Miltenyi Biotec

Aplikace CliniMACS Plus

Uživatelská příručka



Součásti systému CliniMACS včetně reagencií, hadičkových souprav, přístrojů a pufru PBS/EDTA jsou navrženy, vyráběny a testovány podle systému kvality certifikovaného podle ISO 13485. V EU jsou součásti systému CliniMACS dostupné jako zdravotnický prostředek s označením CE pro jejich zamýšlené použití, pokud není uvedeno jinak. V USA je systém CliniMACS CD34 Reagent včetně CliniMACS Plus Instrument, CliniMACS CD34 Reagent, CliniMACS Tubing Set TS, CliniMACS Tubing Set LS a CliniMACS PBS/EDTA Buffer schválen FDA jako nástroj pro použití u lidí (HUD), které je na základě federálního zákona USA schváleno pro použití k léčbě pacientů a akutní myeloidní leukémií (AML) v první úplné remisi. Účinnost zařízení pro tuto indikaci nebyla prokázána. Další výrobky produktové řady CliniMACS jsou k dispozici pro použití pouze na základě schválené žádosti hodnoceného nového léčivého přípravku (IND) nebo výjimky pro prostředky, které jsou předmětem klinické zkoušky (IDE). V Austrálii jsou následující součásti systému CliniMACS Plus zahrnuty do Australského rejstříku terapeutického zboží (ARTG) a jsou proto schváleny pro dodávání: CliniMACS Plus Instrument, CliniMACS CD34 Reagent, CliniMACS Tubing Set, CliniMACS Tubing Set LS, CliniMACS Depletion Tubing Set a CliniMACS PBS/EDTA Buffer. V Austrálii se smí používat pouze výrobky, které jsou zařazeny do ARTG.

Pokud není specificky uvedeno jinak, výrobky a služby společnosti Miltenyi Biotec jsou určeny pouze k výzkumným účelům a ne pro terapeutické či diagnostické použití.

Copyright © 2024 Miltenyi Biotec a/nebo její dceřiné společnosti. Všechna práva vyhrazena.

Žádná část této publikace nesmí být reprodukována, ukládána ve vyhledávacím systému, přenášena, zveřejňována nebo šířena v jakékoliv podobě nebo jakýmikoliv prostředky, mechanicky, fotokopiemi, mikrofilmy, záznamy či jinak bez předchozího písemného souhlasu společnosti Miltenyi Biotec s tím, že bez ohledu na předchozí ustanovení si vlastníci systému CliniMACS Plus mohou pořizovat kopie výlučně pro účely školení personálu při používání a zajišťování servisu jednotky v rámci jejich podniku nebo organizace.

CliniMACS, MACS, MACSmix, logo Miltenyi Biotec a MiniMACS jsou registrované ochranné známky společnosti Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG a/nebo jejích přidružených společností v různých zemích světa. Všechny ostatní ochranné známky uvedené v tomto dokumentu jsou majetkem příslušných vlastníků a slouží pouze pro identifikační účely.

Aplicace CliniMACS® Plus

Uživatelská příručka

Verze softwaru 2.4x

Vydáno: 2024-03
210-003-224/01

MD CE 0123

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

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

www.miltenyibiotec.com

Zásadní informace

Tato uživatelská příručka obsahuje informace k používání aplikací CliniMACS Plus. Návod k použití, varování, preventivní opatření a jiné důležité informace pro použití přístroje CliniMACS Plus Instrument jsou uvedeny v uživatelské příručce přístroje CliniMACS Plus Instrument.

⚠ VAROVÁNÍ

Systém CliniMACS Plus smí obsluhovat pouze školená obsluha. Před uvedením systému do provozu si pečlivě přečtěte a pochopte bezpečnostní informace, varování, preventivní opatření a pokyny pro správnou funkci přístroje CliniMACS Plus Instrument uvedené v návodu k použití systému CliniMACS Plus (zejména bezpečnostních informací v uživatelské příručce přístroje CliniMACS Plus Instrument a v kapitole 3 „Varování a preventivní opatření" na straně 27 této uživatelské příručky) a ve všech doporučeních týkajících se bezpečnosti vydaných společností Miltenyi Biotec. Věnujte zvláštní pozornost všem varováním zobrazeným na systému nebo uvedeným u spotřebních materiálů, příslušenství, doplňkových materiálů a vybavení. Obsluha musí během provozu přístroje vždy dodržovat všechny bezpečnostní informace, varování, preventivní opatření a pokyny a ověřit si, že jsou dodržovány všechny bezpečnostní informace, varování, preventivní opatření a pokyny. Nedodržování bezpečnostních informací, varování, preventivních opatření a pokynů uvedených v návodu k použití by mohlo způsobit vadnou funkci přístroje, poškození majetku, ztráta cílových buněk, poranění osob a/nebo úmrtí.

Obsah

1	**Úvod**	**11**
1.1	Všeobecné informace	11
1.2	Označení buněk s reagenciemi CliniMACS	12
1.3	Magnetická separace buněk s vysokým gradientem	13
1.4	Separační strategie	13
1.4.1	Strategie obohacení	14
1.4.2	Strategie deplece	15
2	**Slovník**	**19**
2.1	Grafický popis	19
2.2	Rejstřík symbolů	19
2.3	Rejstřík termínů	20
3	**Varování a preventivní opatření**	**27**
3.1	Týkající se procesu	27
3.2	Reagencie a biotinové konjugáty CliniMACS	28
3.3	Zacházení s biologicky nebezpečným materiálem	29
3.4	Buněčný výchozí produkt	30
4	**Systém CliniMACS Plus**	**31**
4.1	CliniMACS Plus Instrument	31
4.2	Reagencie a biotinové konjugáty CliniMACS	31
4.3	Hadičkové soupravy CliniMACS	31
4.4	CliniMACS PBS/EDTA Buffer	31
4.5	Příslušenství CliniMACS	32
4.6	Další potřebné materiály	32
4.7	Požadované vybavení	33
5	**Přehled použití**	**35**
5.1	Čtyři KROKY k cílovým buňkám	35
5.2	Přehledová tabulka	37

6	**Přehled KROKŮ 1–4 pro konkrétní aplikaci**	**41**
6.1	Obohacení CD34 pozitivními buňkami	41
6.1.1	KROK 1: Příprava buněk a magnetické značení	41
6.1.2	KROK 2: Volba separačního programu	43
6.1.3	KROK 3: Instalace hadičkových souprav CliniMACS	44
6.1.4	KROK 4: Separace CliniMACS Plus	44
6.2	Obohacení CD14 pozitivními buňkami	44
6.2.1	KROK 1: Příprava buněk a magnetické značení	44
6.2.2	KROK 2: Volba separačního programu	47
6.2.3	KROK 3: Instalace hadičkových souprav CliniMACS	47
6.2.4	KROK 4: Separace CliniMACS Plus	47
6.3	Obohacení/deplece reagencií CliniMACS Anti-Biotin Reagent	48
6.3.1	KROK 1: Příprava buněk a magnetické značení	48
6.3.2	KROK 2: Volba separačního programu	52
6.3.3	KROK 3: Instalace hadičkových souprav CliniMACS	52
6.3.4	KROK 4: Separace CliniMACS Plus	52
6.4	Obohacení CD56 pozitivními buňkami	53
6.4.1	KROK 1: Příprava buněk a magnetické značení	53
6.4.2	KROK 2: Volba separačního programu	56
6.4.3	KROK 3: Instalace hadičkových souprav CliniMACS	56
6.4.4	KROK 4: Separace CliniMACS Plus	56
6.5	Deplece CD3 pozitivních buněk	57
6.5.1	KROK 1: Příprava buněk a magnetické značení	57
6.5.2	KROK 2: Volba separačního programu	61
6.5.3	KROK 3: Instalace hadičkových souprav CliniMACS	61
6.5.4	KROK 4: Separace CliniMACS Plus	61
6.6	Deplece CD19 pozitivních buněk	62
6.6.1	KROK 1: Příprava buněk a magnetické značení	62
6.6.2	KROK 2: Volba separačního programu	64
6.6.3	KROK 3: Instalace hadičkových souprav CliniMACS	64
6.6.4	KROK 4: Separace CliniMACS Plus	64

6.7	Deplece CD3 pozitivních buněk a CD19 pozitivních buněk	65
6.7.1	KROK 1: Příprava buněk a magnetické značení	65
6.7.2	KROK 2: Volba separačního programu	68
6.7.3	KROK 3: Instalace hadičkových souprav CliniMACS	68
6.7.4	KROK 4: Separace CliniMACS Plus	68
6.8	Obohacení/deplece CD8 pozitivními buňkami	69
6.8.1	KROK 1: Příprava buněk a magnetické značení	69
6.8.2	KROK 2: Volba separačního programu	72
6.8.3	KROK 3: Instalace hadičkových souprav CliniMACS	72
6.8.4	KROK 4: Separace CliniMACS Plus	73
6.9	Obohacení/deplece CD25 pozitivními buňkami	73
6.9.1	KROK 1: Příprava buněk a magnetické značení	73
6.9.2	KROK 2: Volba separačního programu	78
6.9.3	KROK 3: Instalace hadičkových souprav CliniMACS	78
6.9.4	KROK 4: Separace CliniMACS Plus	78
6.10	Obohacení/deplece CD4 pozitivními buňkami	79
6.10.1	KROK 1: Příprava buněk a magnetické značení	79
6.10.2	KROK 2: Volba separačního programu	83
6.10.3	KROK 3: Instalace hadičkových souprav CliniMACS	83
6.10.4	KROK 4: Separace CliniMACS Plus	83
6.11	Deplece CD4 pozitivních buněk a CD8 pozitivních buněk	83
6.11.1	KROK 1: Příprava buněk a magnetické značení	84
6.11.2	KROK 2: Volba separačního programu	87
6.11.3	KROK 3: Instalace hadičkových souprav CliniMACS	87
6.11.4	KROK 4: Separace CliniMACS Plus	87
6.12	Obohacení CD1c (BDCA-1) pozitivních buněk – část 1: Deplece CD19 pozitivních buněk a značení CD1c (BDCA-1) pozitivních buněk	88
6.12.1	KROK 1: Příprava buněk a magnetické značení	88
6.12.2	KROK 2: Volba separačního programu	90
6.12.3	KROK 3: Instalace hadičkových souprav CliniMACS	91
6.12.4	KROK 4: Separace CliniMACS Plus	91

6.13 Obohacení CD1c (BDCA-1) pozitivních buněk – část 2: Flexible Labeling System 91
6.13.1 KROK 1: Příprava buněk a magnetické značení 91
6.13.2 KROK 2: Volba separačního programu 93
6.13.3 KROK 3: Instalace hadičkových souprav CliniMACS 93
6.13.4 KROK 4: Separace CliniMACS Plus 93
6.14 Obohacení CD304 (BDCA-4) pozitivních buněk 94
6.14.1 KROK 1: Příprava buněk a magnetické značení 94
6.14.2 KROK 2: Volba separačního programu 96
6.14.3 KROK 3: Instalace hadičkových souprav CliniMACS 96
6.14.4 KROK 4: Separace CliniMACS Plus 97
6.15 Deplece TCRα/β pozitivních buněk 97
6.15.1 KROK 1: Příprava buněk a magnetické značení 97
6.15.2 KROK 2: Volba separačního programu 100
6.15.3 KROK 3: Instalace hadičkových souprav CliniMACS 100
6.15.4 KROK 4: Separace CliniMACS Plus 100
6.16 Deplece CD45RA pozitivních buněk 101
6.16.1 KROK 1: Příprava buněk a magnetické značení 101
6.16.2 KROK 2: Volba separačního programu 103
6.16.3 KROK 3: Instalace hadičkových souprav CliniMACS 104
6.16.4 KROK 4: Separace CliniMACS Plus 104
6.17 Obohacení lidských buněk vylučujících IFN-gama systémem CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma) 104
6.17.1 KROK 1: Příprava buněk a magnetické značení 104
6.17.2 KROK 2: Volba separačního programu 117
6.17.3 KROK 3: Instalace hadičkových souprav CliniMACS 117
6.17.4 KROK 4: Separace CliniMACS Plus 117

7 Podrobné vysvětlení KROKŮ 1–4 119

7.1 KROK 1: Příprava buněk a magnetické značení 119
7.1.1 Vyžadované první činnosti 119
7.1.2 Magnetické značení buněk 120

7.2 KROK 2: Volba separačního programu 132
7.2.1 Zapněte přístroj CliniMACS Plus Instrument. 132
7.2.2 CD34 SELECTION 1/2 132
7.2.3 ENRICHMENT 1.1 134
7.2.4 ENRICHMENT 3.2 139
7.2.5 DEPLETION 2.1 141
7.2.6 DEPLETION 3.1 146
7.3 KROK 3: Instalace hadičkových souprav CliniMACS 151
7.3.1 Souprava CliniMACS Tubing Set a CliniMACS Tubing Set LS 151
7.3.2 Alternativní instalace hadičkových souprav CliniMACS Tubing Set 166
7.3.3 Hadičková souprava CliniMACS Depletion Tubing Set 171
7.4 KROK 4: Separace CliniMACS Plus 185
7.4.1 CD34 SELECTION 1/2 185
7.4.2 ENRICHMENT 1.1 189
7.4.3 ENRICHMENT 1.1 193
7.4.4 DEPLETION 2.1 197
7.4.5 DEPLETION 3.1 201

8 Řešení problémů 205

8.1 Miltenyi Biotec Technical Support 205
8.2 Příprava produktu leukaferézy 205
8.3 Přístroj CliniMACS Plus Instrument a hadičkové soupravy CliniMACS 206
8.3.1 Chybová hlášení 206
8.3.2 Vložení a plnění soupravy hadiček 206
8.4 Automatická separace buněk 207
8.4.1 Varování 207
8.4.2 Neočekávané události: Všechny separační programy 207
8.4.3 Neočekávané události: Pouze program obohacení 210
8.4.4 Neočekávané události: CD34 SELECTION 1/2 210
8.4.5 Neočekávané události: ENRICHMENT 1.1 211
8.4.6 Neočekávané události: ENRICHMENT 3.2 212
8.4.7 Nouzový program (pro použití pouze z programy obohacování) 213
8.4.8 Neočekávané události: DEPLETION 2.1 214
8.4.9 Neočekávané události: DEPLETION 3.1 214

8.5 Účinnost separace buněk 216
8.5.1 Neočekávané události: Pouze program obohacení 216
8.5.2 Neočekávané události: CD34 SELECTION 1/2 a ENRICHMENT 1.1 218
8.5.3 Neočekávané události: CD34 SELECTION 1/2 219
8.5.4 Neočekávané události: ENRICHMENT 1.1 219
8.5.5 Neočekávané události: DEPLETION 2.1 a DEPLETION 3.1 219

9 Právní oznámení 221
9.1 Omezená záruka 221
9.2 Ochranné známky 222

1 Úvod

1.1 Všeobecné informace

Systém CliniMACS Plus nabízí soupravu nástrojů pro vytvoření vysoce kvalitních, standardizovaných separací buněk pro terapeutické použití.

Systém CliniMACS Plus je založen na technologii magnetické separace buněk (technologie MACS®) vyvinuté společností Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG. Společnost Miltenyi Biotec zpřístupnila tyto výrobky pro klinické využití při splnění požadavků evropských regulačních norem.

Reagencie a biotinové konjugáty CliniMACS jsou určeny pouze k použití *in vitro* a nejsou určeny k léčebnému použití nebo pro přímou infuzi pacientům.

Reagencie CliniMACS v kombinaci se systémem CliniMACS Plus jsou určeny na separaci lidských buněk.

Společnost Miltenyi Biotec jako výrobce systému CliniMACS Plus neposkytuje žádná doporučení ohledně použití oddělených buněk pro terapeutické účely a nečiní žádná tvrzení týkající se klinického přínosu.

Pro výrobu a používání cílových buněk u lidí musí být dodržována národní legislativa a předpisy – např. pro EU směrnice 2004/23/ES (lidské tkáně a buňky) nebo směrnice 2002/98/ES (lidská krev a krevní složky). Proto za jakékoliv klinické použití cílových buněk výlučně odpovídá uživatel systému CliniMACS Plus.

OMEZENÁ ZÁRUKA
Pokud je systém CliniMACS Plus používán způsobem, který není výslovně popsán v této příručce, veškeré záruky od samého počátku zanikají.

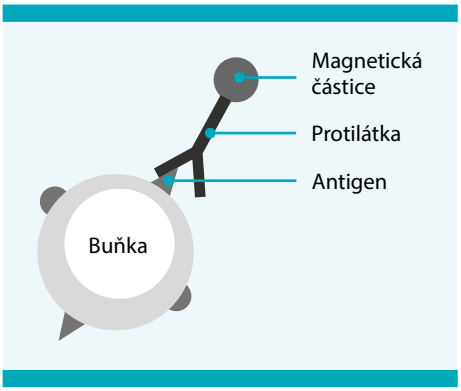
DŮLEŽITÉ
Před použitím systému CliniMACS Plus nebo jakýchkoli jeho součástí mimo země Evropské hospodářské společenství je třeba získat souhlas regulačního orgánu, zda jsou systém CliniMACS Plus, resp. součásti CliniMACS v dané zemi registrovány.

1.2 Označení buněk s reagenciemi CliniMACS

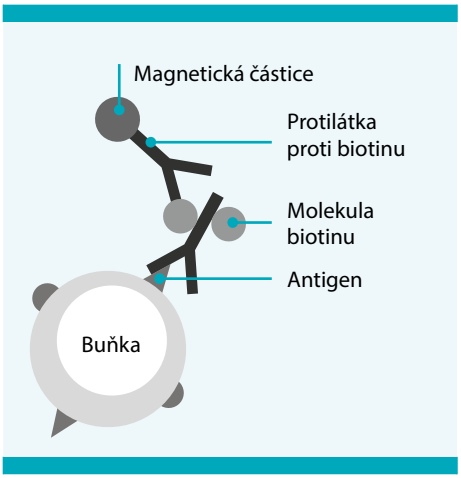
Systém MACS Magnetic Cell Sorting je dobře prověřený výkonný nástroje pro oddělení mnoha typů buněk ve výzkumných laboratořích i v klinických použitích. Směsi buněk jsou separovány v magnetickém poli pomocí imunomagnetického značení specifického typu zájmových buněk, např. lidské CD34 pozitivní hematopoetické progenitorové buňky z populací heterogenních hematologických buněk.

Pomocí systému CliniMACS Plus lze buňky magneticky značit třemi různými způsoby:

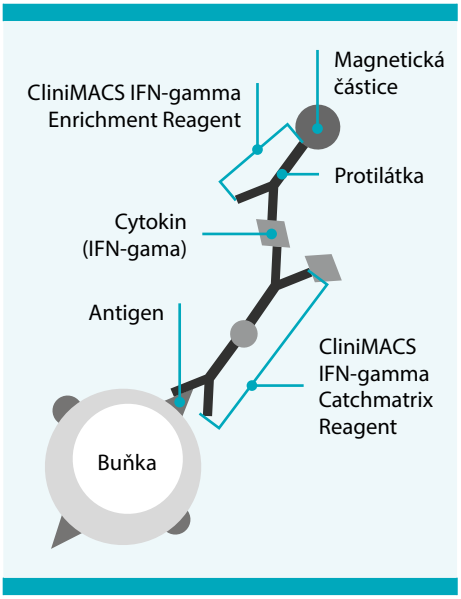
- Přímo v jednosměrném postupu značení antigen-specifickými protilátkami konjugovanými se superparamagnetickými železo--dextranovými kuličkami (viz Obrázek 1.1).
- Nepřímo ve dvoustupňovém postupu značení zvaném Flexible Labeling System. V prvním kroku jsou buňky značeny antigen-specifickými protilátkami konjugovanými s biotinem. V druhém kroku jsou tyto protilátky značeny biotin-specifickými protilátkami konjugovanými se superparamagnetickými železo-dextranovými kuličkami (viz Obrázek 1.2).
- Nepřímo ve dvoustupňovém postupu značení nazvaném CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gama). Především dojde k opakované stimulaci buněk *in vitro* s cílem zajistit sekreci cytokinu (např. IFN-gama). V první kroku značení jsou opakovaně stimulované buňky označeny hybridní molekulou obsahující protilátku specifickou pro leukocyty a protilátku specifickou pro cytokin, nazývanou reagencie CliniMACS IFN-gamma Catchmatrix Reagent. Buňky poté inkubují, aby byla umožněna sekrece cytokinu, který je „zachycen" pomocí záchytové matrice na povrchu buněk. Následně v druhém kroku značení se označí buňky vylučující cytokin protilátkami specifickými pro cytokin, jež jsou konjugovány na superparamagnetické železo-dextranové kuličky (CliniMACS IFN-gamma Enrichment Reagent) (viz Obrázek 1.3).



Obrázek 1.1: Magnetické značení buněk



Obrázek 1.2: Flexible Labeling System



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

1.3 Magnetická separace buněk s vysokým gradientem

Suspenze magneticky označených buněk se zavede do přístroje CliniMACS Plus Instrument připravenou sadou hadiček. Tato jednotka magnetické separace buněk s vysokým gradientem obsahuje specificky vyvinutý, výkonný permanentní magnet a separační kolonu s feromagnetickou matricí.

Pole s vysokým gradientem umožňuje generování velkých magnetických sil a rychlou demagnetizaci. Když jsou malé feromagnetické struktury, jako je sloupcová matrice, umístěny do magnetického pole, narušují homogenitu pole. To má za následek generování vysokých magnetických gradientů. Feromagnetické struktury ve svém bezprostředním okolí generují magnetické síly 10 000krát silnější než v konvenčních geometriích. Pole s vysokým gradientem přitahuje označené buňky k matrici a účinně je zadržuje. Po vyjmutí kolony z magnetu umožňuje rychlá demagnetizace matrice kolony uvolnění zadržených buněk.

1.4 Separační strategie

Systém CliniMACS Plus poskytuje uživateli různorodé separační programy. Separační programy lze obecně rozdělit na strategie obohacování (CD34 SELECTION 1/2, ENRICHMENT 1.1 a ENRICHMENT 3.2) a strategie deplece (DEPLETION 2.1 a DEPLETION 3.1).

Obohacení magneticky značených buněk

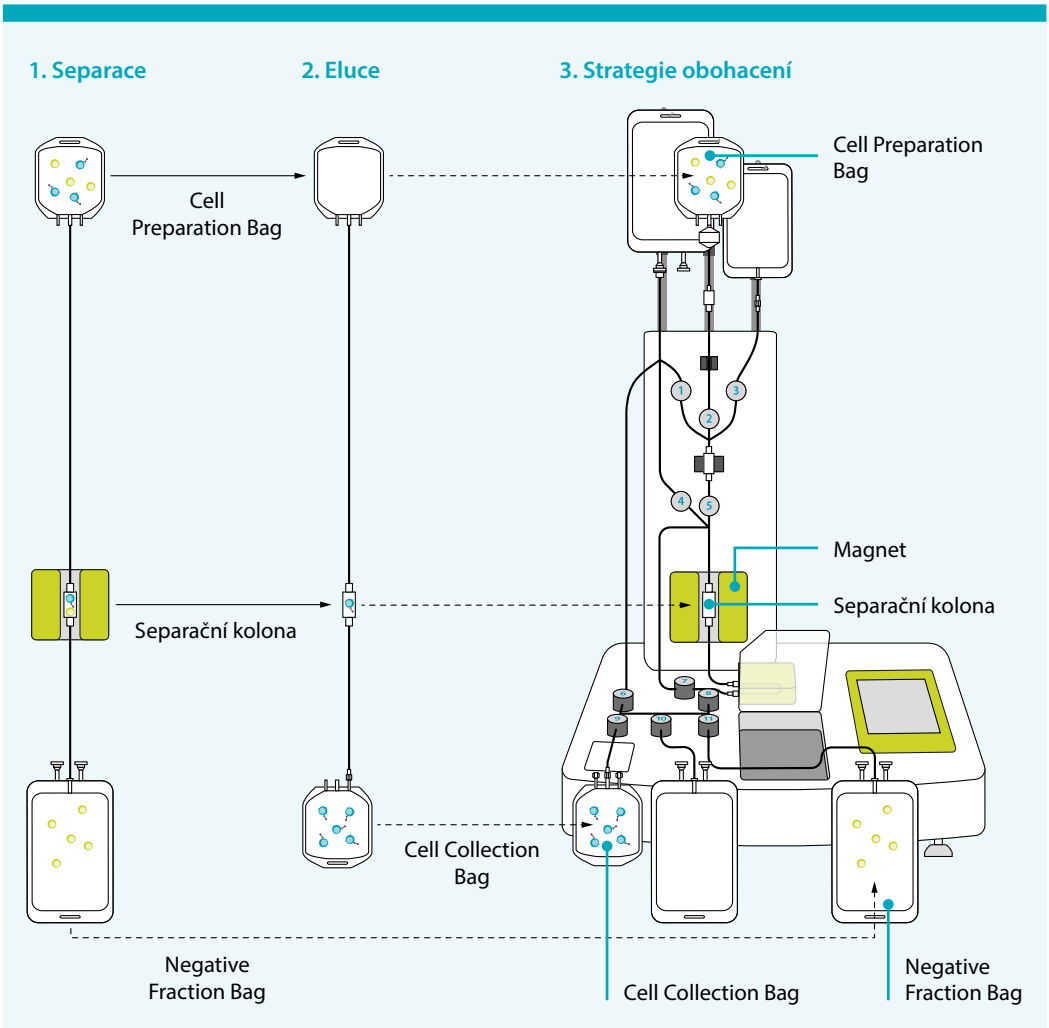
Při vývěru strategie obohacení jsou magneticky značené buňky (primárně označené reagencií CliniMACS Reagent) zadrženy v separační koloně a neznačené buňky projdou skrz. Označené buňky (cílové buňky) se shromáždí ve vaku Cell Collection Bag a neznačené buňky (necílové buňky) ve vaku Negative Fraction Bag (viz Obrázek 1.4).

Deplece magneticky značených buněk

Technologie MACS je rovněž velmi účinná pro depleci specifických buněčných populací. Nežádoucí buňky jsou specificky označeny superparamagnetickými částicemi a odděleny od cílových buněk při průchodu přes magnetickou kolonu s vysokým gradientem.. Na rozdíl od strategie obohacení se neznačené buňky (cílové buňky) shromažďují ve vaku Cell Collection Bag a označené buňky (necílové buňky) se shromažďují ve vaku Negative Fraction Bag (viz Obrázek 1.5) nebo ve vaku Non-Target Cell Bag (viz Obrázek 1.6 a Obrázek 1.7).

1.4.1 Strategie obohacení

Obohacení buněk pomocí sad CliniMACS Tubing Set a CliniMACS Tubing Set LS

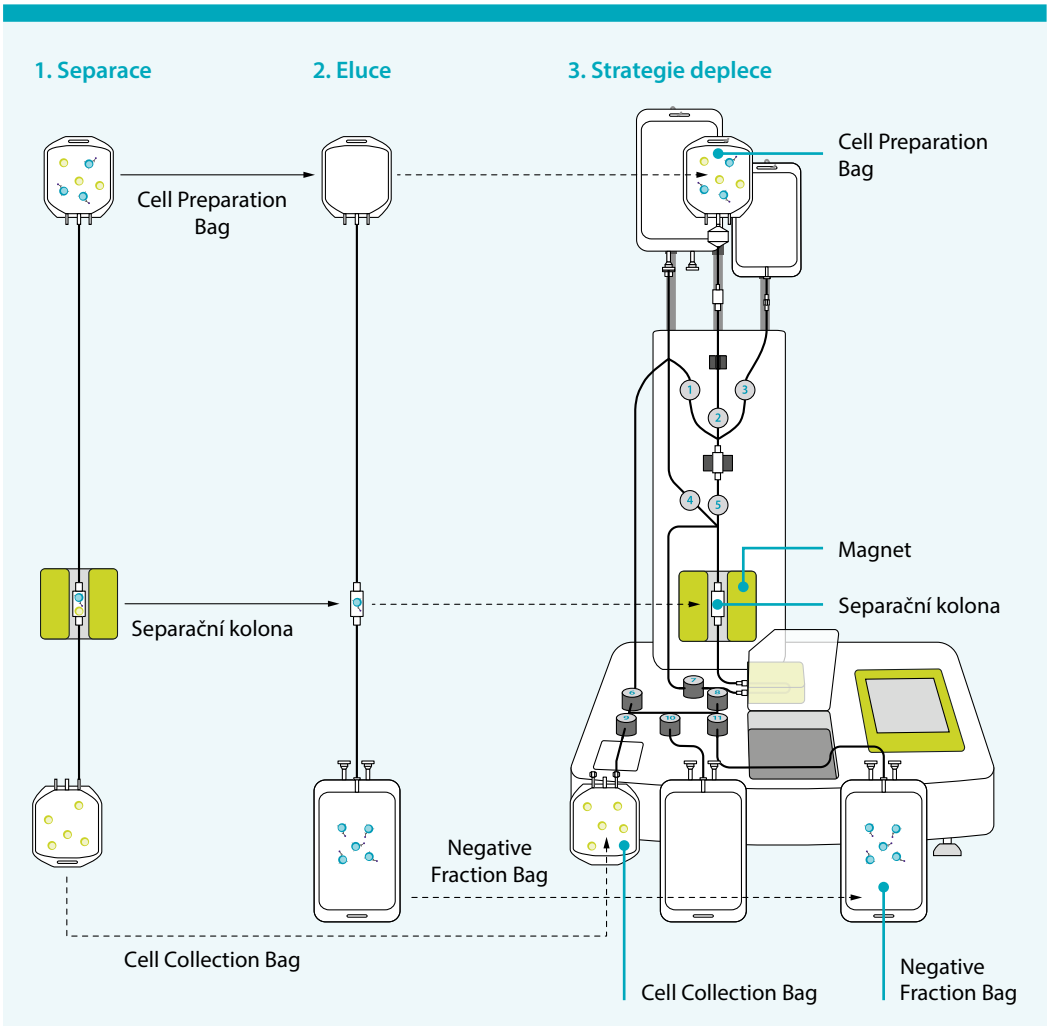


Obrázek 1.4: Strategie programů obohacení pomocí sad CliniMACS Tubing Set a CliniMACS Tubing Set LS

1. Magnet je v poloze „ON“. Magneticky značené buňky jsou zadrženy v separační koloně, zatímco ostatní neznačené buňky (necílové buňky) protékají kolonou a jsou shromažďovány ve vaku Negative Fraction Bag.
2. Magnet je v poloze „OFF“. Magneticky označené buňky (cílové buňky) se uvolní ze separační kolony a shromáždí se ve vaku Cell Collection Bag.
3. Obohacovací program zadrží magneticky označené buňky v separační koloně, neznačené buňky (necílové buňky) protékají kolonou a jsou shromažďovány ve vaku Negative Fraction Bag. Když se magnet přesune do polohy „OFF“, magneticky označené buňky (cílové buňky) se uvolní z kolony a shromáždí se ve vaku Cell Collection Bag. **Poznámka:** Cílová frakce buněk je vždy shromážděna ve vaku Cell Collection Bag.

1.4.2 Strategie deplece

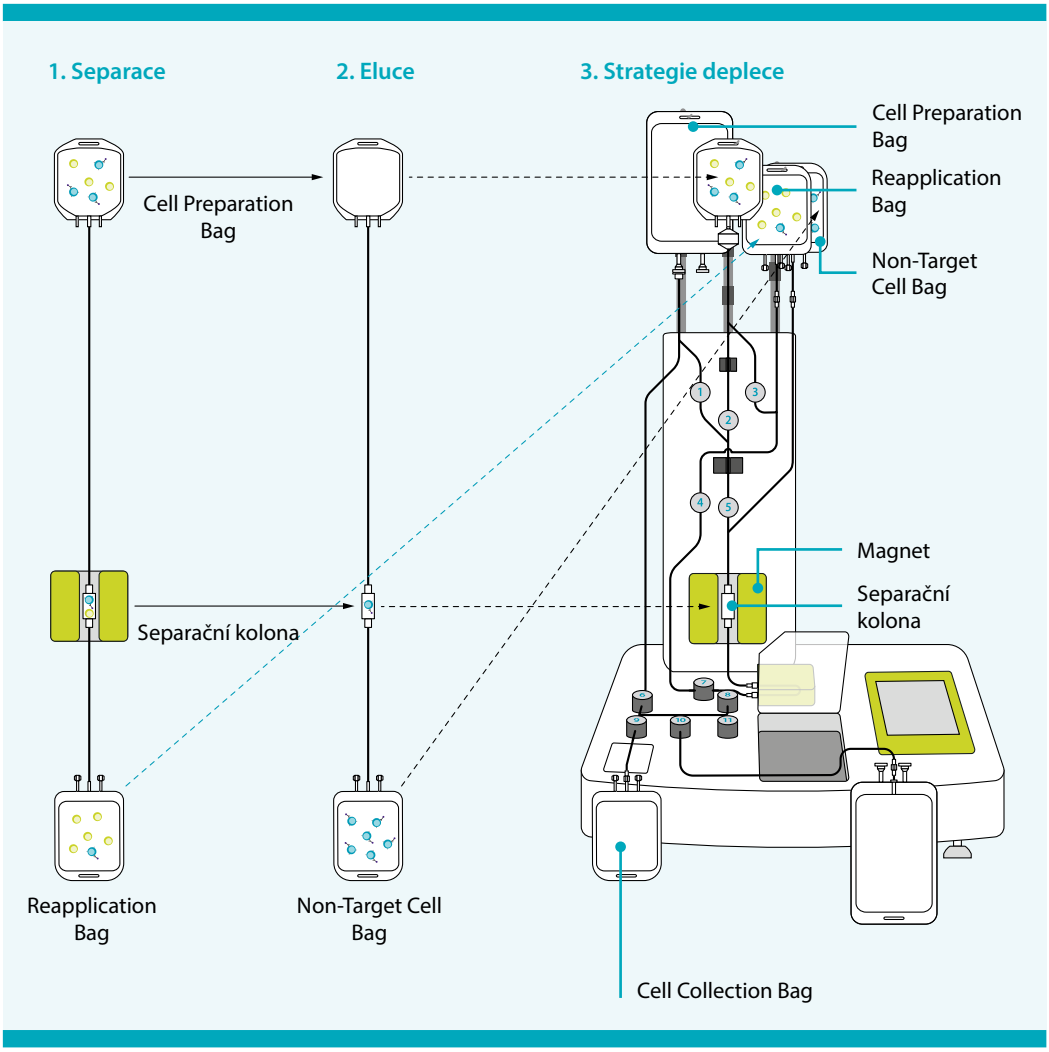
Deplece buněk pomocí sady CliniMACS Tubing Set LS: DEPLETION 2.1



Obrázek 1.5: Strategie deplečního programu DEPLETION 2.1 využívající sadu CliniMACS Tubing Set LS

1. Magnet je v poloze „ON“. Magneticky značené buňky jsou zadrženy v separační koloně, zatímco ostatní neznačené buňky (cílové buňky) protékají kolonou a jsou shromažďovány ve vaku Cell Collection Bag.
2. Magnet je v poloze „OFF“. Magneticky označené buňky (necílové buňky) se uvolní ze separační kolony a shromáždí se ve vaku Negative Fraction Bag.
3. Depleční program (DEPLETION 2.1) zadrží magneticky označené buňky v separační koloně, neznačené buňky (cílové buňky) protékají kolonou a jsou shromažďovány ve vaku Cell Collection Bag. Když se magnet přesune do polohy „OFF“, magneticky značené buňky (necílové buňky) se uvolní z kolony a shromáždí se ve vaku Negative Fraction Bag. **Poznámka:** Cílová frakce buněk je vždy shromážděna ve vaku Cell Collection Bag.

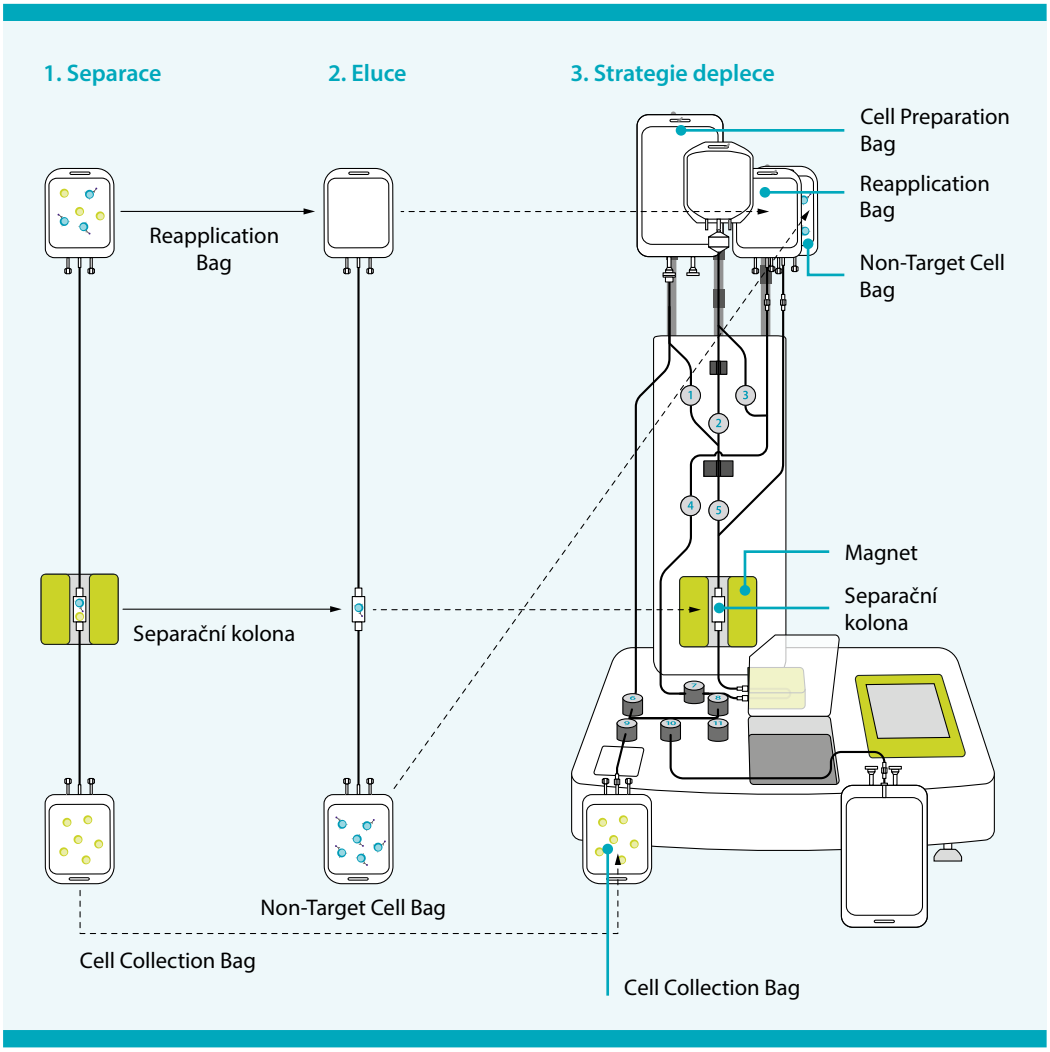
Deplece buněk pomocí sady CliniMACS Depletion Tubing Set: DEPLETION 3.1 (Část 1: Staged Cell Loading [Bulk Loading Stage])



Obrázek 1.6: Strategie deplečního programu DEPLETION 3.1 využívající sadu CliniMACS Depletion Tubing Set (Část 1)

1. Staged Cell Loading (Bulk Loading Stage): Magnet je v poloze „ON“. Magneticky značené buňky jsou zadrženy v separační koloně, zatímco ostatní neznačené buňky (cílové buňky) protékají kolonou a jsou shromažďovány ve vaku Reapplication Bag.
2. Magnet je v poloze „OFF“. Magneticky označené buňky (necílové buňky) se uvolní ze separační kolony a shromáždí se ve vaku Non-Target Cell Bag.
3. Program deplece (DEPLETION 3.1) zadržuje magneticky označené buňky v separační koloně, neznačené buňky (cílové buňky) protékají kolonou a jsou shromažďovány ve vaku Reapplication Bag, aby mohly být znovu vloženy do separační kolony ve druhé citlivé depleci (viz Obrázek 1.7). Když se magnet přesune do polohy „OFF“, magneticky značené buňky (necílové buňky) se uvolní z kolony a shromáždí se ve vaku Non-Target Cell Bag.

Deplece buněk pomocí sady CliniMACS Depletion Tubing Set: DEPLETION 3.1 (Část 2: Sensitive Sample Loading [Sensitive Loading Stage])



Obrázek 1.7: Strategie deplečního programu DEPLETION 3.2 využívající sadu CliniMACS Depletion Tubing Set (Část 1)

4. Sensitive Sample Loading (Sensitive Loading Stage): Magnet je v poloze „ON“. Buňky z vaku Reapplication Bag jsou znovu vloženy do separační kolony. Několik zbývajících magneticky značených buněk je zadrženo v separační koloně, zatímco ostatní neznačené buňky (cílové buňky) protékají kolonou a jsou shromažďovány ve vaku Cell Collection Bag.

5. Magnet je v poloze „OFF“. Magneticky označené buňky (necílové buňky) se uvolní ze separační kolony a shromáždí se ve vaku Non-Target Cell Bag.

6. Na konci separace jsou značené buňky (necílové buňky) ve vaku Non-Target Cell Bag a neznačené buňky (cílové buňky) jsou ve vaku Cell Collection Bag. **Poznámka:** Cílová frakce buněk je vždy shromážděna ve vaku Cell Collection Bag.

2 Slovník

2.1 Grafický popis

Následující tabulka zobrazuje panely použité v této uživatelské příručce k informování uživatele o možných rizicích, pokud nebudou dodržena uvedená varování a preventivní opatření. Úroveň nebezpečí klasifikuje nebezpečí, jak je popsáno níže. Úroveň, typ a zdroj nebezpečí, jakož i možné důsledky, zákazy a opatření jsou uvedeny níže. Ikony na levé straně podrobně popisují riziko.

⚠ VAROVÁNÍ

Označuje nebezpečnou situaci, která, pokud se jí nevyhnete, může mít za následek smrt nebo vážné zranění.

⚠ UPOZORNĚNÍ

Označuje nebezpečnou situaci, která, pokud se jí nevyhnete, může mít za následek drobné nebo středně vážné zranění.

OZNÁMENÍ

Označuje informace považované za důležité, ale nesouvisející s nebezpečím (např. zprávy týkající se poškození majetku)

DŮLEŽITÉ

Doporučuje uživateli důležité postupy nebo informace, které nesouvisejí se zraněním osob nebo škodami na majetku.

2.2 Rejstřík symbolů

Přehled symbolů použitých pro systém CliniMACS Plus je uveden v uživatelské příručce přístroje CliniMACS Plus Instrument. Rejstřík symbolů popisuje symboly použité v uživatelských příručkách a k označování výrobků CliniMACS.

2.3 Rejstřík termínů

Aferéza	Způsob odběru krve, při kterém je odebrána celá krev, vybrána a uchována požadovaná složka a zbytek krve je vrácen dárci
Antigen CD1c (BDCA-1)	CD1c je součást klastru genu CD1, o němž se má za to, že souvisí s MHC. Geny CD1 jsou v klastru v oblasti 170 000 bp lidského chromozómu 1q23.1. Jím kódované proteiny (CD1a-e) jsou exprimovány jako heterodimery složené z těžkého řetězce CD1 nekovalentně párovaného s mikroglobulinem ß2. CD1c se podílí na prezentaci antigenu mikrobiálních glykolipidů nebo lipopetidových antigenů vůči T lymfocytům. V lidské periferní krvi je CD1c (BDCA-1) exprimován na myeloidních dendritických buňkách typu-1 (MDC1) a na podskupině B lymfocytů. Nacházejí se v lymfatických uzlinách, plášťových zónách a zárodečných centrech v okrajové zóně sleziny a v periferní krvi plodu a dospělého člověka.
Antigen CD3	Antigen CD3 je přítomen na zralých lidských T buňkách, thymocytech a podskupině NK buněk. Je spojen s T buněčným receptorem (TCR) a je zodpovědný za transdukci signálu TCR. Antigen CD3 je komplex pěti neměnných řetězců: γ, δ, ε, ζ a η. Protilátka CD3 rozpoznává všechny T buňky, tj. reaguje se 70–80 % lidských lymfocytů periferní krve a s 65–85 % thymocytů. Epitop rozpoznávaný protilátkou je umístěn na ε-řetězci komplexu CD3.
Antigen CD4	Antigen CD4 je exprimován na většině thymocytů a přibližně dvou třetinách T buněk periferní krve; je také exprimován na monocytech a makrofázích. CD4 je přídatná molekula při rozpoznávání cizích antigenů ve spojení s MHC třídy II. Kromě toho je CD4 receptorem pro HIV-1.
Antigen CD8	Antigen CD8 je dimer s disulfidovou vazbou, který existuje buď jako CD8 α homodimer, nebo jako CD8 α/β heterodimer. CD8 je silně exprimován na CD8 pozitivních T buňkách a thymocytech a na podskupině NK buněk a CD8 pozitivních γ/δ T buněk. CD8 působí jako koreceptor s receptory T buněk omezenými na MHC I. třídy při rozpoznávání antigenu.
Antigen CD14	Antigen CD14 je membránový glykoprotein s buňkami 53–55 kD exprimovaný na monocytech. Antigen CD14 je známý jako receptor pro komplex LPS a LPS vazebného proteinu (LBP).

Antigen CD19	Antigen CD19 je kritická signální transdukční molekula, která reguluje vývoj, aktivaci a diferenciaci B lymfocytů. Jako marker linie B buněk je CD19 exprimován od časného stádia pro-B buněk do stádia lymfoblastů B buněk, ale exprese je regulována směrem dolů po zrání B buněk na plazmatické buňky. Antigen CD19 je dále exprimován na většině maligních B lymfocytů a na podskupině folikulárních dendritických buněk.
Antigen CD25	Antigen CD25, alfa řetězec receptoru interleukinu-2 s nízkou afinitou (IL-2Rα), je exprimován na aktivovaných T a B buňkách, NK buňkách a monocytech, stejně jako na regulačních CD4 pozitivních T buňkách. Antigen CD25 vykazuje tři epitopové oblasti A, B a C. Protilátka činidla CliniMACS CD25 rozpoznává epitop A molekuly CD25.
Antigen CD34	Antigen CD34 je vysoce glykosylovaný 115 kDa integrální membránový protein typu 1 neznámé funkce, který je exprimován na 1 % až 4 % normálních buněk kostní dřeně a méně než 0,2 % normálních leukocytů periferní krve, na podskupinách stromálních buněk kostní dřeně, a na endotelu malých cév různých tkání.
Antigen CD45RA	Antigen CD45RA je exprimován na naivních CD4 a CD8 pozitivních T buňkách, stejně jako na podskupinách B buněk, NK buněk a monocytů. Jde o izoformu běžného leukocytárního antigenu CD45, transmembránové protein tyrosinfosfatázy.
Antigen CD56	Antigen CD56 je členem rodiny NCAM (rodina molekul adheze nervových buněk), která je exprimována v hematopoetickém systému na buňkách NK, NKT.
Antigen CD304 (BDCA-4)	Antigen CD304 (BDCA-4) je 130–140 kDa buněčný povrchový glykoprotein exprimovaný v čerstvé krvi a kostní dřeni výhradně na plazmacytoidních dendritických buňkách.
Antigen TCRα/β	TCRα/β je heterodimer receptoru T buněk složený ze dvou řetězců transmembránových glykoproteinů, α a β. Oba řetězce jsou členy nadrodiny Ig a sestávají z konstantní a polymorfní variabilní oblasti. Variabilní oblast TCRα/β se podílí na rozpoznávání antigenních peptidů prezentovaných MHC komplexem buněk prezentujících antigen. Antigen TCRα/β je exprimován na většině T buněk periferní krve.
BDCA	Antigen krevních dendritických buněk (Blood Dendritic Cell Antigen)
Bezpečnostní spínač čerpadla	Senzor, který zabraňuje spuštění čerpadla, pokud jsou otevřená dvířka čerpadla

Buffer Waste Bag	Odpadový vak na shromáždění pufru během separace buněk nástrojem CliniMACS Plus Instrument
Buněčný výchozí produkt	Produkt obsahující buňky, používaný jako výchozí materiál pro separační proces CliniMACS Plus, např. odběr leukaferézou, PBMC nebo kostní dřeň
Cell Collection Bag	Vak, ve kterém se po separaci shromažďují vyčištěné cílové buňky
Cell Preparation Bag	Vak, do kterého se přenáší buněčný produkt a ve kterém se provádí magnetické značení a promývání buněk
CliniMACS Anti-Biotin Reagent	Činidlo pro magnetické značení buněk primárně značených biotinylovanými protilátkami nebo ligandy.
CliniMACS CD1c Biotin (BDCA-1)	Biotinylovaná protilátka pro značení lidských buněk exprimujících antigen CD1c (BDCA-1) před magnetickým značením pomocí reagencie CliniMACS Anti-Biotin Reagent.
CliniMACS CD3 Reagent	Reagencie pro magnetické značení buněk exprimujících antigen CD3
CliniMACS CD4 Reagent	Reagencie pro magnetické značení buněk exprimujících antigen CD4
CliniMACS CD8 Reagent	Reagencie pro magnetické značení buněk exprimujících antigen CD8
CliniMACS CD14 Reagent	Reagencie pro magnetické značení buněk exprimujících antigen CD14
CliniMACS CD19 Reagent	Reagencie pro magnetické značení buněk exprimujících antigen CD19
CliniMACS CD25 Reagent	Reagencie pro magnetické značení buněk exprimujících antigen CD25
CliniMACS CD34 Reagent	Reagencie pro magnetické značení buněk exprimujících antigen CD34
CliniMACS CD45RA Reagent	Reagencie pro magnetické značení buněk exprimujících antigen CD45RA
CliniMACS CD56 Reagent	Reagencie pro magnetické značení buněk exprimujících antigen CD56
CliniMACS CD304 (BDCA-4) Reagent	Reagencie pro magnetické značení buněk exprimujících antigen CD304 (BDCA-4)

CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma)	Kombinace reagencií tvořená reagencií CliniMACS IFN-gamma Catchmatrix Reagent a regencií CliniMACS IFN-gamma Enrichment Reagent. Pomocí systému CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma) lze obohacovat buňky vylučující IFN-gama po opakované stimulaci *in vitro*.
CliniMACS Depletion Tubing Set	Souprava hadiček, konektorů, kolon a vaků, kterými se zpracovává magneticky označená buněčná suspenze a ve kterých probíhá magnetická separace buněk speciálně navržená pro zvláštní potřeby deplece
CliniMACS IFN-gamma Catchmatrix Reagent	Součást systému CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma) pro povrchové značení leukocytů IFN-gama specifickými protilátkami.
CliniMACS IFN-gamma Enrichment Reagent	Součást systému CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma) pro magnetické značení IFN-gama vázaná na reagencii CliniMACS IFN-gamma Catchmatrix Reagent na buňky vylučující IFN-gama.
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	Pufr se používá pro přípravu buněk a separaci buněk v systému CliniMACS Plus: PBS (fosfátem pufrovaný fyziologický roztok) doplněný 1 mM EDTA, pH 7,2. Před použitím se pufr CliniMACS PBS/EDTA Buffer musí doplnit HSA pro použití ve farmacii na konečnou koncentraci 0,5 % (hmotnost/objem, tj. 5 g HSA na litr pufru).
CliniMACS Plus Instrument	Přístroj pro magnetickou separaci buněk využívající technologii MACS
CliniMACS TCRα/β-Biotin	Biotinylovaná protilátka pro značení lidských buněk exprimujících antigen TCRα/β před magnetickým značením pomocí reagencie CliniMACS Anti-Biotin
CliniMACS Tubing Set, CliniMACS Tubing Set LS	Souprava hadiček, konektorů, kolon a vaků, kterými se zpracovává magneticky označená buněčná suspenze a ve kterých probíhá magnetická separace buněk
Držák na vak	Držák na přístroji CliniMACS Plus Instrument na zavěšení vaku Cell Preparation Bag, vaku Non-Target Cell Bag, vaku Priming Waste Bag, vaku Reapplication Bag a vaku na pufr.
Držák předřazené kolony	Podpěra namontovaná na přístroji CliniMACS Plus Instrument, která drží předřazenou kolonu na místě
Držák selekční kolony	Viz držák separační kolony.
Držák separační kolony	Lisovaná vodítka v magnetické jednotce, která drží separační kolonu na místě

EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová
Extraktor plazmy	Zařízení použité k extrakci kapaliny z vaku Cell Preparation Bag po promytí buněk
×g	Násobky gravitačního zrychlení Země
Hematopoetické progenitorové buňky	Progenitorové buňky lymfoidní, myeloidní a erytroidní linie
HSA	Lidský sérový albumin
IgG	Imunoglobulin G
Konektor typu Luer	Šroubovací spojka, součást hadičkové soupravy
Leukaferéza	Aferéza shromažďující leukocyty
Lidský sérový albumin	HSA pro použití ve farmacii schválený v zemi uživatele je nezbytný jako doplněk pufru při použití se systémem CliniMACS Plus.
Luer/Spike Interconnector	Přenosová sada s propichovacím kolíkem (ostrý hrot) a adaptérem stříkačky (zásuvka luer) pro plazmu nebo tekutiny
Negative Fraction Bag	Vak soupravy CliniMACS Tubing Set a souprava CliniMACS Tubing Set LS obsahující frakci necílových buněk
Magnetická protilátka	Superparamegneticky značená protilátka
MDC	Myeloidní dendritické buňky
Monoklonální protilátky	Protilátka jediného typu, která působí proti specifickému epitopu (antigen, antigenní determinant) a je produkována jediným klonem B buněk nebo jedinou hybridomovou buněčnou linií, která je vytvořena fúzí buňky lymfocytu s buňkou myelomu. Některé myelomové buňky přirozeně syntetizují jednotlivé protilátky.
Non-Target Cell Bag	Vak soupravy CliniMACS Tubing Set obsahující frakci necílových buněk
Orbitální rotátor	Zařízení používané k míchání buněčného produktu během reakce s reagenciemi CliniMACS
ot/min	Otáčky za minutu

PBMC	Mononukleární buňka periferní krve
Peristaltické čerpadlo	Hadičkové čerpadlo používané v přístroji CliniMACS Plus Instrument k regulaci průtoku tekutiny hadičkovou soupravou
Plasma Waste Bag	Odpadový vak pro odběr přebytečné plazmy před postupem značení
Plnění	Krok před oddělením buněk, v kterém se hadičková souprava pr splachování oplachuje pufrem
Postup uvnitř vaku	Sterilní zpracování a přenos buněk v uzavřeném prostředí přenosových vaků
Předřazená kolona	První kolona v hadičkových soupravách CliniMACS Tubing Set a CliniMACS Tubing Set LS, která slouží jako filtr k zachycení buněk, které mají nespecifické interakce s matricí kolony
Předřazený systémový filtr	40µm filtrační zařízení mezi vakem Cell Preparation Bag a předřazenou kolonou používané k zachycení shluků a zbytků buněk
Přenosový vak	Vak s hadičkami a propichovacím hrotem na konci
Přídržný kroužek	Součást soupravy hadiček, která umožňuje, aby hadičky čerpadla zůstaly na svém správném místě
Přihrádka na vak	Přihrádka v přístroji CliniMACS Plus Instrument, ve které je umístěn vak Negative Fraction Bag a vak Buffer Waste Bag
Priming Waste Bag	Vak, do nějž se shromažďuje pufr z plnicího kroku
Protilátka proti biotinu	Tato protilátka rozpoznává buňky, které byly již dříve označeny příslušnou biotinylovanou protilátkou nebo ligandem.
Reapplication Bag	Vak soupravy CliniMACS Depletion Tubing Set, do nějž se dočasně shromažďují neznačené buňky během separace. Neznačené buňky z vaku Reapplication Bag se na separační kolonu nanesou dvakrát, aby byla zajištěna vysoká čistota cílových buněk.
Sada pro přenos plazmy	Přenosová souprava se dvěma propichovacími kolíky (ostré hroty) pro plazmu nebo tekutiny
Selekční kolona	Viz separační kolona.
Senzor kapaliny	Součást přístroje CliniMACS Plus Instrument, která detekuje kapalinu v hadičkách

Separační kolona	Kolona, v níž se po vystavení magnetickému poli oddělí magneticky označené buňky
Separační program	Softwarový program určený k obohacení nebo depleci magneticky označených buněčných podskupin ze smíšené buněčné populace. Na výběr je několik programů separace podle toho, jakou separaci chcete provést.
Separační reagencie	Reagencie pro magnetické značení buněk, např. CliniMACS CD34 Reagent
Spojka pro odběr vzorků na stanovišti	Injekční otvor, např. pro odběr vzorků nebo přídavek reagencií CliniMACS do vaku Cell Preparation Bag
T armatura	Armatura ve tvaru T na soupravě hadiček, kde se stýkají tři hadičky
Tepelné svařovací zařízení	Topné zařízení použité pro sterilizaci hadiček PVC těsnění
Výběrový pufr	Viz pufr CliniMACS PBS/EDTA Buffer.
Wash Waste Bag	Sběrný vak, ve kterém se shromažďuje promývací supernatant separací od sedimentované buněčné suspenze po krocích centrifugace během přípravy vzorku
WBC	Bílé krvinky (White Blood Cells)
Značení	Reakce buněk s reagencií pro magnetické značení, např. CliniMACS CD34 Reagent na pozitivní buňky CD34

3 Varování a preventivní opatření

Tato kapitola vysvětluje potenciální rizika spojená s provozem systému CliniMACS Plus. Po celou dobu musí být dodržovány místní bezpečnostní pokyny, zásady, normy týkající se správné výrobní praxe, zdraví, bezpečnosti a prevence nehod. Pokyny k použití, např. varování a bezpečnostní opatření týkající se manipulace s biologicky nebezpečnými materiály a buněčným výchozím produktem, jakož i komponentami systému CliniMACS Plus, naleznete v příslušných částech návodu k použití příslušné komponenty. Podrobný návod k použití pro přístroj CliniMACS Plus Instrument je uveden v uživatelské příručce přístroje CliniMACS Plus Instrument.

Jakoukoliv závažnou nežádoucí příhodu, která se vyskytne v souvislosti s tímto výrobkem, je zapotřebí hlásit společnosti Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG – při využití uvedených kontaktních informací – a kompetentnímu orgánu členského státu, v němž uživatel tohoto výrobku působí.

3.1 Týkající se procesu

⚠ VAROVÁNÍ

Riziko selhání procesu nebo poškození přístroje. Riziko selhání procesu nebo poškození přístroje, pokud postupy provádí neškolená obsluha. Všechny procesní postupy smí provádět pouze vyškolená obsluha. Školení obsluhy zajistí kvalifikovaný zástupce společnosti Mitenyi Biotec.

⚠ UPOZORNĚNÍ

Riziko snížené výkonnosti procesu. Teploty nižší nebo vyšší než teplota místnosti mohou mít za následek nižší životaschopnost, čistotu a výtěžek cílových buněk. Přípravu vzorku a separaci buněk provádějte při pokojové teplotě (+19 °C až +25 °C [+66 °F až +77 °F]).

⚠ UPOZORNĚNÍ

Bezpečnost zařízení může být narušena. Bezpečnost zařízení může být narušena, pokud přístroj nebude použito podle pokynů výrobce. Pečlivě si přečtěte a seznamte se s bezpečnostními informacemi, varováními, preventivními opatřeními a pokyny pro správnou funkci systému CliniMACS Plus uvedené v tomto návodu k použití CliniMACS Plus a ve všech doporučeních týkajících se bezpečnosti vydaných společností Miltenyi Biotec.

- Pro výrobu a používání cílových buněk u lidí musí být dodržována národní legislativa a předpisy – např. pro EU směrnice 2004/23/ES (lidské tkáně a buňky) nebo směrnice 2002/98/ES (lidská krev a krevní složky). Proto za jakékoliv klinické použití cílových buněk výlučně odpovídá uživatel systému CliniMACS Plus.
- Se všemi materiály, které přišly do kontaktu s krví a krevními deriváty, se musí být zacházeno jako s infekčním materiálem. Je třeba dodržovat předpisy pro zacházení s infekčním materiálem.

- Veškeré hadice, armatury, ventily, předřazená kolona a oddělovací kolona by měly být během plnicího kroku důkladně zkontrolovány na těsnost.
- Všechny vaky, včetně vaků použitých při přípravě vzorku, by měly být uchovány, dokud nebude dokončena konečná analýza všech buněk a nebude potvrzeno úspěšné oddělení cílových buněk.

3.2 Reagencie a biotinové konjugáty CliniMACS

- Když je frakce cílových buněk podána infuzí nebo injekcí pacientům, mohou dostat stopy myší protilátky a železo-dextran.
- Železo-dextranové kuličky a/nebo myší protilátky mohou u pacientů způsobit alergické nebo anafylaktické reakce. K dispozici by mělo být vybavení intenzivní péče a léky.
- Separaci buněk pomocí reagencií a biotinových konjugátů CliniMACS smí provádět pouze školená obsluha.
- Obsluha používající reagencie CliniMACS a biotinové konjugáty má zkušenosti se separací buněk z kostní dřeně nebo periferní krve.
- Necílové buňky nejsou určeny pro terapeutické použití a nemohou být pacientům podávány opakovanou infuzí.
- Reagencie a biotinové konjugáty CliniMACS jsou určeny pouze k použití *in vitro* a nejsou určeny k léčebnému použití nebo pro přímou infuzi pacientům.
- Použití reagencií a biotinových konjugátů CliniMACS se nedoporučuje u pacientů se známou citlivostí vůči myším imunoglobulinům či železu-dextranu nebo s podezření na ni.
- U pacientů se mohou vyvinout lidské anti-myší protilátky (HAMA).
- Nepoužívejte po datu použitelnosti uvedeném na štítku produktu.
- Nepoužívejte, jestliže je obal výrobku poškozený. Reagencii používejte, pouze pokud je injekční lahvička nepoškozená a zapečetěná.

3.3 Zacházení s biologicky nebezpečným materiálem

⚠ VAROVÁNÍ

Riziko závažného poranění či úmrtí. V závislosti na použitém biologickém materiálu může kontakt vést k závažnému poranění či úmrtí osob. Vždy noste osobní bezpečnostní vybavení v souladu s varováními a preventivními opatřeními, zvláště v případě, že se používá či používal biologicky nebezpečný materiál.

- Aby se zabránilo kontaminaci buněčného výchozího produktu, měly by být všechny kroky přípravy prováděny za sterilních podmínek pomocí aseptických technik (např. v digestoři s laminárním tokem).
- Pracovník provádějící separaci buněk musí být vyškolen v správném používání zařízení a zacházení s krevními produkty a aspiráty kostní dřeně.
- Pracovník provádějící separaci buněk by měl při práci se vzorkem pacienta a při zacházení s potenciálně biologicky nebezpečným materiálem nosit vhodný oděv (např. laboratorní plášť, rukavice a ochranné štíty nebo brýle).
- Se všemi krevními produkty je třeba zacházet jako s potenciálním biologickým nebezpečím. S produktem leukaferézy, krevním produktem, aspirátem kostní dřeně, odebranými buňkami, použitým pufrem, použitou sadou hadiček a dalšími materiály, které byly v kontaktu s těmito tekutinami, je třeba zacházet jako s biologicky nebezpečnými materiály podle standardních nemocničních nebo institucionálních požadavků.
- Přístroj CliniMACS Plus Instrument by měl být považován za potenciální biologické riziko po každém separačním běhu a měl by být vyčištěn vodným biocidním detergentem (např. Bacillol® plus nebo Meliseptol®, viz také bod „Čištění a údržba“ v uživatelské příručce přístroje CliniMACS Plus Instrument) podle standardních nemocničních nebo institucionálních požadavků.
- S jednorázovými materiály musí být zacházeno podle standardních nemocničních nebo institucionálních požadavků pro biologicky nebezpečné materiály.

3.4 Buněčný výchozí produkt

DŮLEŽITÉ

Označení a separace buněk by měla začít co nejdříve poté, co byl odebrán buněčný výchozí produkt. Při zahájení postupu označování a separace by produkt neměl být starší než 24 hodin.

- Buněčný výchozí produkt (např. produkt leukaferézy) by měl být odebírán podle standardních nemocničních nebo institucionálních postupů ve standardních odběrových vacích.
- Kontejner obsahující buněčný výchozí produkt by měl být označen identifikací pacienta, časem, datem a místem odběru podle postupů stanovených pro použití v souladu s klinickým protokolem.
- Pro přepravu by měl být výchozí buněčný produkt zabalen do izolovaných nádob a skladován při pokojové teplotě (+19 °C až +25 °C [+66 °F až +77 °F]) podle standardních postupů k odběru krve v nemocnici nebo v zdravotnickém zařízení schválených pro použití s klinickým protokolem. Neuchovávejte v chladničce. Buněčná koncentrace by během přepravy neměla překročit $0{,}2\times10^9$ buněk na mL.
- Zabraňte intenzivnímu míchání buněčného výchozího materiálu.
- Pokud se má buněčný výchozí produkt uchovávat, např. přes noc, je třeba jej skladovat při kontrolované teplotě místnosti (+19 °C až +25 °C [+66 °F až +77 °F]). Během skladování by koncentrace leukocytů nikdy neměla překročit $0{,}2\times10^9$ buněk na mL.
- Buňky je zapotřebí skladovat v autologní plazmě. Pokud bude koncentrace buněk vyšší než $0{,}2\times10^9$ buněk na mL, naředťe buněčný výchozí produkt autologní plazmou.

4 Systém CliniMACS Plus

Systém CliniMACS Plus, skládající se ze součástí přístroje CliniMACS Plus Instrument, reagencií CliniMACS, hadičkové soupravy CliniMACS Tubing Set, pufru CliniMACS PBS/EDTA Buffer a dalších doplňků, které musejí být používány v kombinaci, je určen pro separaci specifických lidských buněk *in vitro* pro klinická použití.

DŮLEŽITÉ
Informace o návodu k použití, např. varování a preventivní opatření týkající se součástí systému CliniMACS Plus, najdete v návodu k použití dodávaném pro příslušnou součást.

4.1 CliniMACS Plus Instrument

Přístroj CliniMACS Plus Instrument je elektromechanické zařízení obsahující permanentní magnet, peristaltické čerpadlo, hadičkové ventily, elektroniku a software.

4.2 Reagencie a biotinové konjugáty CliniMACS

Reagencie CliniMACS jsou tmavé, neviskózní, koloidní roztoky obsahující buněčné konjugáty specifických protilátek v pufru. Reagencie obsahuje protilátku chemicky navázanou na superparamagnetické částice.

Biotinové konjugáty CliniMACS jsou čiré a bezbarvé roztoky obsahující protilátku kovalentně navázanou na biotin v pufru. Protilátky jsou vysoce specifické, umožňují značení vzácných cílových buněk *in vitro*.

4.3 Hadičkové soupravy CliniMACS

Hadičkové soupravy CliniMACS Tubing Set jsou sterilní jednorázové materiály určené k použití v kombinaci s přístrojem CliniMACS Plus Instrument k *in vitro* obohacování nebo depleci lidských buněk z heterogenních hematologických buněčných populací.

4.4 CliniMACS PBS/EDTA Buffer

Pufr CliniMACS PBS/EDTA Buffer je promývací a transportní kapalina, která umožňuje separaci lidských buněk.

4.5 Příslušenství CliniMACS

- **sada pro přenos plazmy:**
  přenosová sada se dvěma kolíky pro plazmu nebo tekutiny, Transfer Set Coupler/Coupler (REF 200-073-902), nebo ekvivalent
- **Luer/Spike Interconnector:**
  přenosová souprava s propichovacím kolíkem a adaptérem stříkačky (zásuvka luer) pro plazmu nebo tekutiny, Luer/Spike Interconnector (REF 200-073-903), nebo ekvivalent

4.6 Další potřebné materiály

Kromě výrobků CliniMACS mohou být pro separaci CliniMACS Plus zapotřebí ještě další materiály.

- **vaky pro buněčnou kulturu, permeabilní pro plyn:**
  Vak MACS GMP Cell Differentiation Bag – 100 mL (REF 170-076-400), nebo ekvivalent
- **přenosové vaky vhodné pro centrifugaci:**
  přenosový vak 150 mL, Terumo nebo ekvivalent
  přenosový vak 600 mL, Terumo nebo ekvivalent
  přenosový vak 1000 mL, Terumo nebo ekvivalent
- **spojka pro odběr vzorků na stanovišti:**
  spojka pro odběr vzorků na stanovišti, Terumo nebo ekvivalent
- **předřazený systémový filtr:**
  filtr pro transfúzi krve, Haemonetics® nebo ekvivalent
- **stříkačky a jehly:**
  vhodné injekční stříkačky (5 mL, 10 mL, 20 mL, 50 mL) a hypodermické jehly o velikosti 20
- **uzavírací kleště**
- **zkumavky vzorků**
- **lidský sérový albumin (HSA):**
  HSA pro použití pouze ve farmacii, který je schváleným přípravkem v zemi uživatele.
- **imunoglobulin G pro klinické použití:**
  Použijte IgG pro použití pouze ve farmacii, který je schváleným přípravkem v zemi uživatele, např. Německo: Gamunex® 10% nebo ekvivalent.
- **médium s buněčnou kulturou:**
  např. RPMI 1640 nebo ekvivalent
- **materiály specifické pro použití:**
  individuální biotinylovaná buněčná specifická protilátka nebo ligand; AB sérum nebo alternativně autologní sérum

4.7 Požadované vybavení

- **nepřerušitelný elektrický přívod:**
  doporučené zdroje UPS: APC Smart-UPS 1500 VA USB & Serial 230 V, výrobce APC (American Power Conversion) nebo ekvivalent
- **digestoř s laminárním tokem**
- **sterilní konektor hadiček**
  Sterilní připojovací zařízení Terumo (TSCD®) nebo ekvivalent
- **orbitální rotátor:**
  Plošinové třepačky Heidolph Instruments nebo ekvivalent
- **odstředivka:**
  Centrifuga Sorvall nebo ekvivalent a nádobky na odstřeďování s aerosolovými uzávěry
- **extraktor plazmy:**
  Stojan na separaci plazmy, zařízení Terumo nebo ekvivalent
- **stolní váhy:**
  Laboratorní váhy, Mettler Toledo nebo ekvivalent, s kapacitou 1 kg, rozlišení 0,1 g
- **tepelné svařovací zařízení hadiček:**
  ruční svařovací zařízení Hematron III, Baxter nebo ekvivalent
- **odstraňovač hadiček:**
  Odstraňovač hadiček, Baxter nebo ekvivalent
- **nádoby na biologicky nebezpečný odpad**

Přídatné vybavení požadované pro systém CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma):

- nádobka pro pěstování kultur s 24 jamkami Corning™ Costar™, deska pro pěstování kultur s 24 jamkami Sigma Aldrich nebo ekvivalent
- MiniMACS™ Separation Unit, Miltenyi Biotec (REF 130-042-102)
- MS Columns, Miltenyi Biotec (REF 130-042-201)
- Pre-Separation Filter, Miltenyi Biotec (REF 130-041-407)
- MACSmix™ Tube Rotator, Miltenyi Biotec (REF 130-090-753)

5 Přehled použití

5.1 Čtyři KROKY k cílovým buňkám

V následující kapitole je uveden přehled týkající se separace CliniMACS Plus. Separace CliniMACS Plus se provádí ve čtyřech KROCÍCH. V prvním kroku se buňky připraví a magneticky označí. Ve druhém kroku se zvolí vhodný separační program. Ve třetím kroku se sada hadiček nainstaluje na přístroj CliniMACS Plus Instrument a ve čtvrtém kroku se buňky automaticky oddělí.

Může být vyžadován záznam procesních dat souvisejících s aplikací. Ohledně podpůrných pracovních listů kontaktujte Miltenyi Biotec Technical Support.

Uživatelská příručka pro aplikace CliniMACS Plus obsahuje různé možnosti pro každý krok (odlišné reagencie, hadičkové soupravy a programy). Před spuštěním aplikace je třeba vybrat kapitoly specifické pro aplikaci (kapitola 6) a podrobné vysvětlení KROKŮ 1–4 (kapitola 7) pomocí přehledové tabulky začínající na další stránce. Přehledová tabulka obsahuje informace o příslušných částech uživatelské příručky. Přehledová tabulka vychází z druhu a počtu reagencií, počtu buněk, typu hadičkové soupravy a příslušného separačního programu potřebného pro separaci.

KROK 1: Příprava buněk a magnetické značení

KROK 1 popisuje přípravu buněčného produktu a magnetické značení specifických buněk exprimujících příslušný antigen. Postupujte podle pokynů v příslušné části. Pokračujte KROKEM 2.

KROK 2: Volba separačního programu

KROK 2 popisuje výběr separačního programu přístroje CliniMACS Plus Instrument. V závislosti na typu buňky a počtu buněk, které mají být odděleny, musí být vybrány různé programy. Chcete-li určit, který program je použitelný, přejděte na přehledovou tabulku na další stránce. Přečtěte si příslušnou část pro vybraný separační program. Postupujte podle pokynů uvedených v příslušné části. Pokračujte KROKEM 3.

KROK 3: Instalace hadičkových souprav CliniMACS

KROK 3 vysvětluje instalaci hadičkové soupravy na přístroj CliniMACS Plus Instrument. Postupujte podle pokynů v příslušné části. Pokračujte KROKEM 4.

KROK 4: Separace CliniMACS Plus

KROK 4 popisuje automatickou separaci CliniMACS Plus. Přístroj CliniMACS Plus Instrument provádí postup automatické separace buněk (vybraný v KROKU 2). Postupujte podle pokynů v příslušné části.

DŮLEŽITÉ

Přehledová tabulka na následujících stránkách shrnuje informace o typických aplikacích reagencií CliniMACS. Pokud má být provedena separace jiného počtu cílových buněk, vyhledejte informace o maximální kapacitě příslušné aplikace v pokynech v přehledu specifickém pro aplikaci. Postupujte podle pokynů v oddílech specifických pro aplikaci a podrobných vysvětlení KROKŮ 1–4. Viz přehledová tabulka.

5.2 Přehledová tabulka

Kapacita použití	Injekční lahvička(y) reagencií	Souprava hadiček	Separační program	Část specifická pro použití	Podrobné vysvětlení odstavců KROKY 1–4			
					KROK 1	KROK 2	KROK 3	KROK 4
Anti-Biotin (REF 173-01) – obohacení								
≤40×10^9 buněk celkem	1× reagencie proti biotinu	1× souprava 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) – deplece (použití v normálním měřítku)								
≤40×10^9 buněk celkem	1× reagencie proti biotinu	1× souprava 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) – deplece (použití ve velkém měřítku)								
>40–80×10^9 buněk celkem	2× reagencie proti biotinu	1× souprava 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) – obohacení								
Buňky vylučující IFN z celkem ≤1×10^9 buněk	1 sada (2 injekční lahvičky reagencií)	1× souprava 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) – deplece – část 1 ze 2								
≤5×10^9 CD19 pozitivních buněk z ≤40×10^9 celkových buněk (WBC)	1× CD19 reagencie a 1× CD1c (BDCA-1)-Biotin	1× souprava 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) – obohacení – část 2 ze 2								
≤0,2×10^9 CD1c (BDCA-1) pozitivních buněk z ≤40×10^9 celkových buněk (WBC)	1× reagencie proti biotinu	1× souprava 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) – deplece (použití v normálním měřítku)								
≤15×10^9 CD3 pozitivních buněk z ≤40×10^9 celkových buněk	1× CD3 reagencie	1× souprava 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) – deplece (použití ve velkém měřítku)								
>15–20×10^9 CD3 pozitivních buněk z >40–80×10^9 celkových buněk	2× CD3 reagencie	1× souprava CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01)	DEPLETION 2.1	6.5	7.1	7.2.5	7.3.1	7.4.4

Kapacita použití	Injekční lahvička(y) reagencií	Souprava hadiček	Separační program	Část specifická pro použití	Podrobné vysvětlení odstavců KROKY 1–4			
					KROK 1	KROK 2	KROK 3	KROK 4
CD3 (REF 273-01) – deplece (použití v normálním měřítku)								
≤15×10^9 CD3 pozitivních buněk z ≤40×10^9 celkových buněk	1× CD3 reagencie	1× souprava 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) – deplece (použití ve velkém měřítku)								
>15–30×10^9 CD3 pozitivních buněk z >40–80×10^9 celkových buněk	2× CD3 reagencie	1× souprava 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) – obohacení								
≤5×10^9 CD4 pozitivních buněk z ≤40×10^9 celkových buněk	1× CD4 reagencie	1× souprava 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) – deplece								
≤12×10^9 CD4 pozitivních buněk z ≤40×10^9 celkových buněk	1× CD4 reagencie	1× souprava 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) – obohacení								
≤4×10^9 CD8 pozitivních buněk z ≤40×10^9 celkových buněk	1× CD8 reagencie	1× souprava 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) – deplece								
≤4×10^9 CD8 pozitivních buněk z ≤40×10^9 celkových buněk	1× CD8 reagencie	1× souprava CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01)	DEPLETION 2.1	6.8	7.1	7.2.5	7.3.1	7.4.4
Kombinace CD4/CD8 (REF 276-01/REF 275-01) – deplece								
≤12×10^9 CD4 pozitivních buněk a ≤4×10^9 CD8 pozitivních buněk z ≤40×10^9 celkových buněk	1× CD4 reagencie a 1× CD8 reagencie	1× souprava 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) – obohacení								
≤4×10^9 CD14 pozitivních buněk z ≤20×10^9 celkových buněk	1× CD14 reagencie	1× souprava 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) – deplece								
≤5×10^9 CD19 pozitivních buněk z ≤40×10^9 celkových buněk	1× CD19 reagencie	1× souprava CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01)	DEPLETION 2.1	6.6	7.1	7.2.5	7.3.1	7.4.4

Kapacita použití	Injekční lahvička(y) reagencií	Souprava hadiček	Separační program	Část specifická pro použití	Podrobné vysvětlení odstavců KROKY 1–4			
					KROK 1	KROK 2	KROK 3	KROK 4
Kombinace CD3/CD19 (REF 273-01/REF 179-01) – deplece								
≤15×10^9 CD3 pozitivních buněk a ≤5×10^9 CD19 pozitivních buněk z ≤40×10^9 celkových buněk	1× CD3 reagencie a 1× CD19 reagencie	1× souprava 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) – obohacení								
≤0,6×10^9 CD25 pozitivních buněk z ≤40×10^9 celkových buněk (WBC)	1× CD25 reagencie	1× souprava 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) – obohacení								
≤0,6×10^9 CD25 pozitivních buněk s vysokou exprimací z ≤40×10^9 celkových buněk (WBC)	1× CD25 reagencie	1× souprava 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) – deplece (použití v normálním měřítku)								
≤6×10^9 CD25 pozitivních buněk z ≤40×10^9 celkových buněk (WBC)	1× CD25 reagencie	1× souprava 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) – deplece (použití ve velkém měřítku)								
>6–12×10^9 CD25 pozitivních buněk z >40–80×10^9 celkových buněk (WBC)	2× CD25 reagencie	1× souprava 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) – obohacení (použití v normálním měřítku)								
≤0,6×10^9 CD34 pozitivních buněk z ≤60×10^9 celkových buněk	1× CD34 reagencie	1× souprava 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) – obohacení (použití ve velkém měřítku)								
>0,6–1,2×10^9 CD34 pozitivních buněk z >60–120×10^9 celkových buněk	2× CD34 reagencie	1× souprava 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) – deplece								
≤20×10^9 CD45RA pozitivních buněk z ≤50×10^9 celkových buněk	1× CD45RA reagencie	1× souprava CliniMACS Depletion Tubing Set (REF 261-01)	DEPLETION 3.1	6.16	7.1	7.2.6	7.3.3	7.4.5

Kapacita použití	Injekční lahvička(y) reagencií	Souprava hadiček	Separační program	Část specifická pro použití	Podrobné vysvětlení odstavců KROKY 1–4			
					KROK 1	KROK 2	KROK 3	KROK 4
CD56 (REF 271-01) – obohacení								
≤5×10^9 CD56 pozitivních buněk z ≤40×10^9 celkových buněk	1× CD56 reagencie	1× souprava 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) – obohacení								
≤0,2×10^9 CD304 (BDCA-4) pozitivních buněk z ≤40×10^9 celkových buněk	1× CD304 (BDCA-4) reagencie	1× souprava 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) – deplece								
≤24×10^9 TCRα/β pozitivních buněk z ≤60×10^9 celkových buněk	1× TCRα/β-biotin a 2× reagencie proti biotinu	1× souprava CliniMACS Depletion Tubing Set (REF 261-01)	DEPLETION 3.1	6.15	7.1	7.2.6	7.3.3	7.4.5

Tabulka 5.1: Přehled dostupných použití s odpovídajícími sadami hadiček a separačními programy

6 Přehled KROKŮ 1–4 pro konkrétní aplikaci

6.1 Obohacení CD34 pozitivními buňkami

Systém CliniMACS Plus CD34 včetně přístroje CliniMACS Plus Instrument, reagencie CliniMACS CD34 Reagent, sady hadiček CliniMACS Tubing Set nebo sady hadiček CliniMACS Tubing Set LS a pufru CliniMACS PBS/EDTA Buffer je určen pro *in vitro* obohacení lidských CD34 pozitivních hematopoetických progenitorových buněk z heterogenních hematologických buněčných populací.

6.1.1 KROK 1: Příprava buněk a magnetické značení

Vyžadované první činnosti

Kapacita použití

- Použití v normálním měřítku: až $0{,}6\times10^9$ CD34 pozitivních buněk z až 60×10^9 celkových buněk (WBC)
- Použití ve velkém měřítku: více než $0{,}6\times10^9$ a až $1{,}2\times10^9$ CD34 pozitivních buněk z až 120×10^9 celkových buněk (WBC)

⚠ UPOZORNĚNÍ

Riziko provedení nedostatečné separace označených buněk. Při překročení specifikací použití existuje riziko nedostatečného specifického označení. Použijte požadované množství buněk a reagencie, jak je popsáno pro příslušnou aplikaci.

Potřebné materiály CliniMACS

Materiál	Katalogové číslo	Množství	Separační program
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1	–
CliniMACS CD34 Reagent	171-01	• 1 injekční lahvička (normální rozsah) • 2 injekční lahvičky (velký rozsah)	–
Souprava CliniMACS Tubing Set	161-01	1 hadičková souprava	CD34 SELECTION 1
Souprava CliniMACS Tubing Set LS	162-01	1 hadičková souprava	CD34 SELECTION 2
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	Vaky 3× 1000 mL[1]	–

1 Před použitím doplňte pufr CliniMACS PBS/EDTA Buffer pomocí HSA na konečnou koncentraci 0,5 % (hm./obj.)

Tabulka 6.1: Materiály CliniMACS potřebné pro obohacení CD34 pozitivních buněk

Další potřebné materiály

- **Cell Preparation Bag:**
  jeden 600 mL přenosový vak, vhodný pro centrifugaci, dále jedna spojka pro odběrové místo a dvě sady pro přenos plazmy pro použití během procesu přípravy buněk
- **Plasma Waste Bag a Wash Waste Bags:**
  tři 600 mL přenosové vaky vhodné pro centrifugaci
- **Cell Collection Bag:**
  jeden 150 mL přenosový vak v kombinaci s propojovací spojkou Luer/Spike Interconnector pro připojení vaku Cell Collection Bag k soupravě hadiček
- jeden předřazený systémový filtr
- uzavírací kleště
- vhodné injekční stříkačky (různé velikosti) a hypodermické jehly o velikosti 20
- lidský sérový albumin (HSA) pro přidání k pufru Pufr CliniMACS PBS/EDTA Buffer na koncovou koncentraci 0,5 % (hm./obj.)
- zkumavky vzorků

▶ Příprava vaků

Určete hmotnost prázdného vaku Cell Collection Bag a vaku Cell Preparation Bag, jak je popsáno v bodě 7.1.1 na straně 119.

Magnetické značení buněk

Podrobný popis následujících kroků naleznete v bodě 7.1 „KROK 1: Příprava buněk a magnetické značení“ na straně 119.

▶ Analýza buněčného výchozího produktu

▶ Přenos výchozího buněčného produktu do vaku Cell Preparation Bag

Pokud je hmotnost výchozího buněčného produktu vyšší než 200 g, ale počet buněk je nižší než 120×10^9 celkových buněk a $1{,}2\times10^9$ CD34 pozitivních buněk, centrifugujte vzorek, abyste snížili objem na maximálně 200 g, a poté pokračujte následujícími kroky.

▶ Naředění buněčného výchozího produktu

Přidejte pufr: Hmotnost pufru, který se má přidat = hmotnost buněčného výchozího produktu × 2

▶ Odstřeďování

Centrifugujte při 200×g, bez brzdy, 15 minut, pokojová teplota (RT: +19 °C až +25 °C [+66 °F až +77 °F]).

▶ **Úprava objemu: objem značení 95 g (±5 g) (použití v normálním měřítku) nebo 190 g (±5 g) (použití ve velkém měřítku)**

1. Odeberte supernatant a upravte vzorek pomocí následující rovnice: Hmotnost supernatantu, který má být odstraněn = hmotnost naředěného buněčného produktu – objem značení
2. Buněčné pelety resuspendujte.

▶ **Inkubace reagencií CliniMACS CD34 Reagent**

1. Přidejte 1 nebo 2 injekční lahvičky reagencie CliniMACS CD34 Reagent (viz Tabulka 6.1). Obsah jemně promíchejte.
2. Inkubujte na orbitálním rotátoru (25 ot/min) 30 minut při pokojové teplotě.

▶ **Odstranění přebytečné reagencie**

1. Naplňte pufrem vak Cell Preparation Bag.
2. Centrifugujte (200×g, bez brzdy, 15 minut, pokojová teplota).
3. Odstraňte co nejvíce supernatantu. **Poznámka:** Odstraňte nejméně 500 g supernatantu. Pokud je odstraněno méně supernatantu než tyto hodnoty, doporučují se celkem tři promývací kroky (místo pouze dvou). Jinak může být odstranění nenavázané reagencie nedostatečné.
4. Buněčné pelety resuspendujte.
5 Naplňte pufrem vak Cell Preparation Bag.
6. Centrifugujte (200×g, bez brzdy, 15 minut, pokojová teplota).
7. Odstraňte co nejvíce supernatantu.
8. Buněčné pelety resuspendujte.
9. Upravte objem vzorku na 150 g (aplikace v běžném měřítku) nebo 275 g (aplikace ve velkém měřítku).

Poznámka: Po odstranění přebytečného činidla odeberte vzorek pro pozdější analýzu (volitelné).

6.1.2 KROK 2: Volba separačního programu

▶ **Zapněte přístroj CliniMACS Plus Instrument.**

▶ **Volba separačního programu CD34 SELECTION 1/2**
(použití 1 injekční lahvičky: CD34 SELECTION 1, nebo použití 2 injekčních lahviček: CD34 SELECTION 2)

Viz bod 7.2.2 na straně 132.

6.1.3 KROK 3: Instalace hadičkových souprav CliniMACS

- **Souprava CliniMACS Tubing Set a CliniMACS Tubing Set LS**

Viz bod 7.3.1 na straně 151.

6.1.4 KROK 4: Separace CliniMACS Plus

- **Provedení separace**
- **Odpojení vaků a zaznamenání procesního kódu**
- **Vyjměte sadu hadiček a vypněte**
- **Analýza buněk**

Viz bod 7.4.1 na straně 185.

6.2 Obohacení CD14 pozitivními buňkami

Systém CliniMACS Plus CD14 včetně přístroje CliniMACS Plus Instrument, reagencie CliniMACS CD14 Reagent, sady hadiček CliniMACS Tubing Set a pufru CliniMACS PBS/EDTA Buffer je určen pro *in vitro* obohacení lidských CD14 pozitivních z heterogenních hematologických buněčných populací.

6.2.1 KROK 1: Příprava buněk a magnetické značení

Vyžadované první činnosti

Kapacita použití

Až 4×10^9 CD14 pozitivních buněk z až 20×10^9 celkových buněk (WBC)

⚠ UPOZORNĚNÍ

Riziko provedení nedostatečné separace označených buněk. Při překročení specifikací použití existuje riziko nedostatečného specifického označení. Použijte požadované množství buněk a reagencie, jak je popsáno pro příslušnou aplikaci.

Potřebné materiály CliniMACS

Materiál	Katalogo-vé číslo	Množství
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS CD14 Reagent	272-01	1 injekční lahvička
Souprava CliniMACS Tubing Set	161-01	1 hadičková souprava
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	Vaky 3×1000 mL[1]

1 Viz Tabulka 6.3 až Tabulka 6.4. Před použitím doplňte pufr CliniMACS PBS/EDTA Buffer pomocí HSA na konečnou koncentraci 0,5 % (hm./obj.)

Tabulka 6.2: Materiály CliniMACS potřebné pro obohacení CD14 pozitivních buněk

Další potřebné materiály

- **Cell Preparation Bag:**
  jeden 600 mL přenosový vak, vhodný pro centrifugaci, dále jedna spojka pro odběrové místo a jedna sada pro přenos plazmy pro použití během procesu přípravy buněk
- **Plasma Waste Bag a Wash Waste Bag:**
  dva 600 mL přenosové vaky vhodné pro centrifugaci
- **Cell Collection Bag:**
  jeden 150 mL nebo jeden 600 mL přenosový vak v kombinaci s propojovací spojkou Luer/Spike Interconnector pro připojení vaku Cell Collection Bag k soupravě hadiček (viz Tabulka 6.4)
- **V případě, že je nezbytná náhrada vaků Negative Fraction Bag a Buffer Waste Bag:**
  dva 1000 mL přenosové vaky v kombinaci se dvěma propojovacími spojkami Luer/Spike Interconnector pro připojení vaků k soupravě hadiček (viz Tabulka 6.4)
- **Pokud je pro separaci zapotřebí více než jeden litr pufru:**
  jedna sada pro přenos plazmy pro připojení vaků na pufr (viz Tabulka 6.4)
- jeden předřazený systémový filtr
- uzavírací kleště
- vhodné injekční stříkačky (různé velikosti) a hypodermické jehly o velikosti 20

Přehled požadovaných materiálů

Příprava buněk	
Buňky celkem (WBC)	≤20×10^9
Označené buňky	≤4×10^9
Počet injekčních lahviček s reagenciemi	1–2
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 mL
Sada pro přenos plazmy	1

Tabulka 6.3: Materiál potřebný pro přípravu buněk CD14 pozitivních buněk

Separace		
Označené buňky	≤2×10^9	>2–4×10^9
Negative Fraction Bag	–	Nahraďte originální vaky hadičkové soupravy 1000 mL přenosovými vaky
Buffer Waste Bag	–	
Priming Waste Bag	–	–
Cell Collection Bag	150 mL	600 mL
Luer/Spike Interconnector	1	3
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 mL	2000 mL
Sada pro přenos plazmy	–	1

Tabulka 6.4: Materiály potřebné pro obohacení CD14 pozitivních buněk

▶ Příprava vaků

Určete hmotnost prázdného vaku Cell Collection Bag a vaku Cell Preparation Bag, jak je popsáno v bodě 7.1.1 na straně 119.

Magnetické značení buněk

Podrobný popis následujících kroků naleznete v bodě 7.1 „KROK 1: Příprava buněk a magnetické značení“ na straně 119.

▶ Analýza buněčného výchozího produktu

▶ Přenos výchozího buněčného produktu do vaku Cell Preparation Bag

▶ Naředění buněčného výchozího produktu

Přidejte pufr: Hmotnost pufru, který se má přidat = 600 g – hmotnost buněčného výchozího produktu

▶ Odstřeďování

Centrifugujte při 300×g, bez brzdy, 15 minut, pokojová teplota pokojová teplota (RT: +19 °C až +25 °C [+66 °F až +77 °F]

▶ Úprava objemu: objem značení 50 g (±5 g)

1. Odeberte supernatant a upravte vzorek pomocí následující rovnice: Hmotnost supernatantu, který má být odstraněn = hmotnost naředěného buněčného výchozího produktu – objem značení
2. Buněčné pelety resuspendujte.

▶ Inkubace reagencií CliniMACS CD14 Reagent

1. Přidejte 1 injekční lahvičku reagencie CliniMACS CD14 Reagent. Obsah jemně promíchejte.
2. Inkubujte na orbitálním rotátoru (25 ot/min) 15 minut při pokojové teplotě.

▶ **Odstranění přebytečné reagencie**

1. Naplňte pufrem vak Cell Preparation Bag.
2. Centrifugujte (300×g, bez brzdy, 15 minut, pokojová teplota).
3. Odstraňte co nejvíce supernatantu. **Poznámka:** Odstraňte nejméně 500 g supernatantu. Pokud je odstraněno méně než 500 g supernatantu, doporučují se celkem dva promývací kroky (místo pouze jednoho). Jinak může být odstranění nenavázané reagencie nedostatečné.
4. Buněčné pelety resuspendujte.
5. Upravte objem naplnění vzorkem na 100 g.

Poznámka: Po odstranění přebytečného činidla odeberte vzorek pro pozdější analýzu (volitelné).

6.2.2 KROK 2: Volba separačního programu

▶ **Zapněte přístroj CliniMACS Plus Instrument.**

▶ **Volba separačního programu ENRICHMENT 1.1**

▶ **Vstup parametru vzorku**

Viz bod 7.2.3 na straně 134.

6.2.3 KROK 3: Instalace hadičkových souprav CliniMACS

▶ **Souprava CliniMACS Tubing Set a CliniMACS Tubing Set LS**

Viz bod 7.3.1 na straně 151.

6.2.4 KROK 4: Separace CliniMACS Plus

▶ **Provedení separace**

▶ **Odpojení vaků a zaznamenání procesního kódu**

▶ **Vyjměte sadu hadiček a vypněte**

▶ **Analýza buněk**

Viz bod 7.4.2 na straně 189.

6.3 Obohacení/deplece reagencií CliniMACS Anti-Biotin Reagent

Systém CliniMACS Plus Anti-Biotin včetně přístroje CliniMACS Plus Instrument, reagencie CliniMACS Anti-Biotin Reagent, sady hadiček CliniMACS Tubing Set nebo sady hadiček CliniMACS Tubing Set LS a pufru CliniMACS PBS/EDTA Buffer je určen pro *in vitro* obohacení nebo depleci lidských buněk již dříve označených biotinylovanými protilátkami.

6.3.1 KROK 1: Příprava buněk a magnetické značení

Vyžadované první činnosti

Kapacita použití

- **Obohacení:** až 40×10^9 celkových buněk (WBC)
- **Deplece:**
  Použití v normálním měřítku: až 40×10^9 celkových buněk (WBC)
  Použití ve velkém měřítku: více než 40×10^9 a až 80×10^9 celkových buněk (WBC)

⚠ UPOZORNĚNÍ

Riziko provedení nedostatečné separace označených buněk. Při překročení specifikací použití existuje riziko nedostatečného specifického označení. Použijte požadované množství buněk a reagencie, jak je popsáno pro příslušnou aplikaci.

Potřebné materiály CliniMACS

Materiál	Katalogové číslo	Množství	Separační program
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1	–
CliniMACS Anti-Biotin Reagent	173-01	• 1 injekční lahvička (normální rozsah) • 2 injekční lahvičky (velký rozsah)	–
Souprava CliniMACS Tubing Set	161-01	1 hadičková souprava	ENRICHMENT 1.1
Souprava CliniMACS Tubing Set LS	162-01	1 hadičková souprava	DEPLETION 2.1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	• 3×1000 mL vaky1 (normální rozsah) • 4×1000 mL vaky1 (velký rozsah)	–

1 Množství pufru se liší v závislosti na zvoleném separačním programu a počtu značených buněk (viz Tabulka 6.6 až Tabulka 6.9). Před použitím doplňte pufr CliniMACS PBS/EDTA Buffer pomocí HSA na konečnou koncentraci 0,5 % (hm./obj.)

Tabulka 6.5: Materiály CliniMACS požadované pro obohacení/depleci reagencií CliniMACS Anti-Biotin Reagent

Další potřebné materiály

- **Cell Preparation Bag:**
  jeden 600 mL přenosový vak, vhodný pro centrifugaci, dále jedna spojka pro odběrové místo a dvě sady pro přenos plazmy pro použití během procesu přípravy buněk
- **Plasma Waste Bag a Wash Waste Bag:**
  dva 600 mL přenosové vaky vhodné pro centrifugaci
- **Cell Collection Bag:**
  jeden 600 mL nebo jeden 1000 mL přenosový vak v kombinaci s propojovací spojkou Luer/Spike Interconnector pro připojení vaku Cell Collection Bag k soupravě hadiček (viz Tabulka 6.7 a Tabulka 6.9)
- **V případě, že je nezbytná náhrada vaků Negative Fraction Bag, Buffer Waste Bag a Priming Waste Bag:**
  dva až tři 1000 mL přenosové vaky v kombinaci se dvěma propojovacími spojkami Luer/Spike Interconnector pro připojení vaků k soupravě hadiček (viz Tabulka 6.7 a Tabulka 6.9).
  Vyměňte vak Priming Waste Bag pomocí sterilního konektoru hadiček.
- **Pokud je pro separaci zapotřebí více než jeden litr pufru:**
  jedna až dvě sady pro přenos plazmy pro připojení vaků na pufr (viz Tabulka 6.7 a Tabulka 6.9)
- jeden předřazený systémový filtr
- uzavírací kleště
- vhodné injekční stříkačky (různé velikosti) a hypodermické jehly o velikosti 20
- lidský sérový albumin (HSA) pro přidání k pufru Pufr CliniMACS PBS/EDTA Buffer na koncovou koncentraci 0,5 % (hm./obj.)
- zkumavky vzorků
- individuální biotinylovaná buněčná specifická protilátka nebo ligand

Přehled materiálů

Příprava buněk (ENRICHMENT 1.1)	
Buňky celkem (WBC)	$\leq 40 \times 10^9$
Počet injekčních lahviček s reagenciemi	1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	2000 mL
Sada pro přenos plazmy	2

Tabulka 6.6: Materiály potřebné pro přípravu buněk (ENRICHMENT 1.1)

Separace (ENRICHMENT 1.1)		
Označené buňky	≤2×10^9	>2–5×10^9
Negative Fraction Bag	–	Nahraďte originální vaky hadičkové soupravy 1000 mL přenosovými vaky
Buffer Waste Bag	–	
Priming Waste Bag	–	–
Cell Collection Bag	600 mL	600 mL
Luer/Spike Interconnector	1	3
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 mL	2000 mL
Sada pro přenos plazmy	–	1

Tabulka 6.7: Materiály potřebné pro obohacení (ENRICHMENT 1.1)

Příprava buněk (DEPLETION 2.1)		
Buňky celkem (WBC)	≤40×10^9	>40–80×10^9
Počet injekčních lahviček s reagenciemi	1	2
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	2000 mL	2000 mL
Sada pro přenos plazmy	2	2

Tabulka 6.8: Materiály potřebné pro přípravu buněk (DEPLETION 2.1)

Separace (DEPLETION 2.1)			
Označené buňky	<5×10^9	5–13×10^9	>13–20×10^9
Negative Fraction Bag	–	Nahraďte originální vaky hadičkové soupravy 1000 mL přenosovými vaky	Nahraďte originální vaky hadičkové soupravy 1000 mL přenosovými vaky
Buffer Waste Bag	–		
Priming Waste Bag	–	–	
Cell Collection Bag	600 mL	1000 mL	1000 mL
Luer/Spike Interconnector	1	3	4
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 mL	2000 mL	3000 mL
Sada pro přenos plazmy	–	1	2

Tabulka 6.9: Materiály potřebné pro depleci (ENRICHMENT 1.1)

▶ Příprava vaků

Určete hmotnost prázdného vaku Cell Collection Bag a vaku Cell Preparation Bag, jak je popsáno v bodě 7.1.1 na straně 119.

Magnetické značení buněk

Podrobný popis následujících kroků naleznete v bodě 7.1 „KROK 1: Příprava buněk a magnetické značení“ na straně 119.

▶ Analýza buněčného výchozího produktu

▶ Přenos výchozího buněčného produktu do vaku Cell Preparation Bag

Naředění buněčného výchozího produktu

Přidejte pufr: Hmotnost pufru, který se má přidat = hmotnost buněčného výchozího produktu × 2

Odstřeďování

1. Centrifugujte při 300×g, bez brzdy, 15 minut, pokojová teplota pokojová teplota (RT: +19 °C až +25 °C [+66 °F až +77 °F]
2. Odeberte supernatant a upravte objem pro značení primární protilátky podle doporučení výrobce primární protilátky.
3. Buněčné pelety resuspendujte.

Značení buněk: inkubace s primární protilátkou

Postupujte podle návodu k použití poskytnutého výrobcem primární protilátky.

Odstranění přebytečného konjugátu (1. promytí)

1. Přidejte pufr: Hmotnost pufru, který se má přidat = 600 g – hmotnost buněčného produktu
2. Centrifugujte při 300×g, bez brzdy, 15 minut, pokojová teplota pokojová teplota (RT: +19 °C až +25 °C [+66 °F až +77 °F]

Úprava objemu: objem značení 95 g (±5 g) (použití v normálním měřítku) nebo 190 g (±5 g) (použití ve velkém měřítku)

1. Odeberte supernatant a upravte vzorek pomocí následující rovnice: hmotnost supernatantu, který se má odebrat = hmotnost naředěného buněčného produktu – objem značení

   Poznámka: Odstraňte nejméně 500 g supernatantu. Pokud je odstraněno méně než 500 g supernatantu, doporučují se celkem dva promývací kroky (místo pouze jednoho). Jinak může být odstranění nenavázané reagencie nedostatečné.
2. Buněčné pelety resuspendujte.

Magnetické značení buněk: inkubace pomocí reagencie CliniMACS Anti-Biotin Reagent

1. Přidejte 1 nebo 2 injekční lahvičky reagencie CliniMACS Anti-Biotin Reagent (viz Tabulka 6.6 a Tabulka 6.8). Obsah jemně promíchejte.
2. Inkubujte na orbitálním rotátoru (25 ot/min) 30 minut při pokojové teplotě.

▶ **Odstranění přebytečné reagencie (2. promytí)**

1. Naplňte pufrem vak Cell Preparation Bag.
2. Centrifugujte (300×g, bez brzdy, 15 minut, pokojová teplota).
3. Odstraňte co nejvíce supernatantu. **Poznámka:** Odstraňte nejméně 500 g supernatantu. Pokud je odstraněno méně supernatantu než shora uvedená hodnota, doporučují se celkem dva promývací kroky (místo pouze jednoho). Jinak může být odstranění nenavázané reagencie nedostatečné.
4. Buněčné pelety resuspendujte.
5. Upravte objem vzorku na 100 g (aplikace v běžném měřítku) nebo 200 g (aplikace ve velkém měřítku).

Poznámka: Po odstranění přebytečného činidla odeberte vzorek pro pozdější analýzu (volitelné).

6.3.2 KROK 2: Volba separačního programu

▶ **Zapněte přístroj CliniMACS Plus Instrument.**

▶ **Volba separačního programu ENRICHMENT 1.1 nebo DEPLETION 2.1**

▶ **Vstup parametru vzorku**

Viz bod 7.2.3 na straně 134 nebo 7.2.5 na straně 141.

6.3.3 KROK 3: Instalace hadičkových souprav CliniMACS

▶ **Souprava CliniMACS Tubing Set a CliniMACS Tubing Set LS**

Viz bod 7.3.1 na straně 151.

6.3.4 KROK 4: Separace CliniMACS Plus

▶ **Provedení separace**

▶ **Odpojení vaků a zaznamenání procesního kódu**

▶ **Vyjměte sadu hadiček a vypněte**

▶ **Analýza buněk**

Viz bod 7.4.2 na straně 189 a 7.4.4 na straně 197.

6.4 Obohacení CD56 pozitivními buňkami

Systém CliniMACS Plus CD56 včetně přístroje CliniMACS Plus Instrument, reagencie CliniMACS CD56 Reagent, sady hadiček CliniMACS Tubing Set a pufru CliniMACS PBS/EDTA Buffer je určen pro *in vitro* obohacení lidských CD56 pozitivních z heterogenních hematologických buněčných populací.

6.4.1 KROK 1: Příprava buněk a magnetické značení

Vyžadované první činnosti

Kapacita použití

Až 5×10^9 CD56 pozitivních buněk z až 40×10^9 celkových buněk (WBC)

⚠ UPOZORNĚNÍ

Riziko provedení nedostatečné separace označených buněk. Při překročení specifikací použití existuje riziko nedostatečného specifického označení. Použijte požadované množství buněk a reagencie, jak je popsáno pro příslušnou aplikaci.

Potřebné materiály CliniMACS

Materiál	Katalogové číslo	Množství
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS CD56 Reagent	271-01	1 injekční lahvička
Souprava CliniMACS Tubing Set	161-01	1 hadičková souprava
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	Vaky 3×1000 mL[1]

1 Viz Tabulka 6.11 a Tabulka 6.12. Před použitím doplňte pufr CliniMACS PBS/EDTA Buffer pomocí HSA na konečnou koncentraci 0,5 % (hm./obj.)

Tabulka 6.10: Materiály CliniMACS potřebné pro obohacení CD56 pozitivních buněk

Další potřebné materiály

- **Cell Preparation Bag:**
  jeden 600 mL přenosový vak, vhodný pro centrifugaci, dále jedna spojka pro odběrové místo a jedna sada pro přenos plazmy pro použití během procesu přípravy buněk
- **Plasma Waste Bag a Wash Waste Bag:**
  dva 600 mL přenosové vaky vhodné pro centrifugaci
- **Cell Collection Bag:**
  jeden 150 mL nebo 600 mL přenosový vak v kombinaci s propojovací spojkou Luer/Spike Interconnector pro připojení vaku Cell Collection Bag k soupravě hadiček (viz Tabulka 6.12)

- **V případě, že je nezbytná náhrada vaků Negative Fraction Bag a Buffer Waste Bag:**
  dva 1000 mL přenosové vaky v kombinaci se dvěma propojovacími spojkami Luer/Spike Interconnector pro připojení vaků k soupravě hadiček (viz Tabulka 6.12)
- **Pokud je pro separaci zapotřebí více než jeden litr pufru:**
  jedna sada pro přenos plazmy pro připojení vaků na pufr (viz Tabulka 6.12)
- jeden předřazený systémový filtr
- uzavírací kleště
- injekční stříkačky (různé velikosti) a hypodermické jehly o velikosti 20
- lidský sérový albumin (HSA) pro přidání k pufru Pufr CliniMACS PBS/EDTA Buffer na koncovou koncentraci 0,5 % (hm./obj.)
- zkumavky vzorků

Přehled požadovaných materiálů

Příprava buněk	
Buňky celkem (WBC)	≤40×10^9
Počet injekčních lahviček s reagenciemi	1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 mL
Sada pro přenos plazmy	1

Tabulka 6.11: Materiály potřebné pro přípravu buněk CD56 pozitivních buněk

Separace		
Označené buňky	≤2×10^9	>2–5×10^9
Negative Fraction Bag	–	Nahraďte originální vaky hadičkové soupravy 1000 mL přenosovými vaky
Buffer Waste Bag	–	
Priming Waste Bag	–	–
Cell Collection Bag	150 mL	600 mL
Luer/Spike Interconnector	1	3
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 mL	2000 mL
Sada pro přenos plazmy	–	1

Tabulka 6.12: Materiály potřebné pro obohacování CD56 pozitivních buněk

▶ Příprava vaků

Určete hmotnost prázdného vaku Cell Collection Bag a vaku Cell Preparation Bag, jak je popsáno v bodě 7.1.1 na straně 119.

Magnetické značení buněk

Podrobný popis následujících kroků naleznete v bodě 7.1 „KROK 1: Příprava buněk a magnetické značení“ na straně 119.

▶ Analýza buněčného výchozího produktu

▶ Přenos výchozího buněčného produktu do vaku Cell Preparation Bag

▶ Naředění buněčného výchozího produktu

Přidejte pufr: Hmotnost pufru, který se má přidat = 600 g – hmotnost buněčného výchozího produktu

▶ Odstřeďování

Centrifugujte při 200×g, bez brzdy, 15 minut, pokojová teplota pokojová teplota (RT: +19 °C až +25 °C [+66 °F až +77 °F]

▶ Úprava objemu: objem značení 95 g (±5 g)

1. Zcela odstraňte supernatant a dejte pozor, abyste neresuspendovali buněčnou peletu.
2. Po odstranění supernatantu buněčnou peletu opatrně resuspendujte.
3. Upravte hmotnost vaku Cell Preparation Bag (CPB) přidáním pufru podle následující rovnice: Cílová hmotnost plněného CPB = 95 g + hmotnost prázdného CPB
4. Buňky resuspendujte.

▶ Inkubace reagencií CliniMACS CD56 Reagent

1. Přidejte 1 injekční lahvičku reagencie CliniMACS CD56 Reagent. Obsah jemně promíchejte.
2. Inkubujte na orbitálním rotátoru (25 ot/min) 30 minut při pokojové teplotě.

▶ Odstranění přebytečné reagencie

1. Naplňte pufrem vak Cell Preparation Bag.
2. Centrifugujte (300×g, bez brzdy, 15 minut, pokojová teplota).
3. Odstraňte co nejvíce supernatantu. **Poznámka:** Odstraňte nejméně 500 g supernatantu. Pokud je odstraněno méně než 500 g supernatantu, doporučují se celkem dva promývací kroky (místo pouze jednoho). Jinak může být odstranění nenavázané reagencie nedostatečné.
4. Po odstranění supernatantu buněčnou peletu opatrně resuspendujte.
5. Upravte objem naplnění vzorkem na 150 g.

Poznámka: Po odstranění přebytečného činidla odeberte vzorek pro pozdější analýzu (volitelné).

6.4.2 KROK 2: Volba separačního programu

- **Zapněte přístroj CliniMACS Plus Instrument.**
- **Volba separačního programu ENRICHMENT 1.1**
- **Vstup parametru vzorku**

Viz bod 7.2.3 na straně 134.

6.4.3 KROK 3: Instalace hadičkových souprav CliniMACS

- **Souprava CliniMACS Tubing Set a CliniMACS Tubing Set LS**

Viz bod 7.3.1 na straně 151.

6.4.4 KROK 4: Separace CliniMACS Plus

- **Provedení separace**
- **Odpojení vaků a zaznamenání procesního kódu**
- **Vyjměte sadu hadiček a vypněte**
- **Analýza buněk**

Viz bod 7.4.2 na straně 189.

6.5 Deplece CD3 pozitivních buněk

Systém CliniMACS Plus CD3 včetně přístroje CliniMACS Plus Instrument, reagencie CliniMACS CD3 Reagent, sady hadiček CliniMACS Tubing Set LS nebo CliniMACS Depletion Tubing Set a pufru CliniMACS PBS/EDTA Buffer je určen pro *in vitro* depleci lidských CD3 pozitivních buněk z heterogenních hematologických buněčných populací.

6.5.1 KROK 1: Příprava buněk a magnetické značení

Vyžadované první činnosti

Kapacita použití

- Použití v normálním měřítku: až 15×10^9 CD3 pozitivních buněk z až 40×10^9 celkových buněk (WBC) využívajících buď soupravu CliniMACS Tubing Set LS, nebo soupravu CliniMACS Depletion Tubing Set
- Použití ve velkém měřítku: více než 15×10^9 a až 20×10^9 CD3 pozitivních buněk z více než 40×10^9 a až 80×10^9 celkových buněk (WBC) využívajících soupravu CliniMACS Tubing Set LS, nebo více než 15×10^9 a až 30×10^9 CD3 pozitivních buněk z více než 40×10^9 a až 80×10^9 celkových buněk (WBC) využívajících soupravu CliniMACS Depletion Tubing Set

⚠ UPOZORNĚNÍ

Riziko provedení nedostatečné separace označených buněk. Při překročení specifikací použití existuje riziko nedostatečného specifického označení. Použijte požadované množství buněk a reagencie, jak je popsáno pro příslušnou aplikaci.

Potřebné materiály CliniMACS

Materiál	Katalogové číslo	Množství	Separační program
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1	
CliniMACS CD3 Reagent	273-01	• 1 injekční lahvička (normální rozsah) • 2 injekční lahvičky (velký rozsah)	
Souprava CliniMACS Tubing Set LS	162-01	1 hadičková souprava	DEPLETION 2.1
Hadičková souprava CliniMACS Depletion Tubing Set	261-01	1 hadičková souprava	DEPLETION 3.1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	Vaky do 5×1000 mL[1]	

1 Viz Tabulka 6.14 až Tabulka 6.16. Před použitím doplňte pufr CliniMACS PBS/EDTA Buffer pomocí HSA na konečnou koncentraci 0,5 % (hm./obj.)

2 **Poznámka:** Pro vysoký počet značených buněk se doporučuje použít soupravu CliniMACS Depletion Tubing Set, aby se ušetřila doba zpracování (např. 20×10^9 značených buněk bude zpracováno do pěti hodin pomocí soupravy CliniMACS Tubing Set LS oproti dvěma hodinám pomocí soupravy CliniMACS Depletion Tubing Set).

Tabulka 6.13: Materiály CliniMACS potřebné pro depleci CD3 pozitivních buněk

Další potřebné materiály

- **Cell Preparation Bag:**
  jeden 600 mL přenosový vak, vhodný pro centrifugaci, dále jedna spojka pro odběrové místo a dvě sady pro přenos plazmy pro použití během procesu přípravy buněk
- **Plasma Waste Bag a Wash Waste Bag:**
  dva 600 mL přenosové vaky vhodné pro centrifugaci
- **Cell Collection Bag:**
  jeden až dva 600 mL přenosové vaky v kombinaci s propojovací spojkou Luer/Spike Interconnector pro připojení vaku Cell Collection Bag k soupravě hadiček

  Pokud se budou pro separaci vyžadovat dva vaky Cell Collection Bag, použijte sadu pro přenos plazmy k propojení obou vaků. Jeden 600 mL přenosový vak je již připevněn k soupravě CliniMACS Depletion Tubing Set (viz Tabulka 6.15 a Tabulka 6.16).
- **V případě, že je nezbytná náhrada vaků Negative Fraction Bag, Buffer Waste Bag a Priming Waste Bag:**
  dva až tři 1000 mL přenosové vaky v kombinaci se dvěma propojovacími spojkami Luer/Spike Interconnector pro připojení vaků k soupravě hadiček (viz Tabulka 6.15 a Tabulka 6.16)

  Vyměňte vak Priming Waste Bag pomocí sterilního konektoru hadiček.
- **Pokud je k separaci zapotřebí více než jeden litr pufru:**
  jedna až dvě sady pro přenos plazmy pro připojení vaků na pufr (viz Tabulka 6.15 a Tabulka 6.16)
- jeden předřazený systémový filtr
- uzavírací kleště
- injekční stříkačky (různé velikosti) a hypodermické jehly o velikosti 20
- lidský sérový albumin (HSA) pro přidání k pufru Pufr CliniMACS PBS/EDTA Buffer na koncovou koncentraci 0,5 % (hm./obj.)
- imunoglobulin G pro klinické použití
- zkumavky vzorků

DŮLEŽITÉ

Po zadání parametrů vzorku (KROK 2) software CliniMACS Plus vypočítá objemy, které budou odebrány ve vacích Reapplication Bag, Cell Collection Bag, Non-Target Cell Bag a Buffer Waste Bag. Pokud objem vypočtené kapaliny překročí standardní objem 500 mL, je nutná výměna vaků.

Přehled požadovaných materiálů

Příprava buněk		
Buňky celkem (WBC)	≤40×10^9	>40–80×10^9
Označené buňky	≤15×10^9	>15–30×10^9
Počet injekčních lahviček s reagenciemi	1	2
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	2000 mL	2000 mL
Sada pro přenos plazmy	2	2
Objem naplnění vzorkem	150 mL	250–300 mL

Tabulka 6.14: Materiály potřebné pro přípravu buněk CD3 pozitivních buněk

Separace (DEPLETION 2.1)			
Označené buňky	≤5×10^9	>5–13×10^9	>13–20×10^9
Negative Fraction Bag	–	Nahraďte originální vaky hadičkové soupravy 1000 mL přenosovými vaky	Nahraďte originální vaky hadičkové soupravy 1000 mL přenosovými vaky
Buffer Waste Bag	–		
Priming Waste Bag	–	–	
Cell Collection Bag	600 mL	1–2×600 mL	2×600 mL
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 mL	2000 mL	3000 mL
Luer/Spike Interconnector	1	3	3
Sada pro přenos plazmy	–	1–2	3

Tabulka 6.15: Materiály potřebné pro depleci CD3 pozitivních buněk (DEPLETION 2.1)

Separace (DEPLETION 3.1)		
Označené buňky	≤29×10^9	>29–30×10^9
Non-Target Cell Bag	Výměna vaku není zapotřebí	
Buffer Waste Bag		
Reapplication Bag		
Cell Collection Bag	–	1×600 mL (doplňkově)
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 mL	
Sada pro přenos plazmy	–	1

Tabulka 6.16: Materiály potřebné pro depleci CD3 pozitivních buněk (DEPLETION 3.1)

Poznámka: Materiály potřebné pro separaci lze také určit zapnutím přístroje CliniMACS Plus Instrument, výběrem separačního programu, který se má použít (DEPLETION 2.1 pro CliniMACS Tubing Set LS a DEPLETION 3.1 pro CliniMACS Depletion Tubing Set) a zadáním parametrů vzorku. Software CliniMACS Plus vypočítá požadované velikosti vaků, které mají být připojeny k sadě hadiček, a požadovanou hmotnost pufru.

▶ Příprava vaků

Určete hmotnost prázdného vaku Cell Collection Bag a vaku Cell Preparation Bag, jak je popsáno v bodě 7.1.1 na straně 119.

Magnetické značení buněk

Podrobný popis následujících kroků naleznete v bodě 7.1 „KROK 1: Příprava buněk a magnetické značení“ na straně 119.

▶ Analýza buněčného výchozího produktu

Určete počet všech CD3 značených buněk (včetně nespecifické vazby CD3, nejen skutečných T buněk). Toto číslo zvažte pro specifikace aplikace a vstup parametrů vzorku (viz KROK 2).

▶ Přenos výchozího buněčného produktu do vaku Cell Preparation Bag

▶ Naředění buněčného výchozího produktu

Přidejte pufr: Hmotnost pufru, který se má přidat = 600 g – hmotnost buněčného výchozího produktu

▶ Odstřeďování

Centrifugujte při 200×g, bez brzdy, 15 minut, pokojová teplota pokojová teplota (RT: +19 °C až +25 °C [+66 °F až +77 °F]

▶ Úprava objemu: objem značení 95 g (±5 g) (použití v normálním měřítku) nebo 190 g (±5 g) (použití ve velkém měřítku)

1. Zcela odstraňte supernatant a dejte pozor, abyste neresuspendovali buněčnou peletu.
2. Po odstranění supernatantu buněčnou peletu opatrně resuspendujte.
3. Upravte hmotnost vaku Cell Preparation Bag (CPB) přidáním pufru podle následující rovnice (vezměte v úvahu IgG): Cílová hmotnost plněného CPB = objem značení – hmotnost IgG + hmotnost prázdného CPB
4. Buněčné pelety resuspendujte.

▶ Inkubace pomocí imunoglobulinu G pro klinické použití

1. Přidejte IgG (1,5 mg/mL).
2. Inkubujte na orbitálním rotátoru (25 ot/min) 5 minut při pokojové teplotě.

▶ Inkubace reagencií CliniMACS CD3 Reagent

1. Přidejte 1 nebo 2 injekční lahvičky reagencie CliniMACS CD3 Reagent (viz Tabulka 6.14). Obsah jemně promíchejte.
2. Inkubujte na orbitálním rotátoru (25 ot/min) 30 minut při pokojové teplotě.

▶ **Odstranění přebytečné reagencie**

1. Naplňte pufrem vak Cell Preparation Bag.
2. Centrifugujte (300×g, bez brzdy, 15 minut, pokojová teplota).
3. Odstraňte co nejvíce supernatantu. **Poznámka:** Odstraňte nejméně 500 g supernatantu. Pokud je odstraněno méně než 500 g supernatantu, doporučují se celkem dva promývací kroky (místo pouze jednoho). Jinak může být odstranění nenavázané reagencie nedostatečné.
4. Buněčné pelety resuspendujte.
5. Upravte objem naplnění vzorkem na 150 g (aplikace v běžném měřítku) nebo 250–300 g (aplikace ve velkém měřítku).

6.5.2 KROK 2: Volba separačního programu

▶ **Zapněte přístroj CliniMACS Plus Instrument.**

▶ **Volba separačního programu DEPLETION 2.1 nebo DEPLETION 3.1**
(při použití soupravy hadiček CliniMACS Tubing Set LS, resp. CliniMACS Depletion Tubing Set)

▶ **Vstup parametru vzorku**
(podle analýzy výchozího buněčného produktu (viz KROK 1))

Viz bod 7.2.5 na straně 141 nebo 7.2.6 na straně 146.

6.5.3 KROK 3: Instalace hadičkových souprav CliniMACS

▶ **Souprava CliniMACS Tubing Set a CliniMACS Tubing Set LS**
nebo
▶ **Hadičková souprava CliniMACS Depletion Tubing Set**

Viz bod 7.3.1 na straně 151 nebo 7.3.3 na straně 171.

6.5.4 KROK 4: Separace CliniMACS Plus

▶ **Provedení separace**

▶ **Odpojení vaků a zaznamenání procesního kódu**

▶ **Vyjměte sadu hadiček a vypněte**

▶ **Analýza buněk**

Viz bod 7.4.4 na straně 197 a 7.4.5 na straně 201.

6.6 Deplece CD19 pozitivních buněk

Systém CliniMACS Plus CD19 včetně přístroje CliniMACS Plus Instrument, reagencie CliniMACS CD19 Reagent, soupravy hadiček CliniMACS Tubing Set LS a pufru CliniMACS PBS/EDTA Buffer je určen pro *in vitro* depleci lidských CD19 pozitivních buněk z heterogenních hematologických buněčných populací.

6.6.1 KROK 1: Příprava buněk a magnetické značení

Vyžadované první činnosti

Kapacita použití

Až 5×10^9 CD19 pozitivních buněk z až 40×10^9 celkových buněk (WBC)

⚠ UPOZORNĚNÍ

Riziko provedení nedostatečné separace označených buněk. Při překročení specifikací použití existuje riziko nedostatečného specifického označení. Použijte požadované množství buněk a reagencie, jak je popsáno pro příslušnou aplikaci.

Potřebné materiály CliniMACS

Materiál	Katalogové číslo	Množství
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS CD19 Reagent	179-01	1 injekční lahvička
Souprava CliniMACS Tubing Set LS	162-01	1 hadičková souprava
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	Vaky 2× 1000 mL[1]

1 Před použitím doplňte pufr CliniMACS PBS/EDTA Buffer pomocí HSA na konečnou koncentraci 0,5 % (hm./obj.)

Tabulka 6.17: Materiály CliniMACS potřebné pro depleci CD19 pozitivních buněk

Další potřebné materiály

- **Cell Preparation Bag:**
  jeden 600 mL přenosový vak, vhodný pro centrifugaci, dále jedna spojka pro odběrové místo a jedna sada pro přenos plazmy pro použití během procesu přípravy buněk
- **Plasma Waste Bag a Wash Waste Bag:**
  dva 600 mL přenosové vaky vhodné pro centrifugaci
- **Cell Collection Bag:**
  jeden 600 mL přenosový vak v kombinaci s propojovací spojkou Luer/Spike Interconnector pro připojení vaku Cell Collection Bag k soupravě hadiček
- jeden předřazený systémový filtr
- uzavírací kleště

- injekční stříkačky (různé velikosti) a hypodermické jehly o velikosti 20
- lidský sérový albumin (HSA) pro přidání k pufru Pufr CliniMACS PBS/EDTA Buffer na koncovou koncentraci 0,5 % (hm./obj.)
- zkumavky vzorků

▶ Příprava vaků

Určete hmotnost prázdného vaku Cell Collection Bag a vaku Cell Preparation Bag, jak je popsáno v bodě 7.1.1 na straně 119.

Magnetické značení buněk

Podrobný popis následujících kroků naleznete v bodě 7.1 „KROK 1: Příprava buněk a magnetické značení“ na straně 119.

▶ Analýza buněčného výchozího produktu

▶ Přenos výchozího buněčného produktu do vaku Cell Preparation Bag

▶ Naředění buněčného výchozího produktu

Přidejte pufr: Hmotnost pufru, který se má přidat = 600 g – hmotnost buněčného výchozího produktu

▶ Odstřeďování

Centrifugujte při 200×g, bez brzdy, 15 minut, pokojová teplota pokojová teplota (RT: +19 °C až +25 °C [+66 °F až +77 °F]

▶ Úprava objemu: objem značení 95 g (±5 g)

1. Zcela odstraňte supernatant a dejte pozor, abyste neresuspendovali buněčnou peletu.
2. Po odstranění supernatantu buněčnou peletu opatrně resuspendujte.
3. Upravte hmotnost vaku Cell Preparation Bag (CPB) přidáním pufru podle následující rovnice: Cílová hmotnost plněného CPB = 95 g + hmotnost prázdného CPB
4. Buněčné pelety resuspendujte.

▶ Inkubace reagencií CliniMACS CD19 Reagent

1. Přidejte 1 injekční lahvičku reagencie CliniMACS CD19 Reagent. Obsah jemně promíchejte.
2. Inkubujte na orbitálním rotátoru (25 ot/min) 30 minut při pokojové teplotě.

▶ **Odstranění přebytečné reagencie**

1. Naplňte pufrem vak Cell Preparation Bag.
2. Centrifugujte (300×g, bez brzdy, 15 minut, pokojová teplota).
3. Odstraňte co nejvíce supernatantu. **Poznámka:** Odstraňte nejméně 500 g supernatantu. Pokud je odstraněno méně než 500 g supernatantu, doporučují se celkem dva promývací kroky (místo pouze jednoho). Jinak může být odstranění nenavázané reagencie nedostatečné.
4. Buněčné pelety resuspendujte.
5. Upravte objem naplnění vzorkem na 100 g.

6.6.2 KROK 2: Volba separačního programu

▶ **Zapněte přístroj CliniMACS Plus Instrument.**

▶ **Volba separačního programu DEPLETION 2.1**

▶ **Vstup parametru vzorku**

Viz bod 7.2.5 na straně 141.

6.6.3 KROK 3: Instalace hadičkových souprav CliniMACS

▶ **Souprava CliniMACS Tubing Set a CliniMACS Tubing Set LS**

Viz bod 7.3.1 na straně 151.

6.6.4 KROK 4: Separace CliniMACS Plus

▶ **Provedení separace**

▶ **Odpojení vaků a zaznamenání procesního kódu**

▶ **Vyjměte sadu hadiček a vypněte**

▶ **Analýza buněk**

Viz bod 7.4.4 na straně 197.

6.7 Deplece CD3 pozitivních buněk a CD19 pozitivních buněk

Systém CliniMACS Plus CD3/CD19 včetně přístroje CliniMACS Plus Instrument, reagencie CliniMACS CD3 Reagent, reagencie CliniMACS CD19 Reagent, sady hadiček CliniMACS Depletion Tubing Set a pufru CliniMACS PBS/EDTA Buffer je určen pro *in vitro* depleci lidských CD3 pozitivních buněk a lidských CD19 pozitivních buněk z heterogenních hematologických buněčných populací.

6.7.1 KROK 1: Příprava buněk a magnetické značení

Vyžadované první činnosti

Kapacita použití

Až 5×10^9 CD3 pozitivních buněk a až 5×10^9 CD19 pozitivních buněk z až 40×10^9 celkových buněk (WBC)

⚠ UPOZORNĚNÍ

Riziko provedení nedostatečné separace označených buněk. Při překročení specifikací použití existuje riziko nedostatečného specifického označení. Použijte požadované množství buněk a reagencie, jak je popsáno pro příslušnou aplikaci.

Potřebné materiály CliniMACS

Materiál	Katalogové číslo	Množství
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS CD3 Reagent	273-01	1 injekční lahvička
CliniMACS CD19 Reagent	179-01	1 injekční lahvička
Hadičková souprava CliniMACS Depletion Tubing Set	261-01	1 hadičková souprava
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	Vaky 4× 1000 mL[1]

1 Před použitím doplňte pufr CliniMACS PBS/EDTA Buffer pomocí HSA na konečnou koncentraci 0,5 % (hm./obj.)

Tabulka 6.18: Materiály CliniMACS potřebné pro depleci CD3 pozitivních buněk a CD19 pozitivních buněk

Další potřebné materiály

- **Cell Preparation Bag:**
  jeden 600 mL přenosový vak, vhodný pro centrifugaci, dále jedna spojka pro odběrové místo a dvě sady pro přenos plazmy pro použití během procesu přípravy buněk
- **Plasma Waste Bag a Wash Waste Bag:**
  dva 600 mL přenosové vaky vhodné pro centrifugaci
- **Cell Collection Bag:**
  jeden až dva 600 mL přenosové vaky v kombinaci s propojovací spojkou Luer/Spike Interconnector pro připojení vaku Cell Collection Bag k soupravě hadiček
- jeden předřazený systémový filtr
- uzavírací kleště
- injekční stříkačky (různé velikosti) a hypodermické jehly o velikosti 20
- lidský sérový albumin (HSA) pro přidání k pufru Pufr CliniMACS PBS/EDTA Buffer na koncovou koncentraci 0,5 % (hm./obj.)
- imunoglobulin G pro klinické použití
- zkumavky vzorků

DŮLEŽITÉ

Po zadání parametrů vzorku (KROK 2) software CliniMACS Plus vypočítá objemy, které budou odebrány ve vacích Reapplication Bag, Cell Collection Bag, Non-Target Cell Bag a Buffer Waste Bag. Pokud objem vypočtené kapaliny překročí standardní objem 500 mL, je nutná výměna požadovaných vaků.

▶ Příprava vaků

Určete hmotnost prázdného vaku Cell Collection Bag a vaku Cell Preparation Bag, jak je popsáno v bodě 7.1.1 na straně 119.

Magnetické značení buněk

Podrobný popis následujících kroků naleznete v bodě 7.1 „KROK 1: Příprava buněk a magnetické značení“ na straně 119.

▶ Analýza buněčného výchozího produktu

Určete počet všech CD3 a CD19 značených buněk (včetně nespecifických vazeb CD3 a CD19, nejen skutečných T a B buněk). Toto číslo zvažte pro specifikace aplikace a vstup parametrů vzorku (viz KROK 2).

▶ Přenos výchozího buněčného produktu do vaku Cell Preparation Bag

Naředění buněčného výchozího produktu

Přidejte pufr: Hmotnost pufru, který se má přidat = 600 g – hmotnost buněčného výchozího produktu

Odstřeďování

Centrifugujte při 200×g, bez brzdy, 15 minut, pokojová teplota pokojová teplota (RT: +19 °C až +25 °C [+66 °F až +77 °F]

Úprava objemu: objem značení 87,5 g (±5 g)

1. Zcela odstraňte supernatant a dejte pozor, abyste neresuspendovali buněčnou peletu.
2. Po odstranění supernatantu buněčnou peletu opatrně resuspendujte.
3. Upravte hmotnost vaku Cell Preparation Bag (CPB) přidáním pufru podle následující rovnice (vezměte v úvahu IgG): Cílová hmotnost plněného CPB = 87,5 g – hmotnost IgG + hmotnost prázdného CPB
4. Buněčné pelety resuspendujte.

Inkubace pomocí imunoglobulinu G pro klinické použití

1. Přidejte IgG (1,5 mg/mL).
2. Inkubujte na orbitálním rotátoru (25 ot/min) 5 minut při pokojové teplotě.

Inkubace reagenciemi CliniMACS CD34 Reagent a CliniMACS CD19 Reagent

1. Přidejte 1 injekční lahvičku reagencie CliniMACS CD3 Reagent a 1 injekční lahvičku reagencie CliniMACS CD19 Reagent. Obsah jemně promíchejte.
2. Inkubujte na orbitálním rotátoru (25 ot/min) 30 minut při pokojové teplotě.

Odstranění přebytečné reagencie

1. Naplňte pufrem vak Cell Preparation Bag.
2. Centrifugujte (300×g, bez brzdy, 15 minut, pokojová teplota).
3. Odstraňte co nejvíce supernatantu. **Poznámka:** Odstraňte nejméně 500 g supernatantu. Pokud je odstraněno méně než 500 g supernatantu, doporučují se celkem dva promývací kroky (místo pouze jednoho). Jinak může být odstranění nenavázané reagencie nedostatečné.
4. Buněčné pelety resuspendujte.
5. Upravte objem naplnění vzorkem na 150 g.

6.7.2 KROK 2: Volba separačního programu

- **Zapněte přístroj CliniMACS Plus Instrument.**
- **Volba separačního programu DEPLETION 3.1**
- **Vstup parametru vzorku**
  (podle analýzy výchozího buněčného produktu (viz KROK 1))

Viz bod 7.2.6 na straně 146.

6.7.3 KROK 3: Instalace hadičkových souprav CliniMACS

- **Hadičková souprava CliniMACS Depletion Tubing Set**

Viz bod 7.3.3 na straně 171.

6.7.4 KROK 4: Separace CliniMACS Plus

- **Provedení separace**
- **Odpojení vaků a zaznamenání procesního kódu**
- **Vyjměte sadu hadiček a vypněte**
- **Analýza buněk**

Viz bod 7.4.5 na straně 201.

6.8 Obohacení/deplece CD8 pozitivními buňkami

Systém CliniMACS Plus CD8 včetně přístroje CliniMACS Plus Instrument, reagencie CliniMACS CD8 Reagent, sady hadiček CliniMACS Tubing Set nebo CliniMACS Tubing Set LS a pufru CliniMACS PBS/EDTA Buffer je určen pro *in vitro* obohacování nebo depleci lidských CD8 pozitivních buněk z heterogenních hematologických buněčných populací.

6.8.1 KROK 1: Příprava buněk a magnetické značení

Vyžadované první činnosti

Kapacita použití

- **Obohacení:** až 4×10^9 označených buněk z až 40×10^9 celkových buněk (WBC) využívajících soupravu CliniMACS Tubing Set
- **Deplece:** až 4×10^9 označením buněk z až 40×10^9 celkových buněk (WBC) využívajících soupravu CliniMACS Tubing Set LS

⚠ UPOZORNĚNÍ

Riziko provedení nedostatečné separace označených buněk. Při překročení specifikací použití existuje riziko nedostatