plazmacytoidalnych komórkach dendrytycznych.
Antygen CD34	Antygen CD34 jest wysoce glikozylowanym integralnym białkiem błonowym 115 kDa typu 1 o nieznanej funkcji, które ulega ekspresji na 1% do 4% prawidłowych komórek szpiku kostnego i mniej niż 0,2% prawidłowych leukocytów krwi obwodowej, na subpopulacjach komórek zrębowych szpiku kostnego i na śródbłonku małych naczyń w różnych tkankach.
Antygen CD4	Antygen CD4 ulega ekspresji na większości tymocytów i około dwóch trzecich limfocytów T krwi obwodowej; ulega również ekspresji na monocytach i makrofagach. CD4 jest cząsteczką pomocniczą w rozpoznawaniu obcych antygenów w powiązaniu z MHC klasy II. Dodatkowo CD4 jest receptorem dla HIV-1.
Antygen CD45RA	Antygen CD45RA ulega ekspresji na naiwnych limfocytach T CD4 i CD8-dodatnich, jak również na subpopulacjach limfocytów B, komórek NK i monocytów. Jest to izoforma wspólnego antygenu leukocytów CD45, białkowej fosfatazy tyrozynowej o charakterze transmembranowym.
Antygen CD56	Antygen CD56 jest członkiem rodziny NCAM (Neural Cell Adhesion Molecule), która ulega ekspresji w obrębie układu krwiotwórczego na komórkach NK, NKT.
Antygen CD8	Antygen CD8 jest dimerem połączonym disulfidowo, który występuje jako homodimer CD8 α lub jako heterodimer CD8 α/β. CD8 ulega silnej ekspresji na CD8-dodatnich limfocytach T i tymocytach oraz na subpopulacji komórek NK i CD8-dodatnich limfocytów T γ/δ. CD8 działa jako współreceptor z receptorami limfocytów T ograniczonymi przez MHC klasy I w rozpoznawaniu antygenów.

Antygen TCRα/β	TCRα/β jest heterodimerem receptora limfocytów T, złożonym z dwóch transmembranowych łańcuchów glikoproteinowych, α i β. Oba łańcuchy są członkami nadrodziny immunoglobulin i składają się ze stałego i polimorficznego regionu zmiennego. Region zmienny TCRα/β bierze udział w rozpoznawaniu peptydów antygenowych prezentowanych przez kompleks MHC komórek prezentujących antygen. Antygen TCRα/β ulega ekspresji na większości limfocytów T krwi obwodowej.
BDCA	Antygen komórek dendrytycznych krwi
Buffer Waste Bag	Worek na odpady do zbierania buforu podczas separacji aparatu CliniMACS Plus Instrument
Bufor selekcyjny	Patrz CliniMACS PBS/EDTA Buffer.
Cell Collection Bag	Worek, w którym gromadzone są oczyszczone komórki docelowe po separacji
Cell Preparation Bag	Worek, do którego przenoszony jest produkt komórkowy i w którym wykonywane jest znakowanie magnetyczne i przemywanie komórek
CliniMACS Anti-Biotin Reagent	Odczynnik do znakowania magnetycznego komórek pierwotnie znakowanych biotynylowanymi przeciwciałami lub ligandami.
CliniMACS CD14 Reagent	Odczynnik do znakowania magnetycznego komórek z ekspresją antygenu CD14
CliniMACS CD19 Reagent	Odczynnik do znakowania magnetycznego komórek z ekspresją antygenu CD19
CliniMACS CD1c Biotin (BDCA-1)	Biotynylowane przeciwciało do znakowania ludzkich komórek z ekspresją antygenu CD1c (BDCA-1) przed znakowaniem magnetycznym przy użyciu CliniMACS Anti-Biotin Reagent.
CliniMACS CD25 Reagent	Odczynnik do znakowania magnetycznego komórek z ekspresją antygenu CD25
CliniMACS CD3 Reagent	Odczynnik do znakowania magnetycznego komórek z ekspresją antygenu CD3
CliniMACS CD304 (BDCA-4) Reagent	Odczynnik do znakowania magnetycznego komórek z ekspresją antygenu CD304 (BDCA-4)
CliniMACS CD34 Reagent	Odczynnik do znakowania magnetycznego komórek z ekspresją antygenu CD34

CliniMACS CD4 Reagent	Odczynnik do znakowania magnetycznego komórek z ekspresją antygenu CD4
CliniMACS CD45RA Reagent	Odczynnik do znakowania magnetycznego komórek z ekspresją antygenu CD45RA
CliniMACS CD56 Reagent	Odczynnik do znakowania magnetycznego komórek z ekspresją antygenu CD56
CliniMACS CD8 Reagent	Odczynnik do znakowania magnetycznego komórek z ekspresją antygenu CD8
CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma)	Kombinacja odczynników, składająca się z CliniMACS IFN-gamma Catchmatrix Reagent i CliniMACS IFN-gamma Enrichment Reagent. Za pomocą CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma) można wzbogacić komórki wydzielające IFN-gamma po restymulacji *in vitro*.
CliniMACS Depletion Tubing Set	Zestaw przewodów, złączy, kolumn i worków, w których przetwarzana jest zawiesina znakowanych magnetycznie komórek i w których następuje separacja komórek magnetycznych. Zestaw jest specjalnie zaprojektowany z myślą o specyficznych potrzebach związanych z deplecją
CliniMACS IFN-gamma Enrichment Reagent	Składnik systemu CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma) do znakowania magnetycznego IFN-gamma związanego z CliniMACS IFN-gamma Catchmatrix Reagent na komórkach wydzielających IFN-gamma
CliniMACS IFN-gamma of Catchmatrix Reagent	Składnik systemu CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma) do powierzchniowego znakowania leukocytów przeciwciałami swoistymi dla IFN-gamma
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	Bufor używany do przygotowania komórek i separacji komórek przy użyciu systemu CliniMACS Plus: PBS (sól fizjologiczna buforowana fosforanem), uzupełniona 1 mM EDTA, pH 7,2. Przed użyciem CliniMACS PBS/EDTA Buffer musi być uzupełniony farmaceutycznie czystym HSA do końcowego stężenia 0,5% (waga/objętość, tzn. 5 g HSA na litr buforu).
CliniMACS Plus Instrument	Urządzenie do separacji magnetycznej komórek wykorzystujące technologię MACS
CliniMACS TCRα/β-Biotin	Biotynylowane przeciwciało do znakowania ludzkich komórek z ekspresją antygenu TCRα/β przed znakowaniem magnetycznym przy użyciu CliniMACS Anti-Biotin Reagent

CliniMACS Tubing Set, CliniMACS Tubing Set LS	Zestaw przewodów, złączy, kolumn i worków, w których przetwarzana jest zawiesina znakowanych magnetycznie komórek i w których następuje separacja komórek magnetycznych
Czujnik płynu	Komponent aparatu CliniMACS Plus Instrument, który wykrywa płyn w przewodach
EDTA	Kwas etylenodiaminotetraoctowy
Ekstraktor osocza	Urządzenie służące do ekstrakcji płynu z Cell Preparation Bag po przemyciu komórek
HSA	Albumina ludzkiej surowicy
IgG	Immunoglobulina G
Kolumna selekcyjna	Patrz kolumna separacyjna.
Kolumna separacyjna	Kolumna, w której komórki znakowane magnetycznie są odseparowywane po ekspozycji na pole magnetyczne
Kolumna wstępna	Pierwsza kolumna w zestawie drenów CliniMACS Tubing Set i w zestawie drenów CliniMACS Tubing Set LS, służąca jako filtr do wychwytywania komórek mających nieswoiste interakcje z matrycą kolumny
Komora worka	Komora aparatu CliniMACS Plus Instrument, w której umieszcza się worek z Negative Fraction Bag i Buffer Waste Bag
Krwiotwórcze komórki progenitorowe	Komórki progenitorowe linii limfoidalnej, mieloidalnej i erytroidalnej
Leukafereza	Pobranie leukocytów metodą aferezy
Luer/Spike Interconnector	Zestaw transferowy z końcówką do przebijania (kolcem) i adapterem strzykawki (złącze żeńskie luer) do osocza lub płynów
MDC	Mieloidalne komórki dendrytyczne
Negative Fraction Bag	Worek zestawu CliniMACS Tubing Set i CliniMACS Tubing Set LS, zawierający frakcję komórek innych niż docelowe
Non-Target Cell Bag	Worek zestawu CliniMACS Depletion Tubing Set, zawierający frakcję komórek innych niż docelowe
Odczynnik separacyjny	Odczynnik do znakowania magnetycznego komórek, np. CliniMACS CD34 Reagent

PBMC	Jednojądrzaste komórki krwi obwodowej
Pierścień mocujący	Część zestawu drenów, która umożliwia utrzymanie drenu pompy we właściwym położeniu
Plasma Waste Bag	Worek na odpady do zbierania nadmiaru osocza przed procedurą znakowania
Początkowy produkt komórkowy	Produkt zawierający komórki, używany jako materiał wyjściowy do procesu Separacji CliniMACS Plus, np. zbiór z leukaferezy, komórki PBMC lub szpik kostny
Pompa perystaltyczna	Pompa przewodowa stosowana w aparatach CliniMACS Plus Instrument do sterowania natężeniem przepływu płynu w zestawie drenów
Pre-System Filter	Urządzenie filtrujące 40 µm pomiędzy Cell Preparation Bag a kolumną wstępną używane do wychwytywania skupisk i pozostałości komórkowych
Priming Waste Bag	Worek, w którym zbierany jest bufor z kroku płukania
Procedura w worku	Sterylne przetwarzanie i przenoszenie komórek w zamkniętym środowisku worków transferowych
Program separacji	Program przeznaczony do wzbogacania lub deplecji znakowanych magnetycznie podzestawów komórek z mieszanej populacji komórek. Należy wybrać z menu programów separacji, w zależności od planowanej separacji.
Przeciwciała monoklonalne	Pojedynczy typ przeciwciała, które jest skierowane przeciwko swoistemu epitopowi (antygen, determinanta antygenowa) i jest wytwarzane przez pojedynczy klon komórek B lub pojedynczą linię komórkową hybrydoma, która powstaje w wyniku połączenia komórki limfocytowej z komórką szpiczaka. Niektóre komórki szpiczaka w sposób naturalny syntetyzują pojedyncze przeciwciała.
Przeciwciało magnetyczne	Przeciwciało znakowane super-paramagnetycznie
Przeciwciało przeciw biotynie	Przeciwciało to rozpoznaje komórki, które wcześniej zostały oznakowane odpowiednim biotynylowanym przeciwciałem lub ligandem.
Płukanie	Krok poprzedzający separację komórek, w którym bufor jest przepłukiwany przez zestaw drenów

Reapplication Bag	Worek zestawu CliniMACS Depletion Tubing Set, w którym tymczasowo zbierane są nieznakowane komórki podczas separacji. Nieznakowane komórki z worka Reapplication Bag są nakładane na kolumnę separacyjną dwukrotnie, aby zapewnić wysoką czystość komórek docelowych.
Rotator orbitalny	Urządzenie używane do mieszania produktu komórkowego podczas reakcji z odczynnikami CliniMACS
Trójnik (łącznik)	Łącznik w kształcie litery T na zestawie drenów w miejscu połączenia trzech drenów
Uchwyt kolumny selekcyjnej	Patrz uchwyt kolumny separacyjnej.
Uchwyt kolumny separacyjnej	Uformowane prowadnice w obudowie magnetycznej, które utrzymują kolumnę separacyjną na miejscu
Uchwyt na kolumnę wstępną	Wspornik zamontowany na aparacie CliniMACS Plus Instrument, który utrzymuje kolumnę wstępną na miejscu
WBC	Białe krwinki
Wash Waste Bag	Worek zbiorczy, w którym zbierany jest supernatant z przemywania poprzez separację od osadzonej zawiesiny komórkowej po krokach wirowania podczas przygotowywania próbki
Wieszak na worek	Wspornik na aparacie CliniMACS Plus Instrument do montażu Cell Preparation Bag, Non-Target Cell Bag, Priming Waste Bag, Reapplication Bag i worka na bufor
Worek transferowy	Worek z drenem i kolcem na końcu
Wyłącznik bezpieczeństwa pompy	Czujnik, który uniemożliwia działanie pompy, gdy drzwi pompy są otwarte
Zestaw do transferu osocza	Zestaw transferowy z dwiema końcówkami do przebijania (kolcami) do osocza lub płynów
Zgrzewarka	Urządzenie grzewcze używane do sterylnego zamykania drenów PCV
Znakowanie	Reakcja komórek z odczynnikiem do znakowania magnetycznego, np. CliniMACS CD34 Reagent, z komórkami CD34 dodatnimi
Złącze luer	Złącze śrubowe, część zestawów drenów
obr./min	Obroty na minutę

×g	Wielokrotność przyspieszenia grawitacyjnego ziemi
Łącznik miejsca pobierania próbek	Port iniekcyjny, np. do usuwania próbek lub dodawania odczynników CliniMACS do worka Cell Preparation Bag

3 Ostrzeżenia i środki ostrożności

W tym rozdziale wyjaśniono potencjalne zagrożenia związane z obsługą systemu CliniMACS Plus. Należy zawsze przestrzegać lokalnych instrukcji bezpieczeństwa w miejscu pracy, przepisów, norm dotyczących dobrej praktyki wytwarzania, zdrowia, bezpieczeństwa i zapobiegania wypadkom. Instrukcje używania, np. ostrzeżenia i środki ostrożności, dotyczące postępowania z materiałami biologicznie niebezpiecznymi i początkowym produktem komórkowym, a także komponentami systemu CliniMACS Plus, znajdują się w odpowiednich rozdziałach instrukcji używania danego komponentu. Szczegółowe instrukcje używania dotyczące aparatu CliniMACS Plus Instrument opisane są w Podręczniku użytkownika CliniMACS Plus Instrument.

Wszelkie poważne incydenty, które miały miejsce w związku z tym produktem, należy zgłaszać do firmy Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG – korzystając w tym celu z podanych informacji kontaktowych – oraz właściwemu organowi państwa członkowskiego, w którym użytkownik tego produktu ma siedzibę.

3.1 Związane z procesem

⚠ OSTRZEŻENIE

Ryzyko niepowodzenia procesu lub uszkodzenia aparatu. Ryzyko niepowodzenia procesu lub uszkodzenia aparatu w przypadku przeprowadzania procedur przez nieprzeszkolonych operatorów. Wszystkie procedury przetwarzania muszą być wykonywane wyłącznie przez przeszkolonych operatorów. Szkolenie operatorów zapewni wykwalifikowany przedstawiciel firmy Miltenyi Biotec.

⚠ PRZESTROGA

Ryzyko zmniejszenia wydajności procesu. Temperatury niższe lub wyższe niż temperatura pokojowa mogą powodować mniejszą żywotność i czystość oraz mniejszy uzysk komórek docelowych. Przygotowanie próbek i separację komórek należy przeprowadzać w temperaturze pokojowej (od +19 do +25 °C [od +66 do +77 °F]).

⚠ PRZESTROGA

Może dojść do naruszenia bezpieczeństwa sprzętu. Jeśli aparat nie jest używany zgodnie z instrukcjami producenta, może dojść do naruszenia bezpieczeństwa sprzętu. Należy dokładnie przeczytać i zrozumieć informacje dotyczące bezpieczeństwa, ostrzeżenia, środki ostrożności i instrukcje prawidłowej obsługi systemu CliniMACS Plus zawarte w instrukcji używania CliniMACS Plus, jak również we wszelkich związanych z bezpieczeństwem zaleceniach wydanych przez firmę Miltenyi Biotec.

- W przypadku produkcji i stosowania komórek docelowych u ludzi należy przestrzegać krajowych przepisów ustawowych i wykonawczych – np. w przypadku UE dyrektywy 2004/23/WE (tkanki i komórki ludzkie) lub dyrektywy

2002/98/WE (krew ludzka i składniki krwi). Zatem wszelkie zastosowania kliniczne komórek docelowych należą wyłącznie do zakresu odpowiedzialności użytkownika systemu CliniMACS Plus.

- Wszystkie materiały, które miały kontakt z krwią i produktami krwiopochodnymi, muszą być traktowane jako materiał zakaźny. Należy przestrzegać przepisów dotyczących postępowania z materiałem zakaźnym.
- Wszystkie dreny, złączki, zawory, kolumnę wstępną i kolumnę separacyjną należy dokładnie sprawdzić pod kątem wycie
- Wszystkie worki, w tym worki używane podczas przygotowania próbek, należy zachować do czasu zakończenia ostatecznej analizy zebranych komórek i potwierdzenia pomyślnej separacji komórek docelowych.

3.2 Odczynniki CliniMACS i koniugaty biotyny

- W przypadku infuzji lub wstrzyknięcia pacjentom frakcji komórek docelowych mogą oni otrzymać śladowe ilości przeciwciał mysich i dekstranu żelaza.
- Kulki dekstranu żelaza i/lub przeciwciała mysie mogą spowodować reakcje alergiczne lub anafilaktyczne u pacjentów. Powinien być dostępny sprzęt do intensywnej terapii i leki.
- Separacja komórek przy użyciu odczynników CliniMACS i koniugatów biotyny musi być przeprowadzana wyłącznie przez przeszkolonych operatorów.
- Operatorzy stosujący odczynniki CliniMACS i koniugaty biotyny powinni mieć doświadczenie w separacji komórek ze szpiku kostnego lub krwi obwodowej.
- Komórki inne niż docelowe nie są przeznaczone do użytku terapeutycznego i nie mogą być z powrotem podawane w infuzji pacjentom.
- Odczynniki CliniMACS i koniugaty biotyny są przeznaczone wyłącznie do stosowania *in vitro* i nie są przeznaczone do stosowania terapeutycznego ani bezpośredniej infuzji u pacjentów.
- Odczynniki CliniMACS i koniugaty biotyny nie są zalecane do stosowania u pacjentów, u których stwierdzono lub podejrzewa się wrażliwość na immunoglobuliny mysie lub dekstran żelaza.
- U pacjentów mogą rozwinąć się ludzkie przeciwciała przeciwmysie (HAMA).
- Nie używać po upływie terminu ważności wydrukowanego na etykiecie produktu.
- Nie używać, jeżeli doszło do uszkodzenia opakowania. Odczynnik można stosować tylko w przypadku nieuszkodzonej i zamkniętej fiolki.

3.3 Postępowanie z materiałami biologicznie niebezpiecznymi

⚠ OSTRZEŻENIE

Ryzyko poważnego obrażenia lub śmierci. W zależności od stosowanego materiału biologicznego kontakt może prowadzić do poważnych obrażeń ciała lub śmierci. Należy zawsze nosić sprzęt ochrony indywidualnej zgodnie z ostrzeżeniami i środkami ostrożności, w szczególności w przypadku, gdy jest lub był używany materiał biologicznie niebezpieczny.

- W celu uniknięcia zanieczyszczenia początkowego produktu komórkowego wszystkie kroki przygotowania powinny być wykonywane w warunkach sterylnych z zastosowaniem technik aseptycznych (np. w wyciągu laminarnym).
- Operator przeprowadzający separację komórek musi być przeszkolony w zakresie właściwego użytkowania sprzętu oraz obchodzenia się z produktami krwiopochodnymi i aspiratem szpiku kostnego.
- Operator przeprowadzający separację komórek powinien nosić odpowiednie ubranie (np. fartuch laboratoryjny, rękawice i okulary ochronne lub gogle) podczas pracy z próbkami pacjentów i obchodzeniem się z materiałem potencjalnie niebezpiecznym biologicznie.
- Wszystkie produkty krwiopochodne muszą być traktowane jako potencjalne zagrożenie biologiczne. Produkty leukaferezy, produkty krwiopochodne, aspirat szpiku kostnego, pobrane komórki, zużyty bufor, zużyty zestaw drenów i inne materiały, które miały kontakt z tymi płynami, muszą być traktowane jako materiały niebezpieczne biologicznie zgodnie ze standardowymi wymaganiami szpitalnymi lub instytucjonalnymi.
- Aparat CliniMACS Plus Instrument należy traktować jako potencjalne zagrożenie biologiczne po każdym cyklu separacji i czyścić wodnym detergentem biobójczym (np. Bacillol® plus lub Meliseptol®, patrz również rozdział „Czyszczenie i konserwacja” w Podręczniku użytkownika CliniMACS Plus Instrument) zgodnie ze standardowymi wymogami szpitalnymi lub instytucjonalnymi.
- Materiały jednorazowego użytku należy traktować jako materiały niebezpieczne biologicznie zgodnie ze standardowymi wymogami szpitalnymi lub instytucjonalnymi.

3.4 Początkowy produkt komórkowy

WAŻNE

Znakowanie oraz separację komórek należy rozpocząć tak szybko, jak to możliwe po pobraniu początkowego produktu komórkowego. W momencie rozpoczęcia procedury znakowania i separacji produkt nie powinien być starszy niż 24 godziny.

- Początkowy produkt komórkowy (np. produkt leukaferezy) należy pobrać zgodnie ze standardowymi procedurami szpitalnymi lub instytucjonalnymi do standardowych worków do pobierania.
- Pojemnik zawierający początkowy produkt komórkowy powinien być oznakowany numerem identyfikacyjnym pacjenta, godziną, datą i miejscem pobrania zgodnie z procedurami określonymi dla protokołu klinicznego.
- Do transportu produkt komórkowy powinien być zapakowany w izolowane pojemniki i przechowywany w kontrolowanej temperaturze pokojowej (od +19 do +25 °C [od +66 do +77 °F]) zgodnie ze standardowymi szpitalnymi lub instytucjonalnymi procedurami pobierania krwi zatwierdzonymi do stosowania w protokole klinicznym. Nie przechowywać w lodówce. Stężenie komórek nie powinno przekraczać $0{,}2\times10^9$ komórek na mL podczas transportu.
- Unikać intensywnego mieszania początkowego materiału komórkowego.
- Jeśli początkowy produkt komórkowy musi być przechowywany, np. przez noc, należy go przechowywać w kontrolowanej temperaturze pokojowej (+19 do +25 °C [+66 do +77 °F]). Podczas przechowywania stężenie leukocytów nie powinno nigdy przekraczać $0{,}2\times10^9$ komórek na mL.
- Komórki należy przechowywać w autologicznym osoczu. Jeśli stężenie komórek jest większe niż $0{,}2\times10^9$ komórek na mL, należy rozcieńczyć początkowy produkt komórkowy autologicznym osoczem.

4 System CliniMACS Plus

System CliniMACS Plus, składający się z takich komponentów jak CliniMACS Plus Instrument, odczynnik(-i) CliniMACS, zestaw drenów CliniMACS Tubing Set, CliniMACS PBS/EDTA Buffer i innych akcesoriów, które muszą być używane razem, jest przeznaczony do separacji *in vitro* swoistych komórek ludzkich do zastosowań klinicznych.

WAŻNE
Instrukcję używania, np. ostrzeżenia i środki ostrożności, dotyczącą komponentów systemu CliniMACS Plus można znaleźć w instrukcji używania dostarczonej dla odpowiedniego komponentu.

4.1 CliniMACS Plus Instrument

CliniMACS Plus Instrument jest urządzeniem elektromechanicznym zawierającym magnes trwały, pompę perystaltyczną, zawory zaciskowe, elektronikę i oprogramowanie.

4.2 Odczynniki CliniMACS i koniugaty biotyny

Odczynniki CliniMACS są ciemno zabarwionymi, nielepkimi, koloidalnymi roztworami zawierającymi koniugaty przeciwciał swoistych dla komórek w buforze. Odczynniki składają się z przeciwciała chemicznie sprzężonego z cząstkami super-paramagnetycznymi.

Koniugaty biotyny CliniMACS są przejrzystymi i bezbarwnymi roztworami zawierającymi przeciwciało połączone kowalencyjnie z biotyną w buforze. Przeciwciała są wysoce swoiste, dzięki czemu możliwe jest znakowanie *in vitro* rzadkich komórek docelowych.

4.3 Zestawy Przewodów CliniMACS

Zestawy przewodów CliniMACS są sterylnymi materiałami eksploatacyjnymi jednorazowego użytku, przeznaczonymi do stosowania w połączeniu z aparatem CliniMACS Plus Instrument *in vitro* do wzbogacania lub deplecji komórek ludzkich z heterogennych populacji komórek hematologicznych.

4.4 CliniMACS PBS/EDTA Buffer

CliniMACS PBS/EDTA Buffer jest płynem do przemywania i transportu, umożliwiającym separację ludzkich komórek *in vitro*.

4.5 Wymagane dodatkowe materiały

- **zestaw do przetaczania osocza:**
  zestaw transferowy z dwoma kolcami do osocza lub płynów, Transfer Set Coupler/Coupler (REF 200-073-902) lub odpowiednik
- **Luer/Spike Interconnector:**
  zestaw transferowy z kolcem i adapterem strzykawki (złącze żeńskie luer) do osocza lub płynów, Luer/Spike Interconnector (REF 200-073-903) lub odpowiednik

4.6 Akcesoria CliniMACS

Oprócz produktów CliniMACS do separacji CliniMACS Plus mogą być wymagane dodatkowe materiały:

- **worki transferowe, nadające się do wirowania:**
  Worek transferowy 150 mL, Terumo lub odpowiednik
  Worek transferowy 600 mL, Terumo lub odpowiednik
  Worek transferowy 1 000 mL, Terumo lub odpowiednik
- **worki do hodowli komórkowych, przepuszczające gaz:**
  MACS GMP Cell Differentiation Bag - 100 mL (REF 170-076-400) lub odpowiednik
- **łącznik miejsca pobierania próbek:**
  Łącznik miejsca pobierania próbek, Terumo lub odpowiednik
- **pre-system filter:**
  filtr do transfuzji krwi, Haemonetics® lub odpowiednik
- **strzykawki i igły:**
  odpowiednie strzykawki (5 mL, 10 mL, 20 mL, 50 mL) i podskórne igły o rozmiarze 20 gauge
- **kleszcze blokujące**
- **probówki**
- **albumina surowicy ludzkiej (HSA):**
  należy stosować wyłącznie HSA o jakości farmaceutycznej, który jest dostępny jako zatwierdzony produkt w kraju użytkownika.
- **immunoglobulina G klasy klinicznej:**
  należy stosować wyłącznie IgG o jakości farmaceutycznej, która jest dostępna jako zatwierdzony lek w kraju użytkownika, np. w Niemczech: Gamunex® 10% lub odpowiednik.
- **pożywka do hodowli komórek:**
  np. RPMI 1640 lub odpowiednik
- **materiały specyficzne dla danego zastosowania:**
  pojedyncze biotynylowane przeciwciało lub ligand swoisty dla komórek; surowica AB lub alternatywnie surowica autologiczna

4.7 Wymagane wyposażenie

- **bezprzerwowe źródło zasilania:**
  zalecany zasilacz UPS: APC Smart-UPS 1500 VA USB i szeregowy 230 V, produkowany przez firmę APC (American Power Conversion) lub odpowiednik
- **wyciąg laminarny**
- **sterylny łącznik drenów:**
  Terumo Sterile Connection Device (TSCD®) lub odpowiednik
- **rotator orbitalny:**
  Wytrząsarki platformowe, aparaty Heidolph lub odpowiednik
- **wirówka:**
  Wirówka, Sorvall lub odpowiednik, oraz wiaderka do wirowania z pokrywami zapobiegającymi rozprzestrzenianiu się aerozoli
- **ekstraktor osocza:**
  Stanowisko do separacji osocza, Terumo Equipment lub odpowiednik
- **waga stolikowa:**
  Waga laboratoryjna, Mettler Toledo lub odpowiednik, o nośności 1 kg; podziałka do 0,1 g
- **zgrzewarka do drenów:**
  Zgrzewarka ręczna Hematron III, Baxter lub odpowiednik
- **ściągacz do drenów:**
  Tube Stripper, Baxter lub odpowiednik
- **pojemniki na odpady stanowiące zagrożenie biologiczne**

Dodatkowe wyposażenie wymagane dla CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma):

- 24-dołkowe naczynie do hodowli Corning™ Costar™ 24-dołkowa płytka do hodowli, Sigma Aldrich lub odpowiednik
- Urządzenie do separacji MiniMACS™, 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 Przegląd zastosowań

5.1 Four STEPS to your target cells

W kolejnym rozdziale przedstawiono przegląd systemu Separacja CliniMACS Plus. Separacja CliniMACS Plus odbywa się w czterech KROKACH. W pierwszym kroku komórki są przygotowywane i znakowane magnetycznie. W drugim kroku wybierany jest odpowiedni program separacji. W trzecim kroku zestaw drenów jest instalowany na aparacie CliniMACS Plus Instrument, a w czwartym kroku komórki są automatycznie odseparowywane.

Może być wymagane rejestrowanie danych procesowych związanych z zastosowaniem. W sprawie arkuszy pomocniczych należy skontaktować się z działem Miltenyi Biotec Technical Support.

Podręcznik użytkownika CliniMACS Plus (Aplikacji) obejmuje różne opcje dla każdego kroku (różne odczynniki, zestawy drenów i programy). Przed rozpoczęciem zastosowania należy wybrać rozdziały poświęcone konkretnym zastosowaniom (rozdział 6) oraz szczegółowe objaśnienia do KROKÓW 1-4 (rozdział 7) za pomocą tabeli poglądowej, która zaczyna się na następnej stronie. Tabela poglądowa zawiera informacje o odpowiednich rozdziałach podręcznika użytkownika. W tabeli poglądowej podano rodzaj i liczbę odczynników, liczbę komórek, rodzaj zestawu drenów oraz odpowiedni program separacji potrzebny do separacji.

KROK 1: Przygotowanie komórek i znakowanie magnetyczne

KROK 1 opisuje przygotowanie produktu komórkowego i znakowanie magnetyczne swoistych komórek z ekspresją odpowiedniego antygenu. Należy postępować zgodnie z instrukcją w odpowiednim rozdziale. Przejść do kroku 2.

KROK 2: Wybór programu separacji

KROK 2 opisuje wybór programu separacji aparatu CliniMACS Plus Instrument. W zależności od rodzaju komórek i liczby komórek przeznaczonych do separacji należy wybrać różne programy. Aby ustalić, który program ma zastosowanie, należy przejść do tabeli poglądowej na następnej stronie. Przeczytać odpowiedni rozdział dla wybranego programu separacji. Należy postępować zgodnie z instrukcją podaną w odpowiednim rozdziale. Przejść do kroku 3.

KROK 3: Instalacja zestawów przewodów CliniMACS

KROK 3 wyjaśnia instalację zestawu drenów na aparacie CliniMACS Plus Instrument. Należy postępować zgodnie z instrukcją w odpowiednim rozdziale. Przejść do kroku 4.

KROK 4: Separacja CliniMACS Plus

KROK 4 opisuje zautomatyzowaną separację CliniMACS Plus. Aparat CliniMACS Plus Instrument wykonuje zautomatyzowaną procedurę separacji komórek (wybraną w KROKU 2). Należy postępować zgodnie z instrukcją w odpowiednim rozdziale.

WAŻNE

Tabela poglądowa na kolejnych stronach podsumowuje informacje o typowych zastosowaniach odczynników CliniMACS. W przypadku konieczności separacji innej liczby komórek docelowych należy zapoznać się z instrukcją zawartą w przeglądzie dla konkretnego zastosowania, aby znaleźć informacje na temat maksymalnej wydajności danego zastosowania. Należy postępować zgodnie z instrukcjami zawartymi w rozdziałach poświęconych konkretnym zastosowaniom i szczegółowych objaśnieniach KROKÓW 1-4. Patrz tabela poglądowa.

5.2 Tabela poglądowa

Wydajność aplikacji	Fiolka(i) z odczynnikiem	Zestaw drenów	Program separacji	Rozdział dotyczący konkretnego zastosowania	Rozdziały ze szczegółowymi objaśnieniami KROKÓW 1-4			
					STEP 1	STEP 2	STEP 3	STEP 4
Anti-Biotin (REF 173-01) – wzbogacanie								
≤40×10^9 komórek łącznie	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) – deplecja (zastosowanie na normalną skalę)								
≤40×10^9 komórek łącznie	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 (zastosowanie na dużą skalę)								
>40–80×10^9 komórek łącznie	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) – wzbogacanie								
Komórki wydzielające IFN z ≤1×10^9 komórek łącznie	1 zestaw (2 fiolki z odczynnikiem)	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) – deplecja - część 1 z 2								
≤5×10^9 komórek CD19-dodatnich z ≤40×10^9 komórek łącznie (WBC)	1× CD19 Reagent i 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) – wzbogacanie - część 2 z 2								
≤0,2×10^9 komórek Cd1c (BDCA-1)-dodatnich z ≤40×10^9 komórek łącznie (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) – deplecja (zastosowanie na normalną skalę)								
≤15×10^9 komórek CD3-dodatnich z ≤40×10^9 komórek łącznie	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) – deplecja (zastosowanie na dużą skalę)								
>15–20×10^9 komórek CD3-dodatnich z > >40–80×10^9 komórek łącznie	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

Wydajność aplikacji	Fiolka(i) z odczynnikiem	Zestaw drenów	Program separacji	Rozdział dotyczący konkretnego zastosowania	Rozdziały ze szczegółowymi objaśnieniami KROKÓW 1-4			
					STEP 1	STEP 2	STEP 3	STEP 4
CD3 (REF 273-01) – deplecja (zastosowanie na normalną skalę)								
≤15×10^9 komórek CD3-dodatnich z ≤40×10^9 komórek łącznie	1× CD3 Reagent	1× CliniMACS Depletion Tubing Set (REF 261-01)	DEPLETION 3.1	6.5	7.1	7.2.6	7.3.3	7.4.5
CD3 (REF 273-01) – deplecja (zastosowanie na dużą skalę)								
>15–30×10^9 komórek CD3-dodatnich z >40–80×10^9 komórek łącznie	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) – wzbogacanie								
≤5×10^9 komórek CD4-dodatnich z ≤40×10^9 komórek łącznie	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) – deplecja								
≤12×10^9 komórek CD4-dodatnich z ≤40×10^9 komórek łącznie	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) – wzbogacanie								
≤4×10^9 komórek CD8-dodatnich z ≤40×10^9 komórek łącznie	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) – deplecja								
≤4×10^9 komórek CD8-dodatnich z ≤40×10^9 komórek łącznie	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
Skojarzenie CD4/CD8 (REF 276-01/REF 275-01) – deplecja								
≤12×10^9 komórek CD4-dodatnich i ≤4×10^9 komórek CD8-dodatnich z ≤40×10^9 komórek łącznie	1× CD4 Reagent and 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) – wzbogacanie								
≤4×10^9 komórek CD14-dodatnich z ≤20×10^9 komórek łącznie	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) – deplecja								
≤5×10^9 komórek CD19-dodatnich z ≤40×10^9 komórek łącznie	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

Wydajność aplikacji	Fiolka(i) z odczynnikiem	Zestaw drenów	Program separacji	Rozdział dotyczący konkretnego zastosowania	Rozdziały ze szczegółowymi objaśnieniami KROKÓW 1-4			
					STEP 1	STEP 2	STEP 3	STEP 4
Skojarzenie CD3/CD19 (REF 273-01/REF 179-01) – deplecja								
≤15×10^9 komórek CD3-dodatnich i ≤5×10^9 komórek CD19-dodatnich z ≤40×10^9 komórek łącznie	1× CD3 Reagent and 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) – wzbogacanie								
≤0,6×10^9 komórek CD25-dodatnich z ≤40×10^9 komórek łącznie (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) – wzbogacanie								
≤0,6×10^9 komórek CD25-dodatnich o dużej ekspresji z ≤40×10^9 komórek łącznie (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) – deplecja (zastosowanie na normalną skalę)								
≤6×10^9 komórek CD25-dodatnich z ≤40×10^9 komórek łącznie (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) – deplecja (zastosowanie na dużą skalę)								
>6-12×10^9 komórek CD25-dodatnich z >40–80×10^9 komórek łącznie (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) – wzbogacanie (zastosowanie na normalną skalę)								
≤0,6×10^9 komórek CD34-dodatnich z ≤60×10^9 komórek łącznie	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) – wzbogacanie (zastosowanie na dużą skalę)								
>0.6–1,2×10^9 komórek CD34-dodatnich z >60–120×10^9 komórek łącznie	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) – deplecja								
≤20×10^9 komórek CD45RA-dodatnich z ≤50×10^9 komórek łącznie	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

Wydajność aplikacji	Fiolka(i) z odczynnikiem	Zestaw drenów	Program separacji	Rozdział dotyczący konkretnego zastosowania	Rozdziały ze szczegółowymi objaśnieniami KROKÓW 1-4			
					STEP 1	STEP 2	STEP 3	STEP 4
CD56 (REF 271-01) – wzbogacanie								
≤5×10^9 komórek CD56-dodatnich z ≤40×10^9 komórek łącznie	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) – wzbogacanie								
≤0,2×10^9 komórek CD304 (BDCA-4)-dodatnich z ≤40×10^9 komórek łącznie	1× odczynnik CD304 (BDCA-4)	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) – deplecja								
≤24×10^9 komórek TCRα/β-dodatnich z ≤60×10^9 komórek łącznie	1× TCRα/β-Biotin and 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

Tabela 5.1: Przegląd dostępnych zastosowań z odpowiednimi zestawami drenów i programami separacji

6 Przegląd KROKÓW 1–4 dla konkretnego zastosowania

6.1 Wzbogacanie komórek CD34-dodatnich

CliniMACS Plus CD34 System, w tym aparat CliniMACS Plus Instrument, odczynnik CliniMACS CD34 Reagent, zestaw drenów CliniMACS Tubing Set lub CliniMACS Tubing Set LS oraz bufor CliniMACS PBS/EDTA Buffer, jest przeznaczony do wzbogacania *in vitro* ludzkich, CD34-dodatnich hematopoetycznych komórek progenitorowych z heterogennych populacji komórek hematologicznych.

6.1.1 KROK 1: Przygotowanie komórek i znakowanie magnetyczne

Pierwsze wymagane działania

Wydajność aplikacji

- Zastosowanie na normalną skalę: do $0{,}6\times10^9$ komórek CD34-dodatnich z komórek łącznie (WBC) do 60×10^9
- Zastosowanie na dużą skalę: więcej niż $0{,}6\times10^9$ i do $1{,}2\times10^9$ komórek CD34-dodatnich z komórek łącznie (WBC) do 120×10^9

⚠ PRZESTROGA

Ryzyko niewystarczającej wydajności separacji znakowanych komórek. W przypadku przekroczenia specyfikacji zastosowania istnieje ryzyko niedostatecznego znakowania swoistego. Należy użyć wymaganej ilości komórek i odczynnika zgodnie z opisem dla danego zastosowania.

Wymagane materiały CliniMACS

Materiał	Numer katalogowy	Ilość	Program separacji
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1	–
CliniMACS CD34 Reagent	171-01	• 1 fiolka (normalna skala) • 2 fiolki (duża skala)	–
CliniMACS Tubing Set	161-01	1 zestaw drenów	CD34 SELECTION 1
CliniMACS Tubing Set LS	162-01	1 zestaw drenów	CD34 SELECTION 2
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	3×worek 1 000 mL[1]	–

1 Przed użyciem uzupełnić CliniMACS PBS/EDTA Buffer o HSA do końcowego stężenia 0,5% (wag./obj.).

Tabela 6.1: Materiały CliniMACS wymagane do wzbogacania komórek CD34-dodatnich

Wymagane dodatkowe materiały

- **Cell Preparation Bag:**
  jeden worek transferowy 600 mL, nadający się do wirowania, oraz jeden łącznik miejsca pobierania próbek i dwa zestawy do przetaczania osocza, do stosowania podczas procedury przygotowania komórek
- **Plasma Waste Bag i worki Wash Waste Bag:**
  trzy worki transferowe 600 mL, nadające się do wirowania
- **Cell Collection Bag:**
  jeden worek transferowy 150 mL w połączeniu z Luer/Spike Interconnector do połączenia Cell Collection Bag z zestawem drenów
- jeden pre-system filter
- kleszcze blokujące
- odpowiednie strzykawki (różnej wielkości) i igły podskórne o rozmiarze 20 gauge
- albumina surowicy ludzkiej (HSA) do dodania do CliniMACS PBS/EDTA Buffer do końcowego stężenia 0,5% (wag./obj.)
- probówki

▶ Przygotowanie worków

Ustalić wagę pustego worka Cell Collection Bag i worka Cell Preparation Bag zgodnie z opisem w rozdziale 7.1.1 na stronie 127.

Znakowanie magnetyczne komórek

Szczegółowy opis następnych kroków, patrz rozdział 7.1 „KROK 1: Przygotowanie komórek i znakowanie magnetyczne" na stronie 127.

▶ Analiza początkowego produktu komórkowego

▶ Przeniesienie początkowego produktu komórkowego do Cell Preparation Bag

Jeżeli waga początkowego produktu komórkowego jest większa niż 200 g, ale liczba komórek jest mniejsza niż 120×10^9 komórek łącznie i $1{,}2\times10^9$ komórek CD34-dodatnich, odwirować próbkę, aby zmniejszyć jej objętość do maksymalnie 200 g, a następnie wykonać następujące czynności

▶ Rozcieńczenie początkowego produktu komórkowego

Dodać bufor: Waga buforu do dodania = Waga początkowego produktu komórkowego × 2

▶ Wirowanie

Wirować przy 200×g, bez hamowania, 15 minut, temperatura pokojowa (RT: od +19 do +25 °C [od +66 do +77 °F]).

▶ Regulacja objętości: objętość znakowania 95 g (±5 g) (zastosowanie na normalną skalę) lub 190 g (±5 g) (zastosowanie na dużą skalę)

1. Usunąć supernatant, aby dostosować próbkę, stosując następujące równanie: Waga supernatantu do usunięcia = Waga rozcieńczonego produktu komórkowego – Objętość znakowania
2. Zawiesić ponownie osad komórkowy.

▶ Inkubacja przy użyciu CliniMACS CD34 Reagent

1. Dodać 1 lub 2 fiolki CliniMACS CD34 Reagent (patrz Tabela 6.1). Delikatnie wymieszać zawartość.
2. Inkubować na rotatorze orbitalnym (25 rpm) przez 30 minut w RT.

▶ Usunięcie nadmiaru odczynnika

1. Napełnić Cell Preparation Bag buforem.
2. Wirować (200×g, bez hamowania, 15 minut, RT).
3. Usunąć jak najwięcej supernatantu. **Wskazówka:** Usunąć co najmniej 500 g supernatantu. Jeśli usunięty supernatant wynosi mniej niż te wartości, zaleca się przeprowadzenie łącznie trzech kroków przemywania (zamiast tylko dwóch). W przeciwnym razie usuwanie niezwiązanego odczynnika może być niewystarczające.
4. Zawiesić ponownie osad komórkowy.
5 Napełnić Cell Preparation Bag buforem.
6. Wirować (200×g, bez hamowania, 15 minut, RT).
7. Usunąć jak najwięcej supernatantu.
8. Zawiesić ponownie osad komórkowy.
9. Dostosować objętość ładowania próbki do 150 g (zastosowanie na normalną skalę) lub 275 g (zastosowanie na dużą skalę).

Wskazówka: Po usunięciu nadmiaru odczynnika pobrać próbkę do późniejszej analizy (opcjonalnie).

6.1.2 KROK 2: Wybór programu separacji

▶ Włączenie aparatu CliniMACS Plus Instrument

▶ Wybór programu separacji CD34 SELECTION 1/2

(przy użyciu 1 fiolki: CD34 SELECTION 1 lub przy użyciu 2 fiolek: CD34 SELECTION 2)

Patrz rozdział 7.2.2 na stronie 140.

6.1.3 KROK 3: Instalacja zestawów przewodów CliniMACS

- **CliniMACS Tubing Set i CliniMACS Tubing Set LS**

Patrz rozdział 7.3.1 na stronie 160.

6.1.4 KROK 4: Separacja CliniMACS Plus

- **Procedura separacji**
- **Odłączenie worków i zapisanie kodu procesu**
- **Rozładowanie zestawu drenów i wyłączenie**
- **Analiza komórek**

Patrz rozdział 7.4.1 na stronie 194.

6.2 Wzbogacanie komórek CD14-dodatnich

CliniMACS Plus CD14 System, w tym aparat CliniMACS Plus Instrument, odczynnik CliniMACS CD14 Reagent, zestaw drenów CliniMACS Tubing Set oraz bufor CliniMACS PBS/EDTA Buffer, jest przeznaczony do wzbogacania *in vitro* ludzkich, CD14-dodatnich komórek z heterogennych populacji komórek hematologicznych.

6.2.1 KROK 1: Przygotowanie komórek i znakowanie magnetyczne

Pierwsze wymagane działania

Wydajność aplikacji

do 4×10^9 komórek CD14-dodatnich z komórek łącznie (WBC) do 20×10^9

⚠ PRZESTROGA

Ryzyko niewystarczającej wydajności separacji znakowanych komórek. W przypadku przekroczenia specyfikacji zastosowania istnieje ryzyko niedostatecznego znakowania swoistego. Należy użyć wymaganej ilości komórek i odczynnika zgodnie z opisem dla danego zastosowania.

Wymagane materiały CliniMACS

Materiał	Numer katalogowy	Ilość
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS CD14 Reagent	272-01	1 fiolka
CliniMACS Tubing Set	161-01	1 zestaw drenów
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	3×worek 1 000 mL[1]

1 Patrz Tabela 6.3 i Tabela 6.4. Przed użyciem uzupełnić CliniMACS PBS/EDTA Buffer o HSA do końcowego stężenia 0,5% (wag./obj.).

Tabela 6.2: Materiały CliniMACS wymagane do wzbogacania komórek CD14-dodatnich

Wymagane dodatkowe materiały

- **Cell Preparation Bag:**
  jeden worek transferowy 600 mL, nadający się do wirowania, oraz jeden łącznik miejsca pobierania próbek i jeden zestaw do przetaczania osocza, do stosowania podczas procedury przygotowania komórek
- **Plasma Waste Bag i Wash Waste Bag:**
  dwa worki transferowe 600 mL, nadające się do wirowania
- **Cell Collection Bag:**
  jeden worek transferowy 150 mL lub jeden worek transferowy 600 mL w połączeniu z Luer/Spike Interconnector do połączenia Cell Collection Bag z zestawem drenów (patrz Tabela 6.4)
- **W przypadku konieczności wymiany worka Negative Fraction Bag i worka Buffer Waste Bag:**
  dwa worki transferowe 1 000 mL w połączeniu z dwoma łącznikami Luer/Spike Interconnector do połączenia worków z zestawem drenów (patrz Tabela 6.4)
- **W przypadku, gdy do separacji potrzebny jest więcej niż jeden litr buforu:**
  jeden zestaw do przetaczania osocza do połączenia worków na bufor (patrz Tabela 6.4)
- jeden pre-system filter
- kleszcze blokujące
- odpowiednie strzykawki (różnej wielkości) i igły podskórne o rozmiarze 20 gauge

Przegląd wymaganych materiałów

Przygotowanie komórek	
Komórki łącznie (WBC)	≤20×10^9
Komórki znakowane	≤4×10^9
Liczba fiolek z odczynnikiem	1–2
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1 000 mL
Zestaw do transferu osocza	1

Tabela 6.3: Materiał wymagany do przygotowania komórek CD14-dodatnich

Separacja		
Komórki znakowane	≤2×10^9	>2–4×10^9
Negative Fraction Bag	–	Wymienić oryginalne worki z zestawu drenów na worki transferowe 1 000 mL
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
Zestaw do transferu osocza	–	1

Tabela 6.4: Materiał wymagany do wzbogacania komórek CD14-dodatnich

▶ Przygotowanie worków

Ustalić wagę pustego worka Cell Collection Bag i worka Cell Preparation Bag zgodnie z opisem w rozdziale 7.1.1 na stronie 127.

Znakowanie magnetyczne komórek

Szczegółowy opis następnych kroków, patrz rozdział 7.1 „KROK 1: Przygotowanie komórek i znakowanie magnetyczne" na stronie 127.

▶ Analiza początkowego produktu komórkowego

▶ Przeniesienie początkowego produktu komórkowego do Cell Preparation Bag

▶ Rozcieńczenie początkowego produktu komórkowego

Dodać bufor: Waga buforu do dodania = 600 g – Waga początkowego produktu komórkowego

▶ Wirowanie

Wirować przy 300×g, bez hamowania, 15 minut, temperatura pokojowa (RT: od +19 do +25 °C [od +66 do +77 °F]).

▶ Regulacja objętości: objętość znakowania 50 g (±5 g)

1. Usunąć supernatant, aby dostosować próbkę, stosując następujące równanie: Waga supernatantu do usunięcia = Waga rozcieńczonego początkowego produktu komórkowego – Objętość znakowania
2. Zawiesić ponownie osad komórkowy.

▶ Inkubacja przy użyciu CliniMACS CD14 Reagent

1. Dodać 1 fiolkę CliniMACS CD14 Reagent. Delikatnie wymieszać zawartość.
2. Inkubować na rotatorze orbitalnym (25 rpm) przez 30 minut w RT.

▶ Usunięcie nadmiaru odczynnika

1. Napełnić Cell Preparation Bag buforem.
2. Wirować (300×g, bez hamowania, 15 minut, RT).
3. Usunąć jak najwięcej supernatantu. **Wskazówka:** Usunąć co najmniej 500 g supernatantu. Jeśli usunięty supernatant wynosi mniej niż 500 g, zaleca się przeprowadzenie łącznie dwóch kroków przemywania (zamiast tylko jednego). W przeciwnym razie usuwanie niezwiązanego odczynnika może być niewystarczające.
4. Zawiesić ponownie osad komórkowy.
5. Dostosować objętość ładowania próbki do 100 g.

Wskazówka: Po usunięciu nadmiaru odczynnika pobrać próbkę do późniejszej analizy (opcjonalnie).

6.2.2 KROK 2: Wybór programu separacji

▶ Włączenie aparatu CliniMACS Plus Instrument

▶ Wybór programu separacji ENRICHMENT 1.1

▶ Wprowadzenie parametrów próbki

Patrz rozdział 7.2.3 na stronie 142.

6.2.3 KROK 3: Instalacja zestawów przewodów CliniMACS

▶ CliniMACS Tubing Set i CliniMACS Tubing Set LS

Patrz rozdział 7.3.1 na stronie 160.

6.2.4 KROK 4: Separacja CliniMACS Plus

- **Procedura separacji**
- **Odłączenie worków i zapisanie kodu procesu**
- **Rozładowanie zestawu drenów i wyłączenie**
- **Analiza komórek**

Patrz rozdział 7.4.2 na stronie 198.

6.3 Wzbogacanie/deplecja przy użyciu CliniMACS Anti-Biotin Reagent

System CliniMACS Plus Anti-Biotin, w tym aparat CliniMACS Plus Instrument, odczynnik CliniMACS Anti-Biotin Reagent, zestaw drenów CliniMACS Tubing Set lub CliniMACS Tubing Set LS oraz bufor CliniMACS PBS/EDTA Buffer, jest przeznaczony do wzbogacania *in vitro* lub deplecji ludzkich komórek, uprzednio znakowanych biotynylowanymi przeciwciałami.

6.3.1 KROK 1: Przygotowanie komórek i znakowanie magnetyczne

Pierwsze wymagane działania

Wydajność aplikacji

- **Wzbogacanie:** do 40×10^9 komórek łącznie (WBC)
- **Deplecja:**
  Zastosowanie na normalną skalę: do 40×10^9 komórek łącznie (WBC)
  Zastosowanie na dużą skalę: więcej niż 40×10^9 i do 80×10^9 komórek łącznie (WBC)

⚠ PRZESTROGA

Ryzyko niewystarczającej wydajności separacji znakowanych komórek. W przypadku przekroczenia specyfikacji zastosowania istnieje ryzyko niedostatecznego znakowania swoistego. Należy użyć wymaganej ilości komórek i odczynnika zgodnie z opisem dla danego zastosowania.

Wymagane materiały CliniMACS

Materiał	Numer katalogowy	Ilość	Program separacji
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1	–
CliniMACS Anti-Biotin Reagent	173-01	• 1 fiolka (normalna skala) • 2 fiolki (duża skala)	–
CliniMACS Tubing Set	161-01	1 zestaw drenów	ENRICHMENT 1.1
CliniMACS Tubing Set LS	162-01	1 zestaw drenów	DEPLETION 2.1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	• 3×worek 1 000 mL[1] (normalna skala) • 4×worek 1 000 mL[1] (duża skala)	–

1 Ilość buforu zmienia się w zależności od wybranego programu separacji i liczby znakowanych komórek (patrz Tabela 6.6 do Tabela 6.9). Przed użyciem uzupełnić CliniMACS PBS/EDTA Buffer o HSA do końcowego stężenia 0,5% (wag./obj.).

Tabela 6.5: Wymagane materiały CliniMACS do wzbogacania/deplecji przy użyciu CliniMACS Anti-Biotin Reagent

Wymagane dodatkowe materiały

- **Cell Preparation Bag:**
  jeden worek transferowy 600 mL, nadające się do wirowania, oraz jeden łącznik miejsca pobierania próbek i dwa zestawy do przetaczania osocza, do stosowania podczas procedury przygotowania komórek
- **Plasma Waste Bag i Wash Waste Bag:**
  dwa worki transferowe 600 mL, nadające się do wirowania
- **Cell Collection Bag:**
  jeden worek transferowy 600 mL lub jeden worek transferowy 1 000 mL w połączeniu z Luer/Spike Interconnector do połączenia Cell Collection Bag z zestawem drenów (patrz Tabela 6.7 i Tabela 6.9)
- **W przypadku konieczności wymiany worka Negative Fraction Bag, Buffer Waste Bag i/lub Priming Waste Bag:**
  dwa do trzech worków transferowych 1 000 mL w połączeniu z dwoma łącznikami Luer/Spike Interconnector do połączenia worków z zestawem drenów (patrz Tabela 6.7 i Tabela 6.9). Wymienić Priming Waste Bag przy użyciu sterylnego łącznika drenów.
- **W przypadku, gdy do separacji potrzebny jest więcej niż jeden litr buforu:**
  jeden do dwóch zestawów do przetaczania osocza do połączenia worków na bufor (patrz Tabela 6.7 i Tabela 6.9)
- jeden pre-system filter
- kleszcze blokujące
- odpowiednie strzykawki (różnej wielkości) i igły podskórne o rozmiarze 20 gauge
- albumina surowicy ludzkiej (HSA) do dodania do CliniMACS PBS/EDTA Buffer do końcowego stężenia 0,5% (wag./obj.)
- probówki
- pojedyncze biotynylowane przeciwciało swoiste dla komórki lub ligand

Przegląd materiałów

Przygotowanie komórek (ENRICHMENT 1.1)	
Komórki łącznie (WBC)	≤40×10^9
Liczba fiolek z odczynnikiem	1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	2 000 mL
Zestaw do transferu osocza	2

Tabela 6.6: Materiały wymagane do przygotowania komórek (ENRICHMENT 1.1)

Separacja (ENRICHMENT 1.1)		
Komórki znakowane	≤2×10^9	>2–5×10^9
Negative Fraction Bag	–	Wymienić oryginalne worki z zestawu drenów na worki transferowe 1 000 mL
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
Zestaw do transferu osocza	–	1

Tabela 6.7: Materiały wymagane do wzbogacania (ENRICHMENT 1.1)

Przygotowanie komórek (DEPLETION 2.1)		
Komórki łącznie (WBC)	≤40×10^9	>40–80×10^9
Liczba fiolek z odczynnikiem	1	2
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	2 000 mL	2 000 mL
Zestaw do transferu osocza	2	2

Tabela 6.8: Materiały wymagane do przygotowania komórek (DEPLETION 2.1)

Separacja (DEPLETION 2.1)			
Komórki znakowane	<5×10^9	5–13×10^9	>13–20×10^9
Negative Fraction Bag	–	Wymienić oryginalne worki z zestawu drenów na worki transferowe 1 000 mL	Wymienić oryginalne worki z zestawu drenów na worki transferowe 1 000 mL
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
Zestaw do transferu osocza	–	1	2

Tabela 6.9: Materiały wymagane do deplecji (DEPLETION 2.1)

▶ Przygotowanie worków

Ustalić wagę pustego worka Cell Collection Bag i worka Cell Preparation Bag zgodnie z opisem w rozdziale 7.1.1 na stronie 127.

Znakowanie magnetyczne komórek

Szczegółowy opis następnych kroków, patrz rozdział 7.1 „KROK 1: Przygotowanie komórek i znakowanie magnetyczne" na stronie 127.

▶ Analiza początkowego produktu komórkowego

▶ Przeniesienie początkowego produktu komórkowego do Cell Preparation Bag

Rozcieńczenie początkowego produktu komórkowego

Dodać bufor: Waga buforu do dodania = Waga początkowego produktu komórkowego × 2

Wirowanie

1. Wirować przy 300×g, bez hamowania, 15 minut, temperatura pokojowa (RT: od +19 do +25 °C [od +66 do +77 °F]).
2. Usunąć supernatant, aby dostosować objętość do znakowania przeciwciał pierwotnych zgodnie z zaleceniami producenta przeciwciała pierwotnego.
3. Zawiesić ponownie osad komórkowy.

Znakowanie komórek: inkubacja przy użyciu przeciwciała pierwotnego

Należy przestrzegać instrukcji używania dostarczonej przez producenta przeciwciała pierwotnego.

Usunięcie nadmiaru koniugatu (1. przemywanie)

1. Dodać bufor: Waga buforu do dodania = 600g – Waga produktu komórkowego
2. Wirować przy 300×g, bez hamowania, 15 minut, temperatura pokojowa (RT: od +19 do +25 °C [od +66 do +77 °F]).

Regulacja objętości: objętość znakowania 95 g (±5 g) (zastosowanie na normalną skalę) lub 190 g (±5 g) (zastosowanie na dużą skalę)

1. Usunąć supernatant, aby dostosować próbkę, stosując następujące równanie: osiem supernatantów do usunięcia = Waga rozcieńczonego produktu komórkowego – Objętość znakowania

   Wskazówka: Usunąć co najmniej 500 g supernatantu. Jeśli usunięty supernatant wynosi mniej niż 500 g, zaleca się przeprowadzenie łącznie dwóch kroków przemywania (zamiast tylko jednego). W przeciwnym razie usuwanie niezwiązanego odczynnika może być niewystarczające.

2. Zawiesić ponownie osad komórkowy.

Znakowanie magnetyczne komórek: inkubacja przy użyciu CliniMACS Anti-Biotin Reagent

1. Dodać 1 lub 2 fiolki CliniMACS Anti-Biotin Reagent (patrz Tabela 6.6 i Tabela 6.8). Delikatnie wymieszać zawartość.
2. Inkubować na rotatorze orbitalnym (25 rpm) przez 30 minut w RT.

- **Usunięcie nadmiaru odczynnika (2. przemywanie)**

1. Napełnić Cell Preparation Bag buforem.
2. Wirować (300×g, bez hamowania, 15 minut, RT).
3. Usunąć jak najwięcej supernatantu. **Wskazówka:** Usunąć co najmniej 500 g supernatantu. Jeśli usunięty supernatant wynosi mniej niż wartości wymienione powyżej, zaleca się przeprowadzenie łącznie dwóch kroków przemywania (zamiast tylko jednego). W przeciwnym razie usuwanie niezwiązanego odczynnika może być niewystarczające.
4. Zawiesić ponownie osad komórkowy.
5. Dostosować objętość ładowania próbki do 100 g (zastosowanie na normalną skalę) lub 200 g (zastosowanie na dużą skalę).

Wskazówka: Po usunięciu nadmiaru odczynnika pobrać próbkę do późniejszej analizy (opcjonalnie).

6.3.2 KROK 2: Wybór programu separacji

- **Włączenie aparatu CliniMACS Plus Instrument**
- **Wybór programu separacji ENRICHMENT 1.1 lub DEPLETION 2.1**
- **Wprowadzenie parametrów próbki**

Patrz rozdział 7.2.3 na stronie 142 lub 7.2.5 na stronie 149.

6.3.3 KROK 3: Instalacja zestawów przewodów CliniMACS

- **CliniMACS Tubing Set i CliniMACS Tubing Set LS**

Patrz rozdział 7.3.1 na stronie 160.

6.3.4 KROK 4: Separacja CliniMACS Plus

- **Procedura separacji**
- **Odłączenie worków i zapisanie kodu procesu**
- **Rozładowanie zestawu drenów i wyłączenie**
- **Analiza komórek**

Patrz rozdział 7.4.2 na stronie 198 i 7.4.4 na stronie 206.

6.4 Wzbogacanie komórek CD56-dodatnich

CliniMACS Plus CD56 System, w tym aparat CliniMACS Plus Instrument, odczynnik CliniMACS CD56 Reagent, zestaw drenów CliniMACS Tubing Set oraz bufor CliniMACS PBS/EDTA Buffer, jest przeznaczony do wzbogacania *in vitro* ludzkich, CD56-dodatnich komórek z heterogennych populacji komórek hematologicznych.

6.4.1 KROK 1: Przygotowanie komórek i znakowanie magnetyczne

Pierwsze wymagane działania

Wydajność aplikacji

Do 5×10^9 komórek CD56-dodatnich z komórek łącznie (WBC) do 40×10^9

⚠ PRZESTROGA

Ryzyko niewystarczającej wydajności separacji znakowanych komórek. W przypadku przekroczenia specyfikacji zastosowania istnieje ryzyko niedostatecznego znakowania swoistego. Należy użyć wymaganej ilości komórek i odczynnika zgodnie z opisem dla danego zastosowania.

Wymagane materiały CliniMACS

Materiał	Numer katalogowy	Ilość
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS CD56 Reagent	271-01	1 fiolka
CliniMACS Tubing Set	161-01	1 zestaw drenów
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	3×worek 1 000 mL[1]

1 Patrz Tabela 6.11 i Tabela 6.12. Przed użyciem uzupełnić CliniMACS PBS/EDTA Buffer o HSA do końcowego stężenia 0,5% (wag./obj.).

Tabela 6.10: Materiały CliniMACS wymagane do wzbogacania komórek CD56-dodatnich

Wymagane dodatkowe materiały

- **Cell Preparation Bag:**
  jeden worek transferowy 600 mL, nadający się do wirowania, oraz jeden łącznik miejsca pobierania próbek i jeden zestaw do przetaczania osocza, do stosowania podczas procedury przygotowania komórek
- **Plasma Waste Bag i Wash Waste Bag:**
  dwa worki transferowe 600 mL, nadające się do wirowania
- **Cell Collection Bag:**
  jeden worek transferowy 150 mL lub worek transferowy 600 mL w połączeniu z Luer/Spike Interconnector do połączenia Cell Collection Bag z zestawem drenów (patrz Tabela 6.12)

- **W przypadku konieczności wymiany worka Negative Fraction Bag i worka Buffer Waste Bag:**
  dwa worki transferowe 1 000 mL w połączeniu z dwoma łącznikami Luer/Spike Interconnector do połączenia worków z zestawem drenów (patrz Tabela 6.12)
- **W przypadku, gdy do separacji potrzebny jest więcej niż jeden litr buforu:**
  jeden zestaw do przetaczania osocza do połączenia worków na bufor (patrz Tabela 6.12)
- jeden pre-system filter
- kleszcze blokujące
- strzykawki (różnej wielkości) i igły podskórne o rozmiarze 20 gauge
- albumina surowicy ludzkiej (HSA) do dodania do CliniMACS PBS/EDTA Buffer do końcowego stężenia 0,5% (wag./obj.)
- probówki

Przegląd wymaganych materiałów

Przygotowanie komórek	
Komórki łącznie (WBC)	≤40×10^9
Liczba fiolek z odczynnikiem	1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1 000 mL
Zestaw do transferu osocza	1

Tabela 6.11: Materiały wymagane do przygotowania komórek CD56-dodatnich

Separacja		
Komórki znakowane	<2×10^9	2–5×10^9
Negative Fraction Bag	–	Wymienić oryginalne worki z zestawu drenów na worki transferowe 1 000 mL
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
Zestaw do transferu osocza	–	1

Tabela 6.12: Materiały wymagane do wzbogacania komórek CD56-dodatnich

▶ Przygotowanie worków

Ustalić wagę pustego worka Cell Collection Bag i worka Cell Preparation Bag zgodnie z opisem w rozdziale 7.1.1 na stronie 127.

Znakowanie magnetyczne komórek

Szczegółowy opis następnych kroków, patrz rozdział 7.1 „KROK 1: Przygotowanie komórek i znakowanie magnetyczne" na stronie 127.

▶ Analiza początkowego produktu komórkowego

▶ Przeniesienie początkowego produktu komórkowego do Cell Preparation Bag

▶ Rozcieńczenie początkowego produktu komórkowego

Dodać bufor: Waga buforu do dodania = 600 g – Waga początkowego produktu komórkowego

▶ Wirowanie

Wirować przy 200×g, bez hamowania, 15 minut, temperatura pokojowa (RT: od +19 do +25 °C [od +66 do +77 °F]).

▶ Regulacja objętości: objętość znakowania 95 g (±5 g)

1. Całkowicie usunąć supernatant, uważając, aby nie zawiesić ponownie osadu komórkowego.
2. Po usunięciu supernatantu ostrożnie zawiesić ponownie osad komórkowy.
3. Dostosować wagę Cell Preparation Bag (CPB) przez dodanie buforu, stosując następujące równanie: Docelowa waga napełnionego CPB = 95 g + Waga pustego CPB
4. Zawiesić ponownie komórki.

▶ Inkubacja przy użyciu CliniMACS CD56 Reagent

1. Dodać 1 fiolkę CliniMACS CD56 Reagent. Delikatnie wymieszać zawartość.
2. Inkubować na rotatorze orbitalnym (25 rpm) przez 30 minut w RT.

▶ Usunięcie nadmiaru odczynnika

1. Napełnić Cell Preparation Bag buforem.
2. Wirować (300×g, bez hamowania, 15 minut, RT).
3. Usunąć jak najwięcej supernatantu. **Wskazówka:** Usunąć co najmniej 500 g supernatantu. Jeśli usunięty supernatant wynosi mniej niż 500 g, zaleca się przeprowadzenie łącznie dwóch kroków przemywania (zamiast tylko jednego). W przeciwnym razie usuwanie niezwiązanego odczynnika może być niewystarczające.
4. Po usunięciu supernatantu ostrożnie zawiesić ponownie osad komórkowy.
5. Dostosować objętość ładowania próbki do 150 g.

Wskazówka: Po usunięciu nadmiaru odczynnika pobrać próbkę do późniejszej analizy (opcjonalnie).

6.4.2 KROK 2: Wybór programu separacji

- **Włączenie aparatu CliniMACS Plus Instrument**
- **Wybór programu separacji ENRICHMENT 1.1**
- **Wprowadzenie parametrów próbki**

Patrz rozdział 7.2.3 na stronie 142.

6.4.3 KROK 3: Instalacja zestawów przewodów CliniMACS

- **CliniMACS Tubing Set i CliniMACS Tubing Set LS**

Patrz rozdział 7.3.1 na stronie 160.

6.4.4 KROK 4: Separacja CliniMACS Plus

- **Procedura separacji**
- **Odłączenie worków i zapisanie kodu procesu**
- **Rozładowanie zestawu drenów i wyłączenie**
- **Analiza komórek**

Patrz rozdział 7.4.2 na stronie 198.

6.5 Deplecja komórek CD3-dodatnich

CliniMACS Plus CD3 System, w tym aparat CliniMACS Plus Instrument, odczynnik CliniMACS CD3 Reagent, zestaw drenów CliniMACS Tubing Set LS lub CliniMACS Depletion Tubing Set oraz bufor CliniMACS PBS/EDTA Buffer, jest przeznaczony do deplecji *in vitro* ludzkich, CD3-dodatnich komórek z heterogennych populacji komórek hematologicznych.

6.5.1 KROK 1: Przygotowanie komórek i znakowanie magnetyczne

Pierwsze wymagane działania

Wydajność aplikacji

- Zastosowanie na normalną skalę: do 15×10^9 komórek CD3 pozytywnych z komórek łącznie (WBC) do 40×10^9 przy użyciu CliniMACS Tubing Set LS lub CliniMACS Depletion Tubing Set
- Zastosowanie na dużą skalę: więcej niż 15×10^9 i do 20×10^9 komórek CD3-dodatnich z komórek łącznie (WBC) więcej niż 40×10^9 i do 80×10^9 przy użyciu CliniMACS Tubing Set LS lub więcej niż 15×10^9 i do 30×10^9 komórek CD3-dodatnich z komórek łącznie (WBC) więcej niż 40×10^9 i do 80×10^9 przy użyciu CliniMACS Depletion Tubing Set

⚠ PRZESTROGA

Ryzyko niewystarczającej wydajności separacji znakowanych komórek. W przypadku przekroczenia specyfikacji zastosowania istnieje ryzyko niedostatecznego znakowania swoistego. Należy użyć wymaganej ilości komórek i odczynnika zgodnie z opisem dla danego zastosowania.

Wymagane materiały CliniMACS

Materiał	Numer katalogowy	Ilość	Program separacji
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1	
CliniMACS CD3 Reagent	273-01	• 1 fiolka (normalna skala) • 2 fiolki (duża skala)	
CliniMACS Tubing Set LS	162-01	1 zestaw drenów	DEPLETION 2.1
CliniMACS Depletion Tubing Set	261-01	1 zestaw drenów	DEPLETION 3.1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	Do 5×worek 1 000 mL[1]	

1 Patrz Tabela 6.14 do Tabela 6.16. Przed użyciem uzupełnić CliniMACS PBS/EDTA Buffer o HSA do końcowego stężenia 0,5% (wag./obj.).

2 **Uwaga:** W przypadku dużej liczby znakowanych komórek zaleca się użycie zestawu CliniMACS Depletion Tubing Set, aby zaoszczędzić czas przetwarzania (np. 20×10^9 znakowanych komórek zostanie przetworzonych w ciągu pięciu godzin przy użyciu CliniMACS Tubing Set LS w porównaniu do dwóch godzin przy użyciu CliniMACS Depletion Tubing Set).

Tabela 6.13: Materiały CliniMACS wymagane do deplecji komórek CD3-dodatnich

Wymagane dodatkowe materiały

- **Cell Preparation Bag:**
  jeden worek transferowy 600 mL, nadające się do wirowania, oraz jeden łącznik miejsca pobierania próbek i dwa zestawy do przetaczania osocza, do stosowania podczas procedury przygotowania komórek
- **Plasma Waste Bag i Wash Waste Bag:**
  dwa worki transferowe 600 mL, nadające się do wirowania
- **Cell Collection Bag:**
  jeden do dwóch worków transferowych 600 mL w połączeniu z Luer/Spike Interconnector do połączenia Cell Collection Bag z zestawem drenów

  Jeśli dwa worki Cell Collection Bag są wymagane do separacji, należy zastosować zestaw do przetaczania osocza do połączenia obu worków. Jeden worek transferowy 600 mL jest już podłączony do CliniMACS Depletion Tubing Set (patrz Tabela 6.15 i Tabela 6.16).
- **W przypadku konieczności wymiany worka Negative Fraction Bag, Buffer Waste Bag i/lub Priming Waste Bag:**
  dwa do trzech worków transferowych 1 000 mL w połączeniu z dwoma łącznikami Luer/Spike Interconnector do połączenia worków z zestawem drenów (patrz Tabela 6.15 i Tabela 6.16)

  Wymienić Priming Waste Bag przy użyciu sterylnego łącznika drenów.
- **W przypadku, gdy do separacji potrzebny jest więcej niż jeden litr buforu:**
  jeden do dwóch zestawów do przetaczania osocza do połączenia worków na bufor (patrz Tabela 6.15 i Tabela 6.16)
- jeden pre-system filter
- kleszcze blokujące
- strzykawki (różnej wielkości) i igły podskórne o rozmiarze 20 gauge
- albumina surowicy ludzkiej (HSA) do dodania do CliniMACS PBS/EDTA Buffer do końcowego stężenia 0,5% (wag./obj.)
- immunoglobulina G klasy klinicznej
- probówki

WAŻNE

Po wprowadzeniu parametrów próbki (KROK 2), oprogramowanie CliniMACS Plus oblicza objętości, które zostaną zebrane do worka Reapplication Bag, Cell Collection Bag, Non-Target Cell Bag i Buffer Waste Bag. Jeśli objętość obliczonego płynu przekracza standardową objętość 500 mL, konieczna jest wymiana worków.

Przegląd wymaganych materiałów

Przygotowanie komórek		
Komórki łącznie (WBC)	≤40×10^9	>40–80×10^9
Komórki znakowane	≤15×10^9	>15–30×10^9
Liczba fiolek z odczynnikiem	1	2
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	2 000 mL	2 000 mL
Zestaw do transferu osocza	2	2
Objętość ładowania próbki	150 mL	250–300 mL

Tabela 6.14: Materiały wymagane do przygotowania komórek CD3-dodatnich

Separacja (DEPLETION 2.1)			
Komórki znakowane	≤5×10^9	>5–13×10^9	>13–20×10^9
Negative Fraction Bag	–	Wymienić oryginalne worki z zestawu drenów na worki transferowe 1 000 mL	Wymienić oryginalne worki z zestawu drenów na worki transferowe 1 000 mL
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
Zestaw do transferu osocza	–	1–2	3

Tabela 6.15: Materiały wymagane do deplecji komórek CD3-dodatnich (DEPLETION 2.1)

Separacja (DEPLETION 3.1)		
Komórki znakowane	<29×10^9	29–30×10^9
Non-Target Cell Bag	Wymiana worka nie jest konieczna	
Buffer Waste Bag		
Reapplication Bag		
Cell Collection Bag	–	1×600 mL (dodatkowo)
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1 000 mL	
Zestaw do transferu osocza	–	1

Tabela 6.16: Materiały wymagane do deplecji komórek CD3-dodatnich (DEPLETION 3.1)

Wskazówka: Materiały wymagane do separacji można również określić poprzez włączenie aparatu CliniMACS Plus Instrument, wybór programu separacji, który ma być zastosowany (DEPLETION 2.1 dla CliniMACS Tubing Set LS i DEPLETION 3.1 dla CliniMACS Depletion Tubing Set) i wprowadzenie parametrów próbki. Oprogramowanie CliniMACS Plus obliczy wymagane rozmiary worków do podłączenia do zestawu drenów oraz wymaganą wagę buforu.

▶ Przygotowanie worków

Ustalić wagę pustego worka Cell Collection Bag i worka Cell Preparation Bag zgodnie z opisem w rozdziale 7.1.1 na stronie 127.

Znakowanie magnetyczne komórek

Szczegółowy opis następnych kroków, patrz rozdział 7.1 „KROK 1: Przygotowanie komórek i znakowanie magnetyczne" na stronie 127.

▶ Analiza początkowego produktu komórkowego

Określić liczbę wszystkich komórek znakowanych CD3 (łącznie z nieswoistym wiązaniem CD3, nie tylko prawdziwych limfocytów T). Uwzględnić tę liczbę dla specyfikacji aplikacji i wprowadzania parametrów próbki (patrz KROK 2).

▶ Przeniesienie początkowego produktu komórkowego do Cell Preparation Bag

▶ Rozcieńczenie początkowego produktu komórkowego

Dodać bufor: Waga buforu do dodania = 600 g – Waga początkowego produktu komórkowego

▶ Wirowanie

Wirować przy 200×g, bez hamowania, 15 minut, temperatura pokojowa (RT: od +19 do +25 °C [od +66 do +77 °F]).

▶ Regulacja objętości: objętość znakowania 95 g (±5 g) (zastosowanie na normalną skalę) lub 190 g (±5 g) (zastosowanie na dużą skalę)

1. Całkowicie usunąć supernatant, uważając, aby nie zawiesić ponownie osadu komórkowego.
2. Po usunięciu supernatantu ostrożnie zawiesić ponownie osad komórkowy.
3. Dostosować wagę Cell Preparation Bag (CPB) przez dodanie buforu, stosując następujące równanie (uwzględnić wagę IgG): Docelowa waga napełnionego CPB = Objętość znakowania – Waga IgG + Waga pustego CPB
4. Zawiesić ponownie osad komórkowy.

▶ Inkubacja przy użyciu immunoglobuliny klasy klinicznej

1. Dodać IgG (1,5 mg/mL).
2. Inkubować na rotatorze orbitalnym (25 rpm) przez 5 minut w RT.

▶ Inkubacja przy użyciu CliniMACS CD3 Reagent

1. Dodać 1 lub 2 fiolki CliniMACS CD3 Reagent (patrz Tabela 6.14). Delikatnie wymieszać zawartość.
2. Inkubować na rotatorze orbitalnym (25 rpm) przez 30 minut w RT.

▶ Usunięcie nadmiaru odczynnika

1. Napełnić Cell Preparation Bag buforem.
2. Wirować (300×g, bez hamowania, 15 minut, RT).
3. Usunąć jak najwięcej supernatantu. **Wskazówka:** Usunąć co najmniej 500 g supernatantu. Jeśli usunięty supernatant wynosi mniej niż 500 g, zaleca się przeprowadzenie łącznie dwóch kroków przemywania (zamiast tylko jednego). W przeciwnym razie usuwanie niezwiązanego odczynnika może być niewystarczające.
4. Zawiesić ponownie osad komórkowy.
5. Dostosować objętość ładowania próbki do 150 g (zastosowanie na normalną skalę) lub 250–300 g (zastosowanie na dużą skalę).

6.5.2 KROK 2: Wybór programu separacji

- **Włączenie aparatu CliniMACS Plus Instrument**
- **Wybór programu separacji DEPLETION 2.1 lub DEPLETION 3.1**
  (w przypadku stosowania odpowiednio CliniMACS Tubing Set LS lub CliniMACS Depletion Tubing Set)
- **Wprowadzenie parametrów próbki**
  (zgodnie z analizą początkowego produktu komórkowego (patrz KROK 1))

Patrz rozdział 7.2.5 na stronie 149 lub 7.2.6 na stronie 154.

6.5.3 KROK 3: Instalacja zestawów przewodów CliniMACS

- **CliniMACS Tubing Set i CliniMACS Tubing Set LS**

lub

- **CliniMACS Depletion Tubing Set**

Patrz rozdział 7.3.1 na stronie 160 lub 7.3.3 na stronie 180.

6.5.4 KROK 4: Separacja CliniMACS Plus

- **Procedura separacji**
- **Odłączenie worków i zapisanie kodu procesu**
- **Rozładowanie zestawu drenów i wyłączenie**
- **Analiza komórek**

Patrz rozdział 7.4.4 na stronie 206 i 7.4.5 na stronie 210.

6.6 Deplecja komórek CD19-dodatnich

CliniMACS Plus CD19 System, w tym aparat CliniMACS Plus Instrument, odczynnik CliniMACS CD19 Reagent, zestaw drenów CliniMACS Tubing Set LS oraz bufor CliniMACS PBS/EDTA Buffer, jest przeznaczony do deplecji *in vitro* ludzkich, CD19-dodatnich komórek z heterogennych populacji komórek hematologicznych.

6.6.1 KROK 1: Przygotowanie komórek i znakowanie magnetyczne

Pierwsze wymagane działania

Wydajność aplikacji

Do 5×10^9 komórek CD19-dodatnich z komórek łącznie (WBC) do 40×10^9

⚠ PRZESTROGA

Ryzyko niewystarczającej wydajności separacji znakowanych komórek. W przypadku przekroczenia specyfikacji zastosowania istnieje ryzyko niedostatecznego znakowania swoistego. Należy użyć wymaganej ilości komórek i odczynnika zgodnie z opisem dla danego zastosowania.

Wymagane materiały CliniMACS

Materiał	Numer katalogowy	Ilość
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS CD19 Reagent	179-01	1 fiolka
CliniMACS Tubing Set LS	162-01	1 zestaw drenów
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	2×worek 1 000 mL[1]

1 Przed użyciem uzupełnić CliniMACS PBS/EDTA Buffer o HSA do końcowego stężenia 0,5% (wag./obj.).

Tabela 6.17: Materiały CliniMACS wymagane do deplecji komórek CD19-dodatnich

Wymagane dodatkowe materiały

- **Cell Preparation Bag:**
  jeden worek transferowy 600 mL, nadające się do wirowania, oraz jeden łącznik miejsca pobierania próbek i jeden zestaw do przetaczania osocza, do stosowania podczas procedury przygotowania komórek
- **Plasma Waste Bag i Wash Waste Bag:**
  dwa worki transferowe 600 mL, nadające się do wirowania
- **Cell Collection Bag:**
  jeden worek transferowy 600 mL w połączeniu z Luer/Spike Interconnector do połączenia Cell Collection Bag z zestawem drenów
- jeden pre-system filter

- kleszcze blokujące
- strzykawki (różnej wielkości) i igły podskórne o rozmiarze 20 gauge
- albumina surowicy ludzkiej (HSA) do dodania do CliniMACS PBS/EDTA Buffer do końcowego stężenia 0,5% (wag./obj.)
- probówki

▶ Przygotowanie worków

Ustalić wagę pustego worka Cell Collection Bag i worka Cell Preparation Bag zgodnie z opisem w rozdziale 7.1.1 na stronie 127.

Znakowanie magnetyczne komórek

Szczegółowy opis następnych kroków, patrz rozdział 7.1 „KROK 1: Przygotowanie komórek i znakowanie magnetyczne" na stronie 127.

▶ Analiza początkowego produktu komórkowego

▶ Przeniesienie początkowego produktu komórkowego do Cell Preparation Bag

▶ Rozcieńczenie początkowego produktu komórkowego

Dodać bufor: Waga buforu do dodania = 600 g – Waga początkowego produktu komórkowego

▶ Wirowanie

Wirować przy 200×g, bez hamowania, 15 minut, temperatura pokojowa (RT: od +19 do +25 °C [od +66 do +77 °F]).

▶ Regulacja objętości: objętość znakowania 95 g (±5 g)

1. Całkowicie usunąć supernatant, uważając, aby nie zawiesić ponownie osadu komórkowego.
2. Po usunięciu supernatantu ostrożnie zawiesić ponownie osad komórkowy.
3. Dostosować wagę Cell Preparation Bag (CPB) przez dodanie buforu, stosując następujące równanie: Docelowa waga napełnionego CPB = 95 g + Waga pustego CPB
4. Zawiesić ponownie osad komórkowy.

▶ Inkubacja przy użyciu CliniMACS CD19 Reagent

1. Dodać 1 fiolkę CliniMACS CD19 Reagent. Delikatnie wymieszać zawartość.
2. Inkubować na rotatorze orbitalnym (25 rpm) przez 30 minut w RT.

- **Usunięcie nadmiaru odczynnika**

1. Napełnić Cell Preparation Bag buforem.
2. Wirować (300×g, bez hamowania, 15 minut, RT).
3. Usunąć jak najwięcej supernatantu. **Wskazówka:** Usunąć co najmniej 500 g supernatantu. Jeśli usunięty supernatant wynosi mniej niż 500 g, zaleca się przeprowadzenie łącznie dwóch kroków przemywania (zamiast tylko jednego). W przeciwnym razie usuwanie niezwiązanego odczynnika może być niewystarczające.
4. Zawiesić ponownie osad komórkowy.
5. Dostosować objętość ładowania próbki do 100 g.

6.6.2 KROK 2: Wybór programu separacji

- **Włączenie aparatu CliniMACS Plus Instrument**
- **Wybór programu separacji DEPLETION 2.1**
- **Wprowadzenie parametrów próbki**

Patrz rozdział 7.2.5 na stronie 149.

6.6.3 KROK 3: Instalacja zestawów przewodów CliniMACS

- **CliniMACS Tubing Set i CliniMACS Tubing Set LS**

Patrz rozdział 7.3.1 na stronie 160.

6.6.4 KROK 4: Separacja CliniMACS Plus

- **Procedura separacji**
- **Odłączenie worków i zapisanie kodu procesu**
- **Rozładowanie zestawu drenów i wyłączenie**
- **Analiza komórek**

Patrz rozdział 7.4.4 na stronie 206.

6.7 Deplecja komórek CD3-dodatnich i CD19-dodatnich

CliniMACS Plus CD3/CD19 System, w tym aparat CliniMACS Plus Instrument, odczynnik CliniMACS CD3 Reagent, CliniMACS CD19 Reagent, zestaw drenów CliniMACS Depletion Tubing Set oraz bufor CliniMACS PBS/EDTA Buffer, jest przeznaczony do jednoczesnej deplecji *in vitro* ludzkich, CD3-dodatnich i ludzkich, CD19-dodatnich komórek z heterogennych populacji komórek hematologicznych.

6.7.1 KROK 1: Przygotowanie komórek i znakowanie magnetyczne

Pierwsze wymagane działania

Wydajność aplikacji

Do 15×10^9 komórek CD3-dodatnich i do 5×10^9 komórek CD19-dodatnich z komórek łącznie (WBC) do 40×10^9

⚠ PRZESTROGA

Ryzyko niewystarczającej wydajności separacji znakowanych komórek. W przypadku przekroczenia specyfikacji zastosowania istnieje ryzyko niedostatecznego znakowania swoistego. Należy użyć wymaganej ilości komórek i odczynnika zgodnie z opisem dla danego zastosowania.

Wymagane materiały CliniMACS

Materiał	Numer katalogowy	Ilość
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS CD3 Reagent	273-01	1 fiolka
CliniMACS CD19 Reagent	179-01	1 fiolka
CliniMACS Depletion Tubing Set	261-01	1 zestaw drenów
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	4×worek 1 000 mL[1]

1 Przed użyciem uzupełnić CliniMACS PBS/EDTA Buffer o HSA do końcowego stężenia 0,5% (wag./obj.).

Tabela 6.18: Materiały CliniMACS wymagane do deplecji komórek CD3-dodatnich i CD19-dodatnich

Wymagane dodatkowe materiały

- **Cell Preparation Bag:**
  jeden worek transferowy 600 mL, nadające się do wirowania, oraz jeden łącznik miejsca pobierania próbek i dwa zestawy do przetaczania osocza, do stosowania podczas procedury przygotowania komórek
- **Plasma Waste Bag i Wash Waste Bag:**
  dwa worki transferowe 600 mL, nadające się do wirowania
- **Cell Collection Bag:**
  jeden do dwóch worków transferowych 600 mL w połączeniu z Luer/Spike Interconnector do połączenia Cell Collection Bag z zestawem
- jeden pre-system filter
- kleszcze blokujące
- strzykawki (różnej wielkości) i igły podskórne o rozmiarze 20 gauge
- albumina surowicy ludzkiej (HSA) do dodania do CliniMACS PBS/EDTA Buffer do końcowego stężenia 0,5% (wag./obj.)
- immunoglobulina G klasy klinicznej
- probówki

WAŻNE

Po wprowadzeniu parametrów próbki (KROK 2), oprogramowanie CliniMACS Plus oblicza objętości, które zostaną zebrane do worka Reapplication Bag, Cell Collection Bag, Non-Target Cell Bag i Buffer Waste Bag. Jeśli objętość obliczonego płynu przekracza standardową objętość 500 mL, konieczna jest wymiana worków.

▶ Przygotowanie worków

Ustalić wagę pustego worka Cell Collection Bag i worka Cell Preparation Bag zgodnie z opisem w rozdziale 7.1.1 na stronie 127.

Znakowanie magnetyczne komórek

Szczegółowy opis następnych kroków, patrz rozdział 7.1 „KROK 1: Przygotowanie komórek i znakowanie magnetyczne" na stronie 127.

▶ Analiza początkowego produktu komórkowego

Określić liczbę wszystkich komórek znakowanych CD3 i CD19 (łącznie z nieswoistym wiązaniem CD3 i CD19, nie tylko prawdziwych limfocytów T i B). Uwzględnić tę liczbę dla specyfikacji aplikacji i wprowadzania parametrów próbki (patrz KROK 2).

▶ Przeniesienie początkowego produktu komórkowego do Cell Preparation Bag

▶ Rozcieńczenie początkowego produktu komórkowego

Dodać bufor: Waga buforu do dodania = 600 g – Waga początkowego produktu komórkowego

▶ Wirowanie

Wirować przy 200×g, bez hamowania, 15 minut, temperatura pokojowa (RT: od +19 do +25 °C [od +66 do +77 °F]).

▶ Regulacja objętości: objętość znakowania 87,5 g (±5 g)

1. Całkowicie usunąć supernatant, uważając, aby nie zawiesić ponownie osadu komórkowego.
2. Po usunięciu supernatantu ostrożnie zawiesić ponownie osad komórkowy.
3. Dostosować wagę Cell Preparation Bag (CPB) przez dodanie buforu, stosując następujące równanie (uwzględnić wagę IgG): Docelowa waga napełnionego CPB = 87,5g – Waga IgG + Waga pustego CPB
4. Zawiesić ponownie osad komórkowy.

▶ Inkubacja przy użyciu immunoglobuliny klasy klinicznej

1. Dodać IgG (1,5 mg/mL).
2. Inkubować na rotatorze orbitalnym (25 rpm) przez 5 minut w RT.

▶ Inkubacja przy użyciu CliniMACS CD3 Reagent i CliniMACS CD19 Reagent

1. Dodać 1 fiolkę odczynnika CliniMACS CD3 Reagent i 1 fiolkę odczynnika CliniMACS CD19 Reagent. Delikatnie wymieszać zawartość.
2. Inkubować na rotatorze orbitalnym (25 rpm) przez 30 minut w RT.

- **Usunięcie nadmiaru odczynnika**

1. Napełnić Cell Preparation Bag buforem.
2. Wirować (300×g, bez hamowania, 15 minut, RT).
3. Usunąć jak najwięcej supernatantu. **Wskazówka:** Usunąć co najmniej 500 g supernatantu. Jeśli usunięty supernatant wynosi mniej niż 500 g, zaleca się przeprowadzenie łącznie dwóch kroków przemywania (zamiast tylko jednego). W przeciwnym razie usuwanie niezwiązanego odczynnika może być niewystarczające.
4. Zawiesić ponownie osad komórkowy.
5. Dostosować objętość ładowania próbki do 150 g.

6.7.2 KROK 2: Wybór programu separacji

- **Włączenie aparatu CliniMACS Plus Instrument**
- **Wybór programu separacji DEPLETION 3.1**
- **Wprowadzenie parametrów próbki**
  (zgodnie z analizą początkowego produktu komórkowego (patrz KROK 1))

Patrz rozdział 7.2.6 na stronie 154.

6.7.3 KROK 3: Instalacja zestawów przewodów CliniMACS

- **CliniMACS Depletion Tubing Set**

Patrz rozdział 7.3.3 na stronie 180.

6.7.4 KROK 4: Separacja CliniMACS Plus

- **Procedura separacji**
- **Odłączenie worków i zapisanie kodu procesu**
- **Rozładowanie zestawu drenów i wyłączenie**
- **Analiza komórek**

Patrz rozdział 7.4.5 na stronie 210.

6.8 Wzbogacanie/deplecja komórek CD8-dodatnich

CliniMACS Plus CD8 System, w tym aparat CliniMACS Plus Instrument, odczynnik CliniMACS CD8 Reagent, zestaw drenów CliniMACS Tubing Set lub CliniMACS Tubing Set LS oraz bufor CliniMACS PBS/EDTA Buffer, jest przeznaczony do wzbogacania *in vitro* lub deplecji ludzkich komórek CD8-dodatnich z heterogennych populacji komórek hematologicznych.

6.8.1 KROK 1: Przygotowanie komórek i znakowanie magnetyczne

Pierwsze wymagane działania

Wydajność aplikacji

- **Wzbogacanie:** do 4×10^9 komórek znakowanych z komórek łącznie (WBC) do 40×10^9 przy użyciu zestawu drenów CliniMACS Tubing Set
- **Deplecja:** do 4×10^9 komórek znakowanych z komórek łącznie (WBC) do 40×10^9 przy użyciu CliniMACS Tubing Set LS

⚠ PRZESTROGA

Ryzyko niewystarczającej wydajności separacji znakowanych komórek. W przypadku przekroczenia specyfikacji zastosowania istnieje ryzyko niedostatecznego znakowania swoistego. Należy użyć wymaganej ilości komórek i odczynnika zgodnie z opisem dla danego zastosowania.

Wymagane materiały CliniMACS

Materiał	Numer katalogowy	Ilość	Program separacji
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1	–
CliniMACS CD8 Reagent	275-01	1 fiolka	–
CliniMACS Tubing Set	161-01	1 zestaw drenów	ENRICHMENT 1.1
CliniMACS Tubing Set LS	162-01	1 zestaw drenów	DEPLETION 2.1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	Do 3×worek 1 000 mL[1]	–

1 Patrz Tabela 6.20 do Tabela 6.22. Przed użyciem uzupełnić CliniMACS PBS/EDTA Buffer o HSA do końcowego stężenia 0,5% (wag./obj.).

Tabela 6.19: Materiały CliniMACS wymagane do wzbogacania/deplecji komórek CD8-dodatnich

Wymagane dodatkowe materiały

- **Cell Preparation Bag:**
  jeden worek transferowy 600 mL, nadające się do wirowania, oraz jeden łącznik miejsca pobierania próbek i jeden zestaw do przetaczania osocza, do stosowania podczas procedury przygotowania komórek
- **Plasma Waste Bag i Wash Waste Bag:**
  dwa worki transferowe 600 mL, nadające się do wirowania
- **Cell Collection Bag:**
  jeden worek transferowy 600 mL w połączeniu z Luer/Spike Interconnector do połączenia Cell Collection Bag z zestawem drenów (patrz Tabela 6.21 i Tabela 6.22)
- **W przypadku konieczności wymiany worka Negative Fraction Bag i worka Buffer Waste Bag:**
  dwa worki transferowe 1 000 mL w połączeniu z dwoma łącznikami Luer/Spike Interconnector do połączenia worków z zestawem drenów (patrz Tabela 6.21 i Tabela 6.22)
- **W przypadku, gdy do separacji potrzebny jest więcej niż jeden litr buforu:**
  jeden zestaw do przetaczania osocza do połączenia worków na bufor (patrz Tabela 6.21 i Tabela 6.22)
- jeden pre-system filter
- kleszcze blokujące
- strzykawki (różnej wielkości) i igły podskórne o rozmiarze 20 gauge
- albumina surowicy ludzkiej (HSA) do dodania do CliniMACS PBS/EDTA Buffer do końcowego stężenia 0,5% (wag./obj.)
- probówki

WAŻNE

Po wprowadzeniu parametrów próbki (KROK 2), oprogramowanie CliniMACS Plus oblicza objętości, które zostaną zebrane do Priming Waste Bag, Cell Collection Bag, Negative Fraction Bag i Buffer Waste Bag. Jeśli objętość obliczonego płynu przekracza standardową objętość 500 mL, konieczna jest wymiana worków zgodnie z poniższym przeglądem wymaganych materiałów.

Przegląd wymaganych materiałów

Przygotowanie komórek	
Komórki łącznie	≤40×10^9
Komórki znakowane	<4×10^9
Liczba fiolek z odczynnikiem	1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1 000 mL
Zestaw do transferu osocza	1
Objętość ładowania próbki	100 mL

Tabela 6.20: Materiały wymagane do przygotowania komórek CD8-dodatnich

Separacja (ENRICHMENT 1.1)		
Komórki znakowane	<2×10^9	2–4×10^9
Negative Fraction Bag	–	Wymienić oryginalne worki z zestawu drenów na worki transferowe 1 000 mL
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
Zestaw do transferu osocza	–	1

Tabela 6.21: Materiały wymagane do wzbogacania komórek CD8-dodatnich

Separacja (DEPLETION 2.1)	
Komórki znakowane	≤4×10^9
Negative Fraction Bag	Wymiana worka nie jest konieczna
Buffer Waste Bag	
Priming Waste Bag	
Cell Collection Bag	600 mL
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1 000 mL
Luer/Spike Interconnector	1

Tabela 6.22: Materiały wymagane do deplecji komórek CD8-dodatnich

▶ Przygotowanie worków

Ustalić wagę pustego worka Cell Collection Bag i worka Cell Preparation Bag zgodnie z opisem w rozdziale 7.1.1 na stronie 127.

Znakowanie magnetyczne komórek

Szczegółowy opis następnych kroków, patrz rozdział 7.1 „KROK 1: Przygotowanie komórek i znakowanie magnetyczne" na stronie 127.

▶ Analiza początkowego produktu komórkowego

▶ Przeniesienie początkowego produktu komórkowego do Cell Preparation Bag

▶ Rozcieńczenie początkowego produktu komórkowego

Dodać bufor: Waga buforu do dodania = 600 g – Waga początkowego produktu komórkowego × 2

▶ Wirowanie

Wirować przy 300×g, bez hamowania, 15 minut, temperatura pokojowa (RT: od +19 do +25 °C [od +66 do +77 °F]).

▶ Regulacja objętości: objętość znakowania 95 g (±5 g)

1. Całkowicie usunąć supernatant, uważając, aby nie zawiesić ponownie osadu komórkowego.
2. Po usunięciu supernatantu ostrożnie zawiesić ponownie osad komórkowy.
3. Dostosować wagę Cell Preparation Bag (CPB) przez dodanie buforu. Obliczyć wagę docelową CPB napełnionego rozcieńczonym produktem komórkowym, stosując równanie: Docelowa waga napełnionego CPB = 95 g – Waga pustego CPB
4. Zawiesić ponownie osad komórkowy.

▶ Inkubacja przy użyciu CliniMACS CD8 Reagent

1. Dodać 1 fiolkę CliniMACS CD8 Reagent. Delikatnie wymieszać zawartość.
2. Inkubować na rotatorze orbitalnym (25 rpm) przez 30 minut w RT.

▶ Usunięcie nadmiaru odczynnika

1. Napełnić Cell Preparation Bag buforem.
2. Wirować (300×g, bez hamowania, 15 minut, RT).
3. Usunąć jak najwięcej supernatantu. **Wskazówka:** Usunąć co najmniej 500 g supernatantu. Jeśli usunięty supernatant wynosi mniej niż 500 g, zaleca się przeprowadzenie łącznie dwóch kroków przemywania (zamiast tylko jednego). W przeciwnym razie usuwanie niezwiązanego odczynnika może być niewystarczające.
4. Zawiesić ponownie osad komórkowy.
5. Dostosować objętość ładowania próbki do 100 g.

6.8.2 KROK 2: Wybór programu separacji

- **Włączenie aparatu CliniMACS Plus Instrument**
- **Wybór programu separacji ENRICHMENT 1.1 lub DEPLETION 2.1**
- **Wprowadzenie parametrów próbki**

Patrz rozdział 7.2.3 na stronie 142 lub 7.2.5 na stronie 149.

6.8.3 KROK 3: Instalacja zestawów przewodów CliniMACS

- **CliniMACS Tubing Set i CliniMACS Tubing Set LS**

Patrz rozdział 7.3.1 na stronie 160.

6.8.4 KROK 4: Separacja CliniMACS Plus

- **Procedura separacji**
- **Odłączenie worków i zapisanie kodu procesu**
- **Rozładowanie zestawu drenów i wyłączenie**
- **Analiza komórek**

Patrz rozdział 7.4.2 na stronie 198 lub 7.4.4 na stronie 206.

6.9 Wzbogacanie/deplecja komórek CD25-dodatnich

CliniMACS Plus CD25 System, w tym aparat CliniMACS Plus Instrument, odczynnik CliniMACS CD25 Reagent, zestaw drenów CliniMACS Tubing Set lub CliniMACS Tubing Set LS oraz bufor CliniMACS PBS/EDTA Buffer, jest przeznaczony do wzbogacania *in vitro* lub deplecji ludzkich komórek CD25-dodatnich – najlepiej komórek o dużej ekspresji CD25 – z heterogennych populacji komórek hematologicznych.

6.9.1 KROK 1: Przygotowanie komórek i znakowanie magnetyczne

Pierwsze wymagane działania

Wydajność aplikacji

- **Wzbogacanie:** Komórki CD25 dodatnie lub o dużej ekspresji CD25: do $0{,}6\times10^9$ komórek znakowanych z komórek łącznie (WBC) do 40×10^9 przy użyciu zestawu drenów CliniMACS Tubing Set
- **Deplecja:**
  Zastosowanie na normalną skalę: do 6×10^9 komórek CD25-dodatnich z komórek łącznie (WBC) do 40×10^9 przy użyciu CliniMACS Tubing Set LS
  Zastosowanie na dużą skalę: więcej niż 6×10^9 i do 12×10^9 komórek CD25-dodatnich z więcej niż 40×10^9 i do 80×10^9 komórek łącznie (WBC) przy użyciu CliniMACS Tubing Set LS

⚠ PRZESTROGA

Ryzyko niewystarczającej wydajności separacji znakowanych komórek. W przypadku przekroczenia specyfikacji zastosowania istnieje ryzyko niedostatecznego znakowania swoistego. Należy użyć wymaganej ilości komórek i odczynnika zgodnie z opisem dla danego zastosowania.

Wymagane materiały CliniMACS

Materiał	Numer katalogowy	Ilość	Program separacji
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1	–
CliniMACS CD25 Reagent	274-01	• 1 fiolka (normalna skala) • 2 fiolki (duża skala)	–
CliniMACS Tubing Set	161-01	1 zestaw drenów	ENRICHMENT 3.2
CliniMACS Tubing Set LS	162-01	1 zestaw drenów	DEPLETION 2.1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	Do 4×worek 1 000 mL[1]	–

1 Patrz Tabela 6.24 do Tabela 6.27. Przed użyciem uzupełnić CliniMACS PBS/EDTA Buffer o HSA do końcowego stężenia 0,5% (wag./obj.).

Tabela 6.23: Materiały CliniMACS wymagane do wzbogacania/deplecji komórek CD25-dodatnich

Wymagane dodatkowe materiały

- **Cell Preparation Bag:**
  jeden worek transferowy 600 mL, nadające się do wirowania, oraz jeden łącznik miejsca pobierania próbek i jeden do dwóch zestawów do przetaczania osocza, do stosowania podczas procedury przygotowania komórek
- **Plasma Waste Bag i Wash Waste Bag:**
  dwa worki transferowe 600 mL (lub dwa 1 000 mL), nadające się do wirowania
- **Cell Collection Bag:**
  jeden worek transferowy 150 mL lub jeden do dwóch worków transferowych 600 mL w połączeniu z Luer/Spike Interconnector do połączenia Cell Collection Bag z zestawem drenów

  Jeśli dwa worki Cell Collection Bag są wymagane do separacji, należy zastosować zestaw do przetaczania osocza do połączenia obu worków (patrz Tabela 6.25 i Tabela 6.27).
- **W przypadku konieczności wymiany worka Negative Fraction Bag i worka Buffer Waste Bag:**
  dwa worki transferowe 1 000 mL w połączeniu z dwoma łącznikami Luer/Spike Interconnector do połączenia worków z zestawem drenów (patrz Tabela 6.25 i Tabela 6.27)
- **W przypadku, gdy do separacji potrzebny jest więcej niż jeden litr buforu:**
  jeden zestaw do przetaczania osocza do połączenia worków na bufor (patrz Tabela 6.25 i Tabela 6.27)
- jeden pre-system filter
- kleszcze blokujące
- strzykawki (różnej wielkości) i igły podskórne o rozmiarze 20 gauge
- albumina surowicy ludzkiej (HSA) do dodania do CliniMACS PBS/EDTA Buffer do końcowego stężenia 0,5% (wag./obj.)
- probówki

WAŻNE

Po wprowadzeniu parametrów próbki (KROK 2), oprogramowanie CliniMACS Plus oblicza objętości, które zostaną zebrane do Priming Waste Bag, Cell Collection Bag, Negative Fraction Bag i Buffer Waste Bag. Jeśli objętość obliczonego płynu przekracza standardową objętość 500 mL, konieczna jest wymiana worków zgodnie z poniższym przeglądem wymaganych materiałów.

Przegląd wymaganych materiałów

Przygotowanie komórek (ENRICHMENT 3.2)		
Aplikacja	**Wzbogacanie komórek CD25-dodatnich**	**Wzbogacanie komórek o dużej ekspresji CD25**
Komórki łącznie (WBC)	≤40×10^9	≤40×10^9
Komórki znakowane	≤0,6×10^9	≤0,6×10^9
Liczba fiolek z odczynnikiem	1	1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1 000–2 000 mL	2 000 mL
Zestaw do transferu osocza	1–2	2
Objętość znakowania	190 mL	380 mL
Temperatura znakowana	Temperatura pokojowa	Od +4 do +8 °C (+39 do +46 °F)

Tabela 6.24: Materiały wymagane do przygotowania komórek CD25-dodatnich/o dużej ekspresji (ENRICHMENT 3.2)

Separacja (ENRICHMENT 3.2)		
Aplikacja	**Wzbogacanie komórek CD25-dodatnich**	**Wzbogacanie komórek o dużej ekspresji CD25**
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1 000 mL	1 000 mL
Negative Fraction Bag	Wymiana worka nie jest konieczna	
Buffer Waste Bag		
Priming Waste Bag		
Cell Collection Bag	150 mL	150 mL
Luer/Spike Interconnector	1	1

Tabela 6.25: Materiały wymagane do wzbogacania komórek CD25-dodatnich/o dużej ekspresji (ENRICHMENT 3.2)

Przygotowanie komórek (DEPLETION 2.1)		
Komórki łącznie (WBC)	≤40×10^9	>40–80×10^9
Komórki znakowane	≤6×10^9	>6–12×10^9
Liczba fiolek z odczynnikiem	1	2
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1 000–2 000 mL	1 000–2 000 mL
Zestaw do transferu osocza	1–2	1–2
Objętość znakowania	95 mL	190 mL
Temperatura znakowana	Temperatura pokojowa	Temperatura pokojowa

Tabela 6.26: Materiały wymagane do przygotowania komórek CD25-dodatnich (DEPLETION 2.1)

Separacja (DEPLETION 2.1)		
Komórki łącznie (WBC)	≤40×10^9	>40–80×10^9
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1 000 mL dla <5×10^9 komórek znakowanych	2 000 mL dla 5–12×10^9 komórek znakowanych
Negative Fraction Bag	–	Wymienić oryginalne worki z zestawu drenów na worki transferowe 1 000 mL
Buffer Waste Bag	–	
Priming Waste Bag	–	–
Cell Collection Bag	600 mL	2×600 mL
Luer/Spike Interconnector	1	3
Zestaw do transferu osocza	–	2

Tabela 6.27: Materiały wymagane do deplecji komórek CD25-dodatnich (DEPLETION 2.1)

▶ Przygotowanie worków

Ustalić wagę pustego worka Cell Collection Bag i worka Cell Preparation Bag zgodnie z opisem w rozdziale 7.1.1 na stronie 127.

Znakowanie magnetyczne komórek

Szczegółowy opis następnych kroków, patrz rozdział 7.1 „KROK 1: Przygotowanie komórek i znakowanie magnetyczne" na stronie 127.

WAŻNE

- Bufor do przygotowania komórek do wzbogacania lub deplecji komórek CD25-dodatnich należy przechowywać w temperaturze od +19 do +25 °C (od +66 do +77 °F).
- Znakowanie magnetyczne podczas przygotowania komórek do wzbogacenia komórek o wysokiej ekspresji CD25 musi być przeprowadzone przy użyciu zimnego buforu (od +4 do +8 °C [od +39 do +46 °F]). Niższe lub wyższe temperatury mogą powodować zmniejszoną czystość oraz niższy uzysk komórek docelowych.

Analiza początkowego produktu komórkowego

Przeniesienie początkowego produktu komórkowego do Cell Preparation Bag

Rozcieńczenie początkowego produktu komórkowego

Dodać bufor: Waga buforu do dodania = Waga początkowego produktu komórkowego × 2

Wirowanie

Wirować przy 300×g, bez hamowania, 15 minut, temperatura pokojowa (RT: od +19 do +25 °C [od +66 do +77 °F]).

Regulacja objętości: objętość znakowania do

wzbogacania komórek CD25-dodatnich: 190 g (±5 g)
wzbogacania komórek o wysokiej ekspresji CD25: 380 g (±5 g)[1]
deplecji komórek CD25-dodatnich (zastosowanie na normalną skalę): 95 g
deplecji komórek CD25-dodatnich (zastosowanie na dużą skalę): 190 g

1. Całkowicie usunąć supernatant, uważając, aby nie zawiesić ponownie osadu komórkowego.
2. Po usunięciu supernatantu ostrożnie zawiesić ponownie osad komórkowy.
3. Dostosować wagę Cell Preparation Bag (CPB) przez dodanie buforu, stosując następujące równanie: Docelowa waga napełnionego CPB = Objętość znakowania + Waga pustego CPB
4. Zawiesić ponownie osad komórkowy.

Inkubacja przy użyciu CliniMACS CD25 Reagent

1. Dodać 1 lub 2 fiolki CliniMACS CD25 Reagent (patrz Tabela 6.24 i Tabela 6.26). Delikatnie wymieszać zawartość.
2. Inkubować na rotatorze orbitalnym (25 rpm):
   a) wzbogacanie lub deplecja komórek CD25-dodatnich: 30 minut przy RT
   b) wzbogacanie komórek o wysokiej ekspresji CD25: 15 minut w temperaturze od +4 do +8 °C (od +39 do +46 °F)

Usunięcie nadmiaru odczynnika

1. Napełnić Cell Preparation Bag buforem.
2. Wirować (300×g, bez hamowania, 15 minut, RT).
3. Usunąć jak najwięcej supernatantu. **Wskazówka:** Usunąć co najmniej 500 g supernatantu. Jeśli usunięty supernatant wynosi mniej niż 500 g, zaleca się przeprowadzenie łącznie dwóch kroków przemywania (zamiast tylko jednego). W przeciwnym razie usuwanie niezwiązanego odczynnika może być niewystarczające.

1 Znakowanie magnetyczne w celu wzbogacania komórek o wysokiej ekspresji CD25 musi być przeprowadzone przy użyciu zimnego buforu (od +4 do +8 °C [od +39 do +46 °F]).

4. Zawiesić ponownie osad komórkowy.
5. Dostosować objętość ładowania próbki do 100 g (zastosowanie na normalną skalę) lub 200 g (zastosowanie na dużą skalę).

6.9.2 KROK 2: Wybór programu separacji

- **Włączenie aparatu CliniMACS Plus Instrument**
- **Wybór programu separacji ENRICHMENT 3.2 lub DEPLETION 2.1**
- **Wprowadzenie parametrów próbki**
  (nie do ENRICHMENT 3.2)

Patrz rozdział 7.2.4 na stronie 147 lub 7.2.5 na stronie 149.

6.9.3 KROK 3: Instalacja zestawów przewodów CliniMACS

- **CliniMACS Tubing Set i CliniMACS Tubing Set LS**

Patrz rozdział 7.3.1 na stronie 160.

6.9.4 KROK 4: Separacja CliniMACS Plus

- **Procedura separacji**
- **Odłączenie worków i zapisanie kodu procesu**
- **Rozładowanie zestawu drenów i wyłączenie**
- **Analiza komórek**

Patrz rozdział 7.4.3 na stronie 202 lub 7.4.4 na stronie 206.

6.10 Wzbogacanie/deplecja komórek CD4-dodatnich

CliniMACS Plus CD4 System, w tym aparat CliniMACS Plus Instrument, odczynnik CliniMACS CD4 Reagent, zestaw drenów CliniMACS Tubing Set lub CliniMACS Tubing Set LS oraz bufor CliniMACS PBS/EDTA Buffer, jest przeznaczony do wzbogacania *in vitro* lub deplecji ludzkich komórek CD4-dodatnich z heterogennych populacji komórek hematologicznych.

6.10.1 KROK 1: Przygotowanie komórek i znakowanie magnetyczne

Pierwsze wymagane działania

Wydajność aplikacji

- **Wzbogacanie:** do 5×10^9 komórek znakowanych z komórek łącznie (WBC) do 40×10^9 przy użyciu zestawu drenów CliniMACS Tubing Set
- **Deplecja:** do 12×10^9 komórek znakowanych z 40×10^9 komórek łącznie (WBC) przy użyciu CliniMACS Tubing Set LS

Wskazówka: Jeśli liczba obliczonych komórek przekracza wydajność aplikacji, należy podzielić próbkę i kontynuować pracę z każdą próbką osobno, używając nowego zestawu drenów dla każdego cyklu aparatu CliniMACS Plus Instrument.

⚠ PRZESTROGA

Ryzyko niewystarczającej wydajności separacji znakowanych komórek. W przypadku przekroczenia specyfikacji zastosowania istnieje ryzyko niedostatecznego znakowania swoistego. Należy użyć wymaganej ilości komórek i odczynnika zgodnie z opisem dla danego zastosowania.

Wymagane materiały CliniMACS

Materiał	Numer katalogowy	Ilość	Program separacji
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1	–
CliniMACS CD4 Reagent	276-01	1 fiolka	–
CliniMACS Tubing Set	161-01	1 zestaw drenów	ENRICHMENT 1.1
CliniMACS Tubing Set LS	162-01	1 zestaw drenów	DEPLETION 2.1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	Do 4×worek 1 000 mL[1]	–

1 Patrz Tabela 6.29 do Tabela 6.32. Przed użyciem uzupełnić CliniMACS PBS/EDTA Buffer o HSA do końcowego stężenia 0,5% (wag./obj.).

Tabela 6.28: Materiały CliniMACS wymagane do wzbogacania/deplecji komórek CD4-dodatnich

Wymagane dodatkowe materiały

- **Cell Preparation Bag:**
  jeden worek transferowy 600 mL, nadające się do wirowania, oraz jeden łącznik miejsca pobierania próbek i jeden zestaw do przetaczania osocza, do stosowania podczas procedury przygotowania komórek
- **Plasma Waste Bag i Wash Waste Bag:**
  dwa worki transferowe 600 mL (lub dwa 1 000 mL), nadające się do wirowania
- **Cell Collection Bag:**
  jeden worek transferowy 150 mL lub jeden do dwóch worków transferowych 600 mL w połączeniu z Luer/Spike Interconnector do połączenia Cell Collection Bag z zestawem drenów

  Jeśli dwa worki Cell Collection Bag są wymagane do separacji, należy zastosować zestaw do przetaczania osocza do połączenia obu worków (patrz Tabela 6.30 i Tabela 6.32).
- **W przypadku konieczności wymiany worka Negative Fraction Bag, Buffer Waste Bag i/lub Priming Waste Bag:**
  do trzech worków transferowych 1 000 mL w połączeniu z dwoma łącznikami Luer/Spike Interconnector do połączenia worków z zestawem drenów (patrz Tabela 6.30 i Tabela 6.32)

  Wymienić Priming Waste Bag przy użyciu sterylnego łącznika drenów.
- **W przypadku, gdy do separacji potrzebny jest więcej niż jeden litr buforu:**
  jeden do dwóch zestawów do przetaczania osocza do połączenia worków na bufor (patrz Tabela 6.30 i Tabela 6.32)
- jeden pre-system filter
- kleszcze blokujące
- strzykawki (różnej wielkości) i igły podskórne o rozmiarze 20 gauge
- albumina surowicy ludzkiej (HSA) do dodania do CliniMACS PBS/EDTA Buffer do końcowego stężenia 0,5% (wag./obj.)
- probówki

WAŻNE

Po wprowadzeniu parametrów próbki (KROK 2), oprogramowanie CliniMACS Plus oblicza objętości, które zostaną zebrane do Priming Waste Bag, Cell Collection Bag, Negative Fraction Bag i Buffer Waste Bag. Jeśli objętość obliczonego płynu przekracza standardową objętość 500 mL, konieczna jest wymiana worków zgodnie z poniższym przeglądem wymaganych materiałów.

Przegląd wymaganych materiałów

Przygotowanie komórek (ENRICHMENT 1.1)	
Komórki łącznie (WBC)	≤40×10^9
Komórki znakowane	≤5×10^9
Liczba fiolek z odczynnikiem	1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1 000 mL
Zestaw do transferu osocza	1

Tabela 6.29: Materiały wymagane do przygotowanie komórek CD4-dodatnich (ENRICHMENT 1.1)

Separacja (ENRICHMENT 1.1)		
Komórki znakowane	≤2×10^9	>2–5×10^9
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1 000 mL	2 000 mL
Negative Fraction Bag	–	Wymienić oryginalne worki z zestawu drenów na worki transferowe 1 000 mL
Buffer Waste Bag	–	
Priming Waste Bag	–	–
Cell Collection Bag	150 mL	600 mL
Luer/Spike Interconnector	1	3
Zestaw do transferu osocza	–	1

Tabela 6.30: Materiały wymagane do wzbogacania komórek CD4-dodatnich (ENRICHMENT 1.1)

Przygotowanie komórek (DEPLETION 2.1)	
Komórki łącznie (WBC)	≤40×10^9
Komórki znakowane	≤12×10^9
Liczba fiolek z odczynnikiem	1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1 000 mL
Zestaw do transferu osocza	1

Tabela 6.31: Materiały wymagane do przygotowania komórek CD4-dodatnich (DEPLETION 2.1)

Separacja (DEPLETION 2.1)		
Komórki znakowane	<5×10^9	5–12×10^9
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1 000 mL	2 000 mL
Negative Fraction Bag	–	Wymienić oryginalne worki z zestawu drenów na worki transferowe 1 000 mL
Buffer Waste Bag	–	
Priming Waste Bag	–	–
Cell Collection Bag	1×600 mL	1–2×600 mL
Luer/Spike Interconnector	1	3
Zestaw do transferu osocza	–	1–2

Tabela 6.32: Materiały wymagane do deplecji komórek CD4-dodatnich (DEPLETION 2.1)

▶ Przygotowanie worków

Ustalić wagę pustego worka Cell Collection Bag i worka Cell Preparation Bag zgodnie z opisem w rozdziale 7.1.1 na stronie 127.

Znakowanie magnetyczne komórek

Szczegółowy opis następnych kroków, patrz rozdział 7.1 „KROK 1: Przygotowanie komórek i znakowanie magnetyczne" na stronie 127.

▶ Analiza początkowego produktu komórkowego

▶ Przeniesienie początkowego produktu komórkowego do Cell Preparation Bag

▶ Rozcieńczenie początkowego produktu komórkowego

Dodać bufor: Waga buforu do dodania = Waga początkowego produktu komórkowego × 2

▶ Wirowanie

Wirować przy 300×g, bez hamowania, 15 minut, temperatura pokojowa (RT: od +19 do +25 °C [od +66 do +77 °F]).

▶ Regulacja objętości: objętość znakowania 95 g (±5 g)

1. Usunąć supernatant, aby dostosować próbkę, stosując następujące równanie: Waga supernatantu do usunięcia = Waga rozcieńczonego produktu komórkowego – 95 g
2. Zawiesić ponownie osad komórkowy.

▶ Inkubacja przy użyciu CliniMACS CD4 Reagent

1. Dodać 1 fiolkę CliniMACS CD4 Reagent. Delikatnie wymieszać zawartość.
2. Inkubować na rotatorze orbitalnym (25 rpm) przez 30 minut w RT.

▶ Usunięcie nadmiaru odczynnika

1. Napełnić Cell Preparation Bag buforem.
2. Wirować (300×g, bez hamowania, 15 minut, RT).
3. Usunąć jak najwięcej supernatantu. **Wskazówka:** Usunąć co najmniej 500 g supernatantu. Jeśli usunięty supernatant wynosi mniej niż 500 g, zaleca się przeprowadzenie łącznie dwóch kroków przemywania (zamiast tylko jednego). W przeciwnym razie usuwanie niezwiązanego odczynnika może być niewystarczające.
4. Zawiesić ponownie osad komórkowy.
5. Dostosować objętość ładowania próbki do 100 g.

6.10.2 KROK 2: Wybór programu separacji

- **Włączenie aparatu CliniMACS Plus Instrument**
- **Wybór programu separacji ENRICHMENT 1.1 lub DEPLETION 2.1**
- **Wprowadzenie parametrów próbki**

Patrz rozdział 7.2.3 na stronie 142 i 7.2.5 na stronie 149.

6.10.3 KROK 3: Instalacja zestawów przewodów CliniMACS

- **CliniMACS Tubing Set i CliniMACS Tubing Set LS**

Patrz rozdział 7.3.1 na stronie 160.

6.10.4 KROK 4: Separacja CliniMACS Plus

- **Procedura separacji**
- **Odłączenie worków i zapisanie kodu procesu**
- **Rozładowanie zestawu drenów i wyłączenie**
- **Analiza komórek**

Patrz rozdział 7.4.2 na stronie 198 lub 7.4.4 na stronie 206.

6.11 Deplecja komórek CD4-dodatnich i CD8-dodatnich

CliniMACS Plus CD4/CD8 System, w tym aparat CliniMACS Plus Instrument, odczynnik CliniMACS CD4 Reagent, CliniMACS CD8 Reagent, zestaw drenów CliniMACS Tubing Set LS oraz bufor CliniMACS PBS/EDTA Buffer, jest przeznaczony do jednoczesnej deplecji *in vitro* ludzkich CD4-dodatnich i CD8-dodatnich komórek z heterogennych populacji komórek hematologicznych.

6.11.1 KROK 1: Przygotowanie komórek i znakowanie magnetyczne

Pierwsze wymagane działania

Wydajność aplikacji

Do 12×10^9 komórek CD4-dodatnich i do 4×10^9 komórek CD8-dodatnich z komórek łącznie (WBC) do 40×10^9

Wskazówka: Jeśli liczba obliczonych komórek przekracza wydajność aplikacji, należy podzielić próbkę i kontynuować pracę z każdą próbką osobno, używając nowego zestawu drenów dla każdego cyklu aparatu CliniMACS Plus Instrument.

⚠ PRZESTROGA

Ryzyko niewystarczającej wydajności separacji znakowanych komórek. W przypadku przekroczenia specyfikacji zastosowania istnieje ryzyko niedostatecznego znakowania swoistego. Należy użyć wymaganej ilości komórek i odczynnika zgodnie z opisem dla danego zastosowania.

Wymagane materiały CliniMACS

Materiał	Numer katalogowy	Ilość
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS CD4 Reagent	276-01	1 fiolka
CliniMACS CD8 Reagent	275-01	1 fiolka
CliniMACS Tubing Set LS	162-01	1 zestaw drenów
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	Do 4×worek 1 000 mL[1]

1 Patrz Tabela 6.34 i Tabela 6.35. Przed użyciem uzupełnić CliniMACS PBS/EDTA Buffer o HSA do końcowego stężenia 0,5% (wag./obj.).

Tabela 6.33: Materiały CliniMACS wymagane do deplecji komórek CD4-dodatnich i CD8-dodatnich

Wymagane dodatkowe materiały

- **Cell Preparation Bag:**
  jeden worek transferowy 600 mL, nadające się do wirowania, oraz jeden łącznik miejsca pobierania próbek i jeden zestaw do przetaczania osocza, do stosowania podczas procedury przygotowania komórek
- **Plasma Waste Bag i Wash Waste Bag:**
  dwa worki transferowe 600 mL (lub dwa 1 000 mL), nadające się do wirowania
- **Cell Collection Bag:**
  jeden do dwóch worków transferowych 600 mL w połączeniu z Luer/Spike Interconnector do połączenia Cell Collection Bag z zestawem drenów

  Jeśli dwa worki Cell Collection Bag są wymagane do separacji, należy zastosować zestaw do przetaczania osocza do połączenia obu worków (patrz Tabela 6.35).
- **W przypadku konieczności wymiany worka Negative Fraction Bag, Buffer Waste Bag i/lub Priming Waste Bag:**
  do trzech worków transferowych 1 000 mL w połączeniu z dwoma łącznikami Luer/Spike Interconnector do połączenia worków z zestawem drenów (patrz Tabela 6.35)

  Wymienić Priming Waste Bag przy użyciu sterylnego łącznika drenów.
- **W przypadku, gdy do separacji potrzebny jest więcej niż jeden litr buforu:**
  jeden do dwóch zestawów do przetaczania osocza do połączenia worków na bufor (patrz Tabela 6.35)
- jeden pre-system filter
- kleszcze blokujące
- strzykawki (różnej wielkości) i igły podskórne o rozmiarze 20 gauge
- albumina surowicy ludzkiej (HSA) do dodania do CliniMACS PBS/EDTA Buffer do końcowego stężenia 0,5% (wag./obj.)
- probówki

WAŻNE

Po wprowadzeniu parametrów próbki (KROK 2), oprogramowanie CliniMACS Plus oblicza objętości, które zostaną zebrane do Priming Waste Bag, Cell Collection Bag, Negative Fraction Bag i Buffer Waste Bag. Jeśli objętość obliczonego płynu przekracza standardową objętość 500 mL, konieczna jest wymiana worków zgodnie z poniższym przeglądem wymaganych materiałów.

Przegląd wymaganych materiałów

Przygotowanie komórek	
Komórki łącznie (WBC)	≤ 40×10^9
Komórki znakowane	≤12×10^9 komórek CD4-dodatnich i ≤4×10^9 komórek CD8-dodatnich
Liczba fiolek z odczynnikiem	1 fiolka odczynnika CliniMACS CD4 Reagent i 1 fiolka odczynnika CliniMACS CD8 Reagent
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1 000 mL
Zestaw do transferu osocza	1

Tabela 6.34: Materiały wymagane do przygotowania komórek CD4-dodatnich i CD8-dodatnich

Separacja			
Komórki znakowane	<5×10^9	5–13×10^9	>13–16×10^9
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1 000 mL	2 000 mL	3 000 mL
Negative Fraction Bag	–	Wymienić oryginalne worki z zestawu drenów na worki transferowe 1 000 mL	Wymienić oryginalne worki z zestawu drenów na worki transferowe 1 000 mL
Buffer Waste Bag	–		
Priming Waste Bag	–	–	
Cell Collection Bag	1× 600 mL	1–2× 600 mL	2× 600 mL
Luer/Spike Interconnector	1	3	3
Zestaw do transferu osocza	–	1–2	3

Tabela 6.35: Materiały wymagane do deplecji komórek CD4-dodatnich i CD8-dodatnich

▶ Przygotowanie worków

Ustalić wagę pustego worka Cell Collection Bag i worka Cell Preparation Bag zgodnie z opisem w rozdziale 7.1.1 na stronie 127.

Znakowanie magnetyczne komórek

Szczegółowy opis następnych kroków, patrz rozdział 7.1 „KROK 1: Przygotowanie komórek i znakowanie magnetyczne" na stronie 127.

▶ Analiza początkowego produktu komórkowego

▶ Przeniesienie początkowego produktu komórkowego do Cell Preparation Bag

▶ Rozcieńczenie początkowego produktu komórkowego

Dodać bufor: Waga buforu do dodania = Waga początkowego produktu komórkowego × 2

▶ Wirowanie

Wirować przy 300×g, bez hamowania, 15 minut, temperatura pokojowa (RT: od +19 do +25 °C (od +66 do +77 °F)

▶ Regulacja objętości: objętość znakowania 88 g (±5 g)

1. Usunąć supernatant, aby dostosować próbkę, stosując następujące równanie: Waga supernatantu do usunięcia = Waga rozcieńczonego produktu komórkowego – Objętość znakowania
2. Zawiesić ponownie osad komórkowy.

▶ Inkubacja przy użyciu CliniMACS CD4 Reagent i CliniMACS CD8 Reagent

1. Dodać 1 fiolkę odczynnika CliniMACS CD4 Reagent i 1 fiolkę odczynnika CliniMACS CD8 Reagent. Delikatnie wymieszać zawartość.
2. Inkubować na rotatorze orbitalnym (25 rpm) przez 30 minut w RT.

▶ Usunięcie nadmiaru odczynnika

1. Napełnić Cell Preparation Bag buforem.
2. Wirować (300×g, bez hamowania, 15 minut, RT).
3. Usunąć jak najwięcej supernatantu. **Wskazówka:** Usunąć co najmniej 500 g supernatantu. Jeśli usunięty supernatant wynosi mniej niż 500 g, zaleca się przeprowadzenie łącznie dwóch kroków przemywania (zamiast tylko jednego). W przeciwnym razie usuwanie niezwiązanego odczynnika może być niewystarczające.
4. Zawiesić ponownie osad komórkowy.
5. Dostosować objętość ładowania próbki do 100 g.

6.11.2 KROK 2: Wybór programu separacji

▶ Włączenie aparatu CliniMACS Plus Instrument

▶ Wybór programu separacji DEPLETION 2.1

▶ Wprowadzenie parametrów próbki

Patrz rozdział 7.2.5 na stronie 149.

6.11.3 KROK 3: Instalacja zestawów przewodów CliniMACS

- **CliniMACS Tubing Set i CliniMACS Tubing Set LS**

Patrz rozdział 7.3.1 na stronie 160.

6.11.4 KROK 4: Separacja CliniMACS Plus

- **Procedura separacji**
- **Odłączenie worków i zapisanie kodu procesu**
- **Rozładowanie zestawu drenów i wyłączenie**
- **Analiza komórek**

Patrz rozdział 7.4.4 na stronie 206.

6.12 Wzbogacanie komórek CD1c (BDCA-1)-dodatnich – część 1: Deplecja komórek CD19-dodatnich i znakowanie komórek CD1c (BDCA-1)-dodatnich

CliniMACS Plus CD1c (BDCA-1)-Biotin System, w tym aparat CliniMACS Plus Instrument, CliniMACS CD1c (BDCA-1)-Biotin, CliniMACS CD19 Reagent, CliniMACS Anti-Biotin Reagent, zestaw drenów CliniMACS Tubing Set LS, CliniMACS Tubing Set oraz bufor CliniMACS PBS/EDTA Buffer, jest przeznaczony do wzbogacania *in vitro* ludzkich, CD1c (BDCA-1)-dodatnich komórek z heterogennych populacji komórek hematologicznych po deplecji komórek CD19-dodatnich.

6.12.1 KROK 1: Przygotowanie komórek i znakowanie magnetyczne

Pierwsze wymagane działania

Wydajność aplikacji

Deplecja do 5×10^9 komórek CD19-dodatnich i znakowanie do $0{,}2\times10^9$ komórek CD1c (BDCA-1)-dodatnich z komórek łącznie (WBC) do 40×10^9

⚠ PRZESTROGA

Ryzyko niewystarczającej wydajności separacji znakowanych komórek. W przypadku przekroczenia specyfikacji zastosowania istnieje ryzyko niedostatecznego znakowania swoistego. Należy użyć wymaganej ilości komórek i odczynnika zgodnie z opisem dla danego zastosowania.

Wymagane materiały CliniMACS

Materiał	Numer katalogowy	Ilość
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS CD1c (BDCA-1)-Biotin	277-01	1 fiolka
CliniMACS CD19 Reagent	179-01	1 fiolka
CliniMACS Tubing Set LS	162-01	1 zestaw drenów
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	2×worek 1 000 mL[1]

1 Przed użyciem uzupełnić bufor o HSA do końcowego stężenia 0,5% (wag./obj.).

Tabela 6.36: Materiały CliniMACS wymagane do wzbogacania komórek CD1c (BDCA-1)-dodatnich (część 1)

Wymagane dodatkowe materiały (do części 1 i części 2)

- **Cell Preparation Bag:**
  dwa worki transferowe 600 mL, nadający się do wirowania, oraz dwa łączniki miejsca pobierania próbek i trzy zestawy do przetaczania osocza, do stosowania podczas procedur przygotowania komórek
- **Worki Plasma Waste Bag i worki Wash Waste Bag:**
  pięć worków transferowych 600 mL, nadających się do wirowania
- **Cell Collection Bag (Part 1):**
  jeden worek transferowy 600 mL, nadający się do wirowania, w połączeniu z Luer/Spike Interconnector do połączenia Cell Collection Bag z zestawem drenów
- **Cell Collection Bag (Part 2):**
  jeden worek transferowy 150 mL, nadające się do wirowania, w połączeniu z Luer/Spike Interconnector do połączenia worka transferowego z zestawem drenów
- dwa pre-system filters
- kleszcze blokujące
- strzykawki (różnej wielkości) i igły podskórne o rozmiarze 20 gauge
- albumina surowicy ludzkiej (HSA) do dodania do CliniMACS PBS/EDTA Buffer do końcowego stężenia 0,5% (wag./obj.)
- probówki

Znakowanie magnetyczne komórek (część 1)

Szczegółowy opis następnych kroków, patrz rozdział 7.1 „KROK 1: Przygotowanie komórek i znakowanie magnetyczne" na stronie 127.

▶ Analiza początkowego produktu komórkowego

▶ Przeniesienie początkowego produktu komórkowego do Cell Preparation Bag

▶ Rozcieńczenie początkowego produktu komórkowego

Dodać bufor: Waga buforu do dodania = Waga początkowego produktu komórkowego × 2

▶ Wirowanie

Wirować przy 200×g, bez hamowania, 15 minut, temperatura pokojowa (RT: od +19 do +25 °C [od +66 do +77 °F]).

▶ Regulacja objętości: objętość znakowania 90 g (±5 g)

1. Po usunięciu supernatantu ostrożnie zawiesić ponownie osad komórkowy.

2. Dostosować wagę Cell Preparation Bag Part 1 (CPB) przez dodanie buforu, stosując następujące równanie: Docelowa waga napełnionego CPB Part 1 = 90 g+ Waga pustego CPB
3. Zawiesić ponownie osad komórkowy.

▶ **Inkubacja przy użyciu CliniMACS CD19 Reagent i CliniMACS CD1c (BDCA-1)-Biotin**

1. Dodać 1 fiolkę odczynnika CliniMACS CD19 Reagent i 1 fiolkę CliniMACS CD1c (BDCA-1)-Biotin. Delikatnie wymieszać zawartość.
2. Inkubować na rotatorze orbitalnym (25 rpm) przez 30 minut w RT.

▶ **Usunięcie nadmiaru odczynnika**

1. Napełnić Cell Preparation Bag Part 1 buforem.
2. Wirować (300×g, bez hamowania, 15 minut, RT).
3. Usunąć jak najwięcej supernatantu. **Wskazówka:** Usunąć co najmniej 500 g supernatantu. Jeśli usunięty supernatant wynosi mniej niż 500 g, zaleca się przeprowadzenie łącznie dwóch kroków przemywania (zamiast tylko jednego). W przeciwnym razie usuwanie niezwiązanego odczynnika może być niewystarczające.
4. Zawiesić ponownie osad komórkowy.
5. Dostosować objętość ładowania próbki do 100 g.

6.12.2 KROK 2: Wybór programu separacji

▶ **Włączenie aparatu CliniMACS Plus Instrument**

▶ **Wybór programu separacji DEPLETION 2.1**

▶ **Wprowadzenie parametrów próbki**

Patrz rozdział 7.2.5 na stronie 149.

6.12.3 KROK 3: Instalacja zestawów przewodów CliniMACS

▶ **CliniMACS Tubing Set i CliniMACS Tubing Set LS**

Patrz rozdział 7.3.1 na stronie 160.

6.12.4 KROK 4: Separacja CliniMACS Plus

- **Procedura separacji**
- **Odłączenie worków i zapisanie kodu procesu**
- **Rozładowanie zestawu drenów i wyłączenie**
- **Analiza komórek**

Patrz rozdział 7.4.4 na stronie 206.

6.13 Wzbogacanie komórek CD1c (BDCA-1)-dodatnich – część 2: Flexible Labeling System

CliniMACS Plus CD1c (BDCA-1)-Biotin System, w tym aparat CliniMACS Plus Instrument, CliniMACS CD1c (BDCA-1)-Biotin, CliniMACS CD19 Reagent, CliniMACS Anti-Biotin Reagent, zestaw drenów CliniMACS Tubing Set LS, CliniMACS Tubing Set oraz bufor CliniMACS PBS/EDTA Buffer, jest przeznaczony do wzbogacania *in vitro* ludzkich, CD1c (BDCA-1)-dodatnich komórek z heterogennych populacji komórek hematologicznych po deplecji komórek CD19-dodatnich.

6.13.1 KROK 1: Przygotowanie komórek i znakowanie magnetyczne

Pierwsze wymagane działania

Wydajność aplikacji

Do $0{,}2\times10^9$ komórek CD1c (BDCA-1)-dodatnich z komórek łącznie (WBC) do 40×10^9

⚠ PRZESTROGA

Ryzyko niewystarczającej wydajności separacji znakowanych komórek. W przypadku przekroczenia specyfikacji zastosowania istnieje ryzyko niedostatecznego znakowania swoistego. Należy użyć wymaganej ilości komórek i odczynnika zgodnie z opisem dla danego zastosowania.

Wymagane materiały CliniMACS

Materiał	Numer katalogowy	Ilość
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS Anti-Biotin Reagent	173-01	1 fiolka
CliniMACS Tubing Set	161-01	1 zestaw drenów
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	3×worek 1 000 mL[1]

1 Przed użyciem uzupełnić bufor o HSA do końcowego stężenia 0,5% (wag./obj.).

Tabela 6.37: Materiały CliniMACS wymagane do wzbogacania komórek CD1c (BDCA-1)-dodatnich (część 2)

Wymagane dodatkowe materiały

Wymagane dodatkowe materiały, patrz część 1.

▶ Przygotowanie worków

Ustalić wagę pustego worka Cell Collection Bag i worka Cell Preparation Bag zgodnie z opisem w rozdziale 7.1.1 na stronie 127.

Znakowanie magnetyczne komórek (produkt komórkowy po deplecji CD19 (część 2))

Szczegółowy opis następnych kroków, patrz rozdział 7.1 „KROK 1: Przygotowanie komórek i znakowanie magnetyczne" na stronie 127.

▶ Przenieść początkowy produkt komórkowy po deplecji CD19 do Cell Preparation Bag Part 2

▶ Rozcieńczenie początkowego produktu komórkowego po deplecji CD19

Dodać bufor: Waga buforu do dodania = 600 g – Waga początkowego produktu komórkowego po deplecji CD19

▶ Wirowanie

Wirować przy 300×g, bez hamowania, 15 minut, temperatura pokojowa (RT: od +19 do +25 °C [od +66 do +77 °F]).

▶ Regulacja objętości: objętość znakowania 95 g (±5 g)

1. Usunąć supernatant, aby dostosować próbkę, stosując następujące równanie: Waga supernatantu do usunięcia = Waga rozcieńczonego produktu komórkowego – Objętość znakowania
2. Zawiesić ponownie osad komórkowy.

▶ Inkubacja przy użyciu CliniMACS Anti-Biotin Reagent

1. Dodać 1 fiolkę CliniMACS Anti-Biotin Reagent. Delikatnie wymieszać zawartość.
2. Inkubować na rotatorze orbitalnym (25 rpm) przez 30 minut w RT.

▶ Usunięcie nadmiaru odczynnika

1. Napełnić Cell Preparation Bag Part 2 buforem.
2. Wirować (300×g, bez hamowania, 15 minut, RT).
3. Usunąć jak najwięcej supernatantu.
4. Zawiesić ponownie osad komórkowy.
5. Napełnić Cell Preparation Bag Part 2 buforem.
6. Wirować (300×g, bez hamowania, 15 minut, RT).
7. Usunąć jak najwięcej supernatantu.
8. Zawiesić ponownie osad komórkowy.
9. Dostosować objętość ładowania próbki do 100 g.

6.13.2 KROK 2: Wybór programu separacji

- **Włączenie aparatu CliniMACS Plus Instrument**
- **Wybór programu separacji ENRICHMENT 3.2**

Patrz rozdział 7.2.4 na stronie 147.

6.13.3 KROK 3: Instalacja zestawów przewodów CliniMACS

- **CliniMACS Tubing Set i CliniMACS Tubing Set LS**

Patrz rozdział 7.3.1 na stronie 160.

6.13.4 KROK 4: Separacja CliniMACS Plus

- **Procedura separacji**
- **Odłączenie worków i zapisanie kodu procesu**
- **Rozładowanie zestawu drenów i wyłączenie**
- **Analiza komórek**

Patrz rozdział 7.4.3 na stronie 202.

6.14 Wzbogacanie komórek CD304 (BDCA-4)-dodatnich

CliniMACS Plus CD304 (BDCA-4) System, w tym aparat CliniMACS Plus Instrument, odczynnik CliniMACS CD304 (BDCA-4) Reagent, zestaw drenów CliniMACS Tubing Set oraz bufor CliniMACS PBS/EDTA Buffer, jest przeznaczony do wzbogacania *in vitro* ludzkich, CD304 (BDCA-4)-dodatnich komórek z heterogennych populacji komórek hematologicznych.

6.14.1 KROK 1: Przygotowanie komórek i znakowanie magnetyczne

Pierwsze wymagane działania

Wydajność aplikacji

Do $0{,}2\times10^9$ komórek CD304 (BDCA-4)-dodatnich z komórek łącznie (WBC) do 40×10^9

⚠ PRZESTROGA

Ryzyko niewystarczającej wydajności separacji znakowanych komórek. W przypadku przekroczenia specyfikacji zastosowania istnieje ryzyko niedostatecznego znakowania swoistego. Należy użyć wymaganej ilości komórek i odczynnika zgodnie z opisem dla danego zastosowania.

Wymagane materiały CliniMACS

Materiał	Numer katalogowy	Ilość
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS CD304 (BDCA-4) Reagent	278-01	1 fiolka
CliniMACS Tubing Set	161-01	1 zestaw drenów
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	4×worek 1 000 mL[1]

1 Przed użyciem uzupełnić CliniMACS PBS/EDTA Buffer o HSA do końcowego stężenia 0,5% (wag./obj.).

Tabela 6.38: Materiały CliniMACS wymagane do wzbogacania komórek CD304 (BDCA-4)-dodatnich

Wymagane dodatkowe materiały

- **Cell Preparation Bag:**
  jeden worek transferowy 600 mL, nadający się do wirowania, oraz jeden łącznik miejsca pobierania próbek i trzy zestawy do przetaczania osocza, do stosowania podczas procedur przygotowania komórek
- **Worki Plasma Waste Bag i worki Wash Waste Bag:**
  pięć worków transferowych 600 mL, nadających się do wirowania

- **Cell Collection Bag:**
  jeden worek transferowy 150 mL w połączeniu z Luer/Spike Interconnector do połączenia Cell Collection Bag z zestawem drenów
- jeden pre-system filter
- kleszcze blokujące
- strzykawki (różnej wielkości) i igły podskórne o rozmiarze 20 gauge
- albumina surowicy ludzkiej (HSA) do dodania do CliniMACS PBS/EDTA Buffer do końcowego stężenia 0,5% (wag./obj.)
- probówki

▶ Przygotowanie worków

Ustalić wagę pustego worka Cell Collection Bag i worka Cell Preparation Bag zgodnie z opisem w rozdziale 7.1.1 na stronie 127.

Znakowanie magnetyczne komórek

Szczegółowy opis następnych kroków, patrz rozdział 7.1 „KROK 1: Przygotowanie komórek i znakowanie magnetyczne" na stronie 127.

▶ Analiza początkowego produktu komórkowego

▶ Przeniesienie początkowego produktu komórkowego do Cell Preparation Bag

▶ Rozcieńczenie początkowego produktu komórkowego po deplecji

Dodać bufor: Waga buforu do dodania = 600 g – Waga początkowego produktu komórkowego

▶ Wirowanie

Wirować przy 200×g, bez hamowania, 15 minut, temperatura pokojowa (RT: od +19 do +25 °C [od +66 do +77 °F]).

▶ Powtórzyć dwukrotnie kroki „Rozcieńczenie początkowego produktu komórkowego" i „Wirowanie"

1. Napełnić jeden worek transferowy do 600 g
2. Wirować przy 300×g, bez hamowania, 15 minut, temperatura pokojowa (RT: od +19 do +25 °C [od +66 do +77 °F]).
3. Usunąć supernatant.

▶ **Regulacja objętości: objętość znakowania 95 g (±5 g)**

1. Całkowicie usunąć supernatant, uważając, aby nie zawiesić ponownie osadu komórkowego.
2. Po usunięciu supernatantu ostrożnie zawiesić ponownie osad komórkowy.
3. Dostosować wagę Cell Preparation Bag (CPB) przez dodanie buforu, stosując następujące równanie: Docelowa waga napełnionego CPB = 95 g + Waga pustego CPB
4. Zawiesić ponownie osad komórkowy.

▶ **Inkubacja przy użyciu CliniMACS CD304 (BDCA-4) Reagent**

1. Dodać 1 fiolkę CliniMACS CD304 (BDCA-4) Reagent. Delikatnie wymieszać zawartość.
2. Inkubować na rotatorze orbitalnym (25 rpm) przez 30 minut w RT.

▶ **Usunięcie nadmiaru odczynnika**

1. Napełnić Cell Preparation Bag buforem.
2. Wirować (300×g, bez hamowania, 15 minut, RT).
3. Usunąć jak najwięcej supernatantu.
4. Zawiesić ponownie osad komórkowy.
5. Dostosować objętość ładowania próbki do 100 g.

6.14.2 KROK 2: Wybór programu separacji

▶ **Włączenie aparatu CliniMACS Plus Instrument**

▶ **Wybór programu separacji ENRICHMENT 3.2**

Patrz rozdział 7.2.4 na stronie 147.

6.14.3 KROK 3: Instalacja zestawów przewodów CliniMACS

▶ **CliniMACS Tubing Set i CliniMACS Tubing Set LS**

Patrz rozdział 7.3.1 na stronie 160.

6.14.4 KROK 4: Separacja CliniMACS Plus

- **Procedura separacji**
- **Odłączenie worków i zapisanie kodu procesu**
- **Rozładowanie zestawu drenów i wyłączenie**
- **Analiza komórek**

Patrz rozdział 7.4.3 na stronie 202.

6.15 Deplecja komórek TCRα/β-dodatnich

CliniMACS Plus TCRα/β-Biotin System, w tym aparat CliniMACS Plus Instrument, CliniMACS TCRα/β-Biotin, CliniMACS Anti-Biotin Reagent, zestaw drenów CliniMACS Depletion Tubing Set oraz bufor CliniMACS PBS/EDTA Buffer, jest przeznaczony do deplecji *in vitro* ludzkich, TCRα/β-dodatnich komórek z heterogennych populacji komórek hematologicznych.

6.15.1 KROK 1: Przygotowanie komórek i znakowanie magnetyczne

Pierwsze wymagane działania

Wydajność aplikacji

Do 24×10^9 komórek TCRα/β-dodatnich z komórek łącznie (WBC) do 60×10^9

⚠ PRZESTROGA

Ryzyko niewystarczającej wydajności separacji znakowanych komórek. W przypadku przekroczenia specyfikacji zastosowania istnieje ryzyko niedostatecznego znakowania swoistego. Należy użyć wymaganej ilości komórek i odczynnika zgodnie z opisem dla danego zastosowania.

Wymagane materiały CliniMACS

Materiał	Numer katalogowy	Ilość
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS TCRα/β-Biotin	701-48	1 fiolka
CliniMACS Anti-Biotin Reagent	173-01	2 fiolki
CliniMACS Depletion Tubing Set	261-01	1 zestaw drenów
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	Do 4×worek 1 000 mL[1]

1 Przed użyciem uzupełnić CliniMACS PBS/EDTA Buffer o HSA do końcowego stężenia 0,5% (wag./obj.).

Tabela 6.39: Materiały CliniMACS wymagane do deplecji komórek TCRα/β-dodatnich

Wymagane dodatkowe materiały

- **Cell Preparation Bag:**
  jeden worek transferowy 600 mL, nadające się do wirowania, oraz jeden łącznik miejsca pobierania próbek i dwa zestawy do przetaczania osocza, do stosowania podczas procedury przygotowania komórek
- **Worki Plasma Waste Bag i worki Wash Waste Bag:**
  cztery worki transferowe 600 mL (lub dwa 1 000 mL), nadające się do wirowania
- **Cell Collection Bag:**
  Jeden worek Cell Collection Bag 600 mL jest już połączony z zestawem CliniMACS Depletion Tubing Set.
- jeden pre-system filter
- kleszcze blokujące
- strzykawki (różnej wielkości) i igły podskórne o rozmiarze 20 gauge
- albumina surowicy ludzkiej (HSA) do dodania do CliniMACS PBS/EDTA Buffer do końcowego stężenia 0,5% (wag./obj.)
- probówki

▶ Przygotowanie worków

Ustalić wagę pustego worka Cell Collection Bag i worka Cell Preparation Bag zgodnie z opisem w rozdziale 7.1.1 na stronie 127.

Znakowanie magnetyczne komórek

Szczegółowy opis następnych kroków, patrz rozdział 7.1 „KROK 1: Przygotowanie komórek i znakowanie magnetyczne" na stronie 127.

▶ Analiza początkowego produktu komórkowego

Określić odsetek/całkowitą liczbę wszystkich komórek znakowanych TCRα/β (łącznie z nieswoistym wiązaniem TCRα/β, nie tylko prawdziwych komórek TCRα/β-dodatnich). Uwzględnić tę liczbę dla specyfikacji aplikacji i wprowadzania parametrów próbki (patrz KROK 2).

▶ Przeniesienie początkowego produktu komórkowego do Cell Preparation Bag

▶ Rozcieńczanie początkowego produktu komórkowego

Dodać bufor: Waga buforu do dodania = Waga początkowego produktu komórkowego × 2

▶ Wirowanie

1. Wirować przy 200×g, bez hamowania, 15 minut, temperatura pokojowa (RT: od +19 do +25 °C [od +66 do +77 °F]).
2. Usunąć supernatant.

Regulacja objętości: objętość znakowania 95 g (±5 g)

1. Całkowicie usunąć supernatant, uważając, aby nie zawiesić ponownie osadu komórkowego.
2. Po usunięciu supernatantu ostrożnie zawiesić ponownie osad komórkowy.
3. Dostosować wagę Cell Preparation Bag (CPB) przez dodanie buforu, stosując następujące równanie: Docelowa waga napełnionego CPB = 95 g + Waga pustego CPB
4. Zawiesić ponownie osad komórkowy.

Znakowanie komórek: inkubacja przy użyciu CliniMACS TCRα/β-Biotin

1. Dodać 1 fiolkę CliniMACS TCRα/β-Biotin. Delikatnie wymieszać zawartość.
2. Inkubować na rotatorze orbitalnym (25 rpm) przez 30 minut w RT.

Usunięcie nadmiaru koniugatu: powtórzyć ten krok

1. Napełnić Cell Preparation Bag buforem.
2. Wirować (300×g, bez hamowania, 15 minut, RT).
3. Usunąć jak najwięcej supernatantu.
4. Zawiesić ponownie osad komórkowy i dostosować wagę do 190 g po drugim przemywaniu.

Znakowanie magnetyczne komórek: inkubacja przy użyciu CliniMACS Anti-Biotin Reagent

1. Dodać 2 fiolki CliniMACS Anti-Biotin Reagent. Delikatnie wymieszać zawartość.
2. Inkubować na rotatorze orbitalnym (25 rpm) przez 30 minut w RT.

Usunięcie nadmiaru odczynnika

1. Napełnić Cell Preparation Bag buforem.
2. Wirować (300×g, bez hamowania, 15 minut, RT).
3. Usunąć jak najwięcej supernatantu. **Wskazówka:** Usunąć co najmniej 500 g supernatantu. Jeśli usunięty supernatant wynosi mniej niż 500 g, zaleca się przeprowadzenie łącznie dwóch kroków przemywania (zamiast tylko jednego). W przeciwnym razie usuwanie niezwiązanego odczynnika może być niewystarczające.
4. Zawiesić ponownie osad komórkowy.
5. Dostosować objętość ładowania próbki do 150 g. Zaleca się maksymalne stężenie WBC wynoszące $0{,}4\times10^{9}$ WBC/mL.

6.15.2 KROK 2: Wybór programu separacji

- **Włączenie aparatu CliniMACS Plus Instrument**
- **Wybór programu separacji DEPLETION 3.1**
- **Wprowadzenie parametrów próbki**

Patrz rozdział 7.2.6 na stronie 154.

6.15.3 KROK 3: Instalacja zestawów przewodów CliniMACS

- **CliniMACS Depletion Tubing Set**

Patrz rozdział 7.3.3 na stronie 180.

6.15.4 KROK 4: Separacja CliniMACS Plus

- **Procedura separacji**
- **Odłączenie worków i zapisanie kodu procesu**
- **Rozładowanie zestawu drenów i wyłączenie**
- **Analiza komórek**

Patrz rozdział 7.4.5 na stronie 210.

6.16 Deplecja komórek CD45RA-dodatnich

CliniMACS Plus CD45RA System, w tym aparat CliniMACS Plus Instrument, odczynnik CliniMACS CD45RA Reagent, zestaw drenów CliniMACS Depletion Tubing Set oraz bufor CliniMACS PBS/EDTA Buffer, jest przeznaczony do deplecji *in vitro* ludzkich, CD45RA-dodatnich komórek z heterogennych populacji komórek hematologicznych.

6.16.1 KROK 1: Przygotowanie komórek i znakowanie magnetyczne

Pierwsze wymagane działania

Wydajność aplikacji

do 20×10^9 komórek CD45RA-dodatnich z komórek łącznie (WBC) do 50×10^9

⚠ PRZESTROGA

Ryzyko niewystarczającej wydajności separacji znakowanych komórek. W przypadku przekroczenia specyfikacji zastosowania istnieje ryzyko niedostatecznego znakowania swoistego. Należy użyć wymaganej ilości komórek i odczynnika zgodnie z opisem dla danego zastosowania.

Wymagane materiały CliniMACS

Materiał	Numer katalogowy	Ilość
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS CD45RA Reagent	701-46	1 fiolka
CliniMACS Depletion Tubing Set	261-01	1 zestaw drenów
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	3×worek 1 000 mL[1]

1 Przed użyciem uzupełnić CliniMACS PBS/EDTA Buffer o HSA do końcowego stężenia 0,5% (wag./obj.).

Tabela 6.40: Materiały CliniMACS wymagane do deplecji komórek CD45RA-dodatnich

Wymagane dodatkowe materiały

- **Worki Cell Preparation Bag:**
  jeden worek transferowy 600 mL, nadające się do wirowania, oraz jeden łącznik miejsca pobierania próbek i dwa zestawy do przetaczania osocza, do stosowania podczas procedury przygotowania komórek
- **Worki Plasma Waste Bag i worki Wash Waste Bag:**
  dwa worki transferowe 600 mL, nadające się do wirowania
- **Cell Collection Bag:**
  Jeden worek Cell Collection Bag 600 mL jest już połączony z zestawem CliniMACS Depletion Tubing Set.
- jeden pre-system filter
- kleszcze blokujące
- strzykawki (różnej wielkości) i igły podskórne o rozmiarze 20 gauge
- albumina surowicy ludzkiej (HSA) do dodania do CliniMACS PBS/EDTA Buffer do końcowego stężenia 0,5% (wag./obj.)
- probówki

WAŻNE

Alternatywnym początkowym źródłem komórek może być frakcja komórek innych niż docelowe z Separacji CliniMACS Plus CD34. Stosowanie odczynnika CliniMACS CD45RA Reagent jest zalecane wyłącznie w przypadku początkowych produktów komórkowych zawierających komórki CD45RA dodatnie w normalnym zakresie częstotliwości (do 80%). Wyższą częstotliwość obserwowano u kilku dawców, u których CD45RA ulega ekspresji przez prawie wszystkie PBMC z powodu rzadkiej mutacji w obrębie genu CD45. W takich przypadkach efektywność deplecji i/lub odzyskiwania może stać się niewystarczająca.

▶ Przygotowanie worków

Ustalić wagę pustego worka Cell Collection Bag i worka Cell Preparation Bag zgodnie z opisem w rozdziale 7.1.1 na stronie 127.

Znakowanie magnetyczne komórek

Szczegółowy opis następnych kroków, patrz rozdział 7.1 „KROK 1: Przygotowanie komórek i znakowanie magnetyczne" na stronie 127.

▶ Analiza początkowego produktu komórkowego

Określić odsetek/całkowitą liczbę wszystkich komórek znakowanych CD45RA (łącznie z nieswoistym wiązaniem CD45RA, nie tylko prawdziwych komórek CD45RA-dodatnich). Uwzględnić tę liczbę dla specyfikacji aplikacji i wprowadzania parametrów próbki (patrz KROK 2).

▶ Przeniesienie początkowego produktu komórkowego do Cell Preparation Bag

Rozcieńczenie początkowego produktu komórkowego po deplecji

Dodać bufor: Waga buforu do dodania = Waga początkowego produktu komórkowego × 2

Wirowanie

Wirować przy 200×g, bez hamowania, 15 minut, temperatura pokojowa (RT: od +19 do +25 °C [od +66 do +77 °F]).

Jeśli frakcja komórek innych niż docelowe z Separacji CliniMACS CD34 jest używana jako alternatywne początkowe źródło komórek, krok rozcieńczania można pominąć. Przejść do kroku wirowania i odwirować komórki przy 300×g (bez hamowania) przez 15 minut w RT.

Regulacja objętości: objętość znakowania 95 g (±5 g)

1. Całkowicie usunąć supernatant, uważając, aby nie zawiesić ponownie osadu komórkowego.
2. Po usunięciu supernatantu ostrożnie zawiesić ponownie osad komórkowy.
3. Dostosować wagę Cell Preparation Bag (CPB) przez dodanie buforu, stosując następujące równanie: Docelowa waga napełnionego CPB = 95 g + Waga pustego CPB
4. Zawiesić ponownie osad komórkowy.

Inkubacja przy użyciu CliniMACS CD45RA Reagent

1. Dodać 1 fiolkę CliniMACS CD45RA Reagent. Delikatnie wymieszać zawartość.
2. Inkubować na rotatorze orbitalnym (25 rpm) przez 30 minut w RT.

Usunięcie nadmiaru odczynnika

1. Napełnić Cell Preparation Bag buforem.
2. Wirować (300×g, bez hamowania, 15 minut, RT).
3. Usunąć jak najwięcej supernatantu. **Wskazówka:** Usunąć co najmniej 500 g supernatantu. Jeśli usunięty supernatant wynosi mniej niż 500 g, zaleca się przeprowadzenie łącznie dwóch kroków przemywania (zamiast tylko jednego). W przeciwnym razie usuwanie niezwiązanego odczynnika może być niewystarczające.
4. Zawiesić ponownie osad komórkowy.
5. Dostosować objętość ładowania próbki. Obliczyć wagę buforu niezbędną do dostosowania wagi zawiesiny komórek do około 125 g. Stężenie komórek nie powinno przekraczać $0{,}4\times10^9$ WBC/mL: Waga buforu do dodania (g)= 125 g – Waga produktu komórkowego po przemywaniu (g)

6.16.2 KROK 2: Wybór programu separacji

- **Włączenie aparatu CliniMACS Plus Instrument**
- **Wybór programu separacji DEPLETION 3.1**
- **Wprowadzenie parametrów próbki**

Patrz rozdział 7.2.6 na stronie 154.

6.16.3 KROK 3: Instalacja zestawów przewodów CliniMACS

- **CliniMACS Depletion Tubing Set**

Patrz rozdział 7.3.3 na stronie 180.

6.16.4 KROK 4: Separacja CliniMACS Plus

- **Procedura separacji**
- **Odłączenie worków i zapisanie kodu procesu**
- **Rozładowanie zestawu drenów i wyłączenie**
- **Analiza komórek**

Patrz rozdział 7.4.5 na stronie 210.

6.17 Wzbogacanie ludzkich komórek wydzielających IFN-gamma przy użyciu CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma)

CliniMACS Plus CCS (IFN-gamma) System, w tym aparat CliniMACS Plus Instrument, CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma), zestaw drenów CliniMACS Tubing Set oraz bufor CliniMACS PBS/EDTA Buffer, jest przeznaczony do wzbogacania *in vitro* ludzkich, wydzielających IFN-gamma komórek z heterogennych populacji komórek hematologicznych.

6.17.1 KROK 1: Przygotowanie komórek i znakowanie magnetyczne

Pierwsze wymagane działania

Wydajność aplikacji

komórki wydzielające IFN-gamma z komórek łącznie (WBC) do 1×10^9

⚠ PRZESTROGA

Ryzyko niewystarczającej wydajności separacji znakowanych komórek. W przypadku przekroczenia specyfikacji zastosowania istnieje ryzyko niedostatecznego znakowania swoistego. Należy użyć wymaganej ilości komórek i odczynnika zgodnie z opisem dla danego zastosowania.

Wymagane materiały CliniMACS

Materiał	Numer katalogowy	Ilość
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma)	279-01	1 zestaw
CliniMACS Tubing Set	161-01	1 zestaw drenów
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	3×worek 1 000 mL[1]

1 Przed użyciem uzupełnić CliniMACS PBS/EDTA Buffer o HSA do końcowego stężenia 0,5% (wag./obj.).

Tabela 6.41: Materiały CliniMACS wymagane do wzbogacania ludzkich komórek wydzielających IFN-gamma

WAŻNE

Bufor do przygotowania komórek przechowywać w niskiej temperaturze od +2 do +8 °C (od +36 do +46 °F). Wyższa lub niższa temperatura otoczenia może powodować zmniejszoną czystość oraz niższy uzysk komórek docelowych.

Wymagane dodatkowe materiały

- **Worki Cell Preparation Bag:**
  dwa worki transferowe 600 mL, nadające się do wirowania, oraz dwa łączniki miejsca pobierania próbek i dwa zestawy do przetaczania osocza, do stosowania podczas procedur przygotowania komórek
- **Worki Plasma Waste Bag i worki Wash Waste Bag:**
  dziewięć worków transferowych 600 mL, nadających się do wirowania
- **Medium bag:**
  osiem worków transferowych 600 mL, nadających się do wirowania
- **Cell Collection Bag (Part 2):**
  jeden worek transferowy 150 mL, nadający się do wirowania, w połączeniu z Luer/Spike Interconnector do połączenia worka transferowego z zestawem drenów
- jeden przepuszczający gaz worek 100 mL do hodowli komórek
- jeden pre-system filter
- kleszcze blokujące
- strzykawki (różnej wielkości) i igły podskórne o rozmiarze 20 gauge
- albumina surowicy ludzkiej (HSA) do dodania do CliniMACS PBS/EDTA Buffer do końcowego stężenia 0,5% (wag./obj.)
- probówki
- 120 mL surowicy AB lub alternatywnie surowicy autologicznej, jako dodatek do stosowanej pożywki
- 1 000 mL pożywki do hodowli komórek (RPMI 1640), +4 °C (+39 °F)
- 1 100 mL pożywki do hodowli komórek (RPMI 1640), +37 °C (+99 °F) uzupełnionej 10% (obj./obj.) surowicy AB lub alternatywnie surowicy autologicznej
- 500 mL pożywki do hodowli komórek (RPMI 1640), +4 °C (+39 °F) uzupełnionej 2% (obj./obj.) surowicy AB lub alternatywnie surowicy autologicznej

▶ Wymagane wyposażenie

Informacje dotyczące sprzętu wymaganego do separacji CliniMACS Plus można znaleźć w rozdziale 4.7.

Dodatkowe wyposażenie wymagane do aplikacji przy użyciu CliniMACS Plus CCS (IFN-gamma) System:

- 24-dołkowe naczynie do hodowli
- urzadzenie do separacji MiniMACS
- MS Columns
- filtr do wstępnej separacji (tylko do MS Columns)
- MACSmix Tube Rotator

▶ Przygotowanie worków

Ustalić wagę pustego worka Cell Collection Bag i worka Cell Preparation Bag zgodnie z opisem w rozdziale 7.1.1 na stronie 127.

Wskazówka: Wstępnie schłodzić wirówkę do +4 °C (+39 °F). Po fazie wydzielania potrzebny jest trzeci Cell Preparation Bag do rekombinacji zawiesin komórkowych. Dlatego jeden z czterech worków transferowych 600 mL (przygotowany z 125 mL pożywki (RPMI) uzupełnionej 10% surowicy AB) należy oznaczyć jako **Preparat komórkowy nr 3 (separacja)**.

Przygotowanie początkowego produktu komórkowego

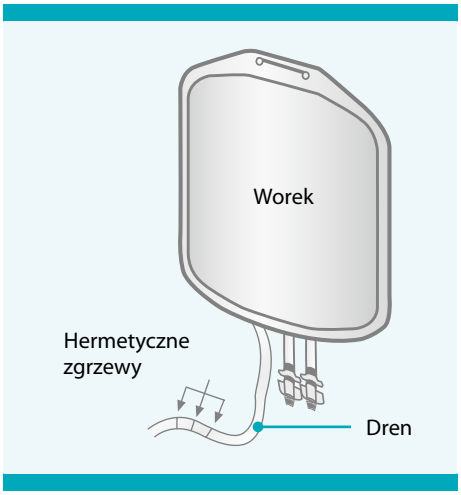
W kolejnych rozdziałach opisano zalecaną procedurę w worku do przygotowania początkowego produktu komórkowego przy użyciu sterylnego łącznika drenów.

- Operator musi być zaznajomiony z obsługą i użytkowaniem sterylnego łącznika drenów.
- Przed rozpoczęciem procedury znakowania i separacji komórek należy upewnić się, że dostępne są wszystkie potrzebne materiały i sprzęty.

Przenieść początkowy produkt komórkowy do Cell Preparation Bag nr 1

1. Przed rozpoczęciem przygotowania początkowego produktu komórkowego należy zapisać datę i godzinę rozpoczęcia.
2. Określić objętość oryginalnego początkowego produktu komórkowego, szacując 1 mL produktu oryginalnego jako równoważny 1 g (1 g ≙ 1 mL).
3. Trzymać obiema rękami worek z początkowym produktem komórkowym i dokładnie wymieszać zawartość, wykonując delikatne ruchy obrotowe.
4. Za pomocą sterylnego łącznika drenów połączyć Cell Preparation Bag nr 1 z workiem zawierającym początkowy produkt komórkowy.
5. Otworzyć kleszcze blokujące, aby przenieść odpowiednią wagę początkowego produktu komórkowego (zawierającego maksymalnie 1×10^9 komórek, zgodnie z ustaloną wcześniej częstotliwością leukocytów) do Cell Preparation Bag nr 1. Wizualnie skontrolować (poprzez monitorowanie wagi), czy odpowiednia waga została przeniesiona. Zamknąć kleszcze blokujące obok Cell Preparation Bag.

6. Zgrzać dreny i rozdzielić worki, pozostawiając co najmniej 15 cm drenu na worku Cell Preparation Bag nr 1 do dalszych połączeń (patrz Rysunek 6.1). Użyć zgrzewarki do wykonania trzech sąsiadujących ze sobą zgrzewów w drenie. Upewnić się, że zgrzewy są dokładnie wykonane. Oddzielić przy środkowym zgrzewie. Przechowywać worek, który zawierał początkowy produkt komórkowy, aż do momentu, gdy zostanie przeprowadzona separacja i ostateczna analiza wszystkich komórek.



Rysunek 6.1: Zgrzewanie worka

7. Wytarować wagę. Położyć napełniony Cell Preparation Bag nr 1 na wadze, niech dren leży na stole. Zapisać wagę napełnionego worka Cell Preparation Bag nr 1.

8. Określić wagę początkowego produktu komórkowego, odejmując wagę pustego worka Cell Preparation Bag nr 1 od wagi worka Cell Preparation Bag nr 1 napełnionego oryginalnym początkowym produktem komórkowym. Zapisać obliczoną wagę.

Waga początkowego produktu komórkowego (g)	=	Waga napełnionego Cell Preparation Bag nr 1 (g)	–	Waga pustego Cell Preparation Bag nr 1 (g)

Rozcieńczanie początkowego produktu komórkowego

Początkowy produkt komórkowy musi być rozcieńczony pożywką hodowlaną. Rozcieńczyć produkt zimną pożywką (od +2 do +8 °C [od +36 do +46 °F]) do całkowitej objętości 500 mL. Obliczyć wagę pożywki do dodania, stosując następujące równanie, i zapisać ją.

Waga pożywki do dodania (g)	=	500 g	–	Waga rozcieńczonego początkowego produktu komórkowego (g)

1. Wziąć jeden z worków Medium Bag i połączyć go z workiem Cell Preparation Bag nr 1 za pomocą sterylnego łącznika drenów.

2. Umieścić na wadze worek Cell Preparation Bag nr 1 i wytarować wagę. Zawiesić Medium Bag na wieszaku na worek.

3. Otworzyć kleszcze blokujące obok Cell Preparation Bag Nr 1. Kontrolując wzrokowo skalę na wadze, przenieść obliczoną wagę pożywki do worka Cell Preparation Bag nr 1.

4. Po przeniesieniu odpowiedniej wagi pożywki zamknąć kleszcze blokujące obok Cell Preparation Bag nr 1, aby zatrzymać przepływ płynu.

5. Używając zgrzewarki, zgrzać dreny, pozostawiając co najmniej 15 cm drenu na worku Cell Preparation Bag nr 1 do dalszych połączeń. Odłączyć Medium Bag.

6. Trzymać obiema rękami Cell Preparation Bag nr 1 i dokładnie wymieszać zawartość, wykonując delikatne ruchy obrotowe. Unikać intensywnego mieszania komórek.
7. Wytarować wagę i zważyć napełniony worek Cell Preparation Bag nr 1. Zapisać wagę.
8. Określić wagę rozcieńczonego początkowego produktu komórkowego, odejmując wagę pustego worka Cell Preparation Bag nr 1 od wagi napełnionego worka Cell Preparation Bag nr 1. Zapisać obliczoną wagę.

Waga rozcieńczonego początkowego produktu komórkowego (g)	=	Waga napełnionego Cell Preparation Bag nr 1 (g)	–	Waga pustego Cell Preparation Bag nr 1 (g)

⚠ OSTRZEŻENIE

Ryzyko zanieczyszczenia. Jeśli worki nie nadają się do przygotowania komórek i nie są prawidłowo umieszczone w koszu wirówki, istnieje ryzyko zanieczyszczenia wskutek uszkodzenia worka. Używać odpowiednich worków, złożyć wszelkie luźne części worków lub drenów w dół, uważając, aby nie naruszyć integralności worka, i umieścić worki bezpiecznie w koszu wirówki.

⚠ PRZESTROGA

Ryzyko mniejszej wydajności separacji komórek. Jeśli worki nie zostaną prawidłowo umieszczone w koszu wirówki, istnieje ryzyko utraty komórek podczas usuwania supernatantu. Złożyć wszelkie luźne części worków lub drenów w dół i umieścić worki bezpiecznie w koszu wirówki.

Wirowanie

1. Używając sterylnego łącznika drenów, połączyć pusty worek Plasma Waste Bag nr 1 z workiem Cell Preparation Bag nr 1.
2. Złożyć wszelkie luźne części worka Cell Preparation Bag nr 1 lub drenów w dół. Umieścić oba worki bezpiecznie w koszu wirówki.
3. Zrównoważyć załadowany kosz odpowiednim obciążonym koszem. Ważne jest, aby wirówka była dokładnie wyważona.
4. Odwirowywać komórki przy 200×g (bez hamowania) przez 10 minut w temperaturze pokojowej (od +19 do +25 °C [od +66 do +77 °F]).
5. Wyjąć worki z wirówki, uważając, aby nie naruszyć osadu komórkowego. Załadować Cell Preparation Bag nr 1 na ekstraktor osocza.
6. Otworzyć kleszcze blokujące obok Cell Preparation Bag Nr 1. Całkowicie usunąć supernatant, uważając, aby nie zawiesić ponownie osadu komórkowego podczas usuwania supernatantu. Po usunięciu supernatantu zamknąć kleszcze blokujące obok Cell Preparation Bag nr 1, aby zatrzymać przepływ płynu.

7. Używając zgrzewarki, zgrzać dreny, pozostawiając co najmniej 15 cm drenu na worku Cell Preparation Bag nr 1 do dalszych połączeń. Odłączyć Plasma Waste Bag nr 1.
8. Powtórzyć rozcieńczanie i wirowanie, używając drugiego Medium Bag i worka Plasma Waste Bag nr 2.
9. Przechowywać worki Plasma Waste Bag aż do momentu, gdy zostanie przeprowadzona separacja i ostateczna analiza wszystkich komórek.

Regulacja objętości

1. Do restymulacji komórek *in vitro* należy dostosować objętość próbki komórek do 100 mL. Po usunięciu supernatantu ostrożnie zawiesić ponownie osad.
2. Dostosować wagę Cell Preparation Bag nr 1 przez dodanie pożywki hodowlanej. Obliczyć wagę pożywki do dodania, stosując następujące równanie:

Waga napełnionego Cell Preparation Bag nr 1 po regulacji objętości (g)	=	100 g	+	Waga pustego Cell Preparation Bag nr 1 (g)

3. Za pomocą sterylnego łącznika drenów połączyć Cell Preparation Bag nr 1 z przygotowanym Medium Bag 10% (zawierającym 600 mL podgrzanej wcześniej pożywki hodowlanej, uzupełnionej 10% surowicy AB). Zawiesić Medium Bag 10% na wieszaku na worek.
4. Wytarować wagę. Umieścić na wadze worek Cell Preparation Bag nr 1 z osadem komórkowym.
5. Otworzyć kleszcze blokujące obok Cell Preparation Bag Nr 1. Napełnić Cell Preparation Bag nr 1 pożywką, aż do osiągnięcia obliczonej „Wagi napełnionego Cell Preparation Bag nr 1 po regulacji objętości". Zamknąć kleszcze blokujące obok Cell Preparation Bag nr 1, aby zatrzymać przepływ płynu.
6. Używając zgrzewarki, zgrzać dreny, pozostawiając co najmniej 15 cm drenu na worku Cell Preparation Bag do dalszych połączeń. Odłączyć Medium Bag 10%.
7. Za pomocą sterylnego łącznika drenów połączyć napełniony worek Cell Preparation Bag nr 1 z przepuszczającym gaz workiem 100 mL do hodowli. Otworzyć kleszcze blokujące obok Cell Preparation Bag nr 1 i całkowicie przenieść zawartość.

⚠ PRZESTROGA

Ryzyko mniejszej wydajności. Jeśli worki nie nadają się do przygotowania komórek, istnieje ryzyko zanieczyszczenia wskutek uszkodzenia worka. Używać przepuszczających gaz worków do hodowli, nadających się do przygotowania komórek.

Znakowanie komórek

Jeden CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma), składający się z dwóch fiolek (po 7,5 mL), jest gotowy do użycia i wystarczający do jednej aplikacji zgodnie z opisem poniżej. Odczynniki nie są przeznaczone do podawania pozajelitowego.

Próbka docelowa i próbka kontrolna

Protokół opisuje procedurę znakowania „próbki docelowej" i „próbki kontrolnej". Obie próbki są przetwarzane równolegle, przy czym próbka kontrolna jest traktowana dokładnie tak samo jak próbka docelowa, ale bez dodatku antygenu. Z tego powodu analiza próbki kontrolnej dostarcza informacji o spontanicznym wydzielaniu cytokin.

Restymulacja *in vitro*

WAŻNE

- Mała negatywna próbka kontrolna (próbka kontrolna), traktowana dokładnie tak samo jak próbka docelowa stymulowana antygenem, ale bez dodatku antygenu, powinna być dołączona jako miara spontanicznego wydzielania cytokin.
- Do restymulacji *in vitro* optymalna gęstość komórek wynosi 0,5-1×10^9 komórek/cm^2 i 1×10^9 komórek/mL.

1. Sterylną strzykawką (1 mL) z igłą o rozmiarze 20 gauge pobrać małą porcję (np. 1 mL = ok. 1×10^9 komórek) komórek, które posłużą jako **próbka kontrolna (niestymulowana)**.
2. Pobraną próbkę hodować w optymalnych warunkach w jednym dołku 24-dołkowego naczynia hodowlanego.
3. Przez jeden z portów strzykawką wstrzyknąć antygen do komórek w przepuszczającym gaz worku do hodowli komórek **(próbka docelowa)** w określonym stężeniu.
4. Inkubować obie próbki w temperaturze +37 °C (+99 °F) i 5-7,5% CO^2 przez odpowiedni czas w inkubatorze. W przypadku stosowania białek lub lizatów komórkowych jako antygenów czas inkubacji wynosi od 4 do 16 godzin. W przypadku peptydów czas inkubacji wynosi od 3 do 6 godzin. Ponieważ na optymalny czas stymulacji wpływają konkretne właściwości antygenu, firma Miltenyi Biotec zaleca przeprowadzenie specjalnych procedur walidacyjnych w celu uzyskania najlepszego wyniku.

Znakowanie przy użyciu CliniMACS IFN-gamma Catchmatrix Reagent

Zapisać numer serii i termin ważności CliniMACS IFN-gamma Catchmatrix Reagent.

Próbka docelowa

WAŻNE

Do fazy wydzielania wybrane naczynie musi mieć odpowiednią wielkość, aby umożliwić dodanie co najmniej 1 objętości zimnego buforu na koniec fazy wydzielania. Gęstość komórek nie może przekraczać 1×10^6 komórek/mL. Dlatego do wydzielania należy inkubować 1×10^9 komórek w łącznie 1000 mL ciepłej pożywki hodowlanej.

1. Za pomocą sterylnego łącznika drenów połączyć worek do hodowli z workiem Cell Preparation Bag nr 2 (wydzielanie) i przenieść komórki. Zapewnić całkowite przeniesienie komórek do Cell Preparation Bag nr 2. Zamknąć kleszcze blokujące obok Cell Preparation Bag nr 2, aby zatrzymać przepływ płynu.
2. Użyć zgrzewarki do zgrzania drenów, pozostawiając co najmniej 15 cm drenu na worku Cell Preparation Bag nr 2 do dalszych połączeń. Odłączyć pusty worek do hodowli.
3. Za pomocą sterylnego łącznika drenu połączyć przygotowany Medium Bag 2% (zawierający 500 mL zimnego (od +2 do +8 °C [od +36 °F do +46 °F]) pożywki hodowlanej uzupełnionej 2% surowicą AB) z Cell Preparation Bag nr 2.
4. Otworzyć kleszcze blokujące obok Cell Preparation Bag Nr 2. Napełnić Cell Preparation Bag nr 2 do 600 mL. Po przeniesieniu odpowiedniej wagi pożywki zamknąć kleszcze blokujące obok Cell Preparation Bag nr 2, aby zatrzymać przepływ płynu.
5. Użyć zgrzewarki do zgrzania drenów, pozostawiając co najmniej 15 cm drenu na worku Cell Preparation Bag nr 2 do dalszych połączeń. Odłączyć Medium Bag 2%.
6. Zgrzewarką połączyć pusty Wash Waste Bag nr 1 z workiem Cell Preparation Bag nr 2.
7. Złożyć wszelkie luźne części worka lub drenów w dół. Umieścić oba worki bezpiecznie w koszu wirówki.
8. Zrównoważyć załadowany kosz odpowiednio obciążonym koszem. Ważne jest, aby wirówka była dokładnie wyważona.
9. Odwirowywać komórki przy 300×g (bez hamowania) przez 10 minut w temperaturze od +4 do +8 °C (od +39 do +46 °F).
10. Umieścić worek Cell Preparation Bag nr 2 na ekstraktorze osocza. Otworzyć kleszcze blokujące obok Cell Preparation Bag Nr 2. Całkowicie usunąć supernatant, uważając, aby nie naruszyć osadu komórkowego. Zamknąć kleszcze blokujące obok Cell Preparation Bag nr 2, aby zatrzymać przepływ płynu.

11. Użyć zgrzewarki do zgrzania drenów, pozostawiając co najmniej 15 cm drenu na worku Cell Preparation Bag nr 2 do dalszych połączeń. Odłączyć Wash Waste Bag nr 1.
12. Po usunięciu supernatantu zawiesić ponownie osad komórkowy w pozostałej objętości.
13. Podłączyć łącznik miejsca pobierania próbek do worka Cell Preparation Bag nr 2 i zdezynfekować przegrodę. Odpowiednią sterylną strzykawką i igłą usunąć 7,425 mL z fiolki z CliniMACS IFN-gamma Catchmatrix Reagent. Do usunięcia zawartości jednej fiolki z odczynnikiem wystarczy strzykawka o pojemności 10 mL. Strzykawka powinna być wyposażona w igłę o rozmiarze 20 gauge.
14. Trzymać obiema rękami Cell Preparation Bag nr 2 i dokładnie wymieszać zawartość, wykonując delikatne ruchy obrotowe.
15. Korzystając z portu iniekcyjnego na łączniku miejsca pobierania próbek, wstrzyknąć całą objętość odczynnika do worka Cell Preparation Bag nr 2. Należy uważać, aby nie przekłuć worka.
16. Zawiesić ponownie komórki i inkubować je przez 5 minut na lodzie. Zapisać czas inkubacji.

Próbka kontrolna (niestymulowana)

1. Przenieść komórki do zamykanej probówki 15 mL.
2. Dodać zimną (od +2 do +8 °C [od +36 do +46 °F]) pożywkę hodowlaną uzupełnioną 2% surowicą AB do 15 mL.
3. Odwirowywać komórki przy 300×g (bez hamowania) przez 10 minut w temperaturze od +4 do +8 °C (od +39 do +46 °F) i ostrożnie usunąć całkowicie supernatant.
4. Zawiesić ponownie osad komórkowy w 100 µl zimnej (od +2 do +8 °C [od +36 do +46 °F]) pożywki hodowlanej uzupełnionej 2% surowicy AB.
5. Dodać pozostałe 75 µl CliniMACS IFN-gamma Catchmatrix Reagent i inkubować zawiesinę przez 5 minut na lodzie.

Faza wydzielania

Próbka docelowa

1. Wziąć cztery wstępnie napełnione worki transferowe (w tym oznaczony Cell Preparation Bag nr 3) zawierające 125 mL ciepłej (+37 °C [+99 °F]) pożywki hodowlanej uzupełnionej 10% surowicy AB.
2. Za pomocą sterylnego łącznika drenów połączyć Cell Preparation Bag nr 2 z przygotowanym Medium Bag 10% (zawierającym podgrzaną wcześniej (+37 °C [+99 °F]) pożywkę hodowlaną, uzupełnioną 10% surowicy AB).
3. Do próbki komórek w Cell Preparation Bag nr 2 dodać 500 mL podgrzanej wcześniej pożywki hodowlanej. Natychmiast rozpocząć odmierzanie czasu inkubacji 45 minut.

4. Rozprowadzić 125 mL powstałej zawiesiny komórkowej w każdym z czterech worków transferowych poprzez seryjne podłączenie worków transferowych do Cell Preparation Bag nr 2 za pomocą sterylnego łącznika drenów. Kontrolując wzrokowo skalę na wadze, przenieść odpowiednią wagę zawiesiny komórkowej. W wyniku tej procedury w każdym z czterech worków transferowych znajduje się 250 g zawiesiny komórkowej. Po transferze należy zgrzać zgrzewarką dreny, aby odłączyć worki transferowe.
5. Inkubować komórki w temperaturze +37 °C (+99 °F) przez resztę 45 minut z ciągłym wolnym obrotem (maks. 50 obr/min) do końca czasu inkubacji. Zapisać czas inkubacji.
6. Wziąć zestaw do przetaczania osocza i upewnić się, że zacisk jest w pozycji zamkniętej. Włożyć kolec zestawu do przetaczania osocza do portu worka na bufor.
7. Po 45 minutach połączyć worek na bufor z workiem Cell Preparation Bag nr 3 za pomocą sterylnego łącznika drenów. Dodać zimny (od +2 do +8 °C [od +36 do +46 °F]) bufor do każdego z czterech worków transferowych (co najmniej jedna objętość, tzn. po 250 mL) poprzez seryjne dołączanie worków transferowych do worka na bufor. Umożliwić schłodzenie komórek, umieszczając worki na 10 minut na lodzie.
8. Za pomocą sterylnego łącznika drenów podłączyć jeden Wash Waste Bag (Wash Waste Bag nr 2 do 5) do każdego z czterech worków transferowych.
9. Odwirowywać komórki przy 300×g (bez hamowania) przez 10 minut w temperaturze +4 °C (+39 °F). Za pomocą ekstraktora osocza całkowicie usunąć supernatant ze wszystkich worków.
10. Zgrzewarką zgrzać dreny każdego z worków. Odłączyć worki Wash Waste Bag.
11. Wziąć zestaw do przetaczania osocza i upewnić się, że zacisk jest w pozycji zamkniętej. Włożyć kolec zestawu do przetaczania osocza do portu worka na bufor.
12. Używając sterylnego łącznika drenów, połączyć worek na bufor z workiem Cell Preparation Bag nr 3.
13. Przesunąć zacisk na zestawie do przetaczania osocza w pozycję otwartą i napełnić Cell Preparation Bag nr 3 200 mL buforu.
14. Po przeniesieniu odpowiedniej wagi buforu przesunąć zacisk na zestawie do przetaczania osocza w pozycję zamkniętą, aby zatrzymać przepływ płynu.
15. Używając zgrzewarki, zgrzać dreny, pozostawiając co najmniej 15 cm drenu na worku Cell Preparation Bag nr 3. Odłączyć worek na bufor.
16. Za pomocą sterylnego łącznika drenów podłączyć jeden z pozostałych trzech worków transferowych zawierających komórki do worka Cell Preparation Bag nr 3 i ponownie połączyć obie zawiesiny.

WAŻNE

Podzielone próbki należy ponownie połączyć w Cell Preparation Bag nr 3 przed odwirowaniem.

17. Powtarzać tę procedurę, aż zawiesiny komórek ze wszystkich czterech worków transferowych zostaną połączone w worku Cell Preparation Bag nr 3.
18. Po ponownym połączeniu komórek połączyć worek na bufor z workiem Cell Preparation Bag nr 3 za pomocą sterylnego łącznika drenów.
19. Przesunąć zacisk na zestawie do przetaczania osocza w pozycję otwartą. Napełnić Cell Preparation Bag buforem do 500 mL.
20. Po przeniesieniu odpowiedniej wagi buforu przesunąć zacisk na zestawie do przetaczania osocza w pozycję zamkniętą, aby zatrzymać przepływ płynu. Otworzyć kleszcze blokujące obok Cell Preparation Bag nr 3.
21. Używając zgrzewarki, zgrzać dreny między obydwoma zaciskami, pozostawiając co najmniej 15 cm drenu na worku Cell Preparation Bag nr 3 do dalszych połączeń. Odłączyć worek na bufor.
22. Używając sterylnego łącznika drenów, połączyć pusty worek Wash Waste Bag nr 6 z workiem Cell Preparation Bag nr 3.
23. Złożyć wszelkie luźne części worka Cell Preparation Bag nr 3 lub drenów w dół. Umieścić oba worki bezpiecznie w koszu wirówki.
24. Zrównoważyć załadowany kosz odpowiednio obciążonym koszem. Ważne jest, aby wirówka była dokładnie wyważona.
25. Odwirowywać komórki przy 300×g (bez hamowania) przez 10 minut w temperaturze +4 °C (+39 °F).

Próbka kontrolna (niestymulowana)

1. Dodać ciepłą (+37 °C [+99 °F]) pożywkę hodowlaną uzupełnioną 10% surowicą AB, aby rozcieńczyć próbkę do maksimum 1×10^6 komórek/mL, tzn. do uzyskania 1×10^9 komórek należy użyć całkowitej objętości 10 mL.
2. Inkubować komórki w zamkniętej probówce przez 45 minut w temperaturze +37 °C (+99 °F) przy powolnym ciągłym obracaniu przy użyciu MACSmix Tube Rotator (maks. 50 obr./min).
3. Po 45 minutach napełnić probówkę zimnym (+4 °C [+39 °F]) buforem i umieścić probówkę na lodzie na 5-10 minut.
4. Odwirowywać komórki przy 300×g (bez hamowania) przez 10 minut w temperaturze od +4 do +8 °C (od +39 do +46 °F).

Znakowanie magnetyczne przy użyciu CliniMACS IFN-gamma Enrichment Reagent

Zapisać numer serii i termin ważności CliniMACS IFN-gamma Enrichment Reagent.

Próbka docelowa

1. Po kroku wirowania ostrożnie usunąć supernatant, używając ekstraktora osocza w sposób opisany powyżej i ponownie zawiesić w pozostałej objętości. Zamknąć kleszcze blokujące obok Cell Preparation Bag nr 3 po usunięciu.

2. Użyć zgrzewarki do zgrzania drenów, pozostawiając co najmniej 15 cm drenu na worku Cell Preparation Bag nr 3 do dalszych połączeń. Odłączyć Wash Waste Bag nr 6.

3. Podłączyć łącznik miejsca pobierania próbek do worka Cell Preparation Bag nr 3 i zdezynfekować przegrodę. Odpowiednią sterylną strzykawką i igłą usunąć 7,425 mL z fiolki z CliniMACS IFN-gamma Enrichment Reagent. Do usunięcia zawartości jednej fiolki z odczynnikiem wystarczy strzykawka o pojemności 10 mL. Strzykawka powinna być wyposażona w igłę o rozmiarze 20 gauge.

4. Korzystając z portu iniekcyjnego na łączniku miejsca pobierania próbek, wstrzyknąć odczynnik do worka Cell Preparation Bag nr 3. Należy uważać, aby nie przekłuć worka. Natychmiast zacząć liczyć czas inkubacji wynoszący 15 minut. Zapisać czas rozpoczęcia inkubacji.

5. Trzymać obiema rękami Cell Preparation Bag i dokładnie wymieszać zawartość, wykonując delikatne ruchy obrotowe.

6. Inkubować komórki przez 15 minut na lodzie. Zapisać czas zakończenia inkubacji.

7. Używając sterylnego łącznika drenów, połączyć worek na bufor z workiem Cell Preparation Bag nr 3.

8. Otworzyć kleszcze blokujące obok Cell Preparation Bag Nr 3. Przesunąć zacisk na zestawie do przetaczania osocza w pozycję otwartą. Napełnić Cell Preparation Bag nr 3 do 500 mL zimnym (od +2 do +8 °C [od +36 do +46 °F]) buforem.

9. Po przeniesieniu odpowiedniej wagi buforu przesunąć zacisk na zestawie do przetaczania osocza w pozycję zamkniętą. Otworzyć kleszcze blokujące obok Cell Preparation Bag nr 3. Zgrzewarką zgrzać dreny między obydwoma zaciskami. Odłączyć worek na bufor.

10. Używając sterylnego łącznika drenów, połączyć pusty worek Wash Waste Bag nr 7 z workiem Cell Preparation Bag nr 3.

11. Złożyć wszelkie luźne części worka lub drenów w dół. Umieścić oba worki bezpiecznie w koszu wirówki.

12. Zrównoważyć załadowany kosz odpowiednio obciążonym koszem. Ważne jest, aby wirówka była dokładnie wyważona.

13. Odwirowywać przy 300×g (bez hamowania) przez 10 minut w temperaturze +4 °C (+39 °F).

14. Ostrożnie usunąć supernatant w sposób opisany powyżej i ponownie zawiesić komórki w 100 mL zimnego (od +2 do +8 °C [od +36 do +46 °F]) buforu.

15. Zdezynfekować przegrodę łącznika miejsca pobierania próbek. Wprowadzić igłę z odpowiednią strzykawką do łącznika miejsca pobierania próbek worka Cell Preparation Bag i pobrać objętość 0,5 mL oznakowanego produktu. Należy uważać, aby nie przekłuć worka. Przenieść próbkę do próbówki. Oznakować probówkę jako ORYGINALNA PRÓBKA DOCELOWA (powinna zawierać identyfikację pacjenta).

WAŻNE

Przed pobraniem próbki należy upewnić się, że komórki zostały dokładnie wymieszane. W celu uzyskania reprezentatywnej próbki należy użyć strzykawki o pojemności co najmniej 5 mL.

16. Zachować próbkę komórkową do analizy komórek, przechowywaną w chłodzie (od +2 do +8 °C [od +36 do +46 °F]).

Próbka kontrolna (niestymulowana)

1. Po odwirowaniu ostrożnie usunąć supernatant.
2. Zawiesić ponownie komórki w 100 µl zimnego buforu (od +2 do +8 °C [od +36 do +46 °F]).
3. Dodać 75 µl pozostałego odczynnika CliniMACS IFN-gamma Enrichment Reagent.
4. Inkubować komórki przez 15 minut na lodzie.
5. Napełnić naczynie zimnym buforem (od +2 do +8 °C [od +36 do +46 °F]) i odwirowywać przy 300×g (bez hamowania) przez 10 minut w temperaturze +4 °C (+39 °F).
6. Ostrożnie usunąć supernatant i ponownie zawiesić komórki w 1 mL zimnego (od +2 do +8 °C [od +36 do +46 °F]) buforu.
7. Pobrać małą próbkę (ok. 100 µl) zawiesiny komórkowej i przenieść ją do probówki, oznakowanej jako ORYGINALNA PRÓBKA KONTROLNA przed separacją. Przechowywać w chłodzie do czasu analizy.

Separacja magnetyczna

Próbka docelowa

Separację magnetyczną próbki docelowej przeprowadza się za pomocą aparatu CliniMACS Plus Instrument. Po przeprowadzeniu procedury separacji należy przetworzyć próbkę kontrolną w sposób opisany poniżej.

Próbka kontrolna (niestymulowana)

1. Przygotować dwie kolumny MS Columns, przepłukując je 500 µl zimnego (od +2 do +8 °C [+36 do +46 °F]) buforu i wyrzucić wyciek.
2. Umieścić pierwszą kolumnę w polu magnetycznym separatora MiniMACS.
3. Przepuścić komórki przez filtr do wstępnej separacji, aby usunąć skupiska.
4. Nanieść zawiesinę komórek na kolumnę.
5. Zebrać całkowity wyciek (zawierający frakcję komórek nieznakowanych). Przemyć kolumnę, dodając na nią 500 µl zimnego buforu. Przeprowadzić łącznie trzy kroki przemywania, nakładając kolejno 500 µl buforu na kolumnę, gdy zbiornik kolumny będzie pusty.

6. Wyjąć kolumnę z separatora, włożyć drugą kolumnę do separatora i nałożyć pierwszą kolumnę na drugą.
7. Odpipetować 1 mL zimnego buforu na pierwszą kolumnę. Natychmiast wypłukać frakcję z komórkami znakowanymi magnetycznie poprzez silne przyłożenie tłoka, dostarczonego z kolumną, bezpośrednio do drugiej kolumny.
8. Zebrać nieznakowane komórki, które przeszły przez kolumnę i przemyć kolumnę 500 µl zimnego buforu. Przeprowadzić łącznie trzy kroki przemywania, nakładając kolejno 500 µl buforu na kolumnę, gdy zbiornik kolumny będzie pusty.
9. Wyjąć drugą kolumnę z separatora i umieścić ją na odpowiedniej probówce oznakowanej jako frakcja pozytywna.
10. Odpipetować 0,5 mL zimnego buforu na kolumnę. Natychmiast wypłukać frakcję z komórkami znakowanymi magnetycznie poprzez silne przyłożenie tłoka, dostarczonego z kolumną.
11. Przechowywać docelową frakcję komórek w chłodzie do czasu analizy.

6.17.2 KROK 2: Wybór programu separacji

- **Wybór programu separacji ENRICHMENT 3.2**

Patrz rozdział 7.2.4 na stronie 147.

6.17.3 KROK 3: Instalacja zestawów przewodów CliniMACS

- **CliniMACS Tubing Set i CliniMACS Tubing Set LS**

Patrz rozdział 7.3.1 na stronie 160.

6.17.4 KROK 4: Separacja CliniMACS Plus

- **Procedura separacji**
- **Odłączenie worków i zapisanie kodu procesu**
- **Rozładowanie zestawu drenów i wyłączenie**
- **Analiza komórek**

Patrz rozdział 7.4.3 na stronie 202.

7 Szczegółowe objaśnienie KROKU 1–4

7.1 KROK 1: Przygotowanie komórek i znakowanie magnetyczne

W tym rozdziale przedstawiono szczegółowe objaśnienia procedur, które są niezbędne do separacji komórek przy użyciu systemu CliniMACS Plus.

7.1.1 Pierwsze wymagane działania

Materiały wymagane do danego zastosowania można znaleźć w rozdziale dotyczącym konkretnego zastosowania (patrz rozdział 5.2 na stronie 39).

Przygotowanie CliniMACS PBS/EDTA Buffer

Uzupełnić CliniMACS PBS/EDTA Buffer HSA do stężenia końcowego 0,5% (wag./obj.).

Przygotowanie worków

Informacje o potrzebnych workach można znaleźć w rozdziale dotyczącym konkretnego zastosowania:

- **Cell Preparation Bag:** Włożyć łącznik miejsca pobierania próbek (lub jego odpowiednik) do zewnętrznego portu worka Cell Preparation Bag. Umieścić kleszcze blokujące na drenie obok worka i zamknąć kleszcze blokujące. Zważyć pusty Cell Preparation Bag z kleszczami blokującymi umieszczonymi obok worka i drenem wiszącym na stole obok wagi. Zapisać wagę.

  WAŻNE
  Ponieważ długość drenów może się zmieniać podczas procedury przygotowania, należy zachować ostrożność przy określaniu wagi worka Cell Preparation Bag. W celu uzyskania dokładnego odczytu należy potwierdzić, że kleszcze blokujące są zawsze umieszczone obok worka i leżą na wadze, a reszta drenów leży na stole obok wagi.

- **Cell Collection Bag:**
  - CliniMACS Tubing Set/CliniMACS Tubing Set LS: Włożyć Luer/Spike Interconnector (lub jego odpowiednik) do zewnętrznego portu worka Cell Collection Bag. Umieścić kleszcze blokujące na drenie obok worka i zamknąć kleszcze blokujące. Zważyć pusty Cell Collection Bag z kleszczami blokującymi umieszczonymi obok worka i drenem wiszącym na stole obok wagi. Zapisać wagę.
  - CliniMACS Depletion Tubing Set: Jeden Cell Collection Bag jest już podłączony do zestawu drenów. Włożyć Luer/Spike Interconnector (lub jego odpowiednik) do zewnętrznego portu worka Cell Collection Bag. Umieścić

kleszcze blokujące na drenie obok worka i zamknąć kleszcze blokujące. Zważyć pusty Cell Collection Bag z kleszczami blokującymi umieszczonymi obok worka i drenem wiszącym na stole obok wagi. Zapisać wagę.

7.1.2 Znakowanie magnetyczne komórek

W kolejnych rozdziałach opisano zalecaną procedurę w worku do przygotowania produktu komórkowego przy użyciu sterylnego łącznika drenów.

- Operator musi być zaznajomiony z obsługą i użytkowaniem sterylnego łącznika drenów.
- Przed rozpoczęciem procedury znakowania i separacji komórek należy upewnić się, że dostępne są wszystkie potrzebne materiały i sprzęty.

WAŻNE

- Wszystkie czynności związane z workami należy wykonywać w sterylnym środowisku (np. wyciągu laminarnym) z zastosowaniem technik aseptycznych. Podłączenie drenów za pomocą sterylnego łącznika drenów może być wykonane poza wyciągiem laminarnym.
- Przeprowadzić przygotowanie próbek i separację komórek w warunkach temperatury określonych w rozdziale dotyczącym konkretnego zastosowania. Wyższa lub niższa temperatura otoczenia spowoduje zmniejszoną czystość oraz niższy uzysk komórek docelowych.

Krótko mówiąc, znakowanie magnetyczne produktu komórkowego odbywa się poprzez następujące kroki:

1. analiza początkowego produktu komórkowego
2. przeniesienie początkowego produktu komórkowego do Cell Preparation Bag
3. rozcieńczenie początkowego produktu komórkowego
4. odwirowanie
5. dotyczy tylko CliniMACS Plus Anti-Biotin System i CliniMACS Plus TCRα/β-Biotin System: znakowanie komórek (inkubacja przy użyciu przeciwciała pierwotnego/CliniMACS TCRα/β-Biotin) i usuwanie nadmiaru koniugatu (1. przemywania)
6. regulacja objętości
7. dotyczy tylko systemów CliniMACS Plus CD3 i CD3/CD19: inkubacja przy użyciu immunoglobuliny klasy klinicznej
8. znakowanie magnetyczne komórek (inkubacja przy użyciu CliniMACS Reagent)
9. usunięcie nadmiaru odczynnika
10. regulacja objętości do separacji komórek

Analiza początkowego produktu komórkowego

Przed rozpoczęciem przygotowania początkowego produktu komórkowego należy określić następujące parametry:

- całkowita liczba leukocytów
- odsetek komórek do znakowania
- całkowita liczba leukocytów do znakowania
- żywotność

Zapewnić pracę w ramach specyfikacji aplikacji.

Po zakończeniu procedury znakowania ponownie sprawdzić parametry. Jest to konieczne w przypadku programów staged-loading (ENRICHMENT 1.1/ DEPLETION 2.1/DEPLETION 3.1), ponieważ podczas konfiguracji aparatu CliniMACS Plus Instrument, przed załadowaniem zestawu drenów do aparatu należy wprowadzić do oprogramowania następujące trzy parametry próbek:

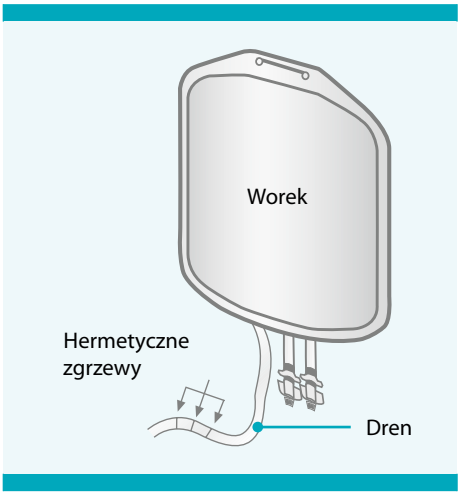
- stężenie leukocytów na mL
- odsetek komórek do znakowania
- końcowa objętość próbki komórkowej (objętość ładowania próbki)

W zależności od przeznaczenia komórek mogą być wymagane inne testy (np. liczba limfocytów T, fenotyp). Zapisać wszystkie dane.

Przeniesienie początkowego produktu komórkowego do Cell Preparation Bag

1. Przed rozpoczęciem przygotowania początkowego produktu komórkowego należy zapisać datę i godzinę rozpoczęcia.
2. Określić objętość początkowego produktu komórkowego, przyjmując 1 mL początkowego produktu komórkowego jako odpowiadający 1 g (1 g ≙ 1 mL).
3. Trzymać obiema rękami worek z początkowym produktem komórkowym i dokładnie wymieszać zawartość, wykonując delikatne ruchy obrotowe.
4. Używając sterylnego łącznika drenów, połączyć worek Cell Preparation Bag z oryginalnym workiem z początkowym produktem komórkowym.
5. Otworzyć kleszcze blokujące, aby przenieść początkowy produkt komórkowy do Cell Preparation Bag. Oczyścić dren z pozostałości krwi za pomocą ściągacza do drenów. Zamknąć kleszcze blokujące na drenie jak najbliżej worka.

6. Zgrzać dreny i rozdzielić worki, pozostawiając co najmniej 15 cm drenu na worku Cell Preparation Bag do dalszych połączeń (patrz Rysunek 7.1). Użyć zgrzewarki do wykonania trzech sąsiadujących ze sobą zgrzewów w drenie. Upewnić się, że zgrzewy są dokładnie wykonane. Oddzielić przy środkowym zgrzewie. Przechowywać oryginalny worek z produktem leukaferezy/początkowym produktem komórkowym aż do momentu, gdy zostanie przeprowadzona separacja i ostateczna analiza wszystkich komórek.



Rysunek 7.1: Zgrzewanie worka.

7. Przed pobraniem próbki zdezynfekować przegrodę łącznika miejsca pobierania próbek. Wymieszać zawartość worka. Wprowadzić igłę z odpowiednią strzykawką do łącznika miejsca pobierania próbek worka Cell Preparation Bag i pobrać objętość 0,5 mL. Przenieść próbkę do próbówki. Oznakować probówkę jako PRODUKT LEUKAFEREZY/POCZĄTKOWY PRODUKT KOMÓRKOWY (powinna zawierać identyfikację pacjenta) i zachować do analizy komórek.

   WAŻNE
   Przed pobraniem próbki należy upewnić się, że początkowy produkt komórkowy został dokładnie wymieszany. W celu uzyskania reprezentatywnej próbki należy użyć strzykawki o pojemności co najmniej 5 mL.

8. Wytarować wagę. Położyć napełniony Cell Preparation Bag na wadze, niech dren leży na stole. Zapisać wagę.

9. Określić wagę początkowego produktu komórkowego, odejmując wagę pustego worka Cell Preparation Bag od wagi worka Cell Preparation Bag napełnionego początkowym produktem komórkowym. Zapisać obliczoną wagę.

Waga początkowego produktu komórkowego (g)	=	Waga napełnionego Cell Preparation Bag (g)	–	Waga pustego Cell Preparation Bag (g)

Rozcieńczenie początkowego produktu komórkowego

Informacje o potrzebnych proporcjach rozcieńczenia można znaleźć w rozdziale dotyczącym konkretnego zastosowania.

Początkowy produkt komórkowy należy rozcieńczyć buforem CliniMACS PBS/EDTA Buffer (uzupełnionym HSA do stężenia końcowego 0,5% (wag./obj.)) przez znakowaniem magnetycznym. Obliczyć wagę buforu do dodania, stosując jedno z poniższych równań (1 lub 2) w zależności od aplikacji, i zapisać ją.

(1) Waga buforu do dodania (g)	=	600 g	–	Waga początkowego produktu komórkowego (g)
(2) Waga buforu do dodania (g)	=	Waga początkowego produktu komórkowego (g)	×	2

1. Wziąć zestaw do przetaczania osocza i upewnić się, że zacisk jest w pozycji zamkniętej. Włożyć kolec zestawu do przetaczania osocza do portu worka na bufor.
2. Używając sterylnego łącznika drenów, połączyć worek na bufor z workiem Cell Preparation Bag. Zawiesić worek na bufor na wieszaku na worek.
3. Umieścić na wadze worek Cell Preparation Bag i wytarować wagę.
4. Otworzyć kleszcze blokujące obok Cell Preparation Bag. Przesunąć zacisk na zestawie do przetaczania osocza w pozycję otwartą. Kontrolując wzrokowo skalę na wadze, przenieść obliczoną wagę buforu do worka Cell Preparation Bag.
5. Po przeniesieniu odpowiedniej wagi buforu przesunąć zacisk na zestawie do przetaczania osocza w pozycję zamkniętą, aby zatrzymać przepływ płynu. Zamknąć kleszcze blokujące na drenie jak najbliżej worka.
6. Użyć zgrzewarki do zgrzania drenów między zaciskiem a kleszczami blokującymi, pozostawiając co najmniej 15 cm drenu na worku Cell Preparation Bag do dalszych połączeń. Odłączyć worek na bufor.
7. Trzymać obiema rękami Cell Preparation Bag i dokładnie wymieszać zawartość, wykonując delikatne ruchy obrotowe. Unikać intensywnego mieszania komórek.
8. Wytarować wagę i zważyć napełniony worek Cell Preparation Bag. Zapisać wagę.
9. Określić wagę rozcieńczonego początkowego produktu komórkowego, odejmując wagę pustego worka Cell Preparation Bag od wagi napełnionego worka Cell Preparation Bag. Zapisać obliczoną wagę.

Waga rozcieńczonego początkowego produktu komórkowego (g)	=	Waga napełnionego Cell Preparation Bag (g)	–	Waga pustego Cell Preparation Bag (g)

Wirowanie

⚠ OSTRZEŻENIE

Ryzyko zanieczyszczenia. Jeśli worki nie nadają się do przygotowania komórek i nie są prawidłowo umieszczone w koszu wirówki, istnieje ryzyko zanieczyszczenia wskutek uszkodzenia worka. Używać odpowiednich worków, złożyć wszelkie luźne części worków lub drenów w dół, uważając, aby nie naruszyć integralności worka, i umieścić worki bezpiecznie w koszu wirówki.

⚠ PRZESTROGA

Ryzyko mniejszej wydajności separacji komórek. Jeśli worki nie zostaną prawidłowo umieszczone w koszu wirówki, istnieje ryzyko utraty komórek podczas usuwania supernatantu. Złożyć wszelkie luźne części worków lub drenów w dół i umieścić worki bezpiecznie w koszu wirówki.

1. Używając sterylnego łącznika drenów, połączyć pusty worek Plasma Waste Bag z workiem Cell Preparation Bag.
2. Złożyć wszelkie luźne części worka Cell Preparation Bag lub drenów w dół. Umieścić oba worki bezpiecznie w koszu wirówki.
3. Zrównoważyć załadowany kosz odpowiednio obciążonym koszem. Ważne jest, aby wirówka była dokładnie wyważona.
4. Odwirować komórki w warunkach określonych w rozdziale dotyczącym konkretnego zastosowania. Zapisać warunki wirowania.
5. Wyjąć worki z wirówki, uważając, aby nie naruszyć osadu komórkowego. Załadować Cell Preparation Bag na ekstraktor osocza, a podłączony worek na odpady na wagę stolikową.

Regulacja objętości

W przypadku znakowania magnetycznego komórek optymalna waga produktu komórkowego różni się w zależności od zastosowania. Należy zapoznać się z objętością znakowania w rozdziale dotyczącym konkretnego zastosowania.

W zależności od zastosowania może być konieczne albo usunięcie tylko pewnej ilości supernatantu, aby osiągnąć objętość znakowania (dostosowane usunięcie supernatantu), albo całkowite usunięcie supernatantu i dodanie buforu, aby osiągnąć objętość znakowania (całkowite usunięcie supernatantu). Należy zapoznać się z rozdziałem dotyczącym konkretnego zastosowania z właściwą opcją i odpowiednio kontynuować.

WAŻNE

- W przypadku używania ekstraktora osocza należy stale kontrolować uchwyt zwalniający ekstraktora i przed rozpoczęciem transferu upewnić się, że kleszcze blokujące obok Cell Preparation Bag są otwarte. Powoli zwalniać uchwyt ekstraktora.
- Podczas usuwania supernatantu należy uważać, aby nie stracić komórek.

Dostosowane usunięcie supernatantu

Obliczyć wagę supernatantu do usunięcia, aby dostosować próbkę do objętości znakowania, stosując następujące równanie:

Waga supernatantu do usunięcia (g)	=	Waga produktu komórkowego po przemyciu (g)	–	Objętość znakowania (g)

Zapisać wagę supernatantu do usunięcia.

1. Umieścić pusty worek Plasma Waste Bag lub Wash Waste Bag nr 1 na wadze i wytarować wagę.
2. Otworzyć kleszcze blokujące obok Cell Preparation Bag. Kontrolując wzrokowo skalę na wadze, usunąć supernatant przy użyciu ekstraktora osocza. Ostrożnie wyciskać nadmiar supernatantu, aż do osiągnięcia obliczonej „wagi supernatantu do usunięcia".
3. Po usunięciu odpowiedniej wagi supernatantu zamknąć kleszcze blokujące obok Cell Preparation Bag, aby zatrzymać przepływ płynu. Zapisać wagę usuniętego supernatantu.
4. Używając zgrzewarki, zgrzać dreny, pozostawiając co najmniej 15 cm drenu na worku Cell Preparation Bag do dalszych połączeń. Odłączyć Plasma Waste Bag lub Wash Waste Bag nr 1.
5. Ostrożnie zawiesić ponownie komórki w worku Cell Preparation Bag. Unikać intensywnego mieszania komórek. Upewnić się, że wszystkie komórki są ponownie zawieszone.
6. Wytarować wagę i zważyć napełniony worek Cell Preparation Bag. Zapisać wagę.
7. Określić wagę produktu komórkowego po regulacji objętości, odejmując wagę pustego worka Cell Preparation Bag od wagi napełnionego worka Cell Preparation Bag. Zapisać obliczoną wagę.

Waga produktu komórkowego po regulacji objętości (g)	=	Waga napełnionego Cell Preparation Bag (g)	–	Waga pustego Cell Preparation Bag (g)

8. Przechowywać Plasma Waste Bag lub Wash Waste Bag aż do momentu, gdy zostanie przeprowadzona ostateczna separacja i analiza wszystkich komórek.

Całkowite usunięcie supernatantu

Całkowicie usunąć supernatant, uważając, aby nie zawiesić ponownie osadu komórkowego podczas usuwania supernatantu. Po usunięciu supernatantu zamknąć kleszcze blokujące obok Cell Preparation Bag, aby zatrzymać przepływ płynu. Używając zgrzewarki, zgrzać dreny, pozostawiając co najmniej 15 cm drenu na worku Cell Preparation Bag do dalszych połączeń. Odłączyć Plasma Waste Bag. Ostrożnie zawiesić ponownie osad.

Dostosować wagę worka Cell Preparation Bag poprzez dodanie buforu. Obliczyć wagę docelową Cell Preparation Bag (CPB) napełnionego rozcieńczonym produktem komórkowym, stosując następujące równanie:

Waga docelowa CPB napełnionego przemytym produktem komórkowym (g)	=	Objętość znakowania (g)	+	Waga pustego CPB (g)

1. Włożyć kolec zestawu do przetaczania osocza do portu worka na bufor. Potwierdzić, że zacisk na zestawie do przetaczania osocza jest w pozycji zamkniętej.
2. Używając sterylnego łącznika drenów, połączyć worek na bufor z workiem Cell Preparation Bag. Zawiesić worek na bufor na wieszaku na worek.

3. Wytarować wagę. Umieścić na wadze worek Cell Preparation Bag z osadem komórkowym.
4. Otworzyć kleszcze blokujące obok Cell Preparation Bag. Przesunąć zacisk na zestawie do przetaczania osocza w pozycję otwartą. Napełnić Cell Preparation Bag buforem, aż do osiągnięcia obliczonej „Wagi docelowej Cell Preparation Bag napełnionego przemytym produktem komórkowym". Przesunąć zacisk na zestawie do przetaczania osocza w pozycję zamkniętą, aby zatrzymać przepływ płynu. Zamknąć kleszcze blokujące obok Cell Preparation Bag.
5. Używając zgrzewarki, zgrzać dreny, pozostawiając co najmniej 15 cm drenu na worku Cell Preparation Bag do dalszych połączeń. Odłączyć worek na bufor.
6. Ostrożnie zawiesić ponownie komórki w worku Cell Preparation Bag. Unikać intensywnego mieszania komórek. Upewnić się, że wszystkie komórki są ponownie zawieszone.
7. Wytarować wagę i zważyć napełniony worek Cell Preparation Bag. Zapisać wagę.
8. Określić wagę produktu komórkowego po regulacji objętości, odejmując wagę pustego worka Cell Preparation Bag od wagi napełnionego worka Cell Preparation Bag. Zapisać obliczoną wagę.

Waga produktu komórkowego po regulacji objętości (g)	=	Waga napełnionego Cell Preparation Bag (g)	–	Waga pustego Cell Preparation Bag (g)

9. Przechowywać worek Plasma Waste Bag aż do momentu, gdy zostanie przeprowadzona separacja i ostateczna analiza wszystkich komórek.

Znakowanie komórek (dotyczy tylko CliniMACS Plus Anti-Biotin System i CliniMACS Plus TCRα/β-Biotin System)

Inkubacja przy użyciu CliniMACS TCRα/β-Biotin

Fiolka CliniMACS TCRα/β-Biotin jest gotowa do użycia i wystarczająca do aplikacji w sposób opisany poniżej. Koniugat nie jest przeznaczony do podawania pozajelitowego.

Koniugat przechowywać w temperaturze od +2 °C do +8 °C (od +36°F do +46°F). NIE zamrażać. Koniugat musi być stosowany na zimno, bezpośrednio z lodówki. NIE podgrzewać przed użyciem. Numer serii i termin ważności koniugatu są wydrukowane na etykiecie fiolki. NIE stosować koniugatu po upływie terminu ważności.

1. Zapisać numer serii i termin ważności CliniMACS TCRα/β-Biotin.
2. Zdezynfekować przegrodę łącznika miejsca pobierania próbek. Używać odpowiedniej sterylnej strzykawki i igły do pobrania całej objętości z jednej fiolki (7,5 mL). Do usunięcia zawartości jednej fiolki wystarczy strzykawka o pojemności 10 mL. Strzykawka powinna być wyposażona w igłę o rozmiarze 20 gauge.

3. Korzystając z portu iniekcyjnego na łączniku miejsca pobierania próbek, wstrzyknąć całą objętość koniugatu do worka Cell Preparation Bag (opcjonalnie przenieść zawartość worka Cell Preparation Bag do nowego worka transferowego, aby zapewnić wysoką wydajność deplecji). Natychmiast zacząć czas inkubacji wynoszący 30 minut.
4. Trzymać obiema rękami Cell Preparation Bag i dokładnie wymieszać zawartość, wykonując delikatne ruchy obrotowe. Zapisać czas rozpoczęcia inkubacji.
5. Umieścić worek Cell Preparation Bag płasko na rotatorze orbitalnym, ustawionym na prędkość około 25 obr./min, i upewnić się, że worek nie jest pomarszczony ani zagięty. Inkubować worek przez łącznie 30 minut w kontrolowanej temperaturze pokojowej (od +19 °C do +25 °C [od +66°F do +77°F]). Zapisać czas zakończenia inkubacji.

Inkubacja przy użyciu przeciwciała pierwotnego (przeciwciało biotynylowane innego producenta)

1. Zawiesić ponownie osad komórkowy i oznakować komórki pierwotnym przeciwciałem biotynylowanym w czasie i mianie zalecanym przez producenta przeciwciała. Upewnić się, że wszystkie komórki są ponownie zawieszone. (Przeciwciało pierwotne powinno być stosowane w optymalnym mianie, tzn. z optymalną intensywnością barwienia i bez barwienia tła. Należy przestrzegać instrukcji używania dostarczonej przez producenta przeciwciała pierwotnego.)
2. Inkubować Cell Preparation Bag na rotatorze orbitalnym przy 25 obr./min. Należy przestrzegać instrukcji używania dostarczonej przez producenta przeciwciała pierwotnego.

Usunięcie nadmiaru koniugatu (1. przemywanie) (dotyczy tylko CliniMACS Plus Anti-Biotin System i CliniMACS Plus TCRα/β-Biotin System)

Rozcieńczyć produkt komórkowy buforem do całkowitej wagi 600 g. Obliczyć wagę buforu do dodania, stosując następujące równanie, i zapisać.

Waga buforu do dodania (g)	=	600 g	–	Waga znakowanego produktu komórkowego (g)

1. Rozcieńczyć produkt komórkowy zgodnie z krokami opisanymi w kroku „Rozcieńczenie początkowego produktu komórkowego” (kroki 1-8) do całkowitej wagi 600 g.
2. Określić wagę produktu komórkowego po usunięciu nadmiaru koniugatu (1. przemywanie), odejmując wagę pustego worka Cell Preparation Bag od wagi napełnionego worka Cell Preparation Bag. Zapisać obliczoną wagę.

Waga produktu komórkowego po usunięciu nadmiaru koniugatu (1. przemywanie) (g)	=	Waga napełnionego Cell Preparation Bag (g)	–	Waga pustego Cell Preparation Bag (g)

3. Używając sterylnego łącznika drenów, połączyć pusty Wash Waste Bag z workiem Cell Preparation Bag.
4. Złożyć wszelkie luźne części worka Cell Preparation Bag lub drenów w dół. Umieścić oba worki bezpiecznie w koszu wirówki.
5. Zrównoważyć załadowany kosz odpowiednio obciążonym koszem. Ważne jest, aby wirówka była dokładnie wyważona.
6. Odwirować komórki w warunkach określonych w rozdziale dotyczącym konkretnego zastosowania.
7. Wyjąć worki z wirówki, uważając, aby nie zawiesić ponownie osadu komórkowego. Załadować Cell Preparation Bag na ekstraktor osocza, a podłączony worek na odpady na wagę stolikową.
8. Wymagana liczba etapów przemywania, patrz rozdział dotyczący konkretnego zastosowania.
9. Dostosować wagę zawiesiny komórkowej w sposób opisany w rozdziale „Regulacja objętości" do ok. 190 g, do znakowania magnetycznego komórek przy użyciu CliniMACS Anti-Biotin Reagent.

Inkubacja przy użyciu immunoglobuliny klasy klinicznej (dotyczy tylko systemów CliniMACS Plus CD3 lub CD3/CD19)

WAŻNE

Należy zwrócić uwagę, że ludzka IgG nie jest komponentem systemu CliniMACS. Należy używać tylko ludzkiej IgG klasy farmaceutycznej, dopuszczonej w danym kraju. Należy uważnie przeczytać ulotkę dołączoną do opakowania stosowanej ludzkiej IgG; w szczególności rozdział dotyczący reakcji nadwrażliwości i ryzyka zakażenia, które ludzka IgG stanowi dla wszystkich pacjentów jako produkt krwiopochodny. Wszystkie zagrożenia wynikające z tych materiałów muszą być ocenione przez użytkownika.

Zdezynfekować przegrodę łącznika miejsca pobierania próbek worka Cell Preparation Bag. Odpowiednią sterylną strzykawką i igłą dodać 1,5 mg ludzkiej IgG na mL produktu komórkowego (np. 1,6 mL Gamunex 10% na 95 mL produktu komórkowego). Dokładnie wymieszać zawartość. Inkubować przez 5 minut w kontrolowanej temperaturze pokojowej, wykonując delikatne ruchy obrotowe (np. 25 obr./min na rotatorze orbitalnym).

Znakowanie magnetyczne komórek: inkubacja przy użyciu odczynnika CliniMACS

Fiolki z odczynnikiem CliniMACS są gotowe do użycia i wystarczające do aplikacji w sposób opisany poniżej. Odczynniki nie są przeznaczone do podawania pozajelitowego.

Odczynniki przechowywać w temperaturze od +2 °C do +8 °C (od +36°F do +46 °F). NIE zamrażać. Odczynniki muszą być stosowane na zimno, bezpośrednio z lodówki. NIE podgrzewać przed użyciem. Numer serii i termin ważności odczynników są wydrukowane na etykiecie fiolki. NIE stosować odczynników po upływie terminu ważności.

1. Zapisać numer serii i termin ważności odczynnika (odczynników) CliniMACS.
2. Zdezynfekować przegrodę łącznika miejsca pobierania próbek. Używać odpowiedniej sterylnej strzykawki i igły do pobrania całej objętości z a) jednej fiolki lub b) dwóch fiolek z odczynnikiem (po 7,5 mL). Do usunięcia zawartości jednej fiolki wystarczy strzykawka o pojemności 10 mL lub do usunięcia zawartości dwóch fiolek z odczynnikiem wystarczy strzykawka o pojemności 20 mL. Strzykawka powinna być wyposażona w igłę o rozmiarze 20 gauge.
3. Korzystając z portu iniekcyjnego na łączniku miejsca pobierania próbek, wstrzyknąć całą objętość odczynnika do worka Cell Preparation Bag (opcjonalnie, w zastosowaniach z deplecją przenieść zawartość worka Cell Preparation Bag do nowego worka transferowego, aby zapewnić wysoką wydajność deplecji). W tym momencie zaczyna się czas inkubacji.
4. Trzymać obiema rękami Cell Preparation Bag i dokładnie wymieszać zawartość, wykonując delikatne ruchy obrotowe.
5. Umieścić worek Cell Preparation Bag płasko na rotatorze orbitalnym, ustawionym na prędkość około 25 obr./min, i upewnić się, że worek nie jest pomarszczony ani zagięty. Inkubować worek w warunkach i czasie określonych w rozdziale dotyczącym konkretnego zastosowania.

Usunięcie nadmiaru odczynnika

W celu usunięcia niezwiązanego odczynnika po zakończeniu inkubacji konieczne jest przemywanie komórek. Informacje o wymaganej liczbie etapów przemywania można znaleźć w rozdziale dotyczącym konkretnego zastosowania.

1. Włożyć kolec zestawu do przetaczania osocza do portu worka na bufor, zawierającego co najmniej 500 mL buforu. Potwierdzić, że zacisk na zestawie do przetaczania osocza jest w pozycji zamkniętej.
2. Używając sterylnego łącznika drenów, połączyć worek na bufor z workiem Cell Preparation Bag. Zawiesić worek na bufor na wieszaku na worek.
3. Umieścić na wadze worek Cell Preparation Bag i wytarować wagę.

4. Otworzyć kleszcze blokujące obok Cell Preparation Bag. Przesunąć zacisk na zestawie do przetaczania osocza w pozycję otwartą. Napełnić Cell Preparation Bag buforem do 600 mL. Przesunąć zacisk na zestawie do przetaczania osocza w pozycję zamkniętą, aby zatrzymać przepływ płynu. Zamknąć kleszcze blokujące obok Cell Preparation Bag. Zapisać wagę napełnionego worka Cell Preparation Bag.
5. Zgrzać dreny między obydwoma zaciskami, pozostawiając co najmniej 15 cm drenu na worku Cell Preparation Bag do dalszych połączeń. Odłączyć worek na bufor.
6. Trzymać obiema rękami Cell Preparation Bag i dokładnie wymieszać zawartość, wykonując delikatne ruchy obrotowe.
7. Używając sterylnego łącznika drenów, połączyć pusty Wash Waste Bag z workiem Cell Preparation Bag.
8. Złożyć wszelkie luźne części worków lub drenów w dół. Bezpiecznie przenieść Cell Preparation Bag i Wash Waste Bag do kosza wirówki.
9. Odwirować komórki w warunkach i czasie określonych w rozdziale dotyczącym konkretnego zastosowania.
10. Uważając, aby nie naruszyć osadu komórkowego, wyjąć worki z wirówki.
11. Ostrożnie zawiesić worek Cell Preparation Bag na ekstraktorze osocza.
12. Umieścić na wadze worek Wash Waste Bag i wytarować wagę.
13. Otworzyć kleszcze blokujące obok Cell Preparation Bag. Przy użyciu ekstraktora osocza usunąć jak najwięcej supernatantu z worka Cell Preparation Bag. Zamknąć kleszcze blokujące obok Cell Preparation Bag, aby zatrzymać przepływ płynu.
14. Używając zgrzewarki, zgrzać dreny, pozostawiając co najmniej 15 cm drenu na worku Cell Preparation Bag do dalszych połączeń. Odłączyć Wash Waste Bag.
15. Przechowywać worek Wash Waste Bag aż do momentu, gdy zostanie przeprowadzona separacja i ostateczna analiza wszystkich komórek.
16. Zawiesić ponownie osad komórkowy w worku Cell Preparation Bag. Unikać intensywnego mieszania komórek. Upewnić się, że wszystkie komórki są ponownie zawieszone.
17. Jeśli wymagana jest większa liczba przemywań (np. w celu wzbogacenia komórek CD34-dodatnich), powtórzyć kroki 1-16.
18. Wytarować wagę i zważyć napełniony worek Cell Preparation Bag. Zapisać wagę.
19. Określić wagę produktu komórkowego po przemyciu, odejmując wagę pustego worka Cell Preparation Bag od wagi napełnionego worka Cell Preparation Bag. Zapisać obliczoną wagę.

Waga produktu komórkowego po przemyciu (g)	=	Waga napełnionego Cell Preparation Bag (g)	–	Waga pustego Cell Preparation Bag (g)

20. Dostosować objętość ładowania próbki: Obliczyć wagę buforu konieczną do dostosowania wagi zawiesiny komórkowej do odpowiedniej objętości ładowania próbki zgodnie z zastosowaniem, stosując następujące równanie. Do załadowania znakowanych i przemytych komórek na zestaw drenów zaleca się maksymalne stężenie komórek $0{,}4\times10^9$ na mL.

Waga buforu do dodania (g)	=	Objętość ładowania próbki (zgodnie z zastosowaniem)	–	Waga produktu komórkowego po przemyciu (g)

21. Używając sterylnego łącznika drenów, połączyć worek na bufor z workiem Cell Preparation Bag. Zawiesić worek na bufor na wieszaku na worek.

22. Umieścić na wadze worek Cell Preparation Bag i wytarować wagę.

23. Otworzyć kleszcze blokujące obok Cell Preparation Bag. Przesunąć zacisk na zestawie do przetaczania osocza w pozycję otwartą. Kontrolując wzrokowo skalę na wadze, przenieść obliczoną wagę buforu do worka Cell Preparation Bag.

24. Po przeniesieniu odpowiedniej wagi buforu przesunąć zacisk na zestawie do przetaczania osocza w pozycję zamkniętą, aby zatrzymać przepływ płynu. Zamknąć kleszcze blokujące obok Cell Preparation Bag.

25. Zgrzewarką zgrzać dreny między obydwoma zaciskami. Odłączyć worek na bufor.

26. Zawiesić ponownie osad komórkowy w worku Cell Preparation Bag. Unikać intensywnego mieszania komórek. Upewnić się, że wszystkie komórki są ponownie zawieszone.

27. Zdezynfekować przegrodę łącznika miejsca pobierania próbek. Wprowadzić igłę z odpowiednią strzykawką do łącznika miejsca pobierania próbek worka Cell Preparation Bag i pobrać objętość 0,5 mL oznakowanego produktu. Przenieść próbkę do próbówki. Oznakować probówkę jako ORYGINALNA (powinna zawierać identyfikację pacjenta) i zachować do analizy.

28. Wytarować wagę i zważyć napełniony worek Cell Preparation Bag. Zapisać wagę.

29. Określić wagę produktu komórkowego po dodaniu buforu (objętość ładowania próbki), odejmując wagę pustego worka Cell Preparation Bag od wagi napełnionego worka Cell Preparation Bag. Zapisać obliczoną wagę.

Waga produktu komórkowego po dodaniu buforu (g)	=	Waga napełnionego Cell Preparation Bag (g)	–	Waga pustego Cell Preparation Bag (g)

▶ **Przejść do KROKU 2.**

NIE podłączać worka Cell Preparation Bag do zestawu drenów, dopóki nie zostanie to wskazane na wyświetlaczu aparatu.

7.2 KROK 2: Wybór programu separacji

7.2.1 Włączenie aparatu CliniMACS Plus Instrument

Włączyć aparat CliniMACS Plus Instrument za pomocą przełącznika ON/OFF znajdującego się na tylnym panelu aparatu. Zapisać czas rozpoczęcia pracy aparatu.

Okno wskazuje ekran główny w rozdziale „Instalacja" Podręcznika użytkownika CliniMACS Plus Instrument.

Aby przejść do menu programów, nacisnąć **ENT**.

7.2.2 CD34 SELECTION 1/2

WAŻNE

- CD34 SELECTION 1 należy stosować wyłącznie w połączeniu z CliniMACS Tubing Set (REF 161-01), natomiast CD34 SELECTION 2 należy stosować wyłącznie w połączeniu z CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01). Przed instalacją należy dokładnie sprawdzić zestaw drenów.
- W oknie wyświetlacza będą pojawiać się podpowiedzi ekranowe i diagramy służące jako przewodniki po procedurach. Przed przejściem do następnego kroku należy wykonać i sprawdzić każdy krok zgodnie z instrukcją w podręczniku. W celu skorygowania błędu podczas wprowadzania danych należy nacisnąć klawisz „Cofnij" (patrz rozdział „Opis" w Podręczniku użytkownika CliniMACS Plus Instrument).

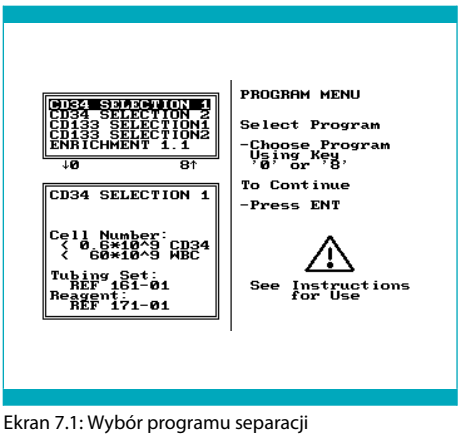
Wybór programu separacji CD34 SELECTION 1/2

Okno wyświetla Ekran 7.1.

W zależności od zastosowania wybrać CD34 SELECTION 1 lub CD34 SELECTION 2.

W celu wyboru programu separacji należy podświetlić nazwę programu czarnym paskiem. Przesuwać pasek w górę i w dół klawiszami **0** i **8**.

Aby przejść do podświetlonego programu, nacisnąć **ENT**.



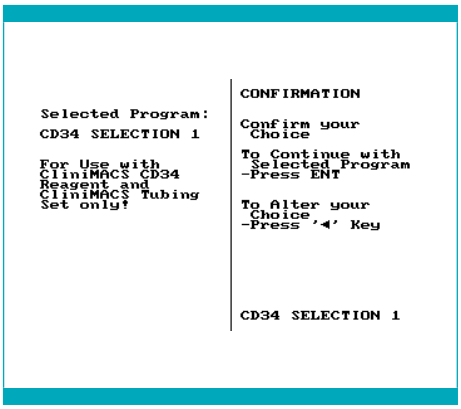
Ekran 7.1: Wybór programu separacji

Potwierdzenie

Okno wyświetla Ekran 7.2.

Aby potwierdzić program separacji i kontynuować, nacisnąć ENT.

Jeśli nie, nacisnąć ◄, aby powrócić do poprzedniego kroku w celu zmiany wyboru.



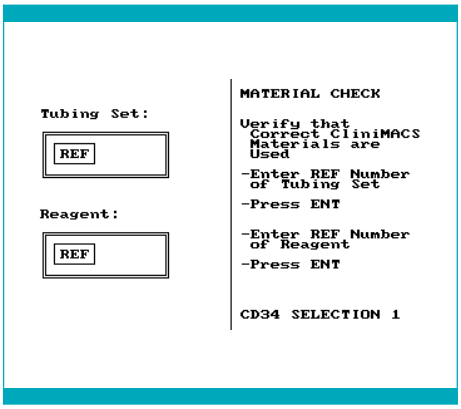
Ekran 7.2: Potwierdzenie

Kontrola materiału

Okno wyświetla Ekran 7.3.

CD34 SELECTION 1 i CD34 SELECTION 2 są zoptymalizowane do wzbogacania komórek CD34-dodatnich.

W celu potwierdzenia, że dostępny jest odpowiedni zestaw drenów i że do znakowania komórek użyto właściwego odczynnika, należy w polu zapytania wpisać odpowiedni numer katalogowy (REF). Oprogramowanie aparatu sprawdzi, czy materiały mogą być używane w połączeniu z wybranym programem.



Ekran 7.3: Kontrola materiału

1. Wpisać numer katalogowy zestawu drenów, który ma być użyty do automatycznej separacji komórek. Aby potwierdzić i kontynuować, nacisnąć ENT.
2. Wpisać numer katalogowy odczynnika, który był użyty do znakowania komórek. Aby potwierdzić i kontynuować, nacisnąć ENT.

Jeśli wprowadzono numer katalogowy zestawu drenów lub odczynnika, który nie został określony dla wybranego programu separacji, pojawia się komunikat. Nacisnąć ENT, aby potwierdzić i wpisać prawidłowy numer katalogowy. Jeśli wprowadzony numer jest nadal nieprawidłowy, komunikat pojawi się po raz drugi. Po naciśnięciu ENT program powróci do menu programów (patrz Ekran 7.1).

WAŻNE

- CD34 SELECTION 1 należy stosować wyłącznie w połączeniu z CliniMACS Tubing Set (REF 161-01), natomiast CD34 SELECTION 2 należy stosować wyłącznie w połączeniu z CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01). Przed instalacją należy dokładnie sprawdzić zestaw drenów.
- W celu skorygowania błędu podczas wprowadzania danych należy nacisnąć klawisz„Cofnij” (patrz rozdział„Opis” w Podręczniku użytkownika CliniMACS Plus Instrument).

Jeśli kontrola materiału zakończyła się powodzeniem, program automatycznie kontynuuje i podaje instrukcję instalacji zestawu drenów.

▶ **Przejść do KROKU 3.**

7.2.3 ENRICHMENT 1.1

WAŻNE

- Program separacji ENRICHMENT 1.1 należy stosować wyłącznie w połączeniu z CliniMACS Tubing Set (REF 161-01).
- W oknie wyświetlacza będą pojawiać się podpowiedzi ekranowe i diagramy służące jako przewodniki po procedurach. Przed przejściem do następnego kroku należy wykonać i sprawdzić każdy krok zgodnie z instrukcją w podręczniku. W celu skorygowania błędu podczas wprowadzania danych należy nacisnąć klawisz „Cofnij" (patrz rozdział „Opis" w Podręczniku użytkownika CliniMACS Plus Instrument).

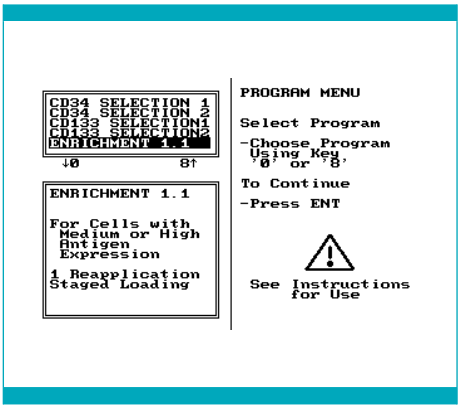
Wybór programu separacji ENRICHMENT 1.1

Okno wyświetla Ekran 7.4.

Wybrać ENRICHMENT 1.1.

W celu wyboru programu separacji należy podświetlić nazwę programu czarnym paskiem. Przesuwać pasek w górę i w dół klawiszami **0** i **8**.

Aby przejść do podświetlonego programu, nacisnąć **ENT**.



Ekran 7.4: Wybór programu separacji

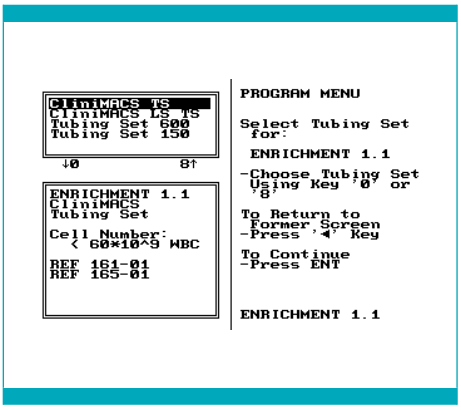
Wybór zestawu drenów

Okno wyświetla Ekran 7.5.

Potwierdzić, że wybrano właściwy program. Jeśli nie, nacisnąć ◄, aby powrócić do poprzedniego kroku w celu zmiany wyboru.

Wybrać zestaw drenów, podświetlając go w polu u góry po lewej stronie czarnym paskiem. Przesuwać pasek w górę i w dół klawiszami **0** i **8**.

Okno poniżej wskazuje istotne dane, jak pojemność i numer katalogowy wybranego zestawu drenów.



Ekran 7.5: Wybór zestawu drenów

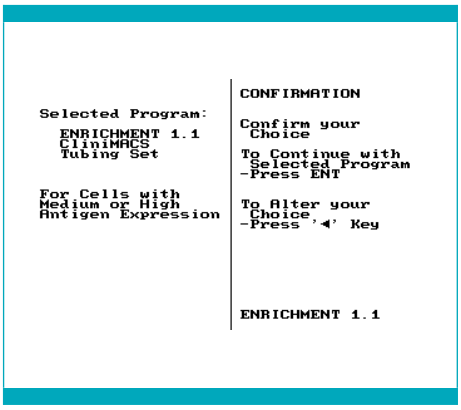
W celu kontynuacji z wybraną kombinacją programu separacji i zestawu drenów nacisnąć **ENT**.

Potwierdzenie

Okno wyświetla Ekran 7.6.

Aby potwierdzić kombinację programu separacji i zestawu drenów i kontynuować, nacisnąć **ENT**.

Jeśli nie, nacisnąć ◄, aby powrócić do poprzedniego kroku w celu zmiany wyboru.



Ekran 7.6: Potwierdzenie

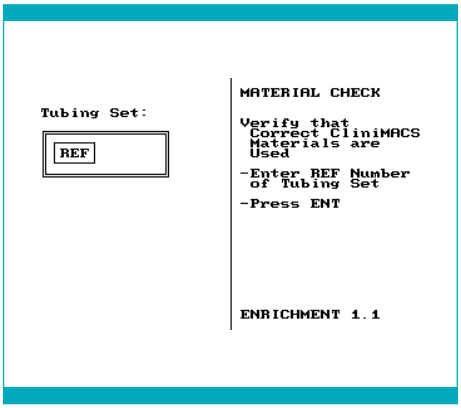
Kontrola materiału

Okno wyświetla Ekran 7.7.

Zapytanie o numer katalogowy (REF) zestawu drenów służy jako kontrola bezpieczeństwa, aby zapewnić, że wybrany zestaw drenów może być używany z wybranym programem.

Wpisać numer katalogowy wybranego zestawu drenów i nacisnąć **ENT**, aby kontynuować.

Jeśli wprowadzono nieodpowiadający numer katalogowy, pojawia się komunikat. W celu potwierdzenia nacisnąć **ENT** i wpisać prawidłowy numer katalogowy. Jeśli wprowadzony numer jest nadal nieprawidłowy, komunikat pojawia się po raz drugi. Po naciśnięciu **ENT** program powróci do menu programów (patrz Ekran 7.4).

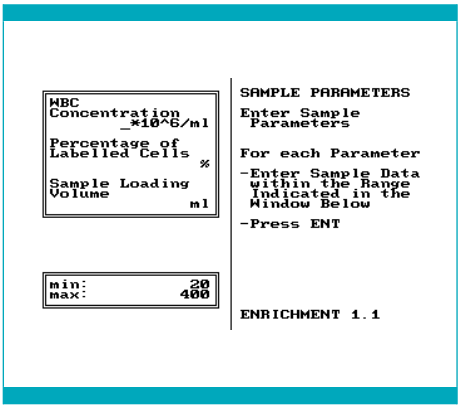


Ekran 7.7: Kontrola materiału

Wprowadzenie parametrów próbki

Jeśli kontrola materiału zakończyła się powodzeniem, program kontynuuje automatycznie zapytanie o parametry próbki, które są niezbędne do dostosowania separacji do każdej próbki i dostarczenia operatorowi ważnych informacji o wymaganych objętościach buforu i worka.

Okno wyświetla Ekran 7.8.



Ekran 7.8: Wprowadzenie parametrów próbki

1. Rozpocząć od wprowadzenia stężenia WBC próbki. Dopuszczalny zakres jest pokazany w polu na dole po lewej stronie. Nacisnąć ◄, aby skorygować błędnie wprowadzone dane.

   Potwierdzić, że wprowadzona wartość odzwierciedla wartość próbki. W przeciwnym razie przetwarzanie próbek może nie być optymalne. Aby przejść do następnego wpisu, nacisnąć **ENT**.

WAŻNE

Wszystkie wymagane parametry próbki odnoszą się do próbki po zakończeniu procedury znakowania komórek i przemywania. Dopuszczalny zakres pokazany w polu po lewej stronie na dole zawsze uwzględnia poprzednie wprowadzone dane. Po każdym wpisie oprogramowanie oblicza i dopasowuje akceptowany zakres następnego zapytania.

⚠ PRZESTROGA

Określenie błędnych parametrów może spowodować nieoptymalne przetwarzanie próbki i zwiększyć ryzyko utraty komórek docelowych. Wprowadzenie wartości stężenia WBC i/lub odsetka znakowanych komórek, które są niższe niż rzeczywiste wartości próbki, może spowodować utratę komórek z powodu przeładowania systemu. Wprowadzenie mniejszej objętości próbki może spowodować utratę komórek z powodu przeładowania lub nawet niepełnego przetworzenia próbki. Jeżeli specyfikacja któregokolwiek z trzech parametrów jest zbyt wysoka, spowoduje to wydłużenie czasu przetwarzania i zwiększenie objętości frakcji komórek docelowych. Należy zawsze pamiętać o wprowadzaniu prawidłowych parametrów.

2. Wpisać odsetek znakowanych komórek. Potwierdzić, że wprowadzona wartość odzwierciedla wartość próbki. W przeciwnym razie przetwarzanie próbek może nie być optymalne (patrz „Ważne”). Aby przejść do następnego wpisu, nacisnąć **ENT**.

3. Wpisać objętość końcową próbki komórkowej. Potwierdzić, że wprowadzona wartość odzwierciedla wartość próbki. W przeciwnym razie przetwarzanie próbek może nie być optymalne (patrz „Ważne”).

Nacisnąć **ENT**, aby kontynuować.

Obliczenie

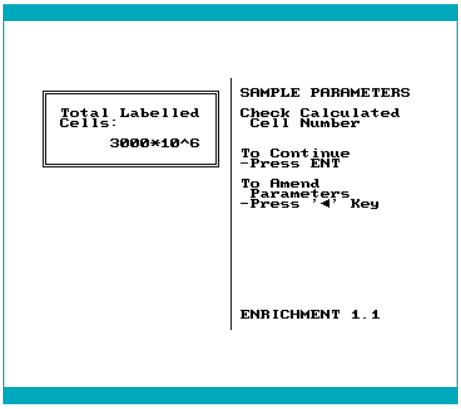
Oprogramowanie CliniMACS Plus oblicza całkowitą liczbę znakowanych komórek, aby sprawdzić, czy wydajność separacji jest wystarczająca.

Wynik jest wyświetlany na jednym z dwóch możliwych ekranów:

- Wynik obliczeń jest wyświetlany na ekranie podobnym do Ekran 7.9. Upewnić się, że obliczona liczba znakowanych komórek jest prawidłowa.

  Nacisnąć **ENT**, aby kontynuować.

  Możliwa jest korekta danych. Nacisnąć ◄, aby wrócić do poprzedniego ekranu w celu korekty.

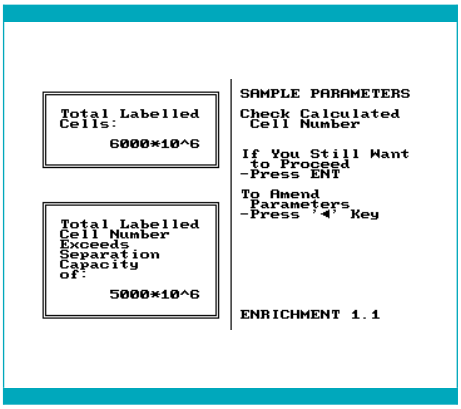


Ekran 7.9: Obliczenie

- Jeśli obliczona liczba znakowanych komórek przekracza wydajność separacji systemu CliniMACS Plus, pojawia się ekran podobny do Ekran 7.10. Upewnić się, że wprowadzono prawidłowe parametry próbki i że obliczona liczba komórek jest prawidłowa. Nacisnąć ◄, aby wrócić do poprzedniego Ekran 7.8 i skorygować parametry próbki.

  Aby uniknąć przeładowania systemu, należy podzielić próbkę i określić objętość każdej porcji. Nacisnąć ◄, aby wrócić do poprzedniego Ekran 7.8. Wprowadzić parametry próbki dla pierwszej porcji próbki i kontynuować separację tej porcji. Po zakończeniu separacji rozpocząć drugą separację z drugą porcją przy użyciu nowego zestawu drenów.

  Nacisnąć **ENT**, aby kontynuować.



Ekran 7.10: Obliczenie: Liczba komórek przekracza wydajność separacji

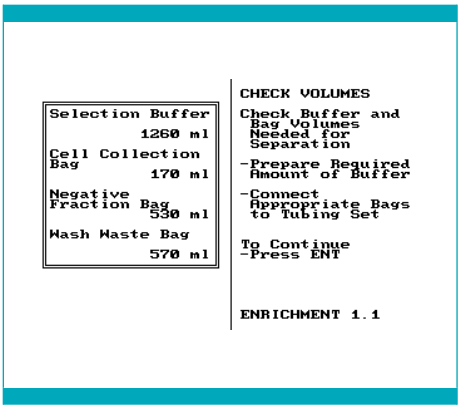
Informacja o objętości

Na podstawie całkowitej liczby znakowanych komórek (patrz rozdział „Obliczenie”) oprogramowanie oblicza liczbę etapów separacji, ilość buforu potrzebną do całej separacji oraz objętości płynów, które zostaną zebrane w Negative Fraction Bag, Buffer Waste Bag i Cell Collection Bag.

Wartości standardowe są następujące:

- CliniMACS PBS/EDTA Buffer: 1 000 mL
- Negative Fraction Bag: 500 mL
- Buffer Waste Bag: 500 mL
- Cell Collection Bag: 150 mL

Jeśli któraś z obliczonych wartości przekracza te wartości standardowe, pojawia się Ekran 7.11, aby poinformować o ilości płynu, który będzie potrzebny i zgromadzony podczas procesu separacji. Jeśli konieczna jest wymiana worków dostarczonych z zestawem drenów (pojemność około 500 mL), należy wymienić je na alternatywne worki o odpowiedniej wielkości. Worki pierwotnie dołączone do zestawu drenów są połączone złączami luer. Worki, które zastępują oryginalne worki, powinny mieć żeńskie złącze luer. Standardowe worki można połączyć za pomocą Luer/Spike Interconnector.



Ekran 7.11: Kontrola objętości

1. Potwierdzić, że dostępna jest żądana ilość buforu. Nie mocować na wieszaku na worek więcej niż trzy litry buforu.

   NOTYFIKACJA

   Ryzyko uszkodzenia aparatu. Przeciążenie wieszaków na worek może spowodować uszkodzenie aparatu. Nośność pojedynczego wieszaka na worek wynosi 3 kg. Nie należy przeciążać wieszaków na worek.

2. Otworzyć tacę z zestawem drenów w sterylnych warunkach i w razie potrzeby wymienić oryginalne worki na większe. Zapewnić nieograniczony przepływ do tych worków.

3. Podłączyć Cell Collection Bag o odpowiedniej wielkości do wolnego złącza luer. Jeśli nie określono na Ekran 7.11, maksymalna objętość elucji frakcji komórek docelowych wynosi 150 mL. Upewnić się, że możliwy jest nieograniczony przepływ do Cell Collection Bag.

WAŻNE

- Upewnić się, że dostępna jest wymagana ilość buforu i że pojemność worków wymienionych na Ekran 7.11 jest wystarczająca. W przeciwnym razie wydajność separacji będzie zagrożona.
- Wszelkie modyfikacje zestawów przewodów CliniMACS powinny być wykonywane w warunkach sterylnych, np. w wyciągu laminarnym.
- W przypadku dalszej analizy lub przetwarzania komórek należy zwrócić uwagę, że objętości podane na Ekran 7.11 nie są objętościami dokładnymi, lecz mieszczącymi się w granicach wymagań bezpieczeństwa.

4. Sprawdzić złącza luer lock na kolumnach. Złącza luer lock muszą być mocno zamknięte.

Nacisnąć **ENT**, aby kontynuować.

Program automatycznie kontynuuje instrukcje dotyczące instalacji zestawu drenów w aparacie.

▶ **Przejść do KROKU 3.**

7.2.4 ENRICHMENT 3.2

WAŻNE

- Program separacji ENRICHMENT 3.2 należy stosować wyłącznie w połączeniu z CliniMACS Tubing Set (REF 161-01).
- W oknie wyświetlacza będą pojawiać się podpowiedzi ekranowe i diagramy służące jako przewodniki po procedurach. Przed przejściem do następnego kroku należy wykonać i sprawdzić każdy krok zgodnie z instrukcją w podręczniku. W celu skorygowania błędu podczas wprowadzania danych należy nacisnąć klawisz „Cofnij" (patrz rozdział „Opis" w Podręczniku użytkownika CliniMACS Plus Instrument).

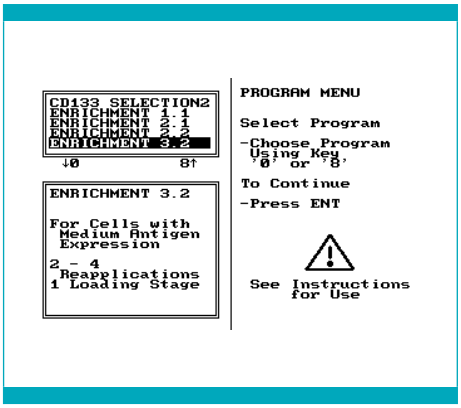
Wybór programu separacji ENRICHMENT 3.2

Okno wyświetla Ekran 7.12.

Wybrać ENRICHMENT 3.2.

W celu wyboru programu separacji należy podświetlić nazwę programu czarnym paskiem. Przesuwać pasek w górę i w dół klawiszami **0** i **8**.

Aby przejść do podświetlonego programu, nacisnąć **ENT**.



Ekran 7.12: Wybór programu separacji

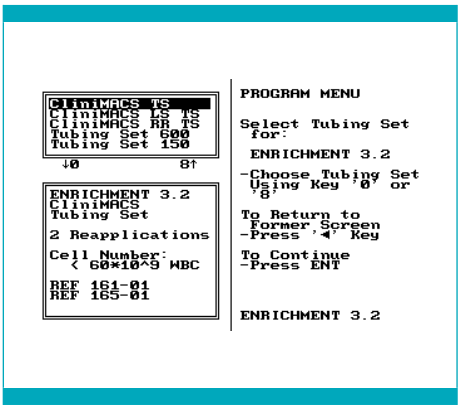
Wybór zestawu drenów

Okno wyświetla Ekran 7.13.

Potwierdzić, że wybrano właściwy program. Jeśli nie, nacisnąć ◄, aby powrócić do poprzedniego kroku w celu zmiany wyboru.

Wybrać zestaw drenów, podświetlając go w polu po lewej stronie czarnym paskiem. Przesuwać pasek w górę i w dół klawiszami **0** i **8**.

Okno poniżej wskazuje istotne dane, jak pojemność i numer katalogowy wybranego zestawu drenów.



Ekran 7.13: Wybór zestawu drenów

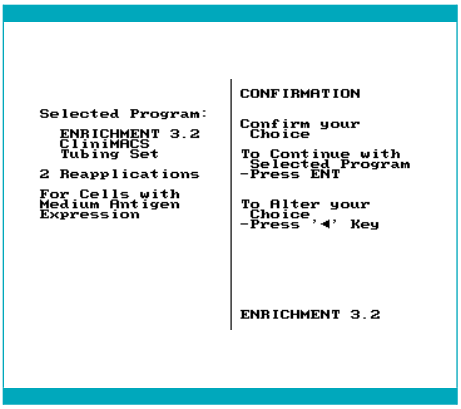
W celu kontynuacji z wybraną kombinacją programu separacji i zestawu drenów nacisnąć **ENT**.

Potwierdzenie

Okno wyświetla Ekran 7.14.

Aby potwierdzić kombinację programu separacji i zestawu drenów i kontynuować, nacisnąć **ENT**.

Jeśli nie, nacisnąć ◄, aby powrócić do poprzedniego kroku w celu zmiany wyboru.



Ekran 7.14: Potwierdzenie

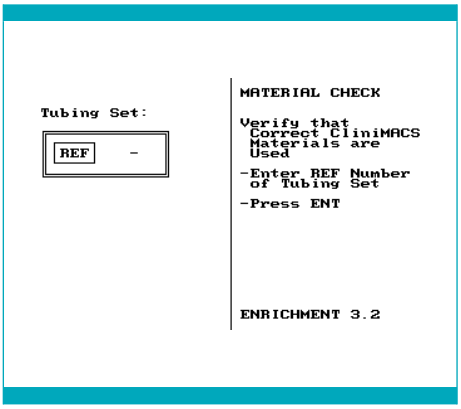
Kontrola materiału

Okno wyświetla Ekran 7.15.

Zapytanie o numer katalogowy (REF) zestawu drenów służy jako kontrola bezpieczeństwa, aby zapewnić, że wybrany zestaw drenów może być używany z wybranym programem.

Wpisać numer katalogowy wybranego zestawu drenów i nacisnąć **ENT**, aby kontynuować.

Jeśli wprowadzono nieodpowiadający numer katalogowy, pojawia się komunikat.



Ekran 7.15: Kontrola materiału

W celu potwierdzenia nacisnąć ENT i wpisać prawidłowy numer katalogowy. Jeśli wprowadzony numer jest nadal nieprawidłowy, komunikat pojawia się po raz drugi. Po naciśnięciu ENT program powróci do menu programów (patrz Ekran 7.12).

Jeśli kontrola materiału zakończyła się powodzeniem, program automatycznie kontynuuje i podaje instrukcję instalacji zestawu drenów.

▶ **Przejść do KROKU 3.**

7.2.5 DEPLETION 2.1

WAŻNE

- Program separacji DEPLETION 2.1 należy stosować wyłącznie w połączeniu z CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01).
- W oknie wyświetlacza będą pojawiać się podpowiedzi ekranowe i diagramy służące jako przewodniki po procedurach. Przed przejściem do następnego kroku należy wykonać i sprawdzić każdy krok zgodnie z instrukcją w podręczniku. W celu skorygowania błędu podczas wprowadzania danych należy nacisnąć klawisz „Cofnij" (patrz rozdział „Opis" w Podręczniku użytkownika CliniMACS Plus Instrument).

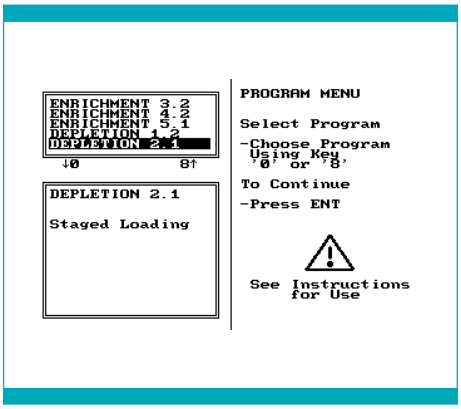
Wybór programu separacji DEPLETION 2.1

Okno wyświetla Ekran 7.16.

Wybrać DEPLETION 2.1.

W celu wyboru programu separacji należy podświetlić nazwę programu czarnym paskiem. Przesuwać pasek w górę i w dół klawiszami 0 i 8.

Aby przejść do podświetlonego programu, nacisnąć ENT.



Ekran 7.16: Wybór programu separacji

Wybór zestawu drenów

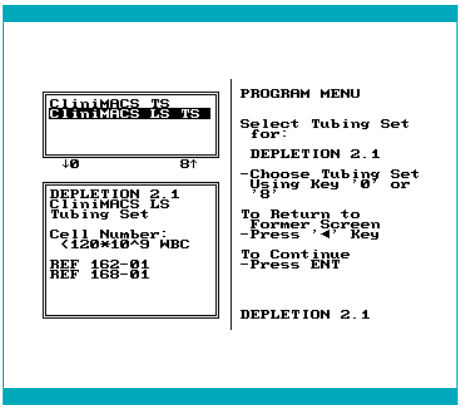
Okno wyświetla Ekran 7.17.

Potwierdzić, że wybrano właściwy program.

Jeśli nie, nacisnąć ◄, aby powrócić do poprzedniego kroku w celu zmiany wyboru.

Wybrać zestaw drenów, podświetlając go w polu u góry po lewej stronie czarnym paskiem. Przesuwać pasek w górę i w dół klawiszami **0** i **8**.

Okno poniżej wskazuje istotne dane, jak pojemność i numer katalogowy wybranego zestawu drenów.



Ekran 7.17: Wybór zestawu drenów

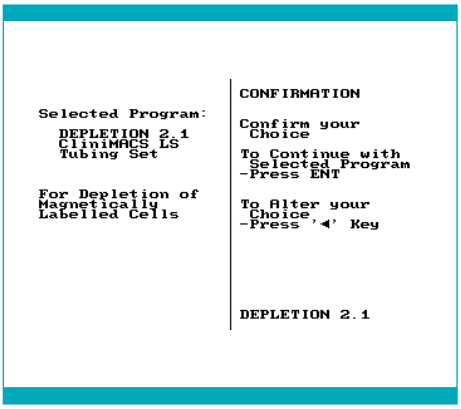
W celu kontynuacji z wybraną kombinacją programu separacji i zestawu drenów nacisnąć **ENT**.

Potwierdzenie

Okno wyświetla Ekran 7.18.

Aby potwierdzić kombinację programu separacji i zestawu drenów i kontynuować, nacisnąć **ENT**.

Jeśli nie, nacisnąć ◄, aby powrócić do poprzedniego kroku w celu zmiany wyboru.



Ekran 7.18: Potwierdzenie

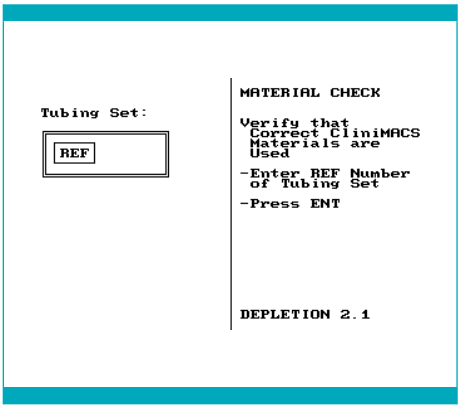
Kontrola materiału

Okno wyświetla Ekran 7.19.

Zapytanie o numer katalogowy (REF) zestawu drenów służy jako kontrola bezpieczeństwa, aby zapewnić, że może być używany zestaw drenów wybrany przez operatora.

Wpisać numer katalogowy wybranego zestawu drenów i nacisnąć **ENT**, aby kontynuować.

Jeśli wprowadzono nieodpowiadający numer katalogowy, pojawia się komunikat.



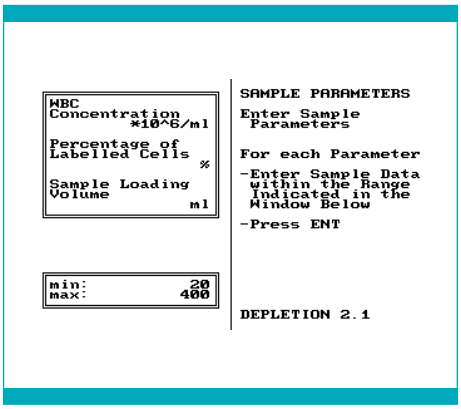
Ekran 7.19: Kontrola materiału

W celu potwierdzenia nacisnąć ENT i wpisać prawidłowy numer katalogowy. Jeśli wprowadzony numer jest nadal nieprawidłowy, komunikat pojawia się po raz drugi. Po naciśnięciu ENT program powróci do menu programów (patrz Ekran 7.16).

Wprowadzenie parametrów próbki

Jeśli kontrola materiału zakończyła się powodzeniem, program kontynuuje automatycznie zapytanie o parametry próbki, które są niezbędne do dostosowania separacji do każdej próbki i dostarczenia operatorowi ważnych informacji o wymaganych objętościach buforu i worka.

Okno wyświetla Ekran 7.20.



Ekran 7.20: Wprowadzenie parametrów próbki

1. Rozpocząć od wprowadzenia stężenia WBC próbki. Dopuszczalny zakres jest pokazany w polu na dole po lewej stronie. Nacisnąć ◄, aby skorygować błędnie wprowadzone dane.

   Potwierdzić, że wprowadzona wartość odzwierciedla wartość próbki. W przeciwnym razie przetwarzanie próbek może nie być optymalne.

   WAŻNE
   Wszystkie wymagane parametry próbki odnoszą się do próbki po zakończeniu procedury znakowania komórek i przemywania. Dopuszczalny zakres pokazany w polu po lewej stronie na dole zawsze uwzględnia poprzednie wprowadzone dane. Po każdym wpisie oprogramowanie oblicza i dopasowuje akceptowany zakres następnego zapytania.

   ⚠ PRZESTROGA

   Określenie błędnych parametrów może spowodować nieoptymalne przetwarzanie próbki i zwiększyć ryzyko utraty komórek docelowych. Wprowadzenie wartości stężenia WBC i/lub odsetka znakowanych komórek, które są niższe niż rzeczywiste wartości próbki, może spowodować utratę komórek z powodu przeładowania systemu. Wprowadzenie mniejszej objętości próbki może spowodować utratę komórek z powodu przeładowania lub nawet niepełnego przetworzenia próbki. Jeżeli specyfikacja któregokolwiek z trzech parametrów jest zbyt wysoka, spowoduje to wydłużenie czasu przetwarzania i zwiększenie objętości frakcji komórek docelowych. Należy zawsze pamiętać o wprowadzaniu prawidłowych parametrów.

   Aby przejść do następnego wpisu, nacisnąć ENT.

2. Wpisać odsetek znakowanych komórek. Potwierdzić, że wprowadzona wartość odzwierciedla wartość próbki. W przeciwnym razie przetwarzanie próbek może nie być optymalne (patrz „Ważne").

   Aby przejść do następnego wpisu, nacisnąć ENT.

3. Wpisać objętość końcową próbki komórkowej. Potwierdzić, że wprowadzona wartość odzwierciedla wartość próbki. W przeciwnym razie przetwarzanie próbek może nie być optymalne (patrz „Ważne”).

Nacisnąć **ENT**, aby kontynuować.

Obliczenie

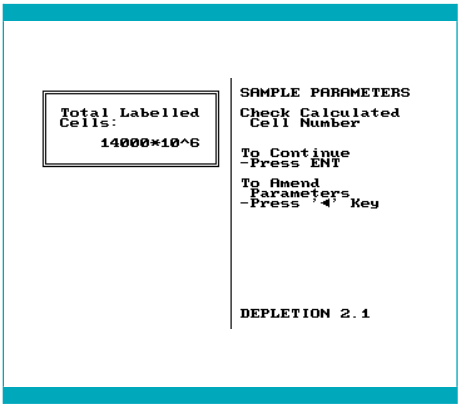
Oprogramowanie CliniMACS Plus oblicza całkowitą liczbę znakowanych komórek, aby sprawdzić, czy wydajność separacji jest wystarczająca.

Wynik jest wyświetlany na jednym z dwóch możliwych ekranów:

- Wynik obliczeń jest wyświetlany na ekranie podobnym do Ekran 7.21. Upewnić się, że obliczona liczba znakowanych komórek jest prawidłowa.

  Nacisnąć **ENT**, aby kontynuować.

  Możliwa jest korekta danych. Nacisnąć ◄, aby wrócić do poprzedniego ekranu w celu korekty.

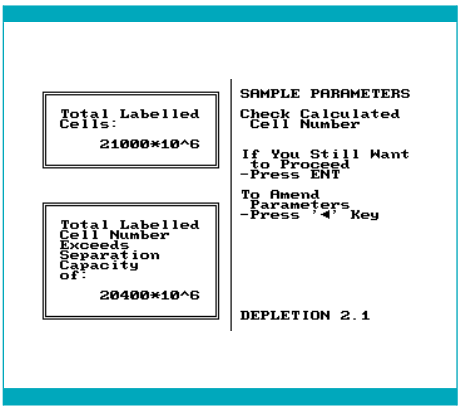


Ekran 7.21: Obliczenie

- Jeśli obliczona liczba znakowanych komórek przekracza wydajność separacji systemu CliniMACS Plus, pojawia się ekran podobny do Ekran 7.22. Upewnić się, że wprowadzono prawidłowe parametry próbki i że obliczona liczba komórek jest prawidłowa. Nacisnąć ◄, aby wrócić do poprzedniego ekranu w celu korekty parametrów próbki.

  Aby uniknąć przeładowania systemu, należy podzielić próbkę i określić objętość każdej porcji. Nacisnąć ◄, aby wrócić do poprzedniego Ekran 7.20. Wprowadzić parametry próbki dla pierwszej porcji próbki i kontynuować separację tej porcji. Po zakończeniu separacji rozpocząć drugą separację z drugą porcją przy użyciu nowego zestawu drenów.

  Nacisnąć **ENT**, aby kontynuować.



Ekran 7.22: Obliczenie: Liczba komórek przekracza wydajność separacji

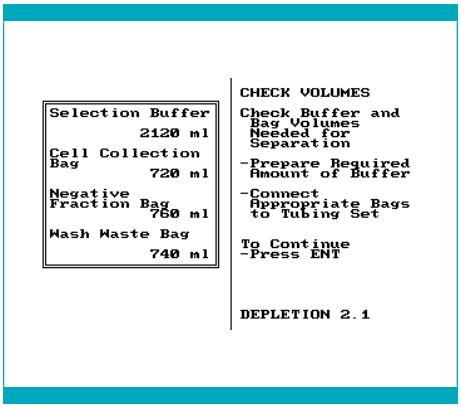
Informacja o objętości

Na podstawie całkowitej liczby znakowanych komórek (patrz rozdział „Obliczenie") oprogramowanie oblicza liczbę etapów separacji, ilość buforu potrzebną do całej separacji oraz objętości płynów, które zostaną zebrane w Negative Fraction Bag, Buffer Waste Bag i Cell Collection Bag.

Wartości standardowe są następujące:

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

Jeśli któraś z obliczonych wartości przekracza te wartości standardowe, pojawia się Ekran 7.23, aby poinformować o ilości płynu, który będzie potrzebny i zgromadzony podczas procesu separacji. Jeśli konieczna jest wymiana worków dostarczonych z zestawem drenów (pojemność około 500 mL), należy wymienić je na alternatywne worki o odpowiedniej wielkości. Worki pierwotnie dołączone do zestawu drenów są połączone złączami luer. Worki, które zastępują oryginalne worki, powinny mieć żeńskie złącze luer. Standardowe worki można połączyć za pomocą Luer/Spike Interconnector.



Ekran 7.23: Kontrola objętości

1. Potwierdzić, że dostępna jest żądana ilość buforu. Nie mocować na wieszaku na worek więcej niż trzy litry buforu.

   NOTYFIKACJA

   Ryzyko uszkodzenia aparatu. Przeciążenie wieszaków na worek może spowodować uszkodzenie aparatu. Nośność pojedynczego wieszaka na worek wynosi 3 kg. Nie należy przeciążać wieszaków na worek.

2. Otworzyć tacę z zestawem drenów w sterylnych warunkach i w razie potrzeby wymienić oryginalne worki na większe. Zapewnić nieograniczony przepływ do tych worków.

3. Podłączyć Cell Collection Bag o odpowiedniej wielkości do wolnego złącza luer. Jeśli nie określono na Ekran 7.23, maksymalna objętość elucji frakcji komórek docelowych wynosi 150 mL. Upewnić się, że możliwy jest nieograniczony przepływ do Cell Collection Bag.

   WAŻNE

   - Upewnić się, że dostępna jest wymagana ilość buforu i że pojemność worków wymienionych na Ekran 7.23 jest wystarczająca. W przeciwnym razie wydajność separacji będzie zagrożona.

- Wszelkie modyfikacje zestawów przewodów CliniMACS powinny być wykonywane w warunkach sterylnych, np. w wyciągu laminarnym.
- W przypadku dalszej analizy lub przetwarzania komórek należy zwrócić uwagę, że objętości podane na Ekran 7.23 nie są objętościami dokładnymi, lecz mieszczącymi się w granicach wymagań bezpieczeństwa.

4. Sprawdzić złącza luer lock na kolumnach. Złącza luer lock muszą być mocno zamknięte.

Nacisnąć **ENT**, aby kontynuować.

Program automatycznie kontynuuje instrukcje dotyczące instalacji zestawu drenów w aparacie.

▶ **Przejść do KROKU 3.**

7.2.6 DEPLETION 3.1

Ważne

- Program separacji DEPLETION 3.1 należy stosować wyłącznie w połączeniu z CliniMACS Depletion Tubing Set (REF 261-01).
- W oknie wyświetlacza będą pojawiać się podpowiedzi ekranowe i diagramy służące jako przewodniki po procedurach. Przed przejściem do następnego kroku należy wykonać i sprawdzić każdy krok zgodnie z instrukcją w podręczniku. W celu skorygowania błędu podczas wprowadzania danych należy nacisnąć klawisz „Cofnij" (patrz rozdział „Opis" w Podręczniku użytkownika CliniMACS Plus Instrument).

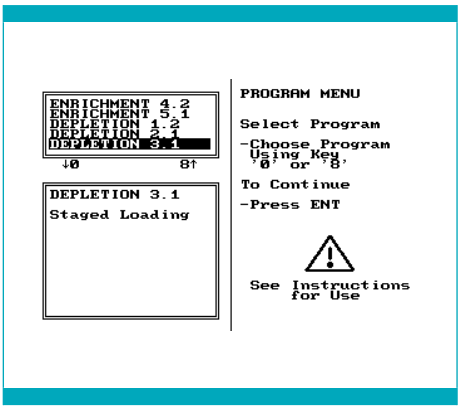
Wybór programu separacji DEPLETION 3.1

Okno wyświetla Ekran 7.24.

Wybrać DEPLETION 3.1.

W celu wyboru programu separacji należy podświetlić nazwę programu czarnym paskiem. Przesuwać pasek w górę i w dół klawiszami **0** i **8**.

Aby przejść do podświetlonego programu, nacisnąć **ENT**.



Ekran 7.24: Wybór programu separacji

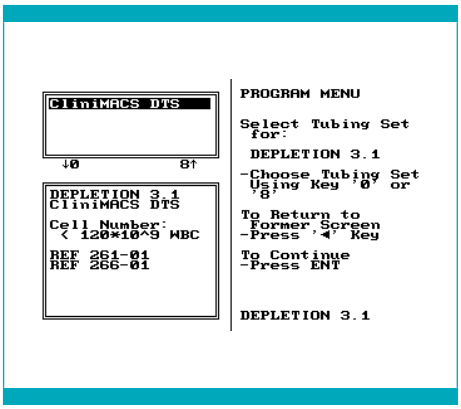
Wybór zestawu drenów

Okno wyświetla Ekran 7.25.

Potwierdzić, że wybrano właściwy program. Jeśli nie, nacisnąć ◄, aby powrócić do poprzedniego kroku w celu zmiany wyboru.

Wybrać zestaw drenów, podświetlając go w polu u góry po lewej stronie czarnym paskiem. Przesuwać pasek w górę i w dół klawiszami 0 i 8.

Okno poniżej wskazuje istotne dane, jak pojemność i numer katalogowy wybranego zestawu drenów.



Ekran 7.25: Wybór zestawu drenów

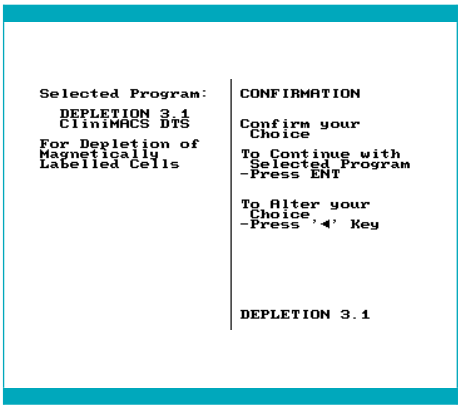
W celu kontynuacji z wybraną kombinacją programu separacji i zestawu drenów nacisnąć ENT.

Potwierdzenie

Okno wyświetla Ekran 7.26.

Aby potwierdzić kombinację programu separacji i zestawu drenów i kontynuować, nacisnąć ENT.

Jeśli nie, nacisnąć ◄, aby powrócić do poprzedniego kroku w celu zmiany wyboru.



Ekran 7.26: Potwierdzenie

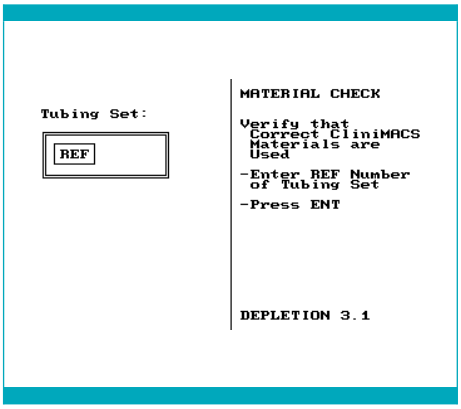
Kontrola materiału

Okno wyświetla Ekran 7.27.

Zapytanie o numer katalogowy (REF) zestawu drenów służy jako kontrola bezpieczeństwa, aby zapewnić, że może być używany zestaw drenów wybrany przez operatora.

Wpisać numer katalogowy wybranego zestawu drenów i nacisnąć ENT, aby kontynuować.

Jeśli wprowadzono nieodpowiadający numer katalogowy, pojawia się komunikat.



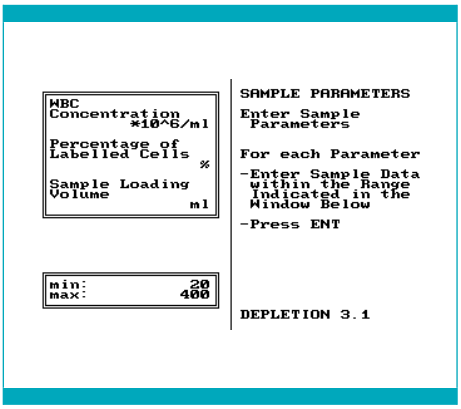
Ekran 7.27: Kontrola materiału

W celu potwierdzenia nacisnąć ENT i wpisać prawidłowy numer katalogowy. Jeśli wprowadzony numer jest nadal nieprawidłowy, komunikat pojawia się po raz drugi. Po naciśnięciu ENT program powróci do menu programów (patrz Ekran 7.25).

Wprowadzenie parametrów próbki

Jeśli kontrola materiału zakończyła się powodzeniem, program kontynuuje automatycznie zapytanie o niektóre parametry próbki, które są niezbędne do dostosowania separacji do każdej próbki i dostarczenia operatorowi ważnych informacji o wymaganych objętościach buforu i worka.

Okno wyświetla Ekran 7.28.



Ekran 7.28: Wprowadzenie parametrów próbki

1. Rozpocząć od wprowadzenia stężenia WBC próbki. Dopuszczalny zakres jest pokazany w polu na dole po lewej stronie. Nacisnąć ◀, aby skorygować błędnie wprowadzone dane.

   Potwierdzić, że wprowadzona wartość odzwierciedla wartość próbki. W przeciwnym razie przetwarzanie próbek może nie być optymalne.

   WAŻNE

   Wszystkie wymagane parametry próbki odnoszą się do próbki po zakończeniu procedury znakowania komórek i przemywania. Dopuszczalny zakres pokazany w polu po lewej stronie na dole zawsze uwzględnia poprzednie wprowadzone dane. Po każdym wpisie oprogramowanie oblicza i dopasowuje akceptowany zakres następnego zapytania.

   ⚠ PRZESTROGA

   Określenie błędnych parametrów może spowodować nieoptymalne przetwarzanie próbki i zwiększyć ryzyko utraty komórek docelowych. Wprowadzenie wartości stężenia WBC i/lub odsetka znakowanych komórek, które są niższe niż rzeczywiste wartości próbki, może spowodować utratę komórek z powodu przeładowania systemu. Wprowadzenie mniejszej objętości próbki może spowodować utratę komórek z powodu przeładowania lub nawet niepełnego przetworzenia próbki. Jeżeli specyfikacja któregokolwiek z trzech parametrów jest zbyt wysoka, spowoduje to wydłużenie czasu przetwarzania i zwiększenie objętości frakcji komórek docelowych. Należy zawsze pamiętać o wprowadzaniu prawidłowych parametrów.

   Aby przejść do następnego wpisu, nacisnąć ENT.

2. Wpisać odsetek znakowanych komórek. Potwierdzić, że wprowadzona wartość odzwierciedla wartość próbki. W przeciwnym razie przetwarzanie próbek może nie być optymalne (patrz „Ważne").

   Aby przejść do następnego wpisu, nacisnąć ENT.

3. Wpisać objętość końcową próbki komórkowej. Potwierdzić, że wprowadzona wartość odzwierciedla wartość próbki. W przeciwnym razie przetwarzanie próbek może nie być optymalne (patrz „Ważne”).

Nacisnąć **ENT**, aby kontynuować.

Obliczenie

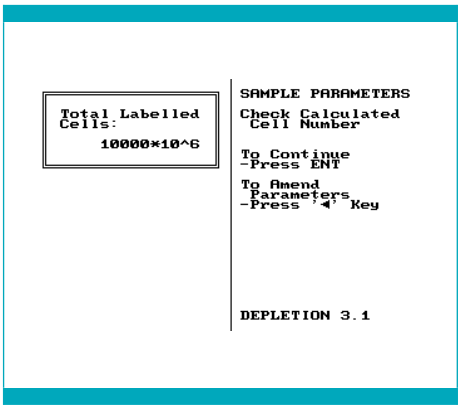
Oprogramowanie CliniMACS Plus oblicza całkowitą liczbę znakowanych komórek, aby sprawdzić, czy wydajność separacji jest wystarczająca.

Wynik jest wyświetlany na jednym z dwóch możliwych ekranów:

- Wynik obliczeń jest wyświetlany na ekranie podobnym do Ekran 7.29. Upewnić się, że obliczona liczba znakowanych komórek jest prawidłowa.

  Nacisnąć **ENT**, aby kontynuować.

  Możliwa jest korekta danych. Nacisnąć ◄, aby wrócić do poprzedniego ekranu w celu korekty.

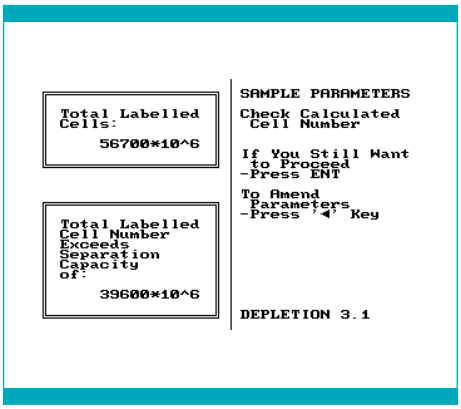


Ekran 7.29: Wybór zestawu drenów

- Jeśli obliczona liczba znakowanych komórek przekracza wydajność separacji systemu CliniMACS Plus, pojawia się ekran podobny do Ekran 7.30. Upewnić się, że wprowadzono prawidłowe parametry próbki i że obliczona liczba komórek jest prawidłowa. Nacisnąć ◄, aby wrócić do poprzedniego ekranu w celu korekty parametrów próbki.

  Aby uniknąć przeładowania systemu, należy podzielić próbkę i określić objętość każdej porcji. Nacisnąć ◄, aby wrócić do poprzedniego Ekran 7.28. Wprowadzić parametry próbki dla pierwszej porcji próbki i kontynuować separację tej porcji. Po zakończeniu separacji rozpocząć drugą separację z drugą porcją przy użyciu nowego zestawu drenów.

  Nacisnąć **ENT**, aby kontynuować.



Ekran 7.30: Obliczenie: Liczba komórek przekracza wydajność separacji

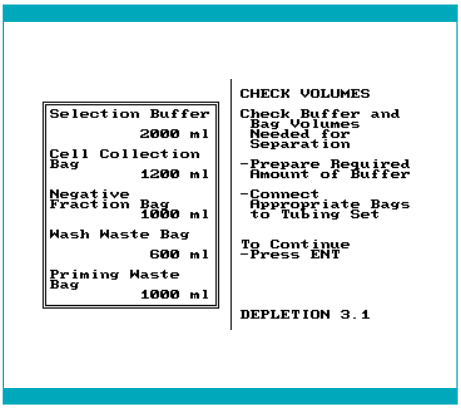
Informacja o objętości

Na podstawie całkowitej liczby znakowanych komórek (patrz rozdział „Obliczenie”) oprogramowanie oblicza liczbę etapów separacji, ilość buforu potrzebną do całej deplecji oraz objętości płynów, które zostaną zebrane w Cell Collection Bag, Non-Target Cell Bag i Reapplication Bag.

WAŻNE

- Negative Fraction Bag odpowiada workowi Non-Target Cell Bag.
- Priming Waste Bag odpowiada workowi Reapplication Bag.

Jeśli któraś z obliczonych wartości przekracza te wartości standardowe, pojawia się Ekran 7.31, aby poinformować o ilości płynu, który będzie potrzebny i zgromadzony podczas procesu separacji. Jeśli konieczna jest wymiana worków dostarczonych z zestawem drenów, należy wymienić je na alternatywne worki o odpowiedniej wielkości. Worki pierwotnie dołączone do zestawu drenów są połączone złączami luer. Worki, które zastępują oryginalne worki, powinny mieć żeńskie złącze luer. Standardowe worki można połączyć za pomocą Luer/Spike Interconnector.



Ekran 7.31: Kontrola objętości

1. Potwierdzić, że dostępna jest żądana ilość buforu. Nie mocować na wieszaku na worek więcej niż trzy litry buforu.

   NOTYFIKACJA

   Ryzyko uszkodzenia aparatu. Przeciążenie wieszaków na worek może spowodować uszkodzenie aparatu. Nośność pojedynczego wieszaka na worek wynosi 3 kg. Nie należy przeciążać wieszaków na worek.

2. Otworzyć tacę z zestawem drenów w sterylnych warunkach i w razie potrzeby wymienić oryginalne worki na większe. Zapewnić nieograniczony przepływ do tych worków.

3. Jeśli konieczna jest wymiana, należy wymienić Cell Collection Bag zestawu drenów na worek transferowy o wystarczającej wielkości. Określić wagę nowego, pustego Cell Collection Bag i zapisać ją. Upewnić się, że możliwy jest nieograniczony przepływ do Cell Collection Bag. Ewentualnie podłączyć dodatkowy worek transferowy o pojemności 600 mL do pierwszego worka Cell Collection Bag, np. za pomocą zestawu do przetaczania osocza.

   WAŻNE

   - Upewnić się, że dostępna jest wymagana ilość buforu i że pojemność worków wymienionych na Ekran 7.31 jest wystarczająca. W przeciwnym razie wydajność separacji będzie zagrożona.
   - Wszelkie modyfikacje zestawów przewodów CliniMACS powinny być wykonywane w warunkach sterylnych, np. w wyciągu laminarnym.
   - W przypadku dalszej analizy lub przetwarzania komórek należy zwrócić uwagę, że objętości podane na Ekran 7.31 nie są objętościami dokładnymi, lecz mieszczącymi się w granicach wymagań bezpieczeństwa.

4. Sprawdzić złącza luer lock na kolumnach. Złącza luer lock muszą być mocno zamknięte.

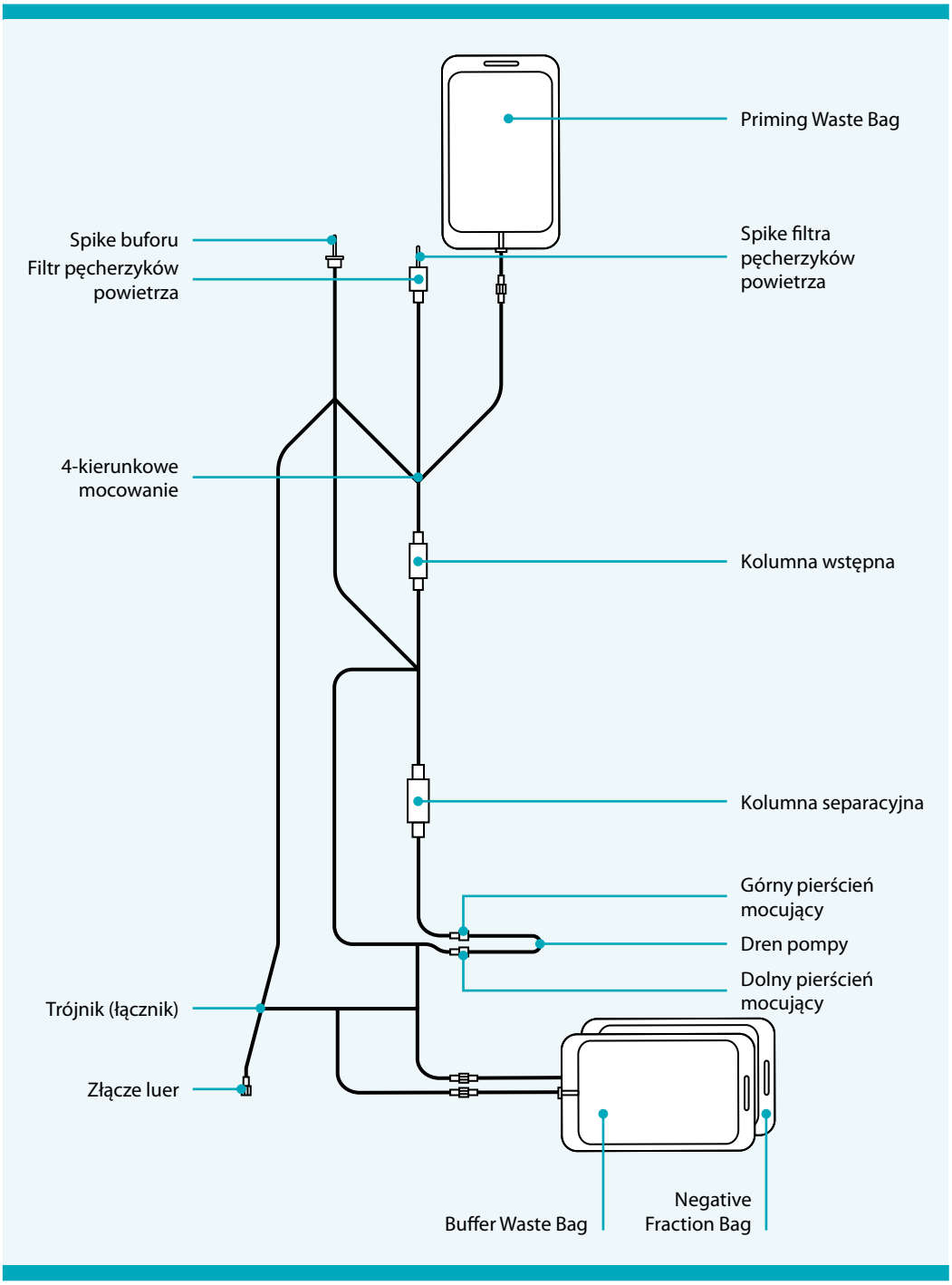
Nacisnąć **ENT**, aby kontynuować.

Program automatycznie kontynuuje instrukcje dotyczące instalacji zestawu drenów w aparacie.

▶ **Przejść do KROKU 3.**

7.3 KROK 3: Instalacja zestawów przewodów CliniMACS

7.3.1 CliniMACS Tubing Set i CliniMACS Tubing Set LS

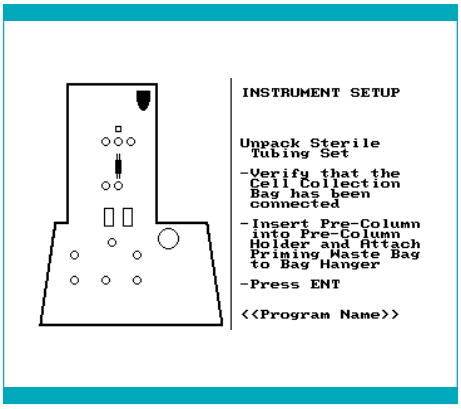


Rysunek 7.2: Ogólna budowa zestawu drenów CliniMACS (np. CliniMACS Tubing Set)

Przygotowanie do instalacji zestawu drenów

Okno wyświetla Ekran 7.32.

Instrukcja jest pokazana po prawej stronie, a schemat odpowiadający instrukcji po lewej stronie ekranu. Migające elementy na ekranie wskazują obszary, na które należy zwrócić uwagę.



Ekran 7.32: Rozpakowanie zestawu drenów

Zestawy CliniMACS Tubing Set i CliniMACS Tubing Set LS są dostarczane w szczelnie zamkniętych, sterylizowanych opakowaniach. Każdy zestaw drenów zawiera wstępnie zmontowane dreny i kolumny do jednej separacji komórek (patrz Rysunek 7.2). Gdy opakowanie jest nienaruszone, zapewniona jest sterylna droga płynu.

⚠ OSTRZEŻENIE

Ryzyko zanieczyszczenia. Uszkodzone opakowanie wskazuje, że zestaw drenów może nie być już sterylny i dlatego nie wolno go używać. Dokładnie sprawdzić opakowanie pod kątem uszkodzeń, przebić lub rozdarć. Zestaw drenów można stosować jedynie w przypadku nieuszkodzonego i zamkniętego opakowania.

Wskazówka: Aparat CliniMACS Plus Instrument pokazuje wybraną nazwę programu, np. CD34 SELECTION 1, w dolnym wierszu ekranu aparatu. Na każdym kroku instalacji zestawu drenów można nacisnąć klawisz „Cofnij" (patrz rozdział „Opis" w Podręczniku użytkownika CliniMACS Plus Instrument), aby powrócić do poprzedniego kroku.

1. Zapisać numer serii i termin ważności zestawu drenów.

   Rozpakować sterylny zestaw drenów w sterylnych warunkach (np. w wyciągu laminarnym). Przed użyciem zestawu drenów CliniMACS Tubing Set LS należy zdjąć klamrę zaciskową użytą do opakowania. Klamra jest oznaczona napisem „Remove before assembly to CliniMACS Plus Instrument" („Zdjąć przed montażem do aparatu CliniMACS Plus Instrument").

2. Sprawdzić złącza luer lock do worków. Złącza luer lock muszą być mocno zamknięte.

Połączenie Cell Collection Bag

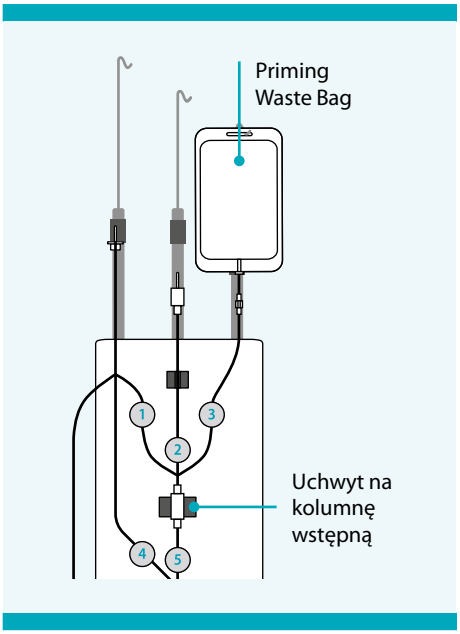
1. Zapisać wagę pustego Cell Collection Bag.
2. W środowisku aseptycznym zdjąć nasadki i założyć sterylny Cell Collection Bag, wyposażony w Luer/Spike Interconnector, na zestaw drenów przed załadowaniem zestawu drenów na aparat CliniMACS Plus Instrument. Upewnić się, że oryginalny dren worka Cell Collection Bag jest zaciśnięty lub zgrzany.

   Jeśli do separacji konieczne jest zastosowanie więcej niż jednego worka Cell Collection Bag, należy połączyć worki za pomocą zestawu do przetaczania osocza. Upewnić się, że wszystkie połączenia są mocno zamknięte.
3. Upewnić się, że możliwy jest nieograniczony przepływ do Cell Collection Bag.
4. Kontynuować instalację zestawu drenów stosując procedurę opisaną poniżej lub procedurę „Alternatywna instalacja zestawów przewodów CliniMACS".

Podłączyć Priming Waste Bag i włożyć kolumnę wstępną

Okno wyświetla Ekran 7.32.

1. Podłączyć worek Priming Waste Bag do prawego wieszaka na worek na aparacie (patrz Rysunek 7.3).
2. Dostosować wysokość wieszaka na worek. Podnieść lub obniżyć wieszak na worek, aby dostosować wysokość do wielkości worka Priming Waste Bag. Należy upewnić się, że jest on umieszczony wystarczająco wysoko, aby zapobiec poważnemu zagięciu drenu, które mogłoby ograniczyć przepływ, oraz że jest wystarczająco nisko, aby uniknąć rozciągnięcia drenu lub połączeń.
3. Umieścić kolumnę wstępną w uchwycie (patrz Rysunek 7.3).



Rysunek 7.3: Podłączenie worka Priming Waste Bag do wieszaka na worek

Aby kontynuować, nacisnąć **ENT**.

Włożyć kolumnę separacyjną i załadować zawór nr 5

Okno wyświetla Ekran 7.33.

Zawory pokazane na ekranie w kolorze czarnym zostaną automatycznie otwarte, aby ułatwić wprowadzenie drenu.

1. Włożyć kolumnę separacyjną do uchwytu kolumny separacyjnej (patrz Rysunek 7.4).

   ⚠ OSTRZEŻENIE

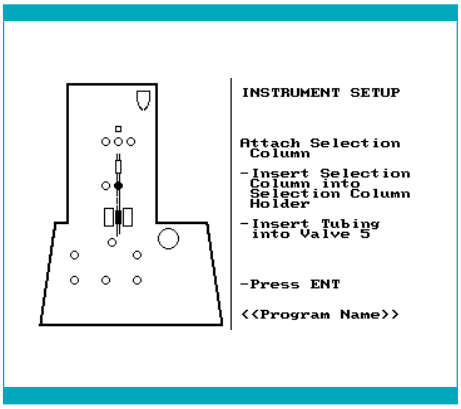
   Ryzyko urazu. Jeśli kolumna separacyjna zostanie włożona lub wyjęta przy włączonej jednostce magnesu, istnieje ryzyko odniesienia obrażeń ciała. Kolumnę separacyjną należy wkładać lub wyjmować tylko wtedy, gdy jednostka magnesu jest wyłączona.

2. Załadować dren do zaworu nr 5.

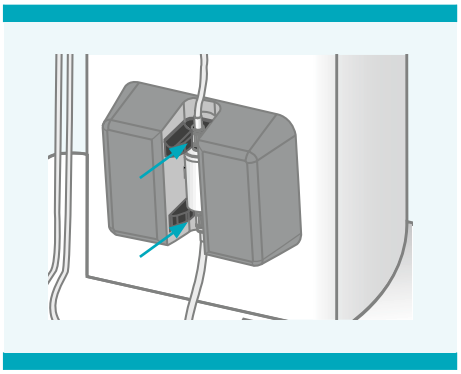
WAŻNE

- Podczas wykonywania każdego kroku należy sprawdzić, czy wszystkie dreny i mocowania nie są zagięte lub mocno wygięte, co mogłoby ograniczyć przepływ płynu przez dreny. Sprawdzić wszystkie zawory, aby upewnić się, że dren jest dobrze dopasowany.
- Zestaw drenów wkładać tylko do otwartych zaworów (gdy przycisk jest wciśnięty do środka). Dren nie będzie prawidłowo dopasowany, jeśli zostanie włożony do zamkniętego zaworu.
- Jeśli po zamknięciu zaworu trzeba wyregulować dren, nie należy ciągnąć drenu bez naciśnięcia przycisku zaworu w celu jego otwarcia (patrz Rysunek 7.5).

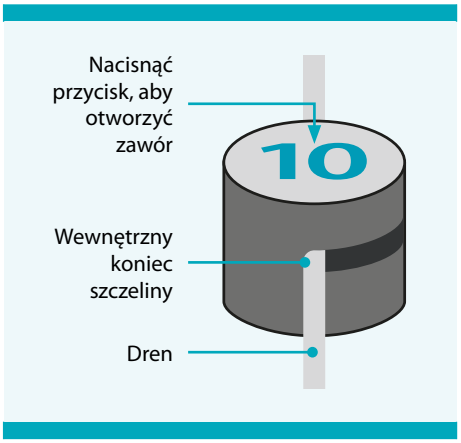
Aby kontynuować, nacisnąć **ENT**.



Ekran 7.33: Włożenie kolumny separacyjnej i załadowanie zaworu nr 5



Rysunek 7.4: Kolumna separacyjna w uchwycie kolumny separacyjnej



Rysunek 7.5: Prawidłowo włożony dren

Załadowanie zaworów nr 1, 2, 3 i 4

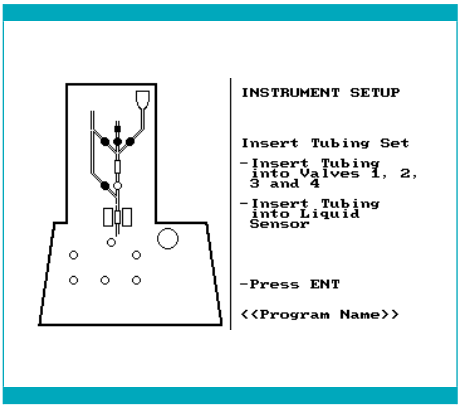
Okno wyświetla Ekran 7.34.

1. Załadować dren do zaworu nr 4. Upewnić się, że dren jest mocno umieszczony w otworze zaworu (patrz Rysunek 7.5). Zwrócić szczególną uwagę na obszar pomiędzy zaworami nr 4 i 5 (patrz Rysunek 7.6) i trzymać mocowanie czterokierunkowe w pozycji pionowej.
2. Wprowadzić dren do zaworu nr 1.
3. Ustawić 4-kierunkowe mocowanie tuż pod zaworem nr 2. Zwrócić szczególną uwagę na obszar poniżej zaworu nr 2.
4. Włożyć dren do zaworu nr 2 i 3.
5. Zamontować dren pomiędzy zaworem nr 2 a filtrem pęcherzyków powietrza do czujnika płynu. Sprawdzić, czy dren jest prawidłowo umieszczony w mocowaniu czujnika.

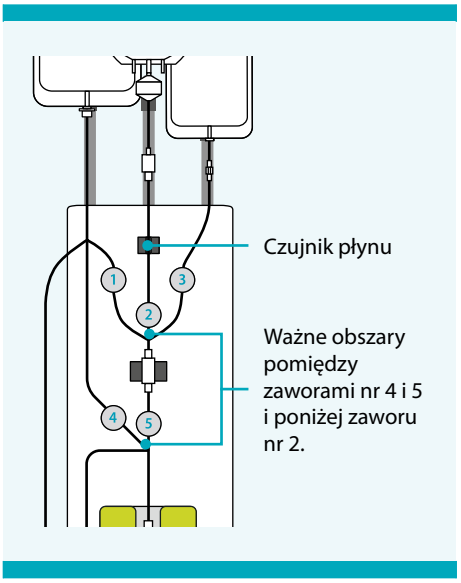
WAŻNE

Aby zapewnić prawidłowe działanie, zarówno czujnik płynu, jak i wprowadzany dren muszą być suche. Dokładnie sprawdzić oba. W przypadku obecności jakiegokolwiek płynu należy osuszyć ten obszar miękką, niestrzępiącą się ściereczką.

Aby kontynuować, nacisnąć **ENT**.



Ekran 7.34: Załadowanie zaworów nr 1, 2, 3, 4 i czujnika płynu

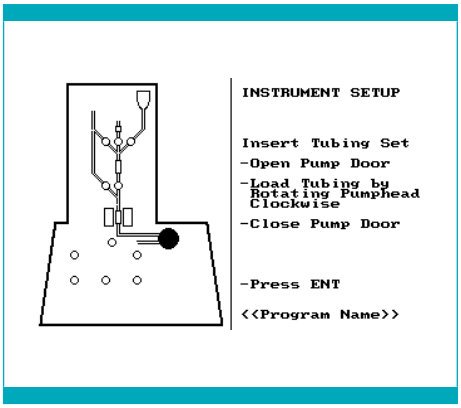


Rysunek 7.6: Dren w zaworach

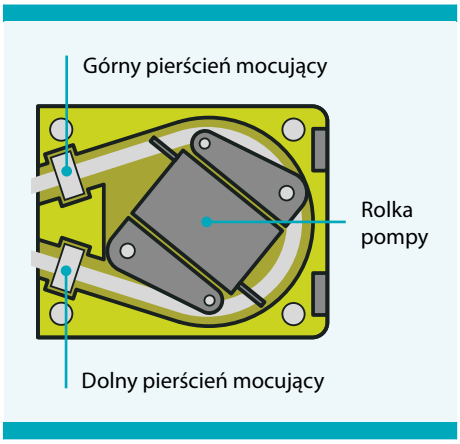
Załadowanie drenu pompy

Okno wyświetla Ekran 7.35.

1. Otworzyć drzwi pompy, podnosząc je do góry przy lewej krawędzi.
2. Włożyć górny pierścień mocujący na drenie pompy do rowka pierścienia mocującego na obudowie pompy (patrz Rysunek 7.7).
3. Obracać rolkę pompy w kierunku zgodnym z ruchem wskazówek zegara, aż dren zostanie przewleczony między obydwoma zestawami trzpieni prowadzących dren i dren będzie ściśle przylegał do rolki pompy. Upewnić się, że dren nie jest ściśnięty na końcu trzpieni prowadzących. Jeśli konieczna jest regulacja drenu wewnątrz pompy, można go rozładować, podnosząc dolny koniec i obracając rolkę pompy w kierunku przeciwnym do ruchu wskazówek zegara.
4. Włożyć dolny pierścień mocujący na drenie pompy do rowka pierścienia mocującego na obudowie pompy.
5. Obracać rolkę pompy w prawo i w lewo, aby upewnić się, że rolka pompy porusza się swobodnie.
6. Zamknąć drzwi pompy.



Ekran 7.35: Załadowanie drenu pompy



Rysunek 7.7: Załadowanie drenu pompy

WAŻNE

Podczas programu separacji komórek pompa natychmiast zatrzymuje bieg po każdym otwarciu obudowy pompy. Jeśli pozostanie otwarta przez ponad 600 sekund, aparat przerwie trwający bieg.

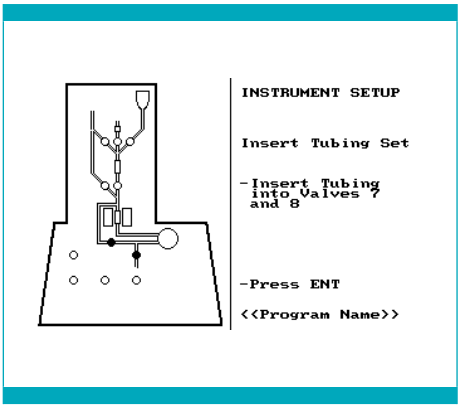
Aby kontynuować, nacisnąć **ENT**.

Załadowanie zaworów nr 7 i 8

Okno wyświetla Ekran 7.36.

1. Załadować dren do zaworu nr 7.
2. Załadować dren do zaworu nr 8.

Aby kontynuować, nacisnąć **ENT**.



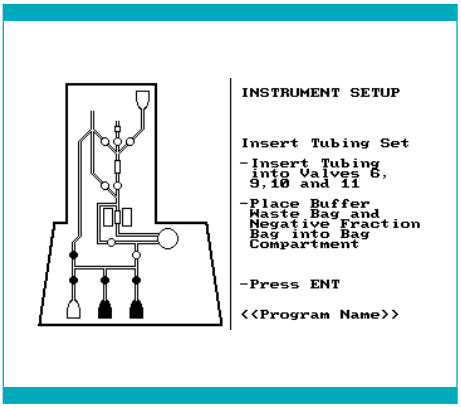
Ekran 7.36: Załadowanie zaworów nr 7 i 8

Załadowanie zaworów nr 6, 9, 10 i 11

Okno wyświetla Ekran 7.37.

1. Załadować dren do zaworów nr 6, 9, 10 i 11.
2. Umieścić Negative Fraction Bag i Buffer Waste Bag w komorze worka. Upewnić się, że dren nie jest ściśnięty pod pokrywą komory worka.

Aby kontynuować, nacisnąć **ENT**.



Ekran 7.37: Załadowanie zaworów nr 6, 9, 10 i 11

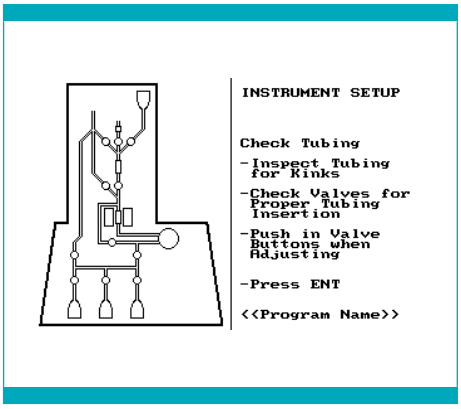
Ponowna kontrola wszystkich drenów i mocowań

Okno wyświetla Ekran 7.38.

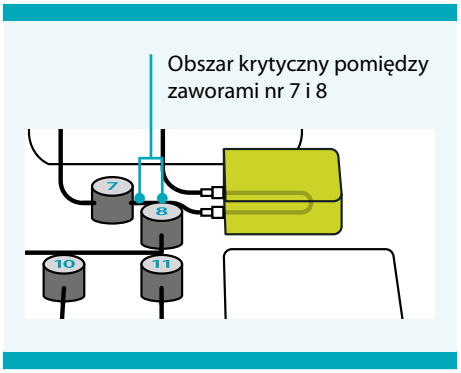
Przed rozpoczęciem separacji komórek należy ponownie sprawdzić wszystkie dreny i mocowania.

Wskazówka: Sprawdzić wszystkie zawory pod kątem prawidłowego wprowadzenia drenów. Upewnić się, że dren jest rozmieszczony równomiernie i że nie ma w nim zagięć ani naciągnięć. Należy zwrócić szczególną uwagę na obszar kolumny wstępnej, jak również obszar pomiędzy pompą a zaworami nr 7 i 8 (patrz Rysunek 7.8) i pomiędzy zaworami nr 4 i 5 (patrz Rysunek 7.6). Jeśli po zamknięciu zaworu trzeba wyregulować dren, nie należy ciągnąć drenu bez naciśnięcia przycisku zaworu w celu jego otwarcia. Jeśli dren został wyregulowany, należy bezwzględnie dwa razy mocno nacisnąć odpowiednie zawory.

Aby kontynuować, nacisnąć **ENT**.



Ekran 7.38: Ponowna kontrola wszystkich drenów i mocowań



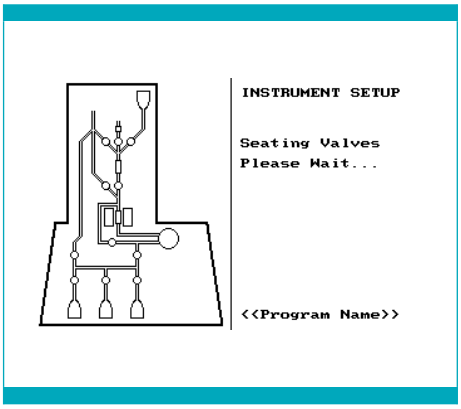
Rysunek 7.8: Dren w zaworach

Osadzenie zaworów

Okno wyświetla Ekran 7.39.

W celu zapewnienia właściwego dopasowania drenu w zaworach aparat uruchomi dwukrotnie wszystkie zawory w sekwencji. Obserwować i słuchać, aby upewnić się, że wszystkie zawory działają prawidłowo. Jeśli któryś z zaworów nie działa prawidłowo, patrz rozdział 8 „Rozwiązywanie problemów" na stronie 215. Ten krok można powtórzyć, naciskając ◄, a następnie **ENT** (patrz rozdział „Opis" w Podręczniku użytkownika CliniMACS Plus Instrument).

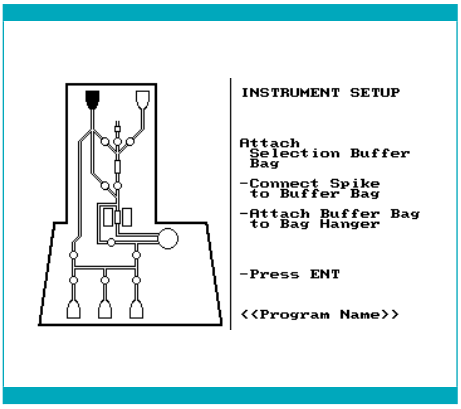
Podczas tej sekwencji kontrolnej testowany jest również napęd magnetyczny.



Ekran 7.39: Osadzenie zaworów

Podłączenie CliniMACS PBS/EDTA Buffer

Okno wyświetla Ekran 7.40.



Ekran 7.40: Podłączenie worka na bufor

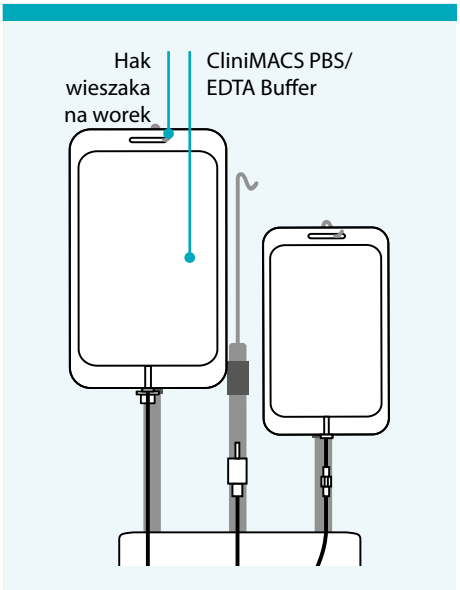
Buforem zalecanym do separacji CliniMACS Plus jest CliniMACS PBS/EDTA Buffer uzupełniony HSA do stężenia końcowego 0,5% (wag./obj.).

1. Stosując techniki aseptyczne, zdjąć nasadkę ze spike'a buforu na zestawie drenów (patrz Rysunek 7.2 na stronie 160) i podłączyć go do worka na bufor. Upewnić się, że przegroda została przebita, umożliwiając swobodny przepływ płynu. Delikatnie ścisnąć worek, aby potwierdzić, że kolec przebił się przez worek.

   Jeśli do separacji konieczne jest zastosowanie więcej niż jednego litra buforu, należy połączyć dwa worki na bufor za pomocą zestawu do przetaczania osocza.

2. Podłączyć worek na bufor do haka worka na bufor na wieszaku na worek (patrz Rysunek 7.9).

3. Dostosować wysokość wieszaka na worek na bufor. Podnieść lub obniżyć wieszak na worek, aby dostosować wysokość do wielkości worka na bufor. Należy upewnić się, że jest on umieszczony wystarczająco wysoko, aby zapobiec poważnemu zagięciu drenu, które mogłoby ograniczyć przepływ, oraz że jest wystarczająco nisko, aby uniknąć rozciągnięcia drenu lub połączeń.



Rysunek 7.9: Podłączenie worka na bufor

NOTYFIKACJA

Ryzyko uszkodzenia aparatu. Przeciążenie wieszaków na worek może spowodować uszkodzenie aparatu. Nośność pojedynczego wieszaka na worek wynosi 3 kg. Nie należy przeciążać wieszaków na worek.

Aby kontynuować, nacisnąć **ENT**.

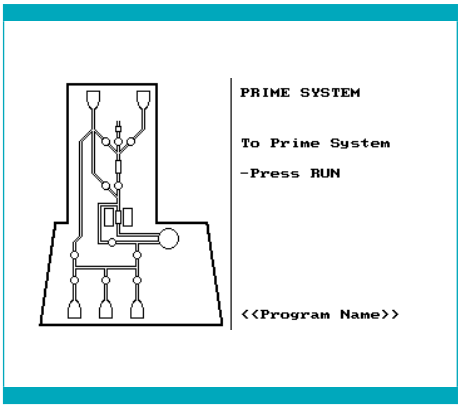
Rozpoczęcie płukania

Okno wyświetla Ekran 7.41.

Aby rozpocząć płukanie, nacisnąć **RUN**.

Okno wyświetla Ekran 7.42.

Podczas fazy płukania zestaw drenów jest wypełniany buforem. Bufor będzie krążył przez zestaw drenów, w tym kolumnę wstępną i kolumnę separacyjną. Odpady z płukania są zbierane w worku Priming Waste Bag i Buffer Waste Bag (patrz Rysunek 7.2 na stronie 160). Cykle płukania będą kontynuowane, powtarzając serię kroków. Faza płukania trwa około 1 minuty. Status płukania będzie aktualizowany na wyświetlaczu.



Ekran 7.41: Rozpoczęcie płukania

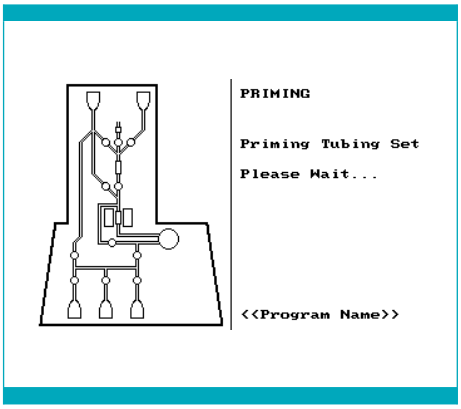
Kontrola podczas płukania

Podczas fazy płukania należy sprawdzić wszystkie dreny, mocowania, zawory i kolumny pod kątem występowania nieszczelności lub fałd, które mogą blokować przepływ płynu.

W przypadku zaobserwowania nieszczelności lub nieprawidłowego działania należy nacisnąć **STOP**, aby zatrzymać bieg.

Operator będzie miał 600 sekund na rozwiązanie problemu.

Wznowić proces przez naciśnięcie **RUN**.



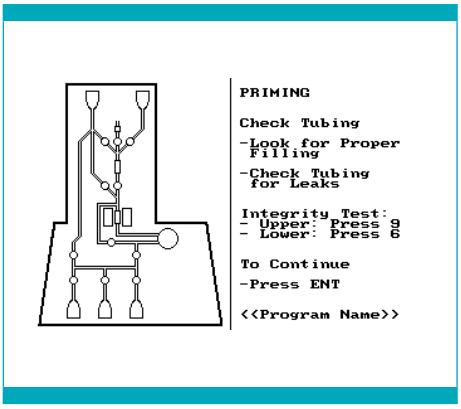
Ekran 7.42: Płukanie w toku

Po 600 sekundach separacja zostanie przerwana. Jeśli operator nie może rozwiązać problemu lub jeśli zestaw drenów jest uszkodzony, należy wyjąć zestaw drenów i wymienić go na nowy.

Wskazówka: Po rozpoczęciu płukania nie jest możliwy powrót do procedury konfiguracji aparatu.

Końcowa kontrola wszystkich drenów i mocowań

Okno wyświetla Ekran 7.43.



Ekran 7.43: Kontrola końcowa drenów

Przed kontynuacją programu należy sprawdzić następujące punkty:

- płyn we wszystkich częściach zestawu drenów (oprócz filtra Pre-System Filter)
- brak nadmiaru powietrza w zestawie drenów
- płyn w worku Priming Waste Bag i Buffer Waste Bag
- brak płynu w worku Negative Fraction Bag lub Cell Collection Bag

Nie naciskać jeszcze ENT.

Test integralności

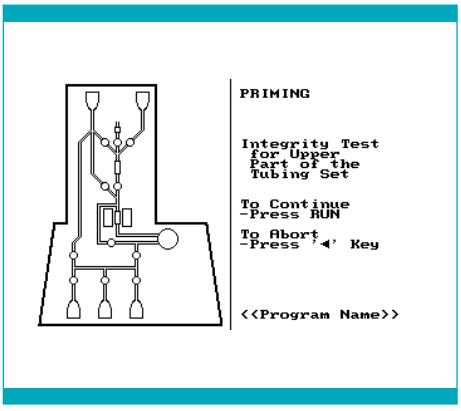
Dla dodatkowego bezpieczeństwa należy wykonać test integralności, aby sprawdzić szczelność zestawu drenów. Sekwencja testu składa się z dwóch zautomatyzowanych podsekwencji, które umożliwiają oddzielne poddanie ciśnieniu i obserwacji górnej i dolnej części zestawu drenów.

Test integralności górnej części zestawu drenów

1. Po wykonaniu przez operatora kroku „Końcowa kontrola wszystkich drenów i mocowań" okno wskazuje Ekran 7.43.
2. Po wykonaniu kroku „Kontrola końcowa wszystkich drenów i mocowań" należy kontynuować i przejść do wykonania testu integralności. **Nie** naciskać ENT.
3. Aby wykonać test integralności dla części górnej, należy nacisnąć 9.

   Okno wyświetla Ekran 7.44.
4. Aby rozpocząć sekwencję testową, nacisnąć RUN.

   Aby wrócić do Ekran 7.43, nacisnąć ◄.



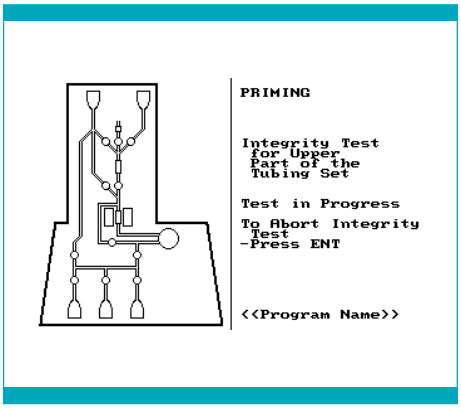
Ekran 7.44: Rozpoczęcie testu integralności dla części górnej

5. Po naciśnięciu **RUN** aparat rozpoczyna automatyczną sekwencję testową dla górnej części zestawu drenów.

   Okno wyświetla Ekran 7.45.

   Zostanie wytworzone nadciśnienie i utrzymane przez dwie minuty. W tym czasie operator powinien obejrzeć wszystkie połączenia powyżej górnego złącza drenów pompy.

   W każdym punkcie sekwencję testową można zakończyć poprzez naciśnięcie **ENT**.



Ekran 7.45: Test integralności dla części górnej w toku

6. Po dwóch minutach ciśnienie zostaje automatycznie uwolnione, a okno wskazuje Ekran 7.43.

   Sprawdzić, czy podczas sekwencji testowej nie doszło do przecieków. W przypadku zaobserwowania nieszczelności na którymkolwiek z połączeń zestawu drenów należy usunąć zestaw i wymienić go na nowy. W celu uzyskania instrukcji dotyczących zwrotu wadliwego zestawu drenów należy skontaktować się z działem Miltenyi Biotec Technical Support.

7. Jeśli nie stwierdzono nieszczelności, należy kontynuować test integralności dolnej części zestawu drenów.

Test integralności dolnej części zestawu drenów

Okno wyświetla Ekran 7.46.

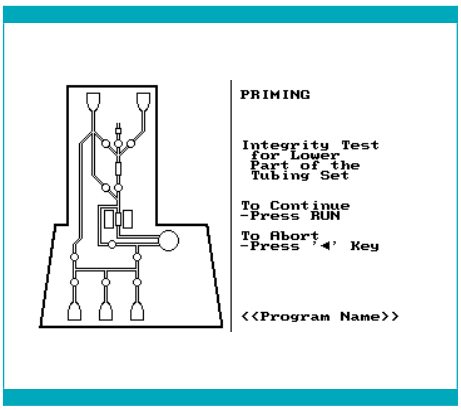
1. Aby przejść do testu integralności dla części dolnej, należy nacisnąć **6**.
   Nie naciskać ENT.

   Okno wyświetla Ekran 7.46.

2. Aby rozpocząć sekwencję testową, nacisnąć **RUN**.

   Aby wrócić do Ekran 7.43, nacisnąć ◄.

3. Po naciśnięciu **RUN** aparat rozpoczyna automatyczną sekwencję testową dla dolnej części zestawu drenów.

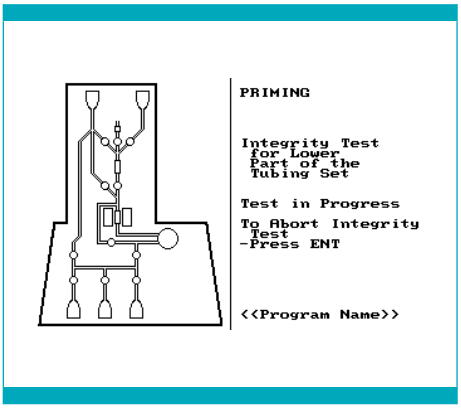


Ekran 7.46: Rozpoczęcie testu integralności dla części dolnej

Okno wyświetla Ekran 7.47.

Zostanie wytworzone nadciśnienie i utrzymane przez 30 sekund. W tym czasie operator powinien obserwować połączenie dolnych drenów pompy i trójników pomiędzy zaworami nr 6, 8, 9, 10 i 11.

W każdym punkcie sekwencję testową można zakończyć poprzez naciśnięcie **ENT**.



Ekran 7.47: Test integralności dla części dolnej w toku

4. Po 30 sekundach ciśnienie zostaje automatycznie uwolnione, a okno wskazuje Ekran 7.43.

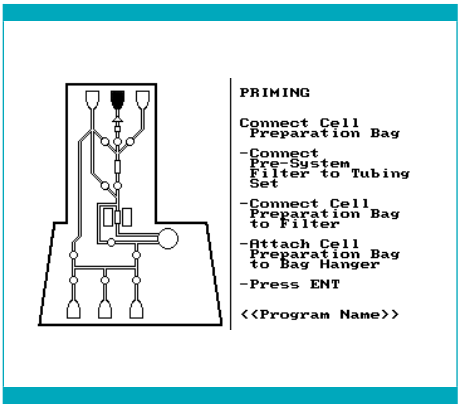
   Sprawdzić, czy podczas sekwencji testowej nie doszło do przecieków. W przypadku zaobserwowania nieszczelności na którymkolwiek z połączeń zestawu drenów należy usunąć zestaw i wymienić go na nowy. W celu uzyskania instrukcji dotyczących zwrotu wadliwego zestawu drenów należy skontaktować się z działem Miltenyi Biotec Technical Support.

5. Jeśli nie zaobserwowano żadnych nieszczelności, operator może teraz przejść do następnego kroku poprzez naciśnięcie **ENT**.

Połączenie Cell Preparation Bag

Okno wyświetla Ekran 7.48.

Podłączyć worek Cell Preparation Bag zawierający czytelnie oznakowany produkt komórkowy:



Ekran 7.48: Połączenie Cell Preparation Bag

1. Zdjąć nasadkę ze spike'a do filtra pęcherzyków powietrza w zestawie drenów (patrz Rysunek 7.2).
2. Zdjąć nasadkę z tępego końca filtra pre-system filter (patrz Rysunek 7.10). Mocno włożyć kolec do filtra pre-system filter.
3. Zdjąć nasadkę z kolca filtra pre-system filter.
4. Wbić pre-system filter w niewykorzystany port worka Cell Preparation Bag, upewniając się, że przegroda jest przebita, co umożliwia swobodny przepływ płynu. Delikatnie ścisnąć worek, aby potwierdzić, że kolec przebił się przez worek.
5. Dokładnie sprawdzić połączenie między filtrem pre-system filter a zestawem drenów, aby upewnić się, że połączenie jest pewne.
6. Zawiesić Cell Preparation Bag na środkowym wieszaku na worek.

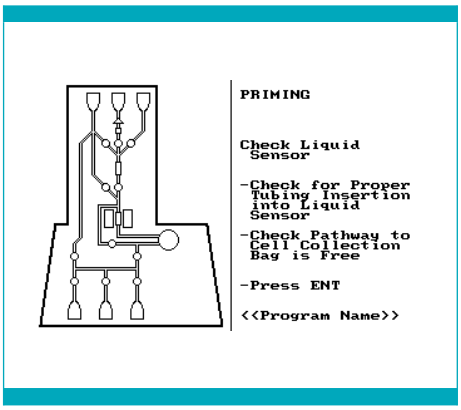
7. Wyregulować wieszak na worek Cell Preparation Bag, aby utrzymać Cell Preparation Bag w pozycji pionowej.

Aby kontynuować, nacisnąć **ENT**.

Kontrola końcowa czujnika płynu

Okno wyświetla Ekran 7.49.

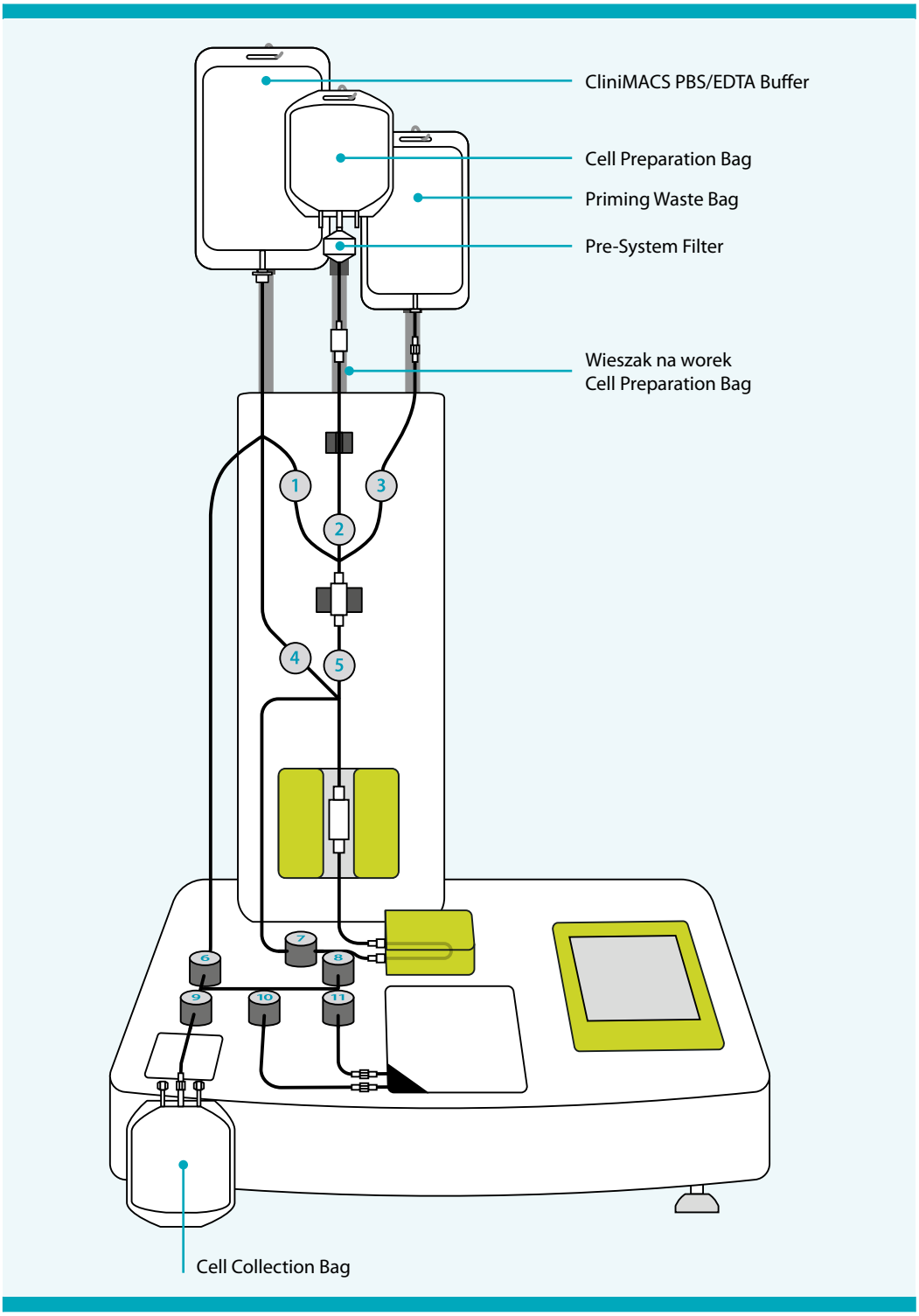
1. Sprawdzić dren czujnika płynu. Upewnić się, że dren jest prawidłowo włożony, nie ma w nim żadnych zewnętrznych płynów i nie został przemieszczony podczas procedury ładowania.
2. Potwierdzić, że możliwy jest nieograniczony przepływ do Cell Collection Bag (np. otwarty zacisk poniżej zaworu 9).



Ekran 7.49: Kontrola końcowa czujnika płynu

Aby kontynuować, nacisnąć **ENT**.

▶ **Przejść do KROKU 4.**



Rysunek 7.10: CliniMACS Plus Instrument z CliniMACS Tubing Set, CliniMACS PBS/EDTA Buffer, Cell Preparation Bag i Cell Collection Bag

7.3.2 Alternatywa instalacja zestawów przewodów CliniMACS

Instrukcje zawarte w KROKU 3 oraz ekrany wskazywane przez aparat CliniMACS Plus Instrument opisują instalację zestawów przewodów CliniMACS w warunkach sterylnych (pomieszczenie czyste).

Sam system CliniMACS Plus jest systemem zamkniętym, który nie musi być eksploatowany w pomieszczeniu czystym. Jeśli jednak pracuje poza pomieszczeniem czystym, należy dostosować procedurę instalacji zestawu drenów, aby zapewnić sterylność procesu separacji komórek.

Sterylność procesu separacji komórek może zostać naruszona podczas podłączania worka Cell Collection Bag, buforu CliniMACS PBS/EDTA Buffer, filtra pre-system filter i worka Cell Preparation Bag. W celu zapewnienia sterylności systemu, komponenty te muszą być podłączone do zestawu drenów w sterylnych warunkach (np. wyciąg laminarny). Jeśli komponenty są podłączane do zestawu drenów przed instalacją na aparacie CliniMACS Plus Instrument, należy zmienić kolejność instrukcji dostarczanych przez aparat i instrukcji zawartych w KROKU 3 oraz podjąć dalsze działania.

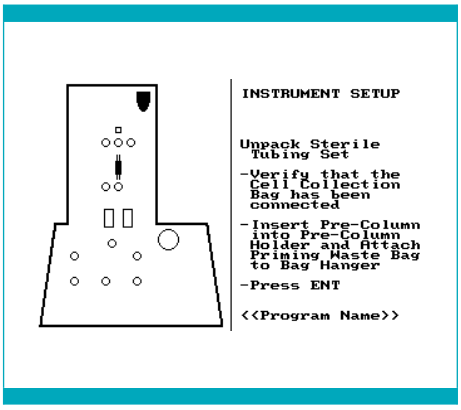
W przypadku obsługi aparatu CliniMACS Plus Instrument poza pomieszczeniem czystym należy postępować zgodnie z poniższymi dodatkowymi instrukcjami, zmieniającymi instrukcje zawarte w KROKU 3.

Przygotowanie do instalacji zestawu drenów

Okno wyświetla Ekran 7.50.

Zgodnie z opisem Cell Collection Bag, CliniMACS PBS/EDTA Buffer, filtr pre-system filter oraz Cell Preparation Bag muszą być podłączone do zestawu drenów przed zainstalowaniem zestawu drenów na aparacie w warunkach sterylnych.

Rozpakować zestaw drenów w warunkach sterylnych i założyć następujące komponenty w warunkach sterylnych:



Ekran 7.50: Rozpakowanie zestawu drenów

- **Połączenie Cell Collection Bag**

  Patrz strona 162.

Podłączenie CliniMACS PBS/EDTA Buffer

WAŻNE

Przed podłączeniem buforu CliniMACS PBS/EDTA Buffer do zestawu drenów należy zacisnąć dren poniżej spike'a buforu kleszczami blokującymi, aby zapobiec przedostawaniu się buforu do zestawu drenów przed instalacją (patrz zacisk 1, Rysunek 7.11 na stronie 179).

Stosując techniki aseptyczne zdjąć nasadkę ze spike'a buforu na zestawie drenów i podłączyć go do worka na bufor. Upewnić się, że przegroda została przebita, umożliwiając swobodny przepływ płynu. Delikatnie ścisnąć worek, aby upewnić się, że kolec przebił się przez worek.

Podłączenie filtra pre-system filter

Zdjąć nasadkę z kolca filtra pęcherzyków powietrza. Zdjąć nasadkę z dolnego otworu filtra pre-system filter.

Mocno włożyć kolec do filtra pre-system filter. NIE zdejmować górnej nasadki filtra pre-system filter. Zamknąć dren tuż poniżej filtra pęcherzyków powietrza kleszczami blokującymi (patrz zacisk 2, Rysunek 7.11 na stronie 179). Zapobiega to przedostaniu się przygotowanej zawiesiny komórek w worku Cell Preparation Bag do filtra pre-system filter i zestawu drenów.

Podłączenie Cell Preparation Bag

Do zestawu drenów podłączyć Cell Preparation Bag zawierający magnetycznie znakowane i przemyte komórki. Przebić worek Cell Preparation Bag filtrem pre-system filter, upewniając się, że przegroda jest przebita, co umożliwia swobodny przepływ płynu. Delikatnie ścisnąć worek, aby upewnić się, że kolec przebił się przez worek.

Instalacja na aparacie CliniMACS Plus Instrument

Zawiesić worek na bufor na lewym wieszaku na bufor, Cell Preparation Bag na środkowym wieszaku na worek i Priming Waste Bag na prawym wieszaku na worek na aparacie.

Aby kontynuować, nacisnąć **ENT**.

- **Podłączyć Priming Waste Bag i włożyć kolumnę wstępną**

  Patrz strona 162.

- **Włożyć kolumnę separacyjną i załadować zawór nr 5**

  Patrz strona 163.

- **Załadowanie zaworów nr 1, 2, 3 i 4**

  Patrz strona 164.

▶ Załadowanie drenu pompy

Patrz strona 165.

▶ Załadowanie zaworów nr 7 i 8

Patrz strona 166.

▶ Załadowanie zaworów nr 6, 9, 10 i 11

Patrz strona 166.

▶ Ponowna kontrola wszystkich drenów i mocowań

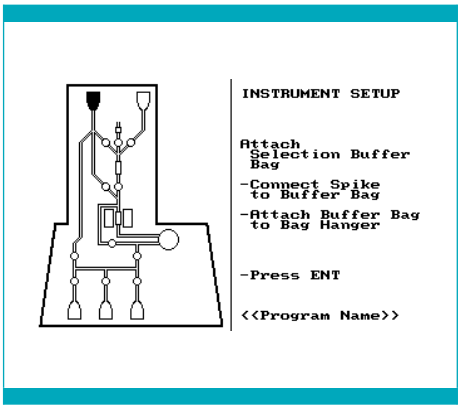
Patrz strona 167.

▶ Osadzenie zaworów

Patrz strona 167.

Podłączenie CliniMACS PBS/EDTA Buffer

Okno wyświetla Ekran 7.51.



Ekran 7.51: Podłączenie worka na bufor

1. Worek na bufor został podłączony podczas kroku „Przygotowanie do instalacji zestawu drenów". Z tego powodu może być konieczna jedynie regulacja wysokości wieszaka na worek na bufor. Podnieść lub obniżyć wieszak, aby dostosować go do wielkości worka na bufor, upewniając się, że przydzielona wysokość jest wystarczająco duża, aby zapobiec silnemu wygięciu drenów, co mogłoby ograniczyć przepływ płynu, i wystarczająco niska, aby uniknąć naciągnięcia drenów lub połączeń.
2. Zdjąć kleszcze blokujące z drenów tuż poniżej spike'a buforu.

Aby kontynuować, nacisnąć **ENT**.

▶ Rozpoczęcie płukania

Patrz strona 169.

▶ Kontrola podczas płukania

Patrz strona 169.

▶ Końcowa kontrola wszystkich drenów i mocowań

Patrz strona 170.

▶ Test integralności

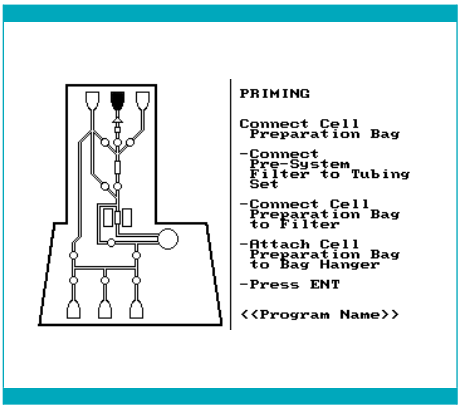
Patrz strona 170.

Połączenie Cell Preparation Bag (i pre-system filter)

Okno wyświetla Ekran 7.52.

1. Worek Cell Preparation Bag i filtr pre-system filter zostały podłączone podczas kroku „Przygotowanie do instalacji zestawu drenów”.
2. Usunąć kleszcze blokujące poniżej filtra pęcherzyków powietrza.

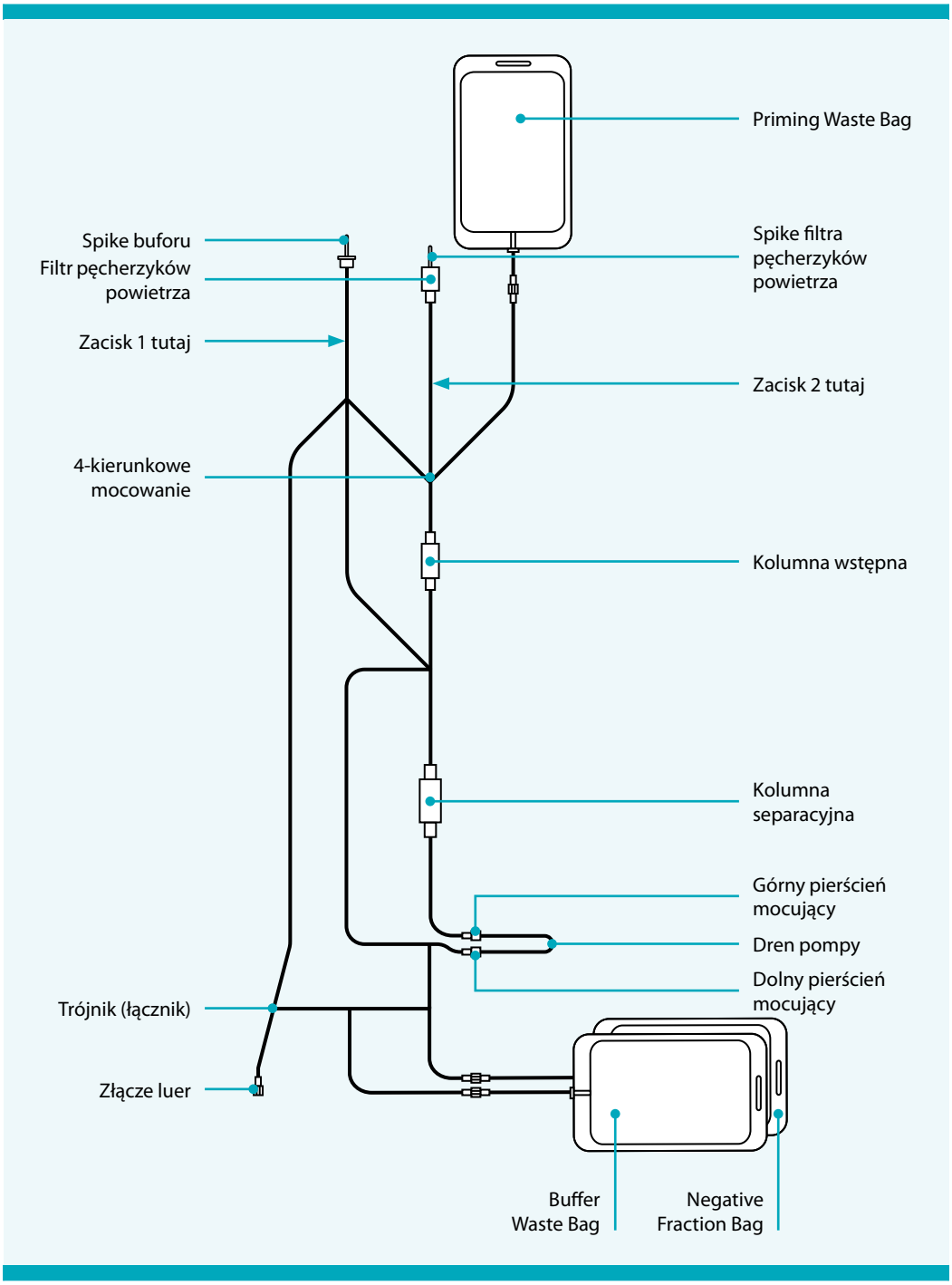
Aby kontynuować, nacisnąć **ENT**.



Ekran 7.52: Połączenie Cell Preparation Bag

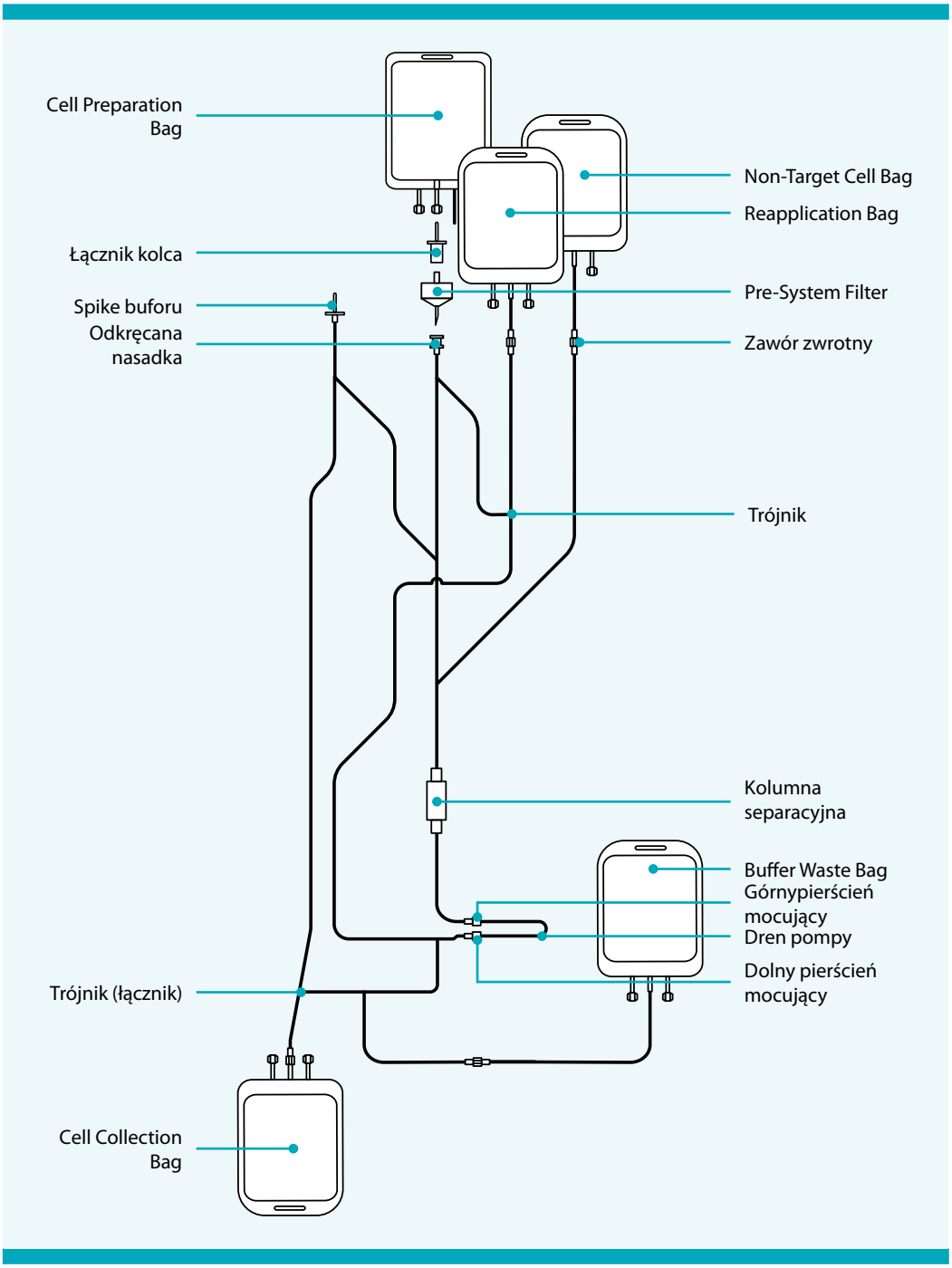
▶ Kontrola końcowa czujnika płynu

Patrz strona 173.



Rysunek 7.11: Ogólna budowa zestawu drenów CliniMACS (np. CliniMACS Tubing Set) z pozycjami zaciskowymi 1 i 2

7.3.3 CliniMACS Depletion Tubing Set

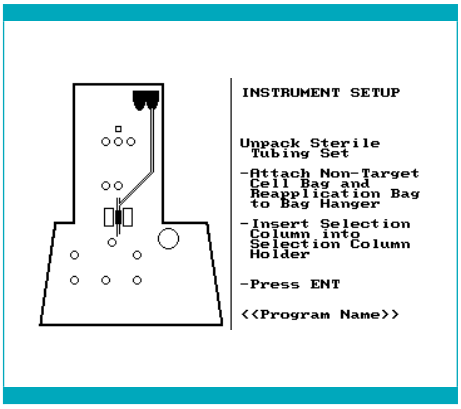


Rysunek 7.12: Ogólna budowa zestawu CliniMACS Depletion Tubing Set

Przygotowanie do instalacji zestawu drenów

Okno wyświetla Ekran 7.53.

Instrukcja jest pokazana po prawej stronie, a schemat odpowiadający instrukcji po lewej stronie. Migające elementy na ekranie wskazują obszary, na które należy zwrócić uwagę.



Ekran 7.53: Rozpakowanie zestawu drenów

Zestaw CliniMACS Depletion Tubing Set jest dostarczany w szczelnym, wysterylizowanym opakowaniu. Każdy zestaw drenów zawiera wstępnie zmontowane dreny, kolumnę i worki do jednej separacji komórek (patrz Rysunek 7.12). Gdy opakowanie jest nienaruszone, zapewniona jest sterylna droga płynu.

Wskazówka: Aparat CliniMACS Plus Instrument pokazuje wybraną nazwę programu, np. DEPLETION 3.1, w dolnym wierszu. Na każdym kroku instalacji zestawu drenów można nacisnąć klawisz „Cofnij" (patrz rozdział „Opis" w Podręczniku użytkownika CliniMACS Plus Instrument), aby powrócić do poprzedniego kroku.

1. Zapisać numer serii i termin ważności zestawu drenów.

   Rozpakować sterylny zestaw drenów w sterylnych warunkach (np. w wyciągu laminarnym). Przed użyciem zestawu drenów należy zdjąć klamrę zaciskową użytą do opakowania. Klamra jest oznaczona napisem „Remove before assembly to CliniMACS Plus Instrument" („Zdjąć przed montażem do aparatu CliniMACS Plus Instrument").

2. Sprawdzić złącza luer lock do worków. Złącza luer lock muszą być mocno zamknięte.

Cell Collection Bag

Zestaw CliniMACS Depletion Tubing Set jest dostarczany z podłączonym workiem Cell Collection Bag. Zapisać wagę pustego Cell Collection Bag. Jeśli do separacji konieczne jest zastosowanie więcej niż jednego worka Cell Collection Bag, należy połączyć worki za pomocą zestawu do przetaczania osocza. Upewnić się, że wszystkie połączenia są mocno zamknięte. Zapisać wagę pustego worka/pustych worków Cell Collection Bag.

Podłączenie Non-Target Cell Bag, Reapplication Bag i włożenie kolumny separacyjnej

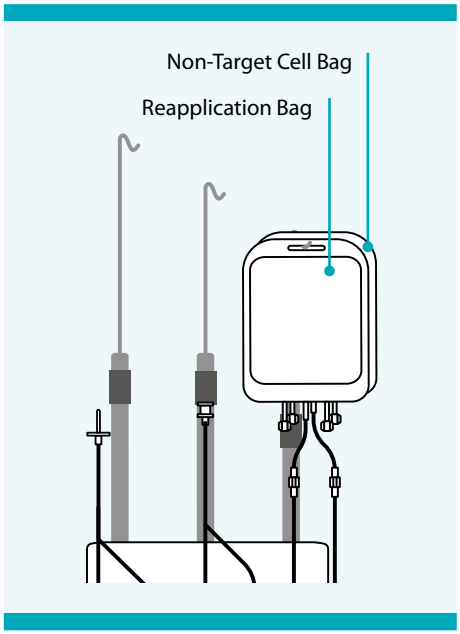
1. Podłączyć worek Non-Target Cell Bag i Reapplication Bag do prawego wieszaka na worek na aparacie (patrz Rysunek 7.13).
2. Dostosować wysokość wieszaków na worek. Podnieść lub obniżyć wieszaki na worek, aby dostosować wysokość do wielkości worków Non-Target Cell Bag i Reapplication Bag. Należy upewnić się, że są one umieszczone wystarczająco wysoko, aby zapobiec poważnemu zagięciu drenu, które mogłoby ograniczyć przepływ, oraz że są wystarczająco nisko, aby uniknąć rozciągnięcia drenu lub połączeń.

   NOTYFIKACJA

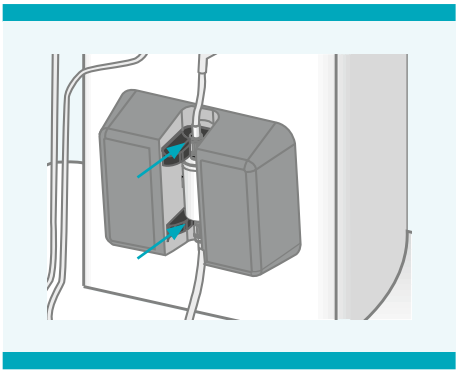
   Ryzyko uszkodzenia aparatu. Przeciążenie wieszaków na worek może spowodować uszkodzenie aparatu. Nośność pojedynczego wieszaka na worek wynosi 3 kg. Nie należy przeciążać wieszaków na worek.
3. Włożyć kolumnę separacyjną do uchwytu kolumny separacyjnej (patrz Rysunek 7.14).

   ⚠ OSTRZEŻENIE

   Ryzyko urazu. Jeśli kolumna separacyjna zostanie włożona lub wyjęta przy włączonej jednostce magnesu, istnieje ryzyko odniesienia obrażeń ciała. Kolumnę separacyjną należy wkładać lub wyjmować tylko wtedy, gdy jednostka magnesu jest wyłączona.



Rysunek 7.13: Podłączenie Non-Target Cell Bag i Reapplication Bag


Rysunek 7.14: Kolumna separacyjna w uchwycie kolumny separacyjnej

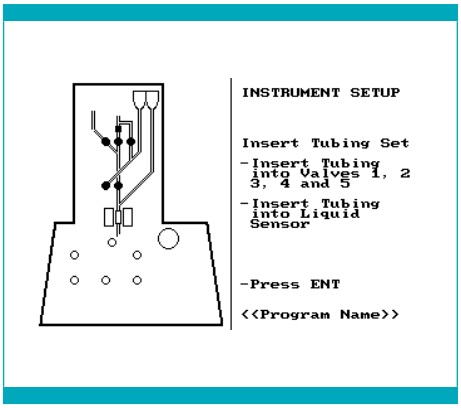
Aby kontynuować, nacisnąć **ENT**.

Załadowanie zaworów nr 1, 2, 3, 4 i 5

Okno wyświetla Ekran 7.54.

Zawory pokazane na ekranie zostaną automatycznie otwarte.

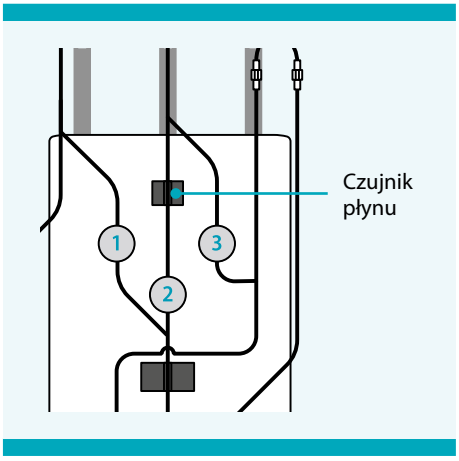
1. Załadować dren do zaworów nr 1, 2, 3, 4 i 5.
2. Wprowadzić dren powyżej zaworu nr 2 do czujnika płynu (patrz Rysunek 7.15).



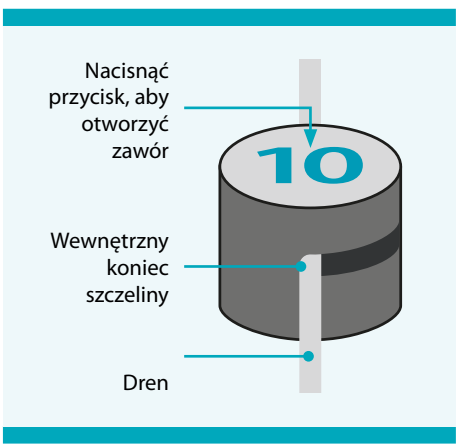
Ekran 7.54: Załadowanie zaworów nr 1, 2, 3, 4 i 5

WAŻNE

- Aby zapewnić prawidłowe działanie, zarówno czujnik płynu, jak i wprowadzany dren muszą być suche. Dokładnie sprawdzić oba. W przypadku obecności jakiegokolwiek płynu należy osuszyć ten obszar miękką, niestrzępiącą się ściereczką.
- Podczas wykonywania każdego kroku należy sprawdzić, czy wszystkie dreny i mocowania nie są zagięte lub mocno wygięte, co mogłoby ograniczyć przepływ płynu przez dreny. Sprawdzić wszystkie zawory, aby upewnić się, że dren jest dobrze dopasowany.
- Zestaw drenów wkładać tylko do otwartych zaworów (gdy przycisk jest wciśnięty do środka). Dren nie będzie prawidłowo dopasowany, jeśli zostanie włożony do zamkniętego zaworu.
- Jeśli po zamknięciu zaworu trzeba wyregulować dren, nie należy ciągnąć drenu bez naciśnięcia przycisku zaworu w celu jego otwarcia (patrz Rysunek 7.16)



Rysunek 7.15: Dren w zaworach

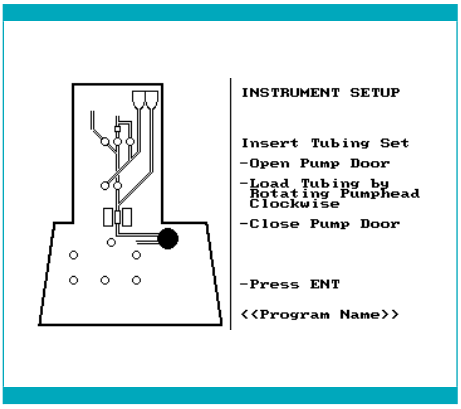


Rysunek 7.16: Prawidłowo włożony dren

Aby kontynuować, nacisnąć **ENT**.

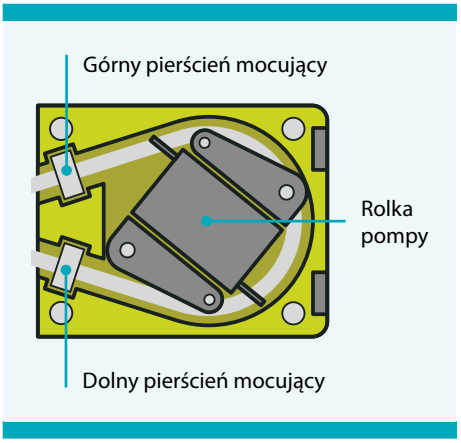
Załadowanie drenu pompy

Okno wyświetla Ekran 7.55.



Ekran 7.55: Załadowanie drenu pompy

1. Otworzyć drzwi pompy, podnosząc je do góry przy lewej krawędzi.
2. Włożyć górny pierścień mocujący na drenie pompy do rowka pierścienia mocującego na obudowie pompy (patrz Rysunek 7.17).
3. Obracać rolkę pompy w kierunku zgodnym z ruchem wskazówek zegara, aż dren zostanie przewleczony między obydwoma zestawami trzpieni prowadzących dren i dren będzie ściśle przylegał do rolki pompy. Upewnić się, że dren nie jest ściśnięty na końcu trzpieni prowadzących. (Jeśli konieczna jest regulacja drenu wewnątrz pompy, można go rozładować, podnosząc dolny koniec i obracając rolkę pompy w kierunku przeciwnym do ruchu wskazówek zegara.)
4. Włożyć dolny pierścień mocujący na drenie pompy do rowka pierścienia mocującego na obudowie pompy.
5. Powtórzyć obrót rolki pompy w kierunku zgodnym z ruchem wskazówek zegara, aby upewnić się, że rolka pompy porusza się swobodnie.
6. Zamknąć drzwi pompy.



Rysunek 7.17: Załadowanie drenu pompy

WAŻNE

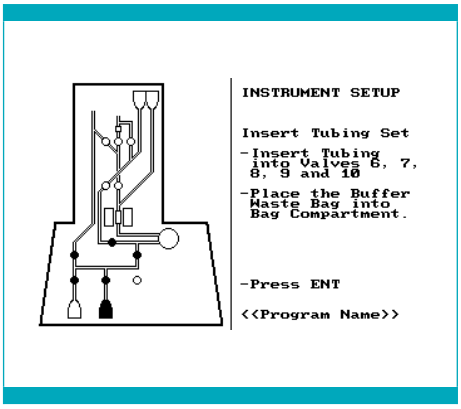
Podczas separacji komórek pompa natychmiast zatrzymuje bieg po każdym otwarciu obudowy pompy. Jeśli pozostanie otwarta przez ponad 600 sekund, aparat przerwie trwający bieg.

Aby kontynuować, nacisnąć **ENT**.

Załadowanie zaworów nr 6, 7, 8, 9 i 10

Okno wyświetla Ekran 7.56.

1. Załadowanie drenu do zaworów nr 6, 7, 8, 9 i 10. Upewnić się, że dren jest mocno umieszczony w otworze zaworu.
2. Umieścić Buffer Waste Bag w komorze worka. Upewnić się, że dren nie jest ściśnięty pod pokrywą komory worka.
3. Upewnić się, że możliwy jest nieograniczony przepływ do Cell Collection Bag.



Ekran 7.56: Załadowanie zaworów nr 6, 7, 8, 9 i 10

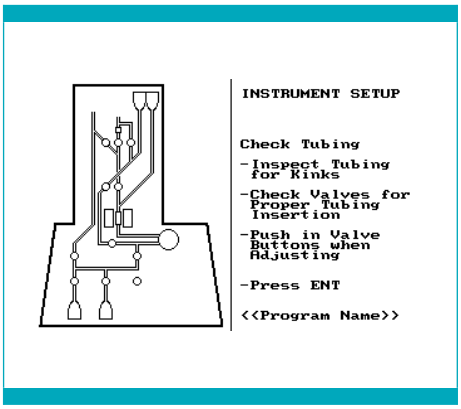
Aby kontynuować, nacisnąć **ENT**.

Ponowna kontrola wszystkich drenów i mocowań

Okno wyświetla Ekran 7.57.

1. Zaczynając od zaworu nr 1, sprawdzić, czy dren jest prawidłowo dopasowany i czy jest prawidłowo umieszczony w każdym zaworze.

   Ponownie sprawdzić dren w każdym zaworze. Upewnić się, że dren wchodzi i wychodzi z każdego zaworu przez powiększenie na wewnętrznym końcu szczeliny (patrz Rysunek 7.16).
2. Sprawdzić, czy dren nie jest zagięty lub skręcony.



Ekran 7.57: Ponowna kontrola wszystkich drenów i mocowań

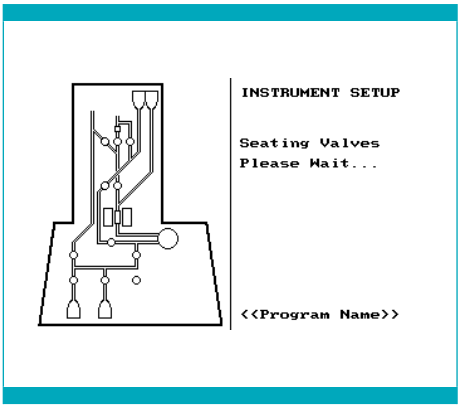
Wskazówka: Jeśli po zamknięciu zaworu trzeba wyregulować dren, nie należy ciągnąć drenu bez naciśnięcia przycisku zaworu w celu jego otwarcia.

Aby kontynuować, nacisnąć **ENT**.

Osadzenie zaworów

Okno wyświetla Ekran 7.58.

W celu zapewnienia właściwego dopasowania drenu w zaworach aparat uruchomi dwukrotnie wszystkie zawory w sekwencji. Obserwować i słuchać, aby upewnić się, że wszystkie zawory działają prawidłowo. Jeśli któryś z zaworów nie działa prawidłowo, patrz rozdział 8 „Rozwiązywanie problemów" na stronie 215. Ten krok można powtórzyć, naciskając ◄, a następnie **ENT** (patrz rozdział „Opis" w Podręczniku użytkownika CliniMACS Plus Instrument).



Ekran 7.58: Osadzenie zaworów

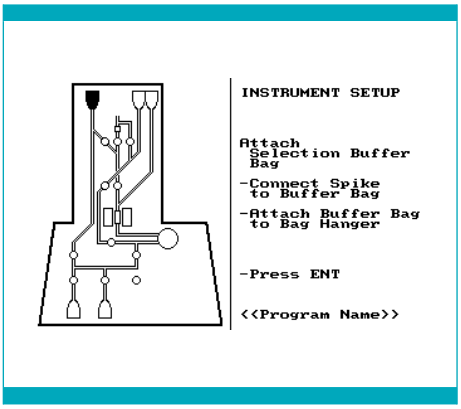
Podczas tej sekwencji kontrolnej testowany jest również napęd magnetyczny.

Podłączenie CliniMACS PBS/EDTA Buffer

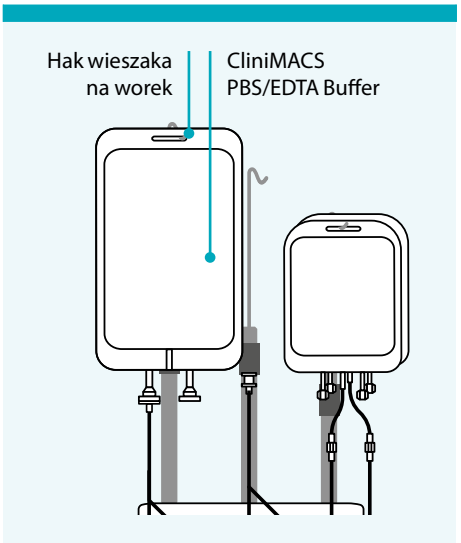
Okno wyświetla Ekran 7.59.

Buforem zalecanym do separacji CliniMACS Plus jest CliniMACS PBS/EDTA Buffer uzupełniony HSA do stężenia końcowego 0,5% (wag./obj.).

1. Stosując techniki aseptyczne zdjąć nasadkę ze spike'a buforu (patrz Rysunek 7.12 na stronie 180) na zestawie drenów i podłączyć go do worka na bufor. Upewnić się, że przegroda została przebita, umożliwiając swobodny przepływ płynu. Delikatnie ścisnąć worek, aby upewnić się, że kolec przebił się przez worek bez przecieku na zewnątrz.
2. Podłączyć worek na bufor do haka worka na bufor na wieszaku na worek (patrz Rysunek 7.18).
3. Dostosować wysokość wieszaka na worek na bufor. Podnieść lub obniżyć wieszak na worek, aby dostosować wysokość do wielkości worka na bufor. Należy upewnić się, że jest on umieszczony wystarczająco wysoko, aby zapobiec poważnemu zagięciu drenu, które mogłoby ograniczyć przepływ, oraz że jest wystarczająco nisko, aby uniknąć rozciągnięcia drenu lub połączeń.



Ekran 7.59: Podłączenie worka na bufor



Rysunek 7.18: Podłączenie worka na bufor

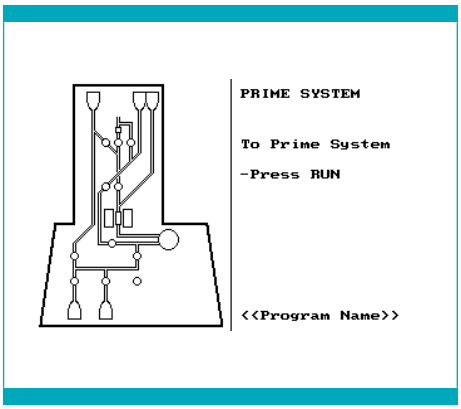
WAŻNE

Ze względu na kilka grawimetrycznych kroków płukania, ważne jest, aby worek na bufor był umieszczony jak najwyżej, upewniając się, że jest wyżej niż worek Reapplication Bag i worek Non-Target Cell Bag (patrz Rysunek 7.20 na stronie 191).

Aby kontynuować, nacisnąć **ENT**.

Rozpoczęcie płukania

Okno wyświetla Ekran 7.60.



Ekran 7.60: Rozpoczęcie płukania

Aby rozpocząć płukanie, nacisnąć **RUN**.

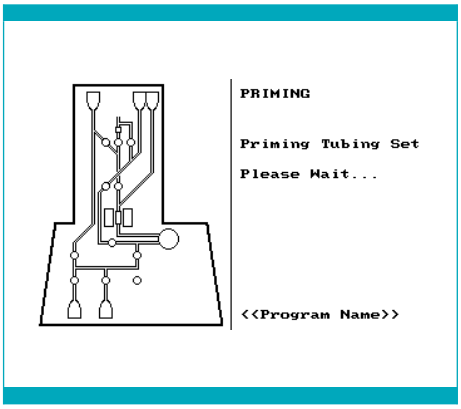
Okno wyświetla Ekran 7.61.

Podczas fazy płukania zestaw drenów jest wypełniany buforem CliniMACS PBS/EDTA Buffer. Bufor będzie krążył przez zestaw drenów, w tym kolumnę separacyjną. Płyn do płukania jest zbierany do worka Buffer Waste Bag, worka Reapplication Bag i worka Non-Target Cell Bag, podczas gdy worek Cell Collection Bag pozostaje pusty (patrz Rysunek 7.12 na stronie 180). Cykle płukania będą kontynuowane, powtarzając serię kroków.

Faza płukania trwa około 2,5 minuty. Status płukania będzie aktualizowany na wyświetlaczu.

Kontrola podczas płukania

Podczas fazy płukania należy sprawdzić wszystkie dreny, mocowania, zawory i kolumnę separacyjną pod kątem występowania nieszczelności lub fałd, które mogą blokować przepływ płynu.



Ekran 7.61: Płukanie w toku

W przypadku zaobserwowania nieszczelności lub nieprawidłowego działania należy nacisnąć **STOP**, aby zatrzymać bieg.

Operator będzie miał 600 sekund na rozwiązanie problemu.

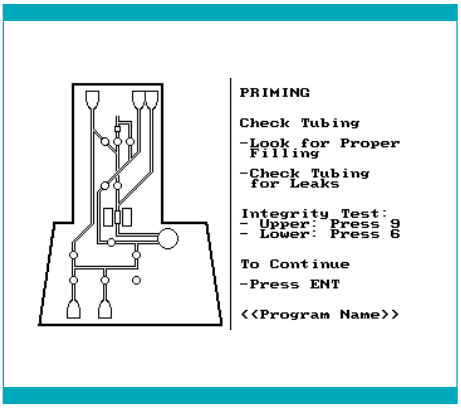
Wznowić proces przez naciśnięcie **RUN**.

Po 600 sekundach separacja zostanie przerwana. Jeśli operator nie może rozwiązać problemu lub jeśli zestaw drenów jest uszkodzony, należy wyjąć zestaw drenów i wymienić go na nowy.

Wskazówka: Po rozpoczęciu płukania nie jest możliwy powrót do procedury konfiguracji aparatu.

Końcowa kontrola wszystkich drenów i mocowań

Okno wyświetla Ekran 7.62.



Ekran 7.62: Kontrola końcowa drenów i mocowań

Przed rozpoczęciem biegu należy sprawdzić następujące punkty:

- płyn we wszystkich częściach zestawu drenów oprócz drenów powyżej zaworów nr 2 i 3
- brak nadmiaru powietrza w zestawie drenów
- płyn w workach Reapplication Bag, Buffer Waste Bag i Non-Target Cell Bag
- brak płynu w worku Cell Collection Bag

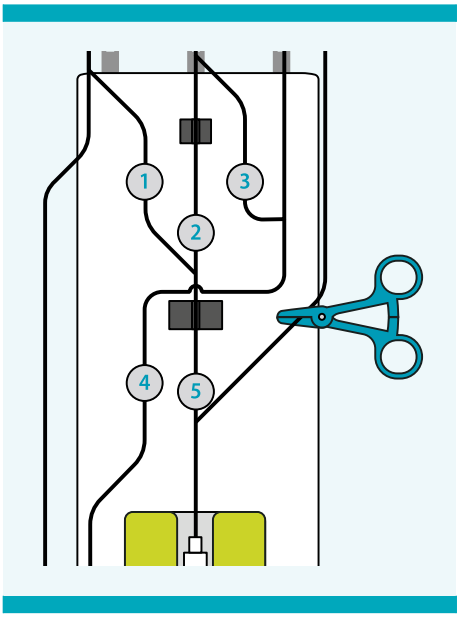
Nie naciskać jeszcze **ENT**.

Test integralności

Dla dodatkowego bezpieczeństwa należy wykonać test integralności, aby sprawdzić szczelność zestawu drenów. Sekwencja testu składa się z dwóch zautomatyzowanych, które umożliwiają oddzielne poddanie nadmiernemu ciśnieniu i sprawdzenie górnej i dolnej części zestawu drenów.

⚠ PRZESTROGA

Ryzyko opóźnienia procesu. Jeśli po zakończeniu testu integralności nie został zdjęty zacisk poniżej worka Non-Target Cell Bag, nie można było usunąć komórek innych niż celowe (znakowanych) z kolumny separacyjnej podczas elucji. Dalsze zatrzymanie komórek innych niż docelowe jest wtedy niemożliwe. Procedurę separacji należy powtórzyć. Po zakończeniu testu integralności usunąć zacisk.



Rysunek 7.19: Przygotowanie do testu integralności

WAŻNE

Test integralności będzie działał prawidłowo tylko w przypadku, jeśli dren zostanie zaciśnięty poniżej worka Non-Target Cell Bag. Przed rozpoczęciem testu integralności zacisnąć dren poniżej worka Non-Target Cell Bag. Po zakończeniu testu integralności usunąć zacisk.

Test integralności górnej części zestawu drenów

1. Po wykonaniu przez operatora kroku „Końcowa kontrola wszystkich drenów i mocowań" okno wskazuje Ekran 7.63.

2. Po przeprowadzeniu kroku „Kontrola końcowa wszystkich drenów i mocowań" **nie** naciskać ENT.

3. Aby przejść do testu integralności dla części górnej, należy nacisnąć 9.

   Okno wyświetla Ekran 7.64.

   WAŻNE

   Zacisnąć dren pod zaworem zwrotnym worka Non-Target Cell Bag.

4. Aby rozpocząć sekwencję testową, nacisnąć RUN.

   Aby wrócić do Ekran 7.63, nacisnąć ◄.

5. Po naciśnięciu RUN aparat rozpoczyna automatyczną sekwencję testową dla górnej części zestawu drenów.

   Okno wyświetla Ekran 7.65.

   Zostanie wytworzone nadciśnienie i utrzymane przez dwie minuty. W tym czasie operator powinien obejrzeć wszystkie połączenia powyżej górnego złącza drenów pompy.

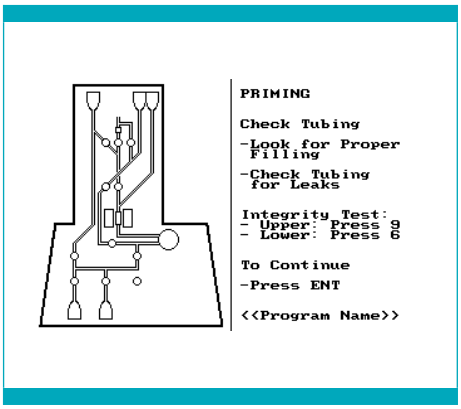
   W każdym punkcie sekwencję testową można zakończyć poprzez naciśnięcie ENT.

6. Po dwóch minutach ciśnienie zostaje automatycznie uwolnione, a okno wskazuje Ekran 7.63.

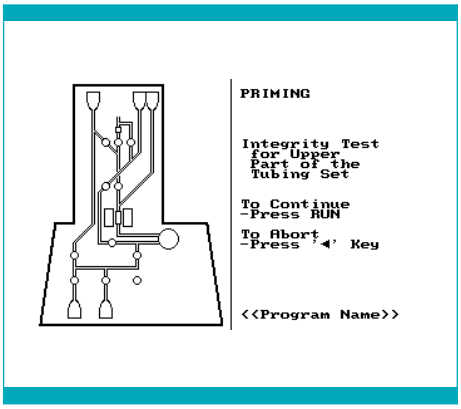
   Sprawdzić, czy podczas sekwencji testowej nie doszło do przecieków. W przypadku zaobserwowania nieszczelności na którymkolwiek z połączeń zestawu drenów należy usunąć zestaw i wymienić go na nowy.

   W celu uzyskania instrukcji dotyczących zwrotu wadliwego zestawu drenów należy skontaktować się z działem Miltenyi Biotec Technical Support.

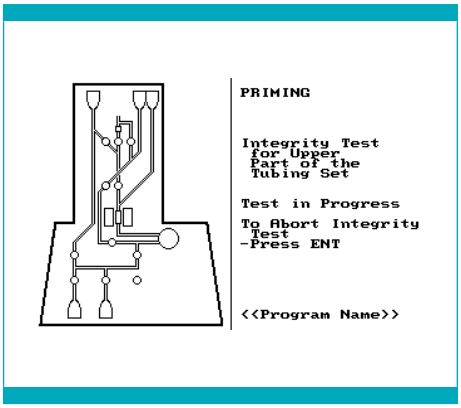
7. Jeśli nie stwierdzono nieszczelności, należy kontynuować test integralności dolnej części zestawu drenów.



Ekran 7.63: Rozpoczęcie testu integralności dla części górnej



Ekran 7.64: Rozpoczęcie testu integralności dla części górnej



Ekran 7.65: Rozpoczęcie testu integralności dla części górnej

Test integralności dolnej części zestawu drenów

Okno wyświetla Ekran 7.63.

1. Aby przejść do testu integralności, nacisnąć **6**.
   Nie naciskać **ENT**.

   Okno wyświetla Ekran 7.66.

2. Aby rozpocząć sekwencję testową, nacisnąć **RUN**.

   Aby wrócić do Ekran 7.63, nacisnąć ◄.

3. Po naciśnięciu **RUN** aparat rozpoczyna automatyczną sekwencję testową dla dolnej części zestawu drenów.

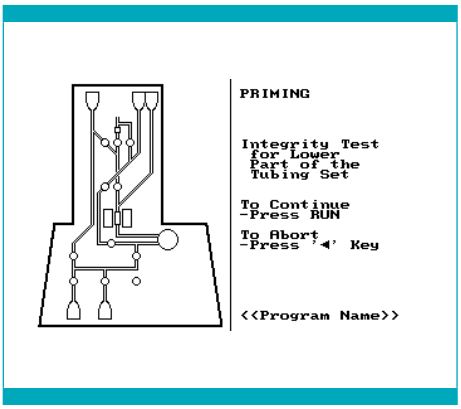
   Okno wyświetla Ekran 7.67.

   Zostanie wytworzone nadciśnienie i utrzymane przez 30 sekund.

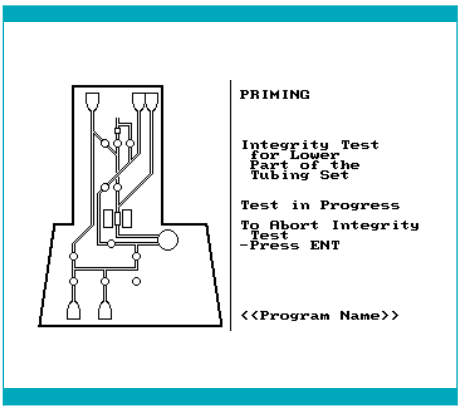
   W tym czasie operator powinien obserwować połączenie dolnych drenów pompy i trójników pomiędzy zaworami nr 6, 8, 9 i 10.

   W każdym punkcie sekwencję testową można zakończyć poprzez naciśnięcie **ENT**.

4. Po 30 sekundach ciśnienie zostaje automatycznie uwolnione, a okno wskazuje Ekran 7.63.



Ekran 7.66: Rozpoczęcie testu integralności dla części dolnej



Ekran 7.67: Test integralności dla części dolnej w toku

   Operator musi sprawdzić, czy podczas sekwencji testowej nie doszło do przecieków. W przypadku zaobserwowania nieszczelności na którymkolwiek z połączeń zestawu drenów należy usunąć zestaw i wymienić go na nowy.

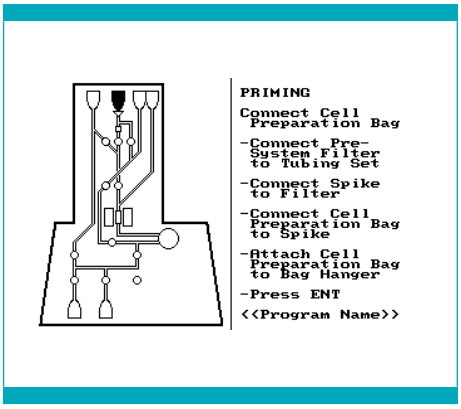
   W celu uzyskania instrukcji dotyczących zwrotu wadliwego zestawu drenów należy skontaktować się z działem Miltenyi Biotec Technical Support.

5. **Otworzyć drogę do worka Non-Target Cell Bag, zdejmując zacisk pod zaworem zwrotnym.**

6. Jeśli nie zaobserwowano żadnych nieszczelności, operator może teraz przejść do następnego kroku poprzez naciśnięcie **ENT**.

Połączenie Cell Preparation Bag

Okno wyświetla Ekran 7.68.



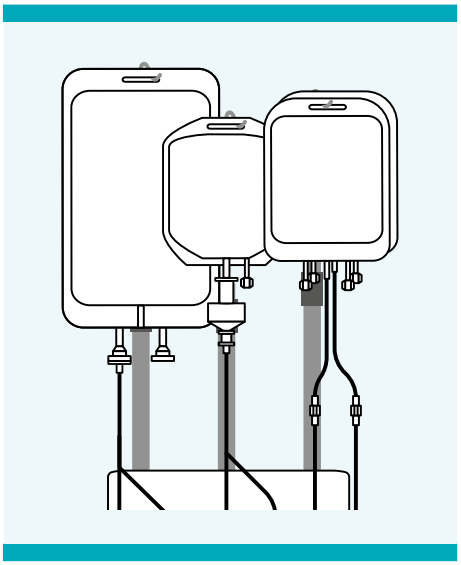
Ekran 7.68: Połączenie Cell Preparation Bag

Do zestawu drenów podłączyć Cell Preparation Bag (zawierający magnetycznie znakowane komórki):

1. Zdjąć odkręcaną nasadkę (patrz Rysunek 7.12 na stronie 180) z zestawu drenów.
2. Zdjąć nasadkę z kolca filtra pre-system filter. Mocno włożyć kolec filtra pre-system filter do zestawu drenów, upewniając się, że przegroda została przebita.
3. Zdjąć nasadki z filtra pre-system filter i tępego końca łącznika kolców i połączyć obie części ze sobą.
4. Zdjąć drugą nasadkę z łącznika kolca i podłączyć kolec do Cell Preparation Bag, upewniając się, że przegroda jest przebita, co umożliwia swobodny przepływ płynu. Delikatnie ścisnąć worek, aby upewnić się, że kolec przebił się przez worek.
5. Sprawdzić połączenie między workiem Cell Preparation Bag, łącznikiem kolca, filtrem pre-system filter a zestawem drenów, aby upewnić się, że połączenie jest pewne.
6. Zawiesić Cell Preparation Bag na wieszaku na worek (patrz Rysunek 7.21).
7. Upewnić się, że worki i dren podłączone do wieszaka na worek nie są rozciągnięte ani wygięte.

   Ze względu na grawimetryczne kroki płukania wykonywane podczas automatycznej separacji bardzo ważne jest, aby worki były prawidłowo wypoziomowane. Ponadto w celu zapewnienia pełnego przetworzenia próbki ważne jest umieszczenie worków Reapplication i Non-Target Cell Bag wyżej niż Cell Preparation Bag (patrz Rysunek 7.20):

   - **Najwyższa pozycja:** worek na bufor
   - **Środkowa pozycja:** worek Reapplication i Non-Target Cell Bag
   - **Najniższa pozycja:** Cell Preparation Bag



Rysunek 7.20: Prawidłowo wypoziomowane worki

Aby kontynuować, nacisnąć **ENT**.

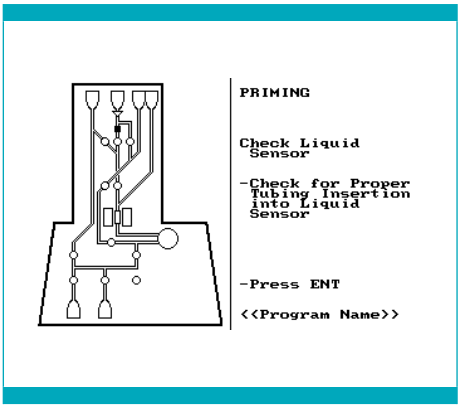
Kontrola końcowa czujnika płynu

Okno wyświetla Ekran 7.69.

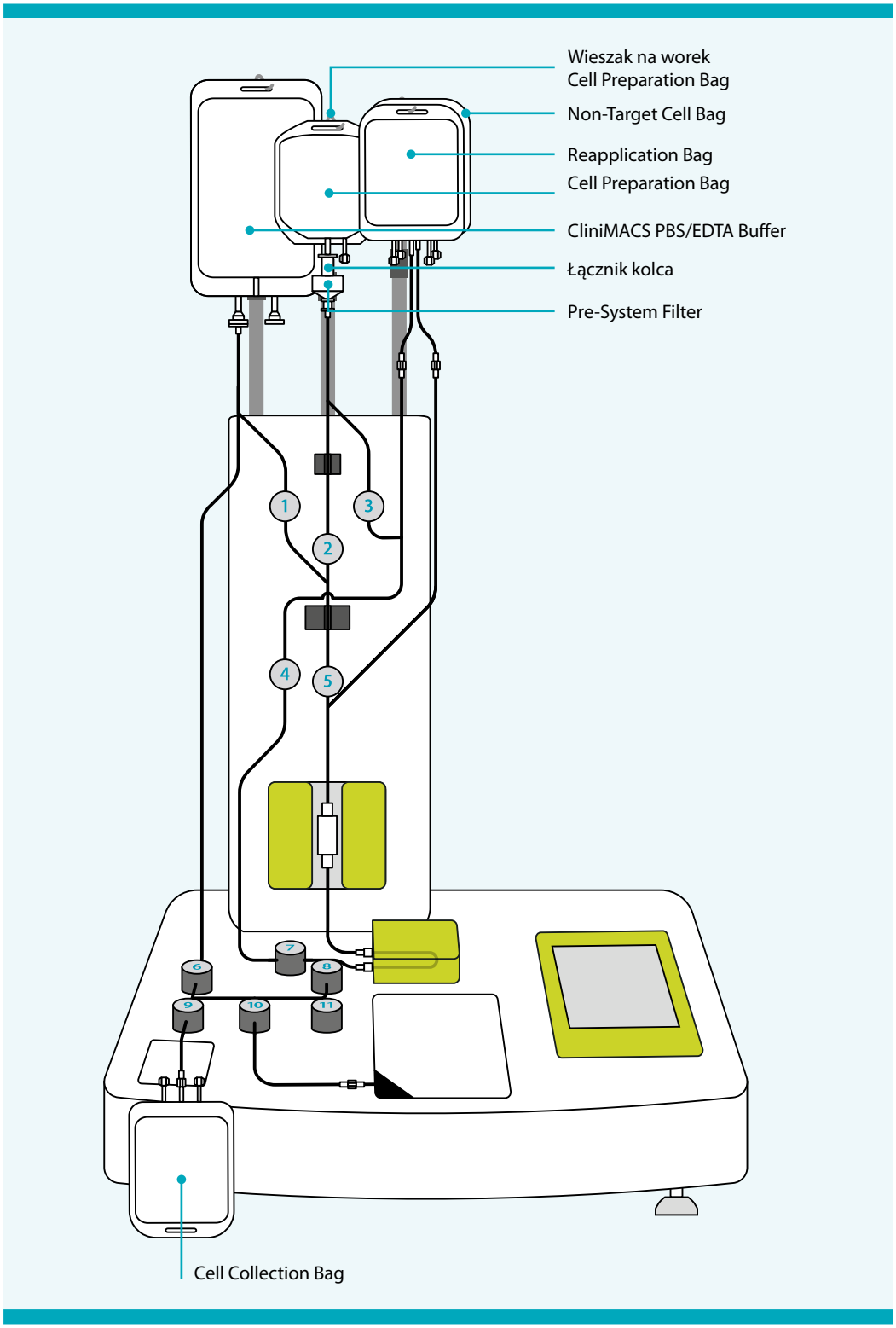
1. Sprawdzić dren czujnika płynu. Upewnić się, że dren został prawidłowo włożony, nie ma w nim żadnych zewnętrznych płynów i nie został przemieszczony podczas procedury ładowania.
2. Potwierdzić, że możliwy jest nieograniczony przepływ płynu do każdego worka.

Aby kontynuować, nacisnąć **ENT**.

▶ **Przejść do KROKU 4.**



Ekran 7.69: Kontrola końcowa czujnika płynu

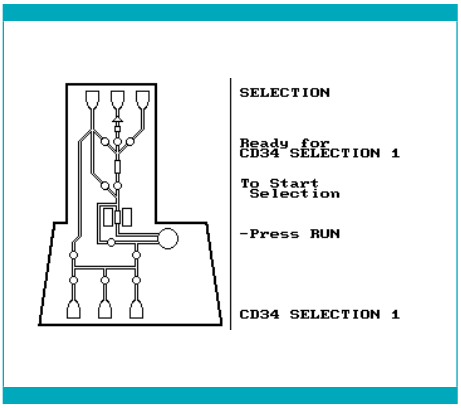


Rysunek 7.21: CliniMACS Plus Instrument z CliniMACS Depletion Tubing Set, CliniMACS PBS/EDTA Buffer, Cell Preparation Bag i Cell Collection Bag

7.4 KROK 4: Separacja CliniMACS Plus

7.4.1 CD34 SELECTION 1/2

Po zakończeniu kontroli końcowej aparat CliniMACS Plus Instrument jest gotowy do rozpoczęcia separacji. Okno wyświetla Ekran 7.70.

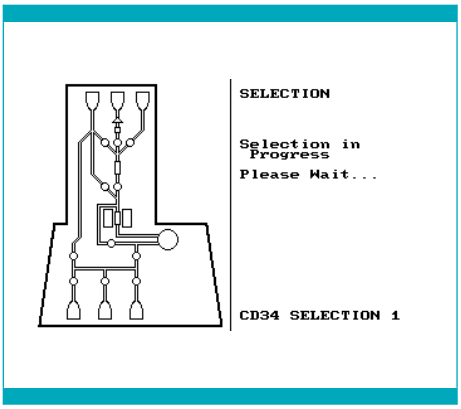


Ekran 7.70: Rozpoczęcie separacji

Aby kontynuować, nacisnąć **RUN**.

Po naciśnięciu **RUN** aparat automatycznie wykona wybraną procedurę separacji.

W każdej fazie operacji pojawia się ekran podobny do Ekran 7.71, pokazujący status procedury separacji.



Ekran 7.71: Separacja w toku

Wskaźnik położenia magnesu jest przedstawiony jako dwa czarne pola obok kolumny separacyjnej, gdy magnes jest „włączony", tzn. został przesunięty do przodu, aby namagnesować kolumnę separacyjną. Jeśli wskaźnik położenia magnesu jest przezroczysty (np. Ekran 7.70), magnes jest „wyłączony", tzn. został przesunięty do tyłu aparatu. Po odsunięciu magnesu kolumna separacyjna znajduje się poza polem magnetycznym i nie jest już namagnesowana.

Wskazówka: Na ekranie może pojawić się inna nazwa programu w zależności od wybranego programu separacji (CD34 SELECTION 1 lub 2).

Procedura separacji

Załadowanie komórek

Procedura separacji rozpoczyna się od napełnienia filtra pre-system filter, aby usunąć resztki powietrza z filtra pre-system filter.

Następnie rozpoczyna się separacja znakowanych komórek. Pompa zasysa zawartość Cell Preparation Bag do zestawu drenów i ładuje produkt komórkowy przez kolumnę wstępną na kolumnę separacyjną. Komórki znakowane magnetycznie (komórki docelowe) są zatrzymywane w kolumnie separacyjnej, umieszczonej w polu magnetycznym, natomiast komórki nieznakowane (komórki inne niż docelowe) są przepuszczane i zbierane w worku Negative Fraction Bag. Gdy worek Cell Preparation Bag jest pusty (co jest automatycznie wykrywane przez czujnik płynu), filtr pre-system filter jest dwukrotnie przepłukiwany buforem.

Przemywanie kolumny I

Kolumna wstępna i kolumna separacyjna są intensywnie przemywane w celu usunięcia wszystkich nieznakowanych komórek. Bufor do przemywania jest zbierany w worku Buffer Waste Bag. Gdy rozpoczyna się krok „Przemywanie kolumny I", wyświetlany jest całkowity czas pozostały do zakończenia procedury separacji.

WAŻNE

Na początku separacji bufor jest pompowany do góry w kierunku Cell Preparation Bag, aby wypełnić filtr pre-system filter. Kilkakrotnie dotknąć delikatnie boku filtra, aby usunąć pęcherzyki powietrza, które mogą być w nim uwięzione.

Uwolnienie komórek I

Magnes jest przesunięty do tyłu aparatu (pozycja „OFF"). Zatrzymane komórki są uwalniane przy szybkim przepływie, ale komórki pozostają w wewnętrznym obiegu drenów.

Ponowne załadowanie komórek I

Magnes jest ponownie przesunięty do pozycji „ON", aby namagnesować kolumnę separacyjną, i komórki są ponownie umieszczane na kolumnie separacyjnej.

Przemywanie kolumny II

Po ponownym załadowaniu komórek następuje drugi krok przemywania, aby usunąć pozostałe nieznakowane komórki. Również wszystkie dreny są kilkakrotnie płukane.

Uwolnienie komórek II, ponowne załadowanie komórek II, przemywanie kolumny III

Komórki są uwalniane i ponownie umieszczane na kolumnie separacyjnej po raz drugi, aby usunąć wszelkie nieznakowane komórki, które nieswoiście przylegają do matrycy kolumny. Następnie kolumna separacyjna jest ponownie przemywana.

Uwolnienie komórek III, ponowne załadowanie komórek III, przemywanie kolumny IV

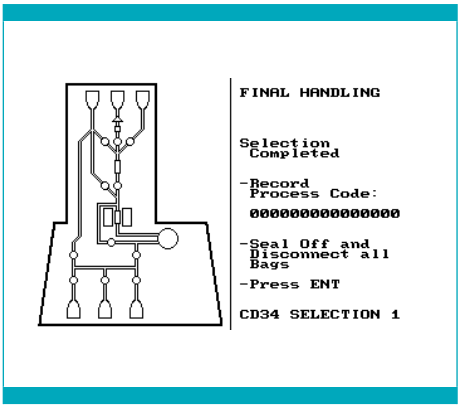
Ponadto program separacji CD34 SELECTION 2 zawiera trzeci krok uwalniania i ponownej aplikacji.

Elucja końcowa komórek

Magnes zostaje przesunięty do pozycji „OFF" i komórki znakowane magnetycznie są uwalniane z kolumny separacyjnej i zbierane w podłączonym worku Cell Collection Bag.

Odłączenie worków i zapisanie kodu procesu

Po zakończeniu biegu okno wskazuje Ekran 7.72.

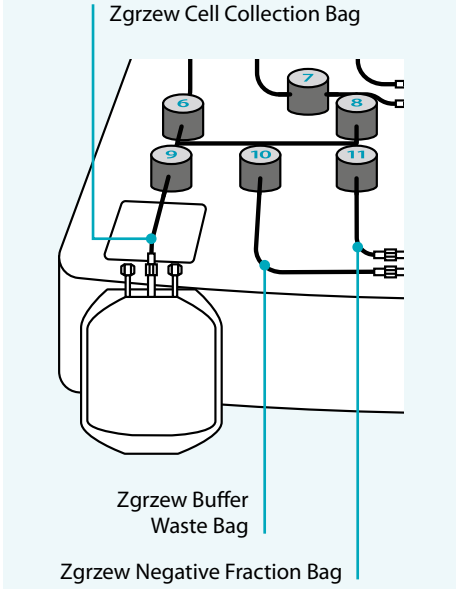


Ekran 7.72: Odłączenie worków i zapisanie kodu procesu

1. Zapisać kod procesu.
2. Zacisnąć lub zgrzać dren nad złączem luer lock łączącym Cell Collection Bag z zestawem drenów (patrz Rysunek 7.22).

   Wykonać trzy hermetyczne zgrzewy w drenie bezpośrednio pod zaworem nr 9. Ostrożnie oddzielić środkowy zgrzew, aby odłączyć Cell Collection Bag od zestawu drenów.
3. Zważyć napełniony Cell Collection Bag. Zapisać wagę.

   Określić wagę frakcji komórek docelowych, odejmując wagę pustego worka Cell Collection Bag od wagi worka Cell Collection Bag zawierającego komórki docelowe. Zapisać wagę.
4. Dokładnie wymieszać zawiesinę komórek docelowych, obracając worek. Pobrać odpowiednią ilość, np. 0,5 mL, i zachować do analizy.
5. Zgrzewarką zgrzać dren powyżej złącza luer lock worka Negative Fraction Bag. Wykonać trzy hermetyczne zgrzewy w drenie. Oddzielić środkowy zgrzew, aby odłączyć worek Negative Fraction Bag.
6. Odłączyć Buffer Waste Bag w ten sam sposób.
7. Usunąć Negative Fraction Bag i Buffer Waste Bag. Przechowywać wszystkie worki do czasu przeprowadzenia końcowej analizy wszystkich komórek.



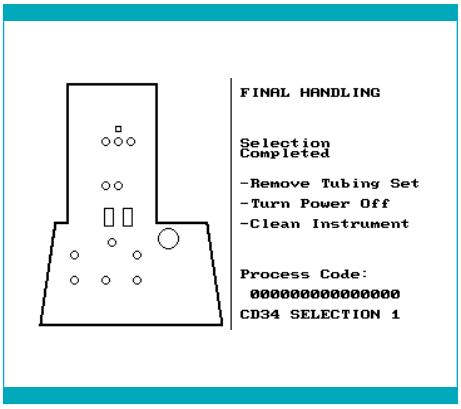
Rysunek 7.22: Odłączenie worków

Komórki docelowe mogą być teraz przetwarzane zgodnie z protokołami klinicznymi.

Aby kontynuować, nacisnąć **RUN**.

Rozładowanie zestawu drenów i wyłączenie

Okno wyświetla Ekran 7.73.



Ekran 7.73: Rozładowanie zestawu drenów i wyłączenie

1. Usunąć zestaw drenów: Zaczynając od zaworów nr 6, 9, 10 i 11 i idąc w górę, zwolnić dren z czujnika płynu i z zaworów, naciskając na zawory. Zwolnić kolumny z uchwytów kolumny. Zestaw drenów należy zutylizować jako zagrożenie biologiczne, zgodnie ze standardowymi procedurami szpitalnymi.
2. Wyłączyć aparat CliniMACS Plus Instrument.
3. Oczyścić aparat zgodnie z instrukcją czyszczenia, patrz rozdział „Czyszczenie i dezynfekcja" w Podręczniku użytkownika CliniMACS Plus Instrument. Należy przestrzegać standardowych procedur postępowania z materiałem zakaźnym.

Analiza komórek

WAŻNE

- CliniMACS PBS/EDTA Buffer nie musi być usuwany przed podaniem oddzielonych komórek docelowych, jeśli objętość nie przekracza 100 mL na przeszczep przy odpowiedniej szybkości infuzji. Należy uwzględnić stan nerek pacjenta i wpływ na elektrolity we krwi. Szczególnie u dzieci należy odpowiednio dostosować szybkość infuzji.
- Jeśli objętość frakcji komórek docelowych przekracza 100 mL, należy ją zmniejszyć odpowiednimi sposobami, np. przez odwirowanie lub wymianę buforu, do roztworu do infuzji zatwierdzonego w kraju użytkownika.

⚠ PRZESTROGA

Ryzyko obniżenia jakości komórek docelowych. Komórki docelowe muszą być analizowane i potwierdzone, że spełniają wymagania użytkownika, w przeciwnym razie przydatność do zastosowania klinicznego może być zagrożona. Zbadać docelowe komórki pod kątem jakości i ilości zgodnie z ich zamierzonym wykorzystaniem.

Musi obejmować następujące parametry:

- całkowita liczba leukocytów
- żywotność i całkowita liczba komórek docelowych
- czystość i odzysk komórek docelowych

Zaleca się również oznaczenie całkowitej liczby leukocytów i żywotności frakcji komórek innych niż docelowe. Lista jest przykładowa i należy uwzględnić inne testy w zależności od przeznaczenia i protokołów klinicznych. Zapisać dane z analizy.

7.4.2 ENRICHMENT 1.1

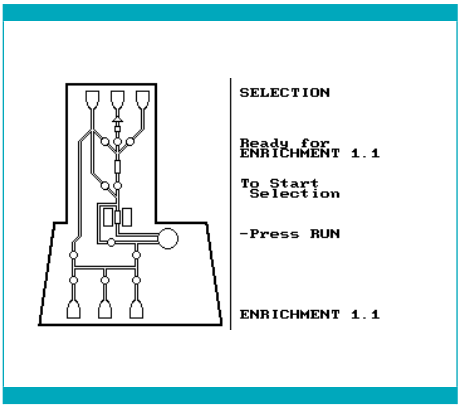
Po zakończeniu kontroli końcowej aparat CliniMACS Plus Instrument jest gotowy do rozpoczęcia separacji. Okno wyświetla Ekran 7.74.

Aby kontynuować, nacisnąć **RUN**.

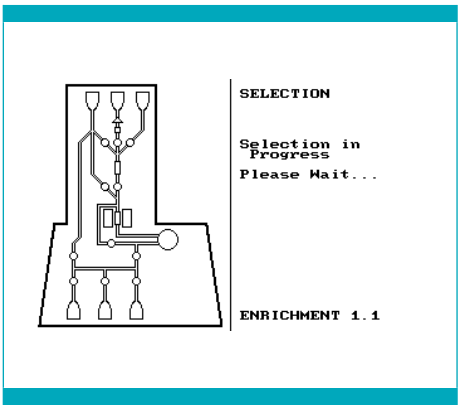
Po naciśnięciu **RUN** aparat automatycznie wykona wybraną procedurę separacji.

W każdej fazie operacji pojawia się ekran podobny do Ekran 7.75, pokazujący status procedury separacji.

Wskaźnik położenia magnesu jest pokazany jako dwa czarne pola obok kolumny separacyjnej, gdy magnes jest „włączony", tzn. został przesunięty do przodu, aby namagnesować kolumnę separacyjną. Jeśli wskaźnik położenia magnesu jest przezroczysty (np. Ekran 7.74), magnes jest „wyłączony", tzn. został przesunięty do tyłu aparatu. Po odsunięciu magnesu kolumna separacyjna znajduje się poza polem magnetycznym i nie jest namagnesowana.



Ekran 7.74: Rozpoczęcie separacji



Ekran 7.75: Separacja w toku

Procedura separacji

Załadowanie komórek

Procedura separacji rozpoczyna się od napełnienia filtra pre-system filter, aby usunąć resztki powietrza z filtra pre-system filter. Następnie rozpoczyna się separacja znakowanych komórek. Pompa zasysa zawartość Cell Preparation Bag do zestawu drenów i ładuje produkt komórkowy przez kolumnę wstępną na kolumnę separacyjną. Komórki znakowane magnetycznie (komórki docelowe) są zatrzymywane w kolumnie separacyjnej, umieszczonej w polu magnetycznym, natomiast komórki nieznakowane (komórki inne niż docelowe) są przepuszczane i są zbierane w worku Negative Fraction Bag.

WAŻNE

Na początku separacji bufor jest pompowany do góry w kierunku Cell Preparation Bag, aby wypełnić filtr pre-system filter. Kilkakrotnie dotknąć delikatnie boku filtra, aby usunąć pęcherzyki powietrza, które mogą być w nim uwięzione.

Wskazówka:

- Jeśli liczba komórek znakowanych magnetycznie (obliczona przez oprogramowanie CliniMACS Plus) przekracza wydajność wiązania kolumny separacyjnej, program separacji automatycznie ładuje i rozdziela próbkę komórek na odpowiednie porcje („ładowanie etapowe").
- Ładowanie zostanie przerwane po osiągnięciu wydajności kolumny separacyjnej, a program separacji przejdzie do następnego kroku separacji. Po zakończeniu ostatniego kroku (końcowa elucja komórek) kolejna porcja próbki zostanie załadowana na kolumnę i odpowiednio przetworzona.

Przemywanie kolumny I

Kolumna wstępna i kolumna separacyjna są intensywnie przemywane w celu usunięcia wszystkich nieznakowanych komórek. Bufor do przemywania jest zbierany w worku Buffer Waste Bag.

Uwolnienie komórek

Magnes jest przesunięty do tyłu aparatu (pozycja „OFF"). Zatrzymane komórki są uwalniane przy szybkim przepływie, ale pozostają w wewnętrznym obiegu drenów.

Ponowne załadowanie komórek

Magnes jest ponownie przesunięty do pozycji „ON", aby namagnesować kolumnę separacyjną, i komórki są ponownie umieszczane na kolumnie separacyjnej.

Przemywanie kolumny II

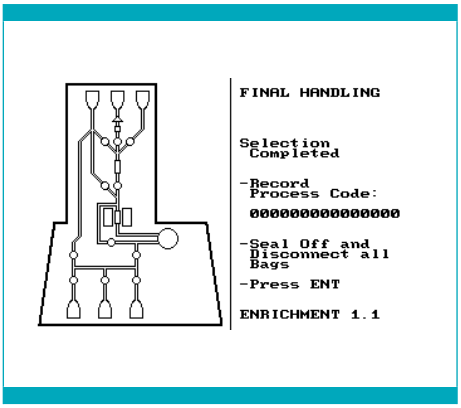
Po ponownym załadowaniu komórek następuje druga sekwencja przemywania kolumny, aby usunąć pozostałe nieznakowane komórki. Również wszystkie dreny są kilkakrotnie płukane.

Elucja końcowa komórek

Magnes zostaje przesunięty do pozycji „OFF" i komórki znakowane magnetycznie (komórki docelowe) są uwalniane z kolumny separacyjnej i zbierane w worku Cell Collection Bag.

Odłączenie worków i zapisanie kodu procesu

Po zakończeniu biegu okno wskazuje Ekran 7.76.

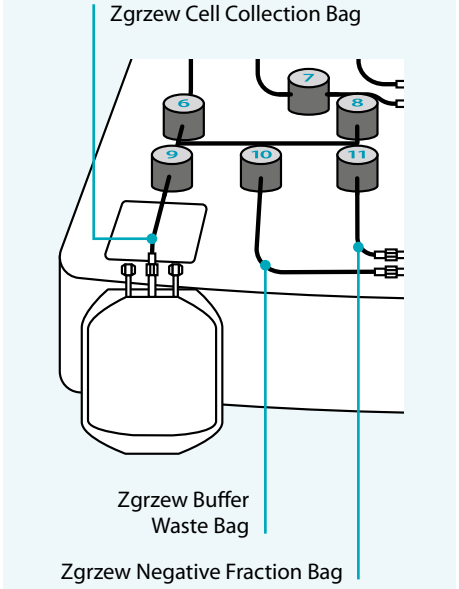


Ekran 7.76: Odłączenie worków i zapisanie kodu procesu

1. Zapisać kod procesu.
2. Zacisnąć lub zgrzać dren nad złączem luer lock łączącym Cell Collection Bag z zestawem drenów (patrz Rysunek 7.23).

   Wykonać trzy hermetyczne zgrzewy w drenie bezpośrednio pod zaworem nr 9. Ostrożnie oddzielić środkowy zgrzew, aby odłączyć Cell Collection Bag od zestawu drenów.
3. Zważyć napełniony Cell Collection Bag. Zapisać wagę.

   Określić wagę frakcji komórek docelowych, odejmując wagę pustego worka Cell Collection Bag od wagi worka Cell Collection Bag zawierającego komórki docelowe. Zapisać wagę.
4. Dokładnie wymieszać zawiesinę komórek docelowych, obracając worek. Pobrać odpowiednią ilość, np. 0,5 mL, i zachować do analizy.
5. Zgrzewarką zgrzać dren powyżej złącza luer lock worka Negative Fraction Bag. Wykonać trzy hermetyczne zgrzewy w drenie. Oddzielić środkowy zgrzew, aby odłączyć worek Negative Fraction Bag.
6. Odłączyć Buffer Waste Bag w ten sam sposób.
7. Usunąć Negative Fraction Bag i Buffer Waste Bag. Przechowywać wszystkie worki do czasu przeprowadzenia końcowej analizy wszystkich komórek.



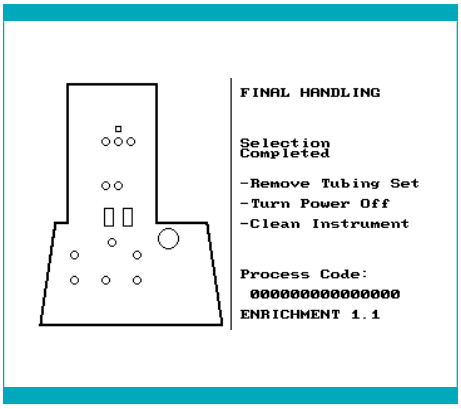
Rysunek 7.23: Odłączenie worków

Komórki docelowe mogą być teraz przetwarzane zgodnie z protokołami klinicznymi.

Aby kontynuować, nacisnąć **ENT**.

Rozładowanie zestawu drenów i wyłączenie

Okno wyświetla Ekran 7.77.



Ekran 7.77: Rozładowanie zestawu drenów i wyłączenie

1. Usunąć zestaw drenów: Zaczynając od zaworów nr 6, 9, 10 i 11 i idąc w górę, zwolnić dren z czujnika płynu i z zaworów, naciskając na zawory. Zwolnić kolumny z uchwytów kolumny. Zestaw drenów należy zutylizować jako zagrożenie biologiczne, zgodnie ze standardowymi procedurami szpitalnymi.
2. Wyłączyć aparat CliniMACS Plus Instrument.
3. Oczyścić aparat zgodnie z instrukcją czyszczenia, patrz rozdział „Czyszczenie i dezynfekcja" w Podręczniku użytkownika CliniMACS Plus Instrument. Należy przestrzegać standardowych procedur postępowania z materiałem zakaźnym.

Analiza komórek

WAŻNE

- CliniMACS PBS/EDTA Buffer nie musi być usuwany przed podaniem oddzielonych komórek docelowych, jeśli objętość nie przekracza 100 mL na przeszczep przy odpowiedniej szybkości infuzji. Należy uwzględnić stan nerek pacjenta i wpływ na elektrolity we krwi. Szczególnie u dzieci należy odpowiednio dostosować szybkość infuzji.
- Jeśli objętość frakcji komórek docelowych przekracza 100 mL, należy ją zmniejszyć odpowiednimi sposobami, np. przez odwirowanie lub wymianę buforu, do roztworu do infuzji zatwierdzonego w kraju użytkownika.

⚠ PRZESTROGA

Ryzyko obniżenia jakości komórek docelowych. Komórki docelowe muszą być analizowane i potwierdzone, że spełniają wymagania użytkownika, w przeciwnym razie przydatność do zastosowania klinicznego może być zagrożona. Zbadać docelowe komórki pod kątem jakości i ilości zgodnie z ich zamierzonym wykorzystaniem.

Musi obejmować następujące parametry:

- całkowita liczba leukocytów
- żywotność i całkowita liczba komórek docelowych
- czystość (efektywność deplecji) i odzysk komórek docelowych

Zaleca się również oznaczenie całkowitej liczby leukocytów i żywotności frakcji komórek innych niż docelowe. Lista jest przykładowa i należy uwzględnić inne testy w zależności od przeznaczenia i protokołów klinicznych. Zapisać dane z analizy.

7.4.3 ENRICHMENT 3.2

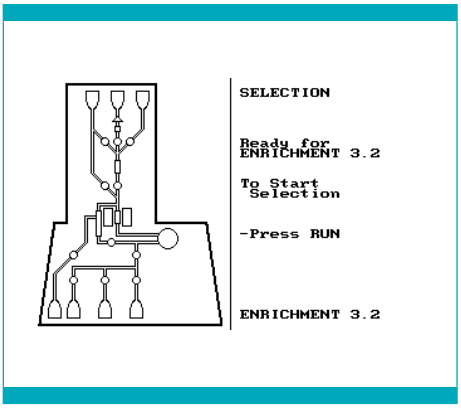
Po zakończeniu kontroli końcowej aparat CliniMACS Plus Instrument jest gotowy do rozpoczęcia separacji. Okno wyświetla Ekran 7.78.

Aby kontynuować, nacisnąć **RUN**.

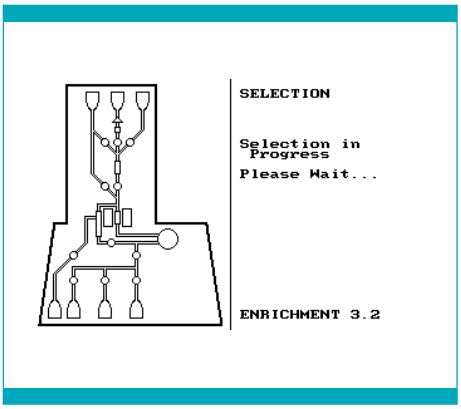
Po naciśnięciu **RUN** aparat automatycznie wykona wybraną procedurę separacji.

W każdej fazie operacji pojawia się ekran podobny do Ekran 7.79, pokazujący status procedury separacji.

Wskaźnik położenia magnesu jest pokazany jako dwa czarne pola obok kolumny separacyjnej, gdy magnes jest „włączony", tzn. został przesunięty do przodu, aby namagnesować kolumnę separacyjną. Jeśli wskaźnik położenia magnesu jest przezroczysty (np. Ekran 7.78), magnes jest „wyłączony", tzn. został przesunięty do tyłu aparatu. Po odsunięciu magnesu kolumna separacyjna znajduje się poza polem magnetycznym i nie jest namagnesowana.



Ekran 7.78: Rozpoczęcie separacji



Ekran 7.79: Separacja w toku

Procedura separacji

Załadowanie komórek

Procedura separacji rozpoczyna się od napełnienia filtra pre-system filter, aby usunąć resztki powietrza z filtra pre-system filter. Następnie rozpoczyna się separacja znakowanych komórek. Pompa zasysa zawartość Cell Preparation Bag do zestawu drenów i ładuje produkt komórkowy przez kolumnę wstępną na kolumnę separacyjną. Komórki znakowane magnetycznie (komórki docelowe) są zatrzymywane w kolumnie separacyjnej, umieszczonej w polu magnetycznym, natomiast komórki nieznakowane (komórki inne niż docelowe) są przepuszczane i są zbierane w worku Negative Fraction Bag. Gdy worek Cell Preparation Bag jest pusty (co jest automatycznie wykrywane przez czujnik płynu), filtr pre-system filter jest dwukrotnie przepłukiwany buforem.

WAŻNE

Na początku separacji bufor jest pompowany do góry w kierunku Cell Preparation Bag, aby wypełnić filtr pre-system filter. Kilkakrotnie dotknąć delikatnie boku filtra, aby usunąć pęcherzyki powietrza, które mogą być w nim uwięzione.

Przemywanie kolumny I

Kolumna wstępna i kolumna separacyjna są intensywnie przemywane w celu usunięcia wszystkich nieznakowanych komórek. Bufor do przemywania jest zbierany w worku Buffer Waste Bag.

Uwolnienie komórek I

Magnes jest przesunięty do tyłu aparatu (pozycja „OFF"). Zatrzymane komórki są uwalniane przy szybkim przepływie, ale komórki pozostają w wewnętrznym obiegu drenów.

Ponowne załadowanie komórek I

Magnes jest ponownie przesunięty do pozycji „ON", aby namagnesować kolumnę separacyjną, i komórki są ponownie umieszczane na kolumnie separacyjnej.

Przemywanie kolumny II

Po ponownym załadowaniu komórek następuje drugi krok przemywania, aby usunąć pozostałe nieznakowane komórki. Również wszystkie dreny są kilkakrotnie płukane.

Uwolnienie komórek II, ponowne załadowanie komórek II, przemywanie kolumny III

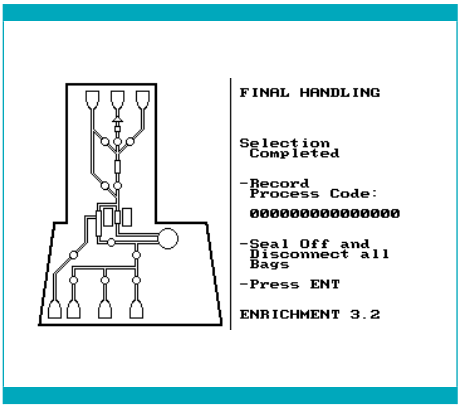
Komórki są uwalniane i ponownie umieszczane na kolumnie separacyjnej po raz drugi, aby usunąć wszelkie nieznakowane komórki, nieswoiście przylegające do matrycy kolumny. Następnie kolumna separacyjna jest ponownie przemywana.

Elucja końcowa komórek

Magnes zostaje przesunięty do pozycji „OFF" i komórki znakowane magnetycznie (komórki docelowe) są uwalniane i zbierane w worku Cell Collection Bag.

Odłączenie worków i zapisanie kodu procesu

Po zakończeniu biegu okno wskazuje Ekran 7.80.

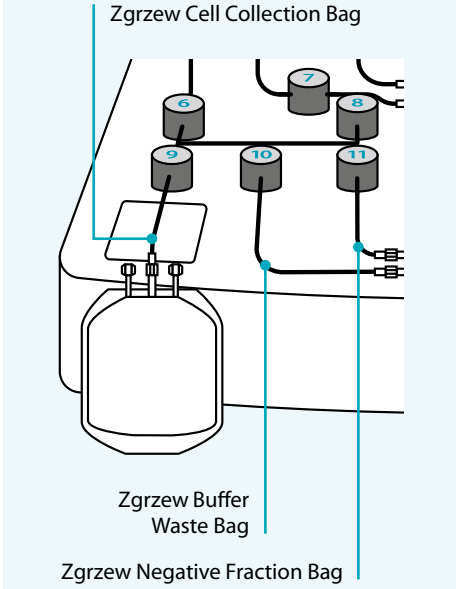


Ekran 7.80: Odłączenie worków i zapisanie kodu procesu

1. Zapisać kod procesu.
2. Zacisnąć lub zgrzać dren nad złączem luer lock łączącym Cell Collection Bag z zestawem drenów (patrz Rysunek 7.24).

   Wykonać trzy hermetyczne zgrzewy w drenie bezpośrednio pod zaworem nr 9. Ostrożnie oddzielić środkowy zgrzew, aby odłączyć Cell Collection Bag od zestawu drenów.
3. Zważyć napełniony Cell Collection Bag. Zapisać wagę.

   Określić wagę frakcji komórek docelowych, odejmując wagę pustego worka Cell Collection Bag od wagi worka Cell Collection Bag zawierającego komórki docelowe. Zapisać wagę.
4. Dokładnie wymieszać zawiesinę komórek docelowych, obracając worek. Pobrać odpowiednią ilość, np. 0,5 mL, i zachować do analizy.
5. Zgrzewarką zgrzać dren powyżej złącza luer lock worka Negative Fraction Bag. Wykonać trzy hermetyczne zgrzewy w drenie. Oddzielić środkowy zgrzew, aby odłączyć worek Negative Fraction Bag.
6. Odłączyć Buffer Waste Bag w ten sam sposób.
7. Usunąć Negative Fraction Bag i Buffer Waste Bag. Przechowywać wszystkie worki do czasu przeprowadzenia końcowej analizy wszystkich komórek.



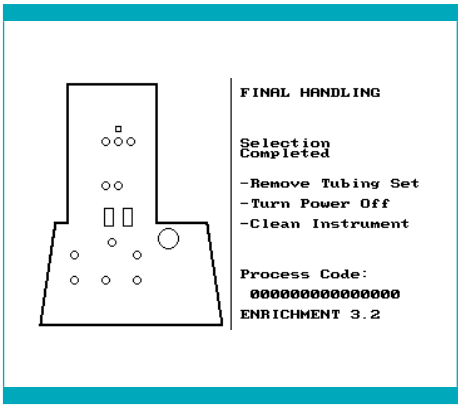
Rysunek 7.24: Odłączenie worków

Komórki docelowe mogą być teraz przetwarzane zgodnie z protokołami klinicznymi.

Aby kontynuować, nacisnąć **ENT**.

Rozładowanie zestawu drenów i wyłączenie

Okno wyświetla Ekran 7.81.



Ekran 7.81: Rozładowanie zestawu drenów i wyłączenie

1. Usunąć zestaw drenów: Zaczynając od zaworów nr 6, 9, 10 i 11 i idąc w górę, zwolnić dren z czujnika płynu i z zaworów, naciskając na zawory. Zwolnić kolumny z uchwytów kolumny. Zestaw drenów należy zutylizować jako zagrożenie biologiczne, zgodnie ze standardowymi procedurami szpitalnymi.
2. Wyłączyć aparat CliniMACS Plus Instrument.
3. Oczyścić aparat zgodnie z instrukcją czyszczenia, patrz rozdział „Czyszczenie i dezynfekcja" w Podręczniku użytkownika CliniMACS Plus Instrument. Należy przestrzegać standardowych procedur postępowania z materiałem zakaźnym.

Analiza komórek

WAŻNE

- CliniMACS PBS/EDTA Buffer nie musi być usuwany przed podaniem oddzielonych komórek docelowych, jeśli objętość nie przekracza 100 mL na przeszczep przy odpowiedniej szybkości infuzji. Należy uwzględnić stan nerek pacjenta i wpływ na elektrolity we krwi. Szczególnie u dzieci należy odpowiednio dostosować szybkość infuzji.
- Jeśli objętość frakcji komórek docelowych przekracza 100 mL, należy ją zmniejszyć odpowiednimi sposobami, np. przez odwirowanie lub wymianę buforu, do roztworu do infuzji zatwierdzonego w kraju użytkownika.

⚠ PRZESTROGA

Ryzyko obniżenia jakości komórek docelowych. Komórki docelowe muszą być analizowane i potwierdzone, że spełniają wymagania użytkownika, w przeciwnym razie przydatność do zastosowania klinicznego może być zagrożona. Zbadać docelowe komórki pod kątem jakości i ilości zgodnie z ich zamierzonym wykorzystaniem.

Musi obejmować następujące parametry:

- całkowita liczba leukocytów
- żywotność i całkowita liczba komórek docelowych
- czystość i odzysk komórek docelowych

Zaleca się również oznaczenie całkowitej liczby leukocytów i żywotności frakcji komórek innych niż docelowe. Lista jest przykładowa i należy uwzględnić inne testy w zależności od przeznaczenia i protokołów klinicznych. Zapisać dane z analizy.

7.4.4 DEPLETION 2.1

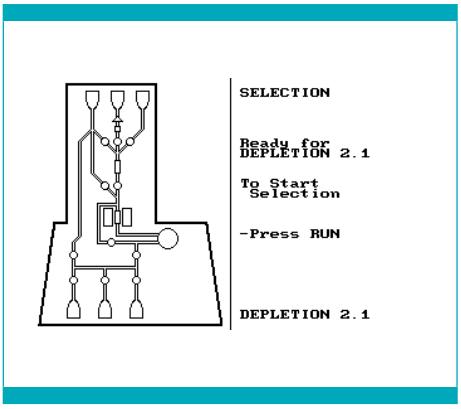
Po zakończeniu kontroli końcowej aparat CliniMACS Plus Instrument jest gotowy do rozpoczęcia separacji. Okno wyświetla Ekran 7.82.

Aby kontynuować, nacisnąć **RUN**.

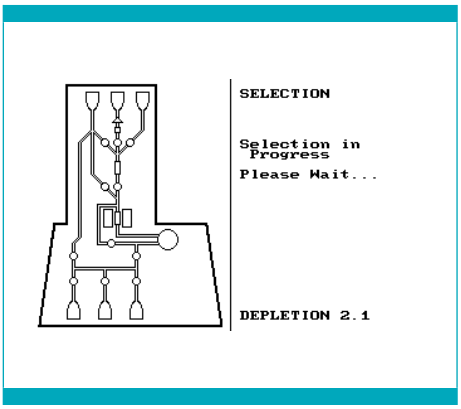
Po naciśnięciu **RUN** aparat automatycznie wykona wybraną procedurę separacji.

W każdej fazie operacji pojawia się ekran podobny do Ekran 7.83, pokazujący status procedury separacji.

Wskaźnik położenia magnesu jest pokazany jako dwa czarne pola obok kolumny separacyjnej, gdy magnes jest „włączony", tzn. został przesunięty do przodu, aby namagnesować kolumnę separacyjną. Jeśli wskaźnik położenia magnesu jest przezroczysty (np. Ekran 7.82), magnes jest „wyłączony", tzn. został przesunięty do tyłu aparatu. Po odsunięciu magnesu kolumna separacyjna znajduje się poza polem magnetycznym i nie jest namagnesowana.



Ekran 7.82: Rozpoczęcie separacji



Ekran 7.83: Separacja w toku

Procedura separacji

Załadowanie komórek

Procedura separacji rozpoczyna się od napełnienia filtra pre-system filter, aby zakończyć płukanie systemu. Następnie rozpoczyna się separacja znakowanych komórek. Pompa zasysa zawartość Cell Preparation Bag do zestawu drenów. Komórki znakowane magnetycznie (komórki inne niż docelowe) są zatrzymywane w kolumnie separacyjnej, umieszczonej w polu magnetycznym, natomiast komórki nieznakowane (komórki docelowe) są przepuszczane i zbierane w worku Cell Collection Bag.

WAŻNE

Na początku separacji bufor jest pompowany do góry w kierunku Cell Preparation Bag, aby wypełnić filtr pre-system filter. Kilkakrotnie dotknąć delikatnie boku filtra, aby usunąć pęcherzyki powietrza, które mogą być w nim uwięzione.

Płukanie filtra pre-system filter

Po całkowitym załadowaniu próbki komórek na zestaw drenów, filtr pre-system filter jest dwukrotnie przepłukiwany buforem, aby zmniejszyć straty komórek w filtrze.

Wskazówka:

- Jeśli liczba komórek znakowanych magnetycznie (obliczona przez oprogramowanie CliniMACS Plus) przekracza wydajność wiązania kolumny separacyjnej, program separacji automatycznie ładuje i rozdziela próbkę komórek na mniejsze porcje („ładowanie etapowe").
- Ładowanie zostanie przerwane po osiągnięciu wydajności kolumny separacyjnej a program separacji przejdzie do następnego kroku separacji. Po zakończeniu ostatniego kroku (Końcowa elucja komórek) kolejna porcja próbki zostanie załadowana na kolumnę.

Przemywanie kolumny

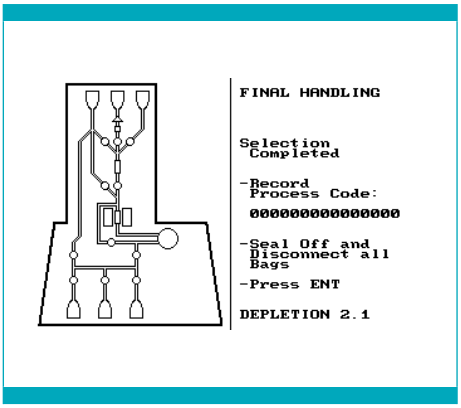
Kolumna wstępna i kolumna separacyjna są intensywnie przemywane w celu usunięcia wszystkich nieznakowanych komórek. Bufor do przemywania jest zbierany w worku Buffer Waste Bag.

Elucja końcowa komórek

Magnes jest przesunięty do pozycji „OFF". Najpierw komórki znakowane magnetycznie są wymywane do Priming Waste Bag. Dopiero po zakończeniu ostatniego etapu ładowania, wszystkie komórki znakowane magnetycznie (komórki inne niż docelowe) są uwalniane z kolumny separacyjnej i zbierane do worka Negative Fraction Bag, aby ograniczyć przenoszenie znakowanych komórek do drenów pompy.

Odłączenie worków i zapisanie kodu procesu

Po zakończeniu biegu okno wskazuje Ekran 7.84.

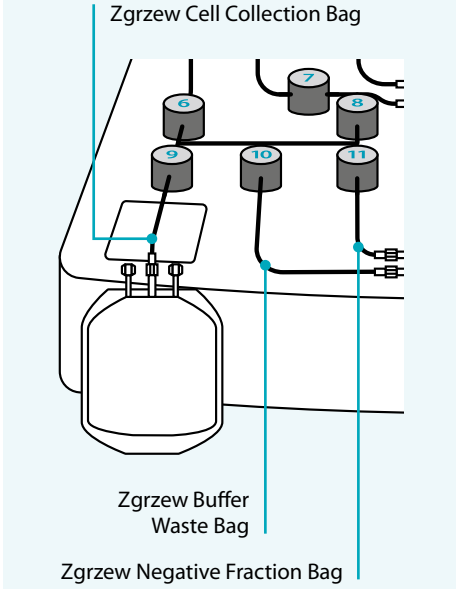


Ekran 7.84: Odłączenie worków i zapisanie kodu procesu

1. Zapisać kod procesu.
2. Zacisnąć lub zgrzać dren nad złączem luer lock łączącym Cell Collection Bag z zestawem drenów (patrz Rysunek 7.25).

   Wykonać trzy hermetyczne zgrzewy w drenie bezpośrednio pod zaworem nr 9. Ostrożnie oddzielić środkowy zgrzew, aby odłączyć Cell Collection Bag od zestawu drenów.
3. Zważyć napełniony Cell Collection Bag. Zapisać wagę.

   Określić wagę frakcji komórek docelowych, odejmując wagę pustego worka Cell Collection Bag od wagi worka Cell Collection Bag zawierającego komórki docelowe. Zapisać wagę.
4. Dokładnie wymieszać zawiesinę komórek docelowych, obracając worek. Pobrać odpowiednią ilość, np. 0,5 mL, i zachować do analizy.
5. Zgrzewarką zgrzać dren powyżej złącza luer lock worka Negative Fraction Bag. Wykonać trzy hermetyczne zgrzewy w drenie. Oddzielić środkowy zgrzew, aby odłączyć worek Negative Fraction Bag.
6. Odłączyć Buffer Waste Bag w ten sam sposób.
7. Usunąć Negative Fraction Bag i Buffer Waste Bag. Przechowywać wszystkie worki do czasu przeprowadzenia końcowej analizy wszystkich komórek.



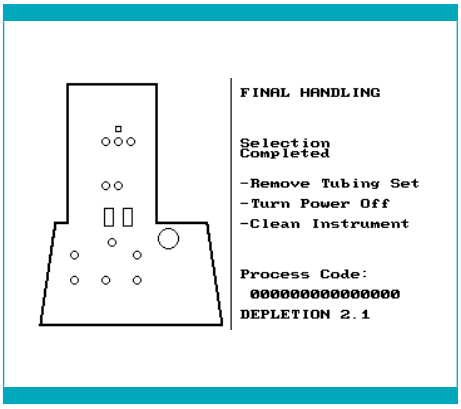
Rysunek 7.25: Odłączenie worków

Komórki docelowe mogą być teraz przetwarzane zgodnie z protokołami klinicznymi.

Aby kontynuować, nacisnąć **ENT**.

Rozładowanie zestawu drenów i wyłączenie

Okno wyświetla Ekran 7.85.



Ekran 7.85: Rozładowanie zestawu drenów i wyłączenie

1. Usunąć zestaw drenów: Zaczynając od zaworów nr 6, 9 i 10 i idąc w górę, zwolnić dren z czujnika płynu i z zaworów, naciskając na zawory. Zwolnić kolumnę z uchwytu kolumny. Zestaw drenów należy zutylizować jako zagrożenie biologiczne, zgodnie ze standardowymi procedurami szpitalnymi.
2. Wyłączyć aparat CliniMACS Plus Instrument.
3. Oczyścić aparat zgodnie z instrukcją czyszczenia, patrz rozdział „Czyszczenie i dezynfekcja" w Podręczniku użytkownika CliniMACS Plus Instrument. Należy przestrzegać standardowych procedur postępowania z materiałem zakaźnym.

Analiza komórek

WAŻNE

- CliniMACS PBS/EDTA Buffer nie musi być usuwany przed podaniem oddzielonych komórek docelowych, jeśli objętość nie przekracza 100 mL na przeszczep przy odpowiedniej szybkości infuzji. Należy uwzględnić stan nerek pacjenta i wpływ na elektrolity we krwi. Szczególnie u dzieci należy odpowiednio dostosować szybkość infuzji.
- Jeśli objętość frakcji komórek docelowych przekracza 100 mL, należy ją zmniejszyć odpowiednimi sposobami, np. przez odwirowanie lub wymianę buforu, do roztworu do infuzji zatwierdzonego w kraju użytkownika.

⚠ PRZESTROGA

Ryzyko obniżenia jakości komórek docelowych. Komórki docelowe muszą być analizowane i potwierdzone, że spełniają wymagania użytkownika, w przeciwnym razie przydatność do zastosowania klinicznego może być zagrożona. Zbadać docelowe komórki pod kątem jakości i ilości zgodnie z ich zamierzonym wykorzystaniem.

Musi obejmować następujące parametry:

- całkowita liczba leukocytów
- żywotność i całkowita liczba komórek docelowych
- efektywność deplecji

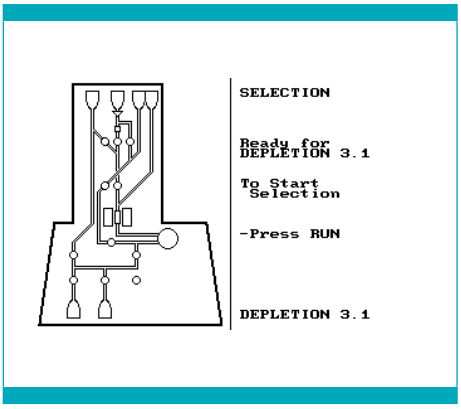
Zaleca się również oznaczenie całkowitej liczby leukocytów i żywotności frakcji komórek innych niż docelowe. Lista jest przykładowa i należy uwzględnić inne testy w zależności od przeznaczenia i protokołów klinicznych. Zapisać dane z analizy.

7.4.5 DEPLETION 3.1

Po zakończeniu kontroli końcowej aparat CliniMACS Plus Instrument jest gotowy do rozpoczęcia separacji. Okno wyświetla Ekran 7.86.

Aby kontynuować, nacisnąć **RUN**.

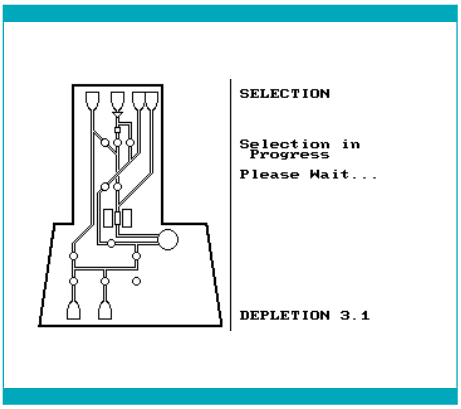
Po naciśnięciu **RUN** aparat automatycznie wykona wybraną procedurę separacji.



Ekran 7.86: Rozpoczęcie separacji

W każdej fazie operacji pojawia się ekran podobny do Ekran 7.87, pokazujący status procedury separacji.

Wskaźnik położenia magnesu jest pokazany jako dwa czarne pola obok kolumny separacyjnej, gdy magnes jest „włączony", tzn. został przesunięty do przodu, aby namagnesować kolumnę separacyjną. Jeśli wskaźnik położenia magnesu jest przezroczysty (np. Ekran 7.86), magnes jest „wyłączony", tzn. został przesunięty do tyłu aparatu. Po odsunięciu magnesu kolumna separacyjna znajduje się poza polem magnetycznym i nie jest namagnesowana



Ekran 7.87: Separacja w toku

Procedura separacji

Depletion 3.1 jest programem dwuetapowym, tzn. komórki są nakładane na kolumnę separacyjną dwukrotnie.

W pierwszej części procesu dochodzi do deplecji większości znakowanych komórek (Staged Cell Loading [Bulk Loading Stage]). W drugiej części procesu dochodzi do deplecji małej ilości pozostałych znakowanych komórek (Sensitive Sample Loading [Sensitive Loading Stage]).

WAŻNE

Na początku separacji bufor jest pompowany do góry w kierunku Cell Preparation Bag, aby wypełnić filtr pre-system filter. Kilkakrotnie dotknąć delikatnie boku filtra, aby usunąć pęcherzyki powietrza, które mogą być w nim uwięzione.

Wskazówka: Jeśli liczba komórek znakowanych magnetycznie (obliczona przez oprogramowanie CliniMACS Plus) przekracza wydajność wiązania kolumny separacyjnej, program separacji automatycznie ładuje i rozdziela próbkę komórek na mniejsze porcje („ładowanie etapowe"). Między każdym etapem ładowania kolumna separacyjna jest przemywana, aby usunąć wszystkie znakowane komórki. Znakowane komórki zostaną wymyte i umieszczone w Non-Target Cell Bag. Bufor do przemywania jest zbierany w worku Reapplication Bag.

Staged Cell Loading (Bulk Loading Stage)

Procedura separacji rozpoczyna się od napełnienia filtra pre-system filter, aby zakończyć płukanie systemu. Następnie rozpoczyna się separacja znakowanych komórek. Pompa zasysa zawartość Cell Preparation Bag do zestawu drenów. Komórki znakowane magnetycznie (komórki inne niż docelowe) są zatrzymywane w kolumnie separacyjnej, umieszczonej w polu magnetycznym, natomiast komórki nieznakowane (komórki docelowe) są przepuszczane i zbierane w worku Reapplication Bag.

Sensitive Sample Loading (Sensitive Loading Stage)

W celu dalszej deplecji komórki w worku Reapplication Bag są ponownie ładowane do kolumny separacyjnej z mniejszą prędkością. Podczas gdy nieliczne pozostałe znakowane komórki są zatrzymywane na kolumnie, komórki nieznakowane (komórki docelowe) przepływają przez pole magnetyczne i są zbierane w worku Cell Collection Bag.

Płukanie filtra pre-system filter i worka Reapplication Bag

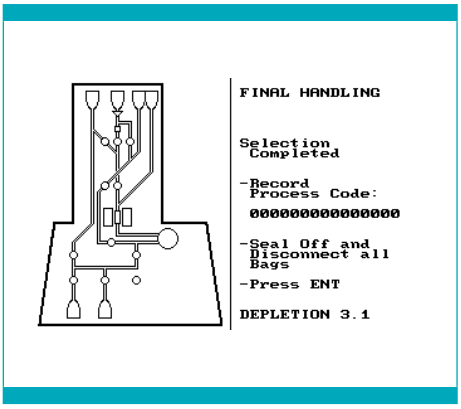
Po zakończeniu deplecji próbki komórek, zarówno masowej, jak i wrażliwej, filtr pre-system filter i worek Reapplication Bag są dwukrotnie przepłukiwane buforem, aby zmniejszyć straty komórek w systemie.

Usunięcie komórek innych niż docelowe

Magnes jest przesunięty do pozycji „OFF". Komórki znakowane magnetycznie (komórki inne niż docelowe) są uwalniane z kolumny separacyjnej i zbierane w Non-Target Cell Bag po każdym etapie ładowania.

Odłączenie worków i zapisanie kodu procesu

Po zakończeniu biegu okno wskazuje Ekran 7.88.

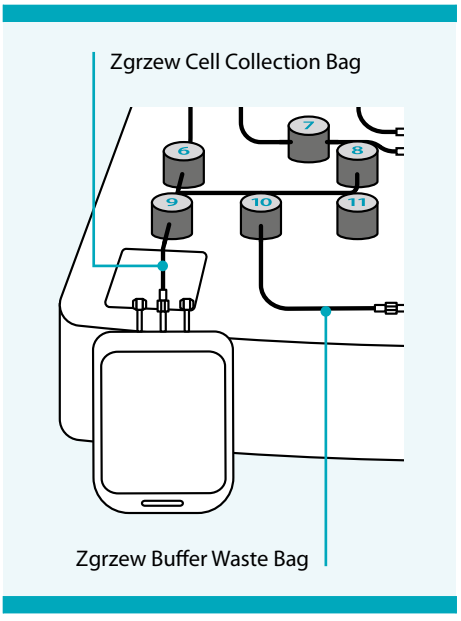


Ekran 7.88: Odłączenie worków i zapisanie kodu procesu

1. Zapisać kod procesu.
2. Zacisnąć lub zgrzać dren nad złączem luer lock łączącym Cell Collection Bag z zestawem drenów (patrz Rysunek 7.26).

   Wykonać trzy hermetyczne zgrzewy w drenie bezpośrednio pod zaworem nr 9. Ostrożnie oddzielić środkowy zgrzew, aby odłączyć Cell Collection Bag od zestawu drenów.
3. Zważyć napełniony Cell Collection Bag. Zapisać wagę.

   Określić wagę frakcji komórek docelowych, odejmując wagę pustego worka Cell Collection Bag od wagi worka Cell Collection Bag zawierającego komórki docelowe. Zapisać wagę.
4. Dokładnie wymieszać zawiesinę komórek docelowych, obracając worek. Pobrać odpowiednią ilość, np. 0,5 mL, i zachować do analizy.
5. Zgrzewarką zgrzać dren powyżej złącza luer lock worka Buffer Waste Bag. Wykonać trzy hermetyczne zgrzewy w drenie. Oddzielić środkowy zgrzew, aby odłączyć worek Buffer Waste Bag.
6. Odłączyć Non-Target Cell Bag w ten sam sposób.



Rysunek 7.26: Odłączenie worków

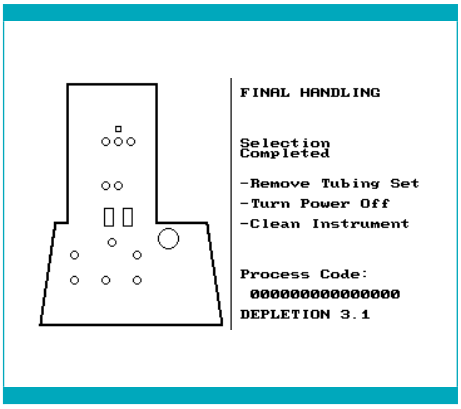
7. Usunąć worki Non-Target Cell Bag i Buffer Waste Bag. Przechowywać wszystkie worki do czasu przeprowadzenia końcowej analizy wszystkich komórek.

Komórki docelowe mogą być teraz przetwarzane zgodnie z protokołami klinicznymi.

Aby kontynuować, nacisnąć **ENT**.

Rozładowanie zestawu drenów i wyłączenie

Okno wyświetla Ekran 7.89.



Ekran 7.89: Rozładowanie zestawu drenów i wyłączenie

1. Usunąć zestaw drenów: Zaczynając od zaworów nr 6, 9 i 10 i idąc w górę, zwolnić dren z czujnika płynu i z zaworów, naciskając na zawory. Zwolnić kolumnę z uchwytu kolumny. Zestaw drenów należy zutylizować jako zagrożenie biologiczne, zgodnie ze standardowymi procedurami szpitalnymi.
2 Wyłączyć aparat CliniMACS Plus Instrument.
3. Oczyścić aparat zgodnie z instrukcją czyszczenia, patrz rozdział „Czyszczenie i dezynfekcja" w Podręczniku użytkownika CliniMACS Plus Instrument. Należy przestrzegać standardowych procedur postępowania z materiałem zakaźnym.

Analiza komórek

WAŻNE

- CliniMACS PBS/EDTA Buffer nie musi być usuwany przed podaniem oddzielonych komórek docelowych, jeśli objętość nie przekracza 100 mL na przeszczep przy odpowiedniej szybkości infuzji. Należy uwzględnić stan nerek pacjenta i wpływ na elektrolity we krwi. Szczególnie u dzieci należy odpowiednio dostosować szybkość infuzji.
- Jeśli objętość frakcji komórek docelowych przekracza 100 mL, należy ją zmniejszyć odpowiednimi sposobami, np. przez odwirowanie lub wymianę buforu, do roztworu do infuzji zatwierdzonego w kraju użytkownika.

⚠ PRZESTROGA

Ryzyko obniżenia jakości komórek docelowych. Komórki docelowe muszą być analizowane i potwierdzone, że spełniają wymagania użytkownika, w przeciwnym razie przydatność do zastosowania klinicznego może być zagrożona. Zbadać docelowe komórki pod kątem jakości i ilości zgodnie z ich zamierzonym wykorzystaniem.

Musi obejmować następujące parametry:

- całkowita liczba leukocytów
- żywotność i całkowita liczba komórek docelowych
- efektywność deplecji

Zaleca się również oznaczenie całkowitej liczby leukocytów i żywotności frakcji komórek innych niż docelowe. Lista jest przykładowa i należy uwzględnić inne testy w zależności od przeznaczenia i protokołów klinicznych. Zapisać dane z analizy.

8 Rozwiązywanie problemów

Niniejszy rozdział ma na celu dostarczenie informacji o możliwych niespodziewanych zdarzeniach, które mogą wystąpić, oraz zaproponowanie odpowiednich działań korygujących. W przypadku informacji, które nie są zawarte w poniższym rozdziale, należy jak najszybciej skontaktować się z działem Miltenyi Biotec Technical Support.

Wskazówka: Kolejność tego rozdziału jest zgodna z rzeczywistą sekwencją separacji.

8.1 Miltenyi Biotec Technical Support

W razie wadliwego działania aparatu lub niepowodzenia procesu, które nie mogą być usunięte przez operatora (komunikaty o błędach), należy skontaktować się z zespołem działu Miltenyi Biotec Technical Support:

+49 2204 8306 3803
technicalsupport@miltenyi.com

Informacje kontaktowe lokalnego działu Miltenyi Biotec Technical Support można znaleźć na stronie internetowej www.miltenyibiotec.com.

8.2 Przygotowanie produktu leukaferezy

- Otrzymana próbka jest rozcieńczona

  W idealnym przypadku znakowanie magnetyczne przeprowadza się w rozcieńczonym produkcie leukaferezy. Dostosować produkt leukaferezy do końcowego rozcieńczenia w proporcjach ok. 1:3. Jeśli otrzymana próbka jest bardziej rozcieńczona niż 1:3 lub jeśli operator nie zna dokładnie stężenia osocza w próbce, należy dodać do próbki immunoglobulinę przed dodaniem odczynnika (zalecane stężenie immunoglobuliny w objętości znakowania: 1,5 mg/mL). Ważne jest, aby podczas znakowania w próbce znajdowała się pewna ilość immunoglobuliny, aby zminimalizować nieswoiste wiązanie odczynnika.

- Liczba komórek docelowych jest niska w produkcie leukaferezy

  Mobilizacja komórek macierzystych była niewystarczająca. Sprawdzić analizę produktu leukaferezy.

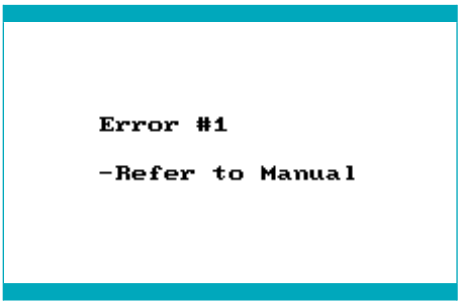
■ Słaba żywotność komórek w produkcie leukaferezy

Produkt leukaferezy mógł zostać pobrany, przechowywany lub transportowany w niewłaściwy sposób. W celu zapewnienia lepszej jakości próbki przygotowanie i separacja produktu leukaferezy powinny być wykonywane niezwłocznie po leukaferezie. Produkt leukaferezy należy przechowywać w stężeniu leukocytów mniejszym niż $0{,}2\times10^9$ na mL. W razie potrzeby należy rozcieńczyć produkt leukaferezy autologicznym osoczem. W momencie rozpoczęcia procedury znakowania i separacji produkt leukaferezy nie powinien być starszy niż 24 godziny. Jeśli produkt leukaferezy musi być przechowywany, np. przez noc, należy go przechowywać w kontrolowanej temperaturze pokojowej (od +19 °C do +25 °C [od +66 °F do +77 °F]).

8.3 CliniMACS Plus Instrument i zestawy przewodów CliniMACS

8.3.1 Komunikaty o błędach

Istnieje wiele możliwych usterek aparatu lub oprogramowania. Są one oznakowane jako takie i będą wskazane na ekranie. Odnoszą się one do błędów wewnętrznych, których operator nie może skorygować. Należy zapisać numer błędu i skontaktować się z działem Miltenyi Biotec Technical Support.



Ekran 8.1: Komunikat o błędzie nr 1

Na Ekran 8.1 pokazano jeden możliwy komunikat o błędzie.

Oprócz komunikatów o błędach, usterki, które mogą być usunięte przez operatora, są oznaczone jako „Komunikaty ostrzegawcze" (patrz rozdział 8.4.1).

8.3.2 Ładowanie i płukanie zestawu drenów

■ Zawór nie otwiera się, gdy operator otrzymuje polecenie włożenia drenu do konkretnego zaworu

Zawory są zaprojektowane do prawidłowego działania po wprowadzeniu drenów. Nacisnąć ręcznie zawór, aby go otworzyć. Podczas sekwencji ruchów zaworu należy uważnie obserwować zawór. Jeśli zawór nie wciska się podczas sekwencji ruchów zaworu, patrz rozdział „Zawór nie wciska się podczas sekwencji ruchów zaworu."

- Zawór nie wciska się podczas sekwencji ruchów zaworu

  Potwierdzić, że dren jest prawidłowo włożony. Sprawdzić, czy zawory zostały dokładnie wyczyszczone. Każdy zawór, który został zanieczyszczony płynem, musi zostać wymieniony. Skontaktować się z działem Miltenyi Biotec Technical Support.

- Bufor wycieka z drenów podczas płukania

  Zestaw drenów jest uszkodzony. Wyłączyć aparat CliniMACS Plus Instrument i ponownie rozpocząć płukanie z zainstalowanym nowym zestawem drenów i wystarczającą ilością nowego buforu.

- W zestawie drenów po płukaniu pojawia się nadmierna ilość powietrza

  Worek na bufor nie jest prawidłowo przebity. Użyć nowego zestawu drenów i wystarczającej ilości nowego buforu i ponownie uruchomić separację CliniMACS Plus. Potwierdzić, że przegroda worka na bufor jest prawidłowo przebita.

- Nieoczekiwana objętość buforu w workach po płukaniu. Po płukaniu płyn powinien znajdować się tylko w worku Priming Waste Bag i worku Buffer Waste Bag

  Zestaw drenów nie jest właściwie zamontowany. Płyn może wyciekać za zaworami, jeśli zestaw drenów nie jest prawidłowo zainstalowany lub zawory nie działają prawidłowo. Usunąć zestaw drenów i wymienić go na nowy. Uruchomić ponownie procedurę płukania z wystarczającą ilością nowego buforu. Jeśli zestaw drenów nie zostanie prawidłowo włożony, efektem może być słaba wydajność separacji CliniMACS Plus.

- Silnik pompy zatrzymuje się podczas płukania

  Dren pompy nie został prawidłowo włożony. Nacisnąć **STOP**, aby przerwać płukanie i wyłączyć zasilanie, a następnie ponownie włączyć. Zacisnąć linię buforu kleszczami blokującymi podczas procedury instalacji, skorygować położenie drenów pompy i usunąć kleszcze blokujące przed ponownym rozpoczęciem sekwencji płukania.

8.4 Automatyczna separacja komórek

8.4.1 Komunikaty ostrzegawcze

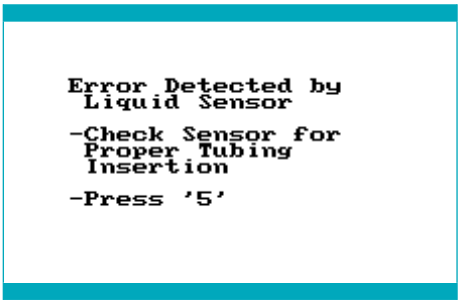
W odróżnieniu od komunikatów o błędach (patrz rozdział 8.3.1), komunikaty ostrzegawcze są wyświetlane na ekranie, gdy wewnętrzny system sterowania aparatu CliniMACS Plus Instrument rozpoznaje usterkę, która może zostać usunięta przez operatora. Zazwyczaj komunikat ostrzegawczy pojawia się w połączeniu z dźwiękiem (krótki sygnał dźwiękowy). Jeśli komunikat ostrzegawczy pojawia się podczas separacji CliniMACS Plus, należy postępować zgodnie z instrukcjami na ekranie, aby kontynuować separację komórek. Ogólnie można powiedzieć, że komunikaty ostrzegawcze pojawiają się po naciśnięciu **STOP**, po otwarciu drzwi pompy, po zatrzymaniu pompy lub po wykryciu błędu przez czujnik płynu.

Ponieważ podczas różnych programów separacji mogą wystąpić różne rodzaje niespodziewanych zdarzeń, poniższy rozdział został odpowiednio podzielony.

8.4.2 Niespodziewane zdarzenia: wszystkie programy separacji

- Błąd wykryty przez czujnik płynu

  Komunikat ostrzegawczy nr. 1 pojawi się w fazie początkowej procesu ładowania komórek, jeśli czujnik płynu nie jest w stanie wykryć płynu w drenach. Ponieważ filtr Pre-System Filter jest płukany buforem przed załadowaniem komórek, w tym miejscu w drenach musi być płyn.

  Rysunek 8.1: Komunikat ostrzegawczy nr 1

  Sprawdzić następujące punkty:

  1. Czy dren został prawidłowo włożony? Do czujnika płynu? Jeśli nie, zrobić to.
  2. Czy dren jest wypełniony buforem? Jeśli nie, patrz punkt 3.
  3. Jeśli dren nie jest wypełniony buforem, należy sprawdzić, czy dren nie jest zagięty i nie blokuje przepływu buforu w górę do filtra Pre-System Filter i Cell Preparation Bag. Wyregulować pozycję zestawu drenów. Jeśli to konieczne, podnieść lub obniżyć wieszaki na worki za pomocą zacisków do wieszaka na worek. Wyregulować pozycję drenów w zaworach. Aby zmienić położenie drenów, należy otworzyć zawór poprzez ręczne naciśnięcie przycisku. Potwierdzić, że dren nie jest zagięty, skręcony lub napięty.
  4. Czy worek Cell Preparation Bag jest prawidłowo przebity? Potwierdzić, że kolec filtra pre-system filter przebił się przez przegrodę portu Cell Preparation Bag.

5. Jeśli zestaw drenów nie został całkowicie wypełniony buforem: Czy spike buforu zestawu drenów przebił się do worka na bufor? Działanie korygujące, patrz „W zestawie drenów po płukaniu pojawia się nadmierna ilość powietrza" w rozdziale 8.3.2.

Po działaniu korygującym należy kontynuować trwającą separację i nacisnąć **5**. Jeśli komunikat ostrzegawczy nr 1 pojawia się ponownie po wykluczeniu każdej z wymienionych powyżej możliwych przyczyn, czujnik płynu może być uszkodzony. Skontaktować się z działem Miltenyi Biotec Technical Support.

Komórki przemieszczają się do niewłaściwej części zestawu drenów. Płyn wycieka przez zawór (zawory)

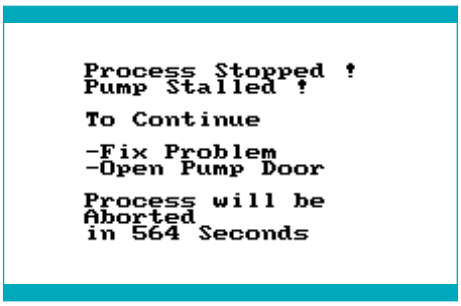
- Zestaw drenów nie został prawidłowo włożony. Jeśli trwa bieg aparatu, należy nacisnąć **STOP** i zacisnąć linię kleszczami blokującymi. Wyregulować dren, naciskając najpierw odpowiedni zawór. Usunąć kleszcze blokujące i nacisnąć **RUN**, aby kontynuować separację. Separacja komórek zostanie przerwana, jeśli w ciągu 600 sekund nie zostanie naciśnięty przycisk **RUN**.
- Zawór nie działa prawidłowo. Nacisnąć **STOP**. Zacisnąć linię kleszczami blokującymi. Kilkakrotnie nacisnąć ręcznie zawór, aby odkleić zakleszczony zawór. Usunąć kleszcze blokujące i nacisnąć **RUN**, aby kontynuować. Separacja komórek zostanie przerwana, jeśli w ciągu 600 sekund nie zostanie naciśnięty przycisk **RUN**. Jeśli użytkownik nie jest w stanie odkleić zaworu, należy skontaktować się z działem Miltenyi Biotec Technical Support.
- Użyto niewłaściwego programu oprogramowania. Sprawdzić na wyświetlaczu nazwę aktualnie używanego programu. Przerwać bieg poprzez naciśnięcie **STOP** i natychmiast skontaktować się z działem Miltenyi Biotec Technical Support.

Magnes nie porusza się

Napęd magnetyczny nie działa. Wystąpiła awaria napędu magnetycznego. Zostanie wyświetlony komunikat o błędzie (patrz rozdział 8.3.1). Należy zapisać numer komunikatu o błędzie i skontaktować się z działem Miltenyi Biotec Technical Support.

Silnik pompy zatrzymuje się podczas separacji komórek

Dren pompy nie został prawidłowo włożony, dlatego pompa nie może się obracać. W tym przypadku w oknie ekranu pojawi się komunikat ostrzegawczy nr 2. Operator ma wtedy 600 sekund na skorygowanie pozycji drenu pompy.



Ekran 8.2: Komunikat ostrzegawczy nr 2

1. Ostrożnie usunąć dren pompy z pompy.
2. Potwierdzić, że dren pompy nie został uszkodzony wskutek nieprawidłowego wprowadzenia. Jeśli dren pompy jest

nieszczelny, należy zacisnąć dren powyżej i poniżej kolumny separacyjnej, aby zachować komórki zatrzymane na kolumnie i skontaktować się z działem Miltenyi Biotec Technical Support.

3. Jeśli dren pompy nie został uszkodzony, można go ponownie włożyć do obudowy pompy.

4. Nacisnąć **RUN**, aby ponownie uruchomić separację w ciągu 600 sekund lub separacja zostanie przerwana.

Jeśli dren pompy jest płaski i zapadnięty, wskazuje to na zatkaną kolumnę. W takim przypadku należy skontaktować się z działem Miltenyi Biotec Technical Support.

■ Ładowanie próbki nie kończy się, mimo że Cell Preparation Bag i filtr pre-system filter są puste

Czujnik płynu nie działa prawidłowo, np. ponieważ powierzchnia drenów w czujniku płynu jest mokra. Nacisnąć **STOP**, aby przerwać separację. Wyjąć dren z czujnika płynu. Osuszyć dren i miejsce kontaktu ręcznikiem papierowym lub materiałem chłonnym. Umieścić dren w czujniku płynu i nacisnąć **RUN**. Nie przerywać sekwencji na dłużej niż 600 sekund, w przeciwnym razie separacja komórek zostanie przerwana.

Jeśli nie można w ten sposób aktywować czujnika płynu, należy nacisnąć **STOP**, następnie **2** i potwierdzić przyciskiem **ENT**, aby pominąć ładowanie próbki i kontynuować separację.

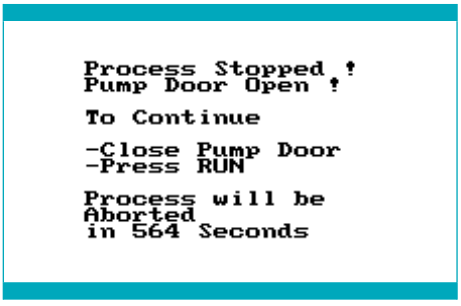
8.4.3 Niespodziewane zdarzenia: tylko programy wzbogacania

■ Bieg zostaje przerwany przed zakończeniem programu separacji komórek

- Otworzyły się drzwi pompy: Ze względów bezpieczeństwa trwająca separacja zostanie automatycznie zatrzymana po otwarciu drzwi pompy podczas pracy aparatu. W oknie ekranu pojawi się komunikat ostrzegawczy nr 5.

  Zamknąć drzwi pompy i nacisnąć **RUN**.

  Jeśli, tak jak w tym przypadku, w ciągu 600 sekund nie zostanie naciśnięty przycisk **RUN**, separacja zostanie przerwana i separacja komórek nie zostanie zakończona. Odzyskać jak najwięcej próbki z zestawu drenów, uruchamiając PROGRAM AWARYJNY.



Ekran 8.3: Komunikat ostrzegawczy nr 5

- Awaria zasilania: Awaria zasilania powoduje zakończenie separacji CliniMACS Plus. Po przywróceniu zasilania separacja komórek nie zostanie zakończona. Odzyskać jak najwięcej próbki z zestawu drenów, uruchamiając PROGRAM AWARYJNY.

8.4.4 Niespodziewane zdarzenia: CD34 SELECTION 1/2

■ Ładowanie zatrzymane przed załadowaniem całej próbki na kolumny

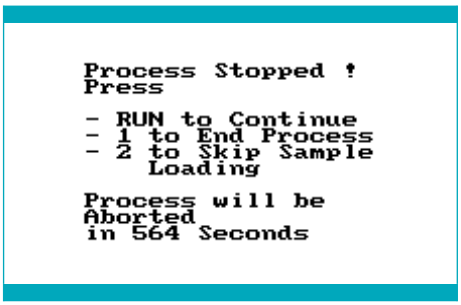
Filtr pre-system filter jest zatkany z powodu dużej ilości resztek komórek lub z powodu niepełnego napełnienia filtra. Wskutek ciągłego pompowania wytworzyła się próżnia, która doprowadziła do powstania pęcherzyków powietrza aktywujących czujnik płynu. Z tego powodu proces separacji był kontynuowany z przemywaniem kolumny, zanim cała próbka mogła zostać załadowana. Nie jest możliwe ponowne rozpoczęcie ładowania próbki po zatrzymaniu sekwencji ładowania.

Poczekać, aż aparat CliniMACS Plus Instrument zakończy program separacji. Nie należy przerywać bieżącego biegu, może to spowodować niepotrzebną utratę komórek. Po zakończeniu procedury separacji przefiltrować pozostałą próbkę za pomocą liniowego filtra 200 µm do krwi i przenieść ją do nowego worka transferowego. Natychmiast przeprowadzić drugą separację przy użyciu nowego zestawu drenów i wystarczającej ilości nowego buforu.

■ Zapadnięcie się drenu pompy i/lub pojawienie się nadmiernej ilości powietrza w zestawie drenów poniżej kolumny wstępnej podczas ładowania komórek

Kolumna wstępna jest zatkana z powodu dużej ilości resztek komórek w Cell Preparation Bag. Konieczne jest ręczne pominięcie załadowania pozostałej próbki i kontynuowanie separacji z komórkami, które zostały już załadowane do systemu.

1. Nacisnąć **STOP**, aby przerwać ładowanie komórek. Pojawi się komunikat ostrzegawczy nr 3.



Ekran 8.4: Komunikat ostrzegawczy nr 3

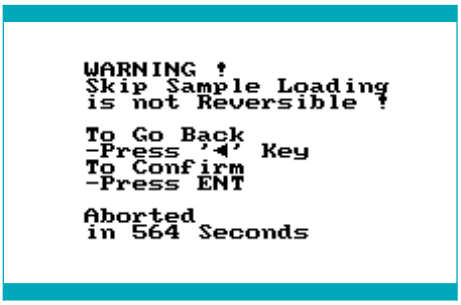
2. Nacisnąć **2**, aby pominąć proces ładowania komórek.

   Pojawi się komunikat ostrzegawczy nr 4, który da operatorowi możliwość potwierdzenia lub zmiany decyzji, ponieważ pominięcie ładowania próbki nie jest odwracalne.

3. Nacisnąć **ENT** i program separacji przerwie ładowanie próbki i będzie kontynuował przemywanie kolumny.

Zacisnąć dren poniżej filtra pre-system filter, aby zapobiec wydostaniu się komórek z worka Cell Preparation Bag do zestawu drenów. Po zakończeniu procedury separacji przefiltrować pozostałą próbkę za pomocą liniowego filtra 200 µm do krwi i przenieść ją do nowego worka transferowego.

Natychmiast przeprowadzić drugą separację przy użyciu nowego zestawu drenów i wystarczającej ilości nowego buforu.



Ekran 8.5: Komunikat ostrzegawczy nr 4

8.4.5 Niespodziewane zdarzenia: ENRICHMENT 1.1

- Ładowanie zatrzymane przed załadowaniem całej próbki na kolumny

  Filtr pre-system filter jest zatkany z powodu dużej ilości resztek komórek lub z powodu niepełnego napełnienia filtra. Wskutek ciągłego pompowania wytworzyła się próżnia, która doprowadziła do powstania pęcherzyków powietrza. To spowodowało aktywację czujnika płynu i proces separacji był kontynuowany bezpośrednio z końcowym etapem ładowania próbki. Po zakończeniu separacji część próbki może pozostać w worku Cell Preparation Bag.

  Poczekać, aż aparat CliniMACS Plus Instrument zakończy program separacji. Nie należy przerywać bieżącego biegu, może to spowodować niepotrzebną utratę komórek.

  Oznaczyć całkowitą liczbę komórek, odsetek komórek docelowych oraz pozostałą objętość próbki w Cell Preparation Bag i wprowadzić rzeczywiste parametry próbki podczas konfiguracji aparatu (KROK 2). Po zakończeniu procedury separacji przefiltrować pozostałą próbkę za pomocą liniowego filtra 200 µm do krwi i przenieść ją do nowego worka transferowego. Natychmiast przeprowadzić drugą separację przy użyciu nowego zestawu drenów i wystarczającej ilości nowego buforu.

- Wprowadzono błędne wartości parametrów próbki

  Wprowadzona objętość ładowania próbki była niższa niż rzeczywista objętość w podłączonym worku Cell Preparation Bag. Nie jest możliwe ponowne rozpoczęcie ładowania próbki po jego zatrzymaniu.

  Poczekać, aż aparat CliniMACS Plus Instrument zakończy program separacji. Nie należy przerywać bieżącego biegu, może to spowodować niepotrzebną utratę komórek.

  Oznaczyć całkowitą liczbę komórek, odsetek komórek docelowych oraz pozostałą objętość próbki w Cell Preparation Bag i wprowadzić rzeczywiste parametry próbki podczas konfiguracji aparatu (KROK 2). Pozostałą próbkę przetworzyć za pomocą nowego zestawu drenów, nowego filtra pre-system filter i wystarczającej ilości nowego buforu.

- Silnik pompy zatrzymuje się podczas elucji komórek docelowych do Cell Collection Bag

  Kleszcze blokujące obok Cell Collection Bag nie są otwarte podczas sekwencji elucji. Z tego powodu droga do Cell Collection Bag jest zablokowana.

  Nacisnąć **STOP** i otworzyć kleszcze blokujące obok Cell Collection Bag. Otworzyć drzwi pompy i sprawdzić, czy dren pompy jest prawidłowo włożony. Zamknąć drzwi pompy i nacisnąć przycisk **RUN**, aby ponownie uruchomić sekwencję elucji w ciągu 600 sekund.

8.4.6 Niespodziewane zdarzenia: ENRICHMENT 3.2

- Ładowanie zatrzymane przed załadowaniem całej próbki na kolumny

  Filtr pre-system filter jest zatkany z powodu dużej ilości resztek komórek lub z powodu niepełnego napełnienia filtra. Wskutek ciągłego pompowania wytworzyła się próżnia, która doprowadziła do powstania pęcherzyków powietrza. To spowodowało aktywację czujnika płynu i proces separacji był kontynuowany z przemywaniem kolumny, zanim cała próbka została załadowana. Nie jest możliwe ponowne rozpoczęcie ładowania próbki po zatrzymaniu sekwencji ładowania.

  Poczekać, aż aparat CliniMACS Plus Instrument zakończy program separacji. Nie należy przerywać bieżącego biegu, może to spowodować niepotrzebną utratę komórek.

  Po zakończeniu procedury separacji przefiltrować pozostałą próbkę za pomocą liniowego filtra 200 µm do krwi i przenieść ją do nowego worka transferowego. Natychmiast przeprowadzić drugą separację przy użyciu nowego zestawu drenów i wystarczającej ilości nowego buforu.

- Silnik pompy zatrzymuje się podczas elucji komórek docelowych do Cell Collection Bag

  Kleszcze blokujące obok Cell Collection Bag nie są otwarte podczas sekwencji elucji. Z tego powodu droga do Cell Collection Bag jest zablokowana.

  Nacisnąć **STOP** i otworzyć kleszcze blokujące obok Cell Collection Bag. Otworzyć drzwi pompy i sprawdzić, czy dren pompy jest prawidłowo włożony. Zamknąć drzwi pompy i nacisnąć przycisk **RUN**, aby ponownie uruchomić sekwencję elucji w ciągu 600 sekund.

8.4.7 Program awaryjny (do stosowania tylko z programami wzbogacania)

Jeśli z jakiegoś powodu bieg został nieodwracalnie zakończony przed wymyciem komórek docelowych z kolumny separacyjnej, można uruchomić program awaryjny w celu wymycia komórek z kolumny separacyjnej. Ten program został opracowany wyłącznie do stosowania ze wszystkimi programami wzbogacania wraz z zestawem CliniMACS Tubing Set (REF 161-01) lub CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01).

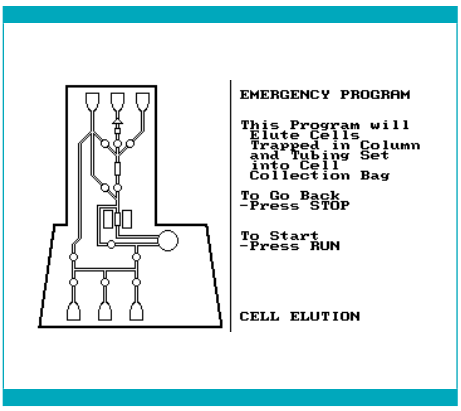
Programu awaryjnego nie można stosować z żadnymi programami deplecji.

Wskazówka: Program awaryjny wymyje około 75 mL płynu. Potwierdzić, że do zestawu drenów dołączony jest odpowiedni worek Cell Collection Bag.

1. Aby potwierdzić, że kolumna separacyjna nie jest namagnesowana, należy wyłączyć aparat, odczekać 5 sekund, a następnie ponownie włączyć aparat. Magnes zostanie wycofany z jednostki separacji magnetycznej (patrz rozdział „Opis" w Podręczniku użytkownika CliniMACS Plus Instrument). Sprawdzić to, przykładając mały przedmiot nadający się do namagnesowania do jednostki separacji magnetycznej. Jeśli magnes nie został wycofany lub trwa awaria zasilania, należy skontaktować się z działem Miltenyi Biotec Technical Support.
2. Poczekać, aż w oknie pojawi się ekran główny (patrz rozdział „Instalacja" w Podręcznik użytkownika CliniMACS Plus Instrument).

   Aby wywołać program awaryjny, nacisnąć **4**. Okno wyświetla Ekran 8.6.
3. Aby kontynuować elucję uwięzionych komórek, nacisnąć **RUN**.

   Wskazówka: Aby wyjść z programu awaryjnego bez rozpoczęcia elucji uwięzionych komórek, należy nacisnąć **STOP**.



Ekran 8.6: Program awaryjny

4. Przenieść wymyte komórki zebrane w worku Cell Collection Bag do nowego worka transferowego o pojemności 600 mL. Na koniec połączyć pozostałe komórki w Cell Preparation Bag z komórkami wymytymi przez program awaryjny. Rozpocząć nową procedurę separacji przy użyciu nowego zestawu drenów i wystarczającej ilości nowego buforu.

8.4.8 Niespodziewane zdarzenia: DEPLETION 2.1

Komórki docelowe nie docierają do Cell Collection Bag

Pompa nie może załadować produktu z Cell Preparation Bag, ponieważ zacisk obok Cell Collection Bag nie jest otwarty podczas sekwencji ładowania komórek. Nacisnąć **STOP** i otworzyć zacisk obok Cell Collection Bag. Kontynuować proces deplecji przez naciśnięcie **RUN**.

Poczekać, aż aparat CliniMACS Plus Instrument zakończy program separacji. Nie należy przerywać bieżącego biegu, może to spowodować niepotrzebną utratę komórek. Jeśli część produktu pozostaje w Cell Preparation Bag po zakończeniu procedury deplecji, należy przetworzyć pozostałe komórki za pomocą nowego zestawu drenów, nowego filtra pre-system filter i wystarczającej ilości nowego buforu.

Oznaczyć całkowitą liczbę komórek, odsetek komórek znakowanych oraz objętość ładowania próbki i wprowadzić rzeczywiste parametry próbki podczas konfiguracji aparatu (KROK 2). Rozpocząć nową deplecję.

Ładowanie zatrzymane przed załadowaniem całej próbki na kolumny

Pęcherzyki powietrza z próbki i/lub filtra pre-system filter aktywowały czujnik płynu, zanim cała próbka została załadowana. Przerwać bieżący bieg i sprawdzić całkowitą liczbę komórek i efektywność deplecji komórek w worku Cell Collection Bag. W razie potrzeby przetworzyć pozostałą próbkę za pomocą nowego zestawu drenów, nowego filtra pre-system filter i wystarczającej ilości nowego buforu.

Oznaczyć całkowitą liczbę komórek, odsetek komórek znakowanych oraz objętość ładowania próbki i wprowadzić rzeczywiste parametry próbki podczas konfiguracji aparatu (KROK 2). Rozpocząć nową deplecję.

8.4.9 Niespodziewane zdarzenia: DEPLETION 3.1

Ładowanie zatrzymane podczas Staged Cell Loading, przed załadowaniem całej próbki na kolumny

- Filtr pre-system filter włożony odwrotnie. Z tego powodu nie jest dostępna funkcja komory ociekowej i pęcherzyki powietrza mogą przechodzić bezpośrednio przez czujnik płynu, powodując zakończenie ładowania próbki przed nałożeniem całej próbki. Aparat kontynuuje proces deplecji, rozpoczynając bezpośrednio kolejny krok. Nie jest możliwe ponowne rozpoczęcie ładowania próbki po jego zatrzymaniu.

- Filtr pre-system filter jest zatkany z powodu dużej ilości resztek komórek lub z powodu niepełnego napełnienia filtra. Wskutek ciągłego pompowania wytworzyła się próżnia, która doprowadziła do powstania pęcherzyków powietrza. To spowodowało aktywację czujnika płynu i proces separacji był kontynuowany bezpośrednio z końcowym etapem ładowania próbki. Po zakończeniu separacji część próbki może pozostać w worku Cell Preparation Bag.

Przerwać bieżący bieg i zebrać zawartość worka Reapplication Bag i worka Cell Preparation Bag. Pozostałe komórki przetworzyć za pomocą nowego zestawu drenów, nowego filtra pre-system filter i wystarczającej ilości nowego buforu.

Ładowanie zatrzymane podczas Sensitive Sample Loading (Sensitive Loading Stage)

Worek Reapplication Bag jest zawieszony niżej niż Cell Preparation Bag. Podczas kroku ładowania wrażliwego Cell Preparation Bag opróżnia się, zanim objętość Reapplication Bag zostanie całkowicie załadowana. Z tego powodu możliwe jest, że pęcherzyk powietrza aktywuje czujnik płynu, zanim próbka zostanie całkowicie załadowana z worka Reapplication Bag po zakończeniu procedury deplecji. Nie jest możliwe ponowne rozpoczęcie ładowania próbki po jego zatrzymaniu.

Poczekać, aż aparat CliniMACS Plus Instrument zakończy program separacji. Nie należy przerywać bieżącego biegu, może to spowodować niepotrzebną utratę komórek. Pozostałą próbkę przetworzyć za pomocą nowego zestawu drenów, filtra pre-system filter i wystarczającej ilości nowego buforu.

Oznaczyć całkowitą liczbę komórek, odsetek komórek znakowanych oraz objętość ładowania próbki i wprowadzić rzeczywiste parametry próbki podczas konfiguracji aparatu (KROK 2). Należy uwzględnić obowiązkowe zapotrzebowanie na trzy duże wieszaki na worek dla programu DEPLETION 3.1 i zapoznać się z instrukcją montażu dla odpowiednich wysokości worków (patrz rozdział 7.3.3).

Komórki docelowe (komórki nieoznakowane) nie docierają do worka Reapplication Bag podczas masowego ładowania Staged Cell Loading (Loading Stage)

Do zaworu nr 3 włożono niewłaściwy dren (prawe odgałęzienie drenu worka Reapplication Bag zamiast lewego odgałęzienia drenu (trójnik)). Nacisnąć **STOP** i usunąć niewłaściwy dren z zaworu nr 3. Ręcznie włożyć właściwy dren (lewe odgałęzienie drenu worka Reapplication Bag) do zaworu nr 3 w sposób opisany w instrukcji montażu. Nacisnąć **RUN**, aby kontynuować procedurę deplecji w ciągu 600 sekund.

Poczekać, aż aparat CliniMACS Plus Instrument zakończy program separacji. Nie należy przerywać bieżącego biegu, może to spowodować niepotrzebną utratę komórek. Sprawdzić efektywność deplecji frakcji docelowej w Cell Collection Bag. Jeśli efektywność deplecji nie jest wystarczająca, powtórzyć procedurę deplecji za pomocą nowego zestawu drenów, nowego filtra pre-system filter i wystarczającej ilości nowego buforu.

Oznaczyć całkowitą liczbę komórek, odsetek komórek znakowanych oraz objętość ładowania próbki i wprowadzić rzeczywiste wartości parametrów próbki podczas konfiguracji aparatu (KROK 2). Rozpocząć nową deplecję.

Przepływ komórek do worka na bufor podczas etapów płukania grawimetrycznego

Worek na bufor jest zawieszony zbyt nisko (niżej niż Cell Preparation Bag). Nacisnąć **STOP** i ustawić wieszak na worek na bufor w prawidłowej pozycji. Potwierdzić, że trzy duże wieszaki na worek są zainstalowane dla programu DEPLETION 3.1 i zapoznać się z instrukcją montażu dla odpowiednich wysokości worków (patrz rozdział 7.3.3).

- Jeśli komórki nie dotarły do worka na bufor, wystarczy ręcznie otworzyć zawory nr 1 i 2, aby umożliwić krótkie przepłukanie zwrotne komórek do worka Cell Preparation Bag. Gdy dren worka na bufor będzie znów czysty, zamknąć zawory nr 1i 2 i nacisnąć **RUN**, aby kontynuować procedurę deplecji w ciągu 600 sekund.
- Jeśli komórki dotarły już do worka na bufor, wymienić worek na bufor, otworzyć ręcznie zawory nr 1i 2 w celu krótkiego przepłukania drenu worka na bufor oraz nacisnąć **RUN**, aby kontynuować procedurę deplecji w ciągu 600 sekund. W razie potrzeby przetworzyć pozostałą próbkę w worku na bufor (jeśli objętość przekracza 300 mL, najpierw przenieść próbkę do nadającego się do wirowania worka w celu zmniejszenia objętości), używając nowego zestawu drenów, nowego filtra pre-system filter i wystarczającej ilości nowego buforu.

Silnik pompy zatrzymuje się podczas pierwszej elucji komórek docelowych do Non-Target Cell Bag

- Kleszcze blokujące nie zostały usunięte po teście integralności. Nacisnąć **STOP** i usunąć kleszcze blokujące. Otworzyć drzwi pompy i sprawdzić, czy dren pompy jest prawidłowo włożony. Zamknąć drzwi pompy i nacisnąć przycisk **RUN**, aby ponownie uruchomić sekwencję elucji w ciągu 600 sekund.
- Do zaworu nr 3 włożono niewłaściwy dren (dren Non-Target Cell Bag zamiast lewego odgałęzienia (trójnik) drenu Reapplication Bag). Nacisnąć **STOP** i usunąć dren worka Non-Target Cell Bag z zaworu nr 3. Ręcznie włożyć właściwy dren (lewe odgałęzienie drenu worka Reapplication Bag) do zaworu nr 3 w sposób opisany w instrukcji montażu. Nacisnąć przycisk **RUN**, aby ponownie uruchomić sekwencję elucji w ciągu 600 sekund.

8.5 Wydajność separacji komórek

8.5.1 Niespodziewane zdarzenia: tylko programy wzbogacania

■ Uzysk komórek docelowych jest mały

- Komórki docelowe były słabo znakowane odczynnikiem:
  - Upłynął termin ważności odczynnika. Sprawdzić termin ważności. Nie stosować odczynników po upływie terminu ważności.
  - Odczynnik nie był prawidłowo przechowywany. Sprawdzić temperaturę przechowywania. Nie używać odczynnika, który był przechowywany w niewłaściwy sposób (patrz instrukcja używania odczynnika).
  - Nie przestrzegano zalecanej procedury znakowania. Należy zapoznać się z rozdziałami dotyczącymi przygotowania próbki i procedury separacji w podręczniku użytkownika.
- Komórki zostały utracone podczas kroków przygotowania.
  - Komórki zostały usunięte wraz z supernatantem do worka Plasma Waste Bag i Wash Waste Bag z powodu niepełnej sedymentacji lub zbyt wczesnego ponownego zawieszenia komórek, np. po wyjęciu worka z wirówki. Porównać zawartość leukocytów w produkcie komórek nieznakowanych i produkcie komórek znakowanych. Sprawdzić ustawienia wirówki pod kątem prawidłowego wirowania. Oznaczyć liczbę komórek ze wszystkich worków na odpady.
  - Bufor nie zawierał HSA. Uzupełnić bufor o HSA do końcowego stężenia 0,5% (wag./obj.), (patrz rozdział „Wymagane materiały CliniMACS" odpowiedniej aplikacji).
  - Ustawienia wirówki nie były optymalne. Sprawdzić ustawienia wirówki.
  - Niewyważenie wirówki lub użycie hamulca lub asymetryczne załadowanie wirówki.
- Analiza była nieprawidłowa.
  - Wystąpił błąd próbkowania. Sprawdzić, czy w zawiesinie komórek nie ma zbitych lub osiadłych komórek. Potwierdzić, że pobrano reprezentatywne próbki i powtórzyć analizę.
  - Wystąpił błąd barwienia. Sprawdzić odczynniki cytometrii przepływowej. Powtórzyć barwienie.
  - Ustawienia cytometru przepływowego były niewłaściwe. Sprawdzić ustawienia aparatu.

Czystość komórek docelowych jest niska.

- Produkt komórkowy był przechowywany w niewłaściwy sposób. Przygotowanie i separacja produktu komórkowego powinny być wykonywane niezwłocznie po leukaferezie. Produkt komórkowy przechowywać w stężeniu leukocytów mniejszym niż $0{,}2\times10^9$ na mL. W razie potrzeby należy rozcieńczyć produkt komórkowy autologicznym osoczem. W momencie rozpoczęcia procedury znakowania i separacji produkt komórkowy nie powinien być starszy niż 24 godziny. Jeśli produkt komórkowy musi być przechowywany, np. przez noc, należy go przechowywać w kontrolowanej temperaturze pokojowej (+19 °C do +25 °C [+66 °F do +77 °F]).
- Nie przestrzegano protokołu znakowania magnetycznego (np. nieprawidłowe objętości podczas znakowania magnetycznego). Należy postępować zgodnie z instrukcjami podanymi dla znakowania magnetycznego (patrz KROK 1 w rozdziale dotyczącym danego zastosowania). W celu rozwiązania problemów należy oznaczyć subpopulacje leukocytów (limfocyty B, limfocyty T, monocyty, granulocyty oraz płytki krwi) zanieczyszczające frakcję komórek docelowych i skontaktować się z działem Miltenyi Biotec Technical Support w celu uzyskania porady.
- Duża liczba granulocytów zanieczyściła produkt początkowy (suboptymalne ustawienie aferezy). Umierające granulocyty będą wtedy wiązać odczynnik CliniMACS nieswoiście, co może prowadzić do zmniejszenia czystości komórek docelowych.
- Wystąpiła usterka zaworu. Wymyta frakcja komórek docelowych została zanieczyszczona częścią frakcji innej niż docelowa lub frakcją odpadów z buforu. Sprawdzić rozmieszczenie drenów w zaworach, aby zapewnić ich prawidłowe działanie. Ocenić zawartość komórek docelowych we frakcji komórek innych niż docelowe i w odpadach z buforu. W razie potrzeby połączyć frakcję komórek docelowych i innych niż docelowe, zredukować do odpowiedniej objętości i powtórzyć separację z nowym zestawem drenów i wystarczającą ilością nowego buforu.

■ Nieswoiste zatrzymanie martwych komórek w produkcie komórkowym lub wysokie nieswoiste straty komórek w trakcie procedury

- Bufor nie zawiera HSA. Uzupełnić bufor o HSA do końcowego stężenia 0,5% (wag./obj.), (patrz rozdział „Wymagane materiały CliniMACS" odpowiedniej aplikacji).
- Produkt komórkowy mógł być przechowywany w niewłaściwy sposób. Przygotowanie i separacja produktu komórkowego powinny być wykonywane niezwłocznie po leukaferezie. Produkt komórkowy przechowywać w stężeniu leukocytów mniejszym niż $0{,}2\times10^9$ na mL. W razie potrzeby należy rozcieńczyć leukaferezę autologicznym osoczem. W momencie rozpoczęcia procedury znakowania i separacji produkt komórkowy nie powinien być starszy niż 24 godziny. Jeśli produkt komórkowy musi być przechowywany, np. przez noc, należy go przechowywać w kontrolowanej temperaturze pokojowej (+19 °C do +25 °C [+66 °F do +77°F]).
- Niepełne załadowanie próbki z powodu zatkania kolumny separacyjnej, filtra pre-system filter lub kolumny wstępnej. Sprawdzić całkowitą liczbę komórek i efektywność deplecji pozostałych komórek.

8.5.2 Niespodziewane zdarzenia: CD34 SELECTION 1/2 i ENRICHMENT 1.1

■ Czystość komórek docelowych jest niska

Elucja z kolumny separacyjnej była niepełna.

- Program separacji został przerwany. Sprawdzić na ekranie komunikat o błędzie. Przejść do rozdziału „Bieg zostaje przerwany przed zakończeniem programu separacji komórek" (patrz rozdział 8.4.3 na stronie 220).
- Wystąpiła awaria pompy lub zaworu. Odzyskać komórki z zestawu drenów zgodnie z programem awaryjnym opisanym w rozdziale 8.4.7. Sprawdzić objętości wszystkich frakcji. Ocenić zawartość komórek docelowych w worku Buffer Waste Bag i worku Negative Fraction Bag.
- Zablokowany dren do worka Cell Collection Bag. Sprawdzić zestaw drenów pod kątem zamkniętych zacisków, okluzji lub zagięć.
- Przekroczono wydajność odczynnika i/lub zestawu drenów. Patrz limit wydajności odpowiedniego zastosowania.
- Dren nie został prawidłowo włożony. Sprawdzić wszystkie zawory pod kątem prawidłowego wprowadzenia drenów.

8.5.3 Niespodziewane zdarzenia: CD34 SELECTION 1/2

Czystość komórek docelowych jest niska

Komórki inne niż docelowe zostały zatrzymane.

- Mobilizacja komórek docelowych była słaba. Wystąpiła bardzo mała liczba komórek docelowych. Z tego powodu mała liczba zanieczyszczających komórek innych niż docelowe (np. granulocyty, monocyty, płytki krwi) może prowadzić do zmniejszenia czystości.
- Podczas znakowania magnetycznego obecna była niewystarczająca ilość osocza lub immunoglobulin. Należy postępować zgodnie z instrukcjami podanymi dla znakowania magnetycznego (patrz KROK 1 danego zastosowania).

  Jeśli nie można zagwarantować końcowego stężenia około 30% autologicznego osocza w próbce podczas znakowania magnetycznego, należy dodać do próbki immunoglobulinę. Końcowe stężenie 1,5 mg/mL jest zalecane dla skutecznego blokowania nieswoistego wiązania odczynników podczas znakowania magnetycznego.

8.5.4 Niespodziewane zdarzenia: ENRICHMENT 1.1

Uzysk komórek docelowych jest mały

Wprowadzenie nieprawidłowych parametrów próbki. Sprawdzić krzyżowo wprowadzone parametry z wynikami analizy.

8.5.5 Niespodziewane zdarzenia: DEPLETION 2.1 i DEPLETION 3.1

Efektywność deplecji jest niska

Jeśli efektywność deplecji jest niewystarczająca, należy przetworzyć pozostałą próbkę za pomocą nowego zestawu drenów i wystarczającej ilości nowego buforu. Należy rozważyć nowe znakowanie komórek przeznaczonych do deplecji. Oznaczyć liczbę komórek i odsetek komórek do deplecji i wprowadzić rzeczywiste parametry próbki podczas konfiguracji aparatu (KROK 2). Jeśli pojawią się widoczne zbitki, pomocne może być przefiltrowanie komórek przed kolejnym biegiem. Należy uwzględnić, że komórki mogą zostać utracone z powodu zbicia i dodatkowej filtracji.

- Przekroczono wydajność odczynnika i/lub zestawu drenów. Patrz limit wydajności odpowiedniego zastosowania.
- Nieprawidłowe oznaczenie komórek, które mają być znakowane odczynnikiem.

- Wprowadzenie nieprawidłowych parametrów próbki. Sprawdzić krzyżowo wprowadzone parametry z wynikami analizy.
- Zmniejszona żywotność komórek. Martwe komórki mogą wiązać się nieswoiście z kolumną separacyjną, zmniejszając w ten sposób wydajność znakowania kolumny, co może potencjalnie prowadzić do niższej skuteczności deplecji. Zapewnić lepszą jakość produktu komórkowego i przetwarzać jak najświeższy produkt. Nie należy stosować przechowywanych produktów, które są starsze niż 24 godziny. Jeśli konieczne jest przechowywanie, produkt należy przechowywać w temperaturze pokojowej (od +19 °C do +25 °C [od +66°F do +77 °F]). Stężenie komórek nie powinno przekraczać $0{,}2\times10^{9}$/mL. W razie potrzeby rozcieńczyć produkt komórkowy autologicznym osoczem, aby uzyskać optymalne stężenie komórek.

9 Informacje prawne

9.5.1 Ograniczona gwarancja

O ile nie określono inaczej w specjalnym oświadczeniu gwarancyjnym, które może być dołączone do danego produktu, lub o ile nie uzgodniono inaczej na piśmie przez należycie upoważnionego przedstawiciela firmy Miltenyi Biotec, gwarancja firmy Miltenyi Biotec na produkty zakupione bezpośrednio od firmy Miltenyi Biotec podlega warunkom sprzedaży, na jakich została udzielona użytkownikowi przez odpowiednią organizację sprzedaży firmy Miltenyi Biotec. Obowiązujące warunki sprzedaży mogą się różnić w zależności od kraju i regionu. Te warunki są dostępne na życzenie lub na stronie internetowej www.miltenyibiotec.com. Żaden z zapisów niniejszego dokumentu nie powinien być interpretowany jako dodatkowa gwarancja.

W przypadku produktów zakupionych od zewnętrznych sprzedawców detalicznych lub odsprzedawców (np. zakupionych od autoryzowanego lokalnego serwisu firmy Miltenyi Biotec) mogą obowiązywać inne warunki.

W celu ustalenia gwarancji udzielonej na produkt należy sprawdzić kartę pakowania, fakturę, paragon lub inną dokumentację sprzedaży. Niektóre komponenty zakupionej kombinacji produktów mogą być objęte krótszą gwarancją niż ta, która jest wymieniona na karcie pakowania, fakturze, paragonie lub innym dokumencie sprzedaży (np. towary podlegające okresowi trwałości lub wychodzące z użycia).

Gwarancja firmy Miltenyi Biotec na ten produkt obejmuje wyłącznie problemy spowodowane wadami materiałowymi lub produkcyjnymi podczas normalnego użytkowania. Nie obejmuje ona problemów z produktem spowodowanych innymi przyczynami, w tym między innymi problemów z produktem wynikających z użytkowania produktu w sposób inny niż wyraźnie opisany w niniejszym podręczniku, na przykład: nieodpowiednie lub nieprawidłowe użytkowanie; nieprawidłowy montaż lub instalacja przez operatora lub osobę trzecią; uzasadnione zużycie; niedbała lub nieprawidłowa obsługa, obchodzenie się, przechowywanie, serwisowanie lub konserwacja; nieprzestrzeganie instrukcji obsługi; nieautoryzowana modyfikacja lub zmiana jakiejkolwiek części tego produktu lub użycie nieodpowiednich materiałów eksploatacyjnych, akcesoriów lub materiałów roboczych.

Gwarancja firmy Miltenyi Biotec nie obejmuje produktów sprzedawanych W STANIE W JAKIM SĄ lub ZE WSZYSTKIMI WADAMI oraz materiałów eksploatacyjnych. Żaden z zapisów niniejszego dokumentu nie powinien być interpretowany jako dodatkowa gwarancja.

Należy niezwłocznie poinformować firmę Miltenyi Biotec, jeśli w ramach takiej gwarancji zostanie zgłoszone roszczenie. Jeśli w okresie obowiązywania gwarancji wystąpi wada materiałowa lub produkcyjna, firma Miltenyi Biotec podejmie odpowiednie kroki, aby przywrócić pełną użyteczność urządzenia.

Ograniczenie odszkodowania. Firma Miltenyi Biotec nie ponosi odpowiedzialności za jakiekolwiek szkody dodatkowe lub następcze z tytułu naruszenia jakichkolwiek wyraźnych lub dorozumianych gwarancji lub warunków dotyczących tego produktu.

Niektóre kraje/stany nie zezwalają na wyłączenie lub ograniczenie szkód dodatkowych lub następczych, tak że powyższe wyłączenia lub ograniczenia mogą nie mieć zastosowania do użytkownika. Niniejsze oświadczenie gwarancyjne daje użytkownikowi określone prawa, a użytkownikowi mogą przysługiwać inne prawa, które różnią się w zależności od stanu lub jurysdykcji.

9.5.2 Znaki towarowe

CliniMACS, MACS, MACSmix, logo Miltenyi Biotec i MiniMACS są zarejestrowanymi znakami towarowymi firmy Miltenyi Biotec i (lub) jej podmiotów zależnych w różnych krajach na całym świecie. Wszystkie inne znaki towarowe wymienione w tym dokumencie są własnością ich odpowiednich właścicieli i zostały użyte wyłącznie do celów identyfikacyjnych.

Miltenyi Biotec

Niemcy/Austria
Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG
Friedrich-Ebert-Straße 68
51429 Bergisch Gladbach
Niemcy
+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

Australia
Miltenyi Biotec
Australia Pty. Ltd.
Unit 11, 2 Eden Park Drive
Macquarie Park NSW 2113
Australia
+61 2 8877 7400
+61 2 9889 5044
macsau@miltenyi.com

Beneluks
Miltenyi Biotec B.V.
Dellaertweg 9C
2316 WZ Leiden
Holandia
macsnl@miltenyi.com
Biuro obsługi klienta - Holandia
0800 4020120
0800 4020100
Biuro obsługi klienta - Belgia
0800 94016
0800 99626
Biuro obsługi klienta - Luksemburg
800 24971
800 24984

Chiny
Miltenyi Biotec Technology & Trading (Shanghai) Co., Ltd.
Room A401, 4/F
No. 1077, Zhangheng Road
Pudong New Area
201203 Szanghaj
Chińska Republika Ludowa
+86 21 6235 1005
+86 21 6235 0953
macscn@miltenyi.com.cn

Francja
Miltenyi Biotec SAS
10 rue Mercoeur
75011 Paryż
Francja
+33 1 56 98 16 16
macsfr@miltenyi.com

Hiszpania
Miltenyi Biotec S.L.
C/Luis Buñuel 2
Ciudad de la Imagen
28223 Pozuelo de Alarcón (Madryd)
Hiszpania
+34 91 512 12 90
+34 91 512 12 91
macses@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
Hong Kong
+852 3751 6698
+852 3619 5772
macshk@miltenyi.com.hk

Japonia
Miltenyi Biotec K.K.
NEX-Eitai Building 5F
16-10 Fuyuki, Koto-ku,
Tokio 135-0041
Japonia
+81 3 5646 8910
+81 3 5646 8911
macsjp@miltenyi.com

Korea Południowa
Miltenyi Biotec Korea Co., Ltd.
Donggeuk 7F
562 Nonhyeon-ro
Gangnam-gu
Seul 06136
Korea Południowa
+82 2 555 1988
+82 2 555 8890
macskr@miltenyi.com

Kraje skandynawskie i nadbałtyckie
Miltenyi Biotec Norden AB
Medicon Village
Scheeletorget 1
223 81 Lund
Szwecja
macsse@miltenyi.com
Biuro obsługi klienta - Szwecja
0200 111 800
+46 280 72 99
Biuro obsługi klienta - Dania
80 20 30 10
+46 46 280 72 99
Biuro obsługi klienta - Norwegia, Finlandia, Islandia i kraje bałtyckie
+46 46 280 72 80
+46 46 280 72 99

Singapur
Miltenyi Biotec Asia Pacific Pte Ltd
438B Alexandra Road, Block B
Alexandra Technopark
#06-01
Singapore 119968
+65 6238 8183
+65 6238 0302
macssg@miltenyi.com

Szwajcaria
Miltenyi Biotec Swiss AG
Gibelinstrasse 27
4500 Solothurn
Szwajcaria
+41 32 623 08 47
+49 2204 85197
macsch@miltenyi.com

Wielka Brytania
Miltenyi Biotec Ltd.
Almac House, Church Lane
Bisley, Surrey GU24 9DR
Wielka Brytania
+44 1483 799 800
+44 1483 799 811
macsuk@miltenyi.com

Włochy
Miltenyi Biotec S.r.l.
Via Paolo Nanni Costa, 30
40133 Bologna
Włochy
+39 051 6 460 411
+39 051 6 460 499
macsit@miltenyi.com

www.miltenyibiotec.com

Firma Miltenyi Biotec dostarcza produkty i usługi na całym świecie. Na stronie internetowej **www.miltenyibiotec.com/local** można znaleźć najbliższy kontakt z Miltenyi Biotec.

CliniMACS, MACS, MACSmix, logo Miltenyi Biotec oraz MiniMACS, są zarejestrowanymi znakami towarowymi lub znakami towarowymi firmy Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG i/lub jej podmiotów zależnych w różnych krajach na całym świecie. Copyright © 2023 Miltenyi Biotec i/lub podmiotów zależnych. Wszelkie prawa zastrzeżone.

210-003-248/01 | Wydany: 2023-09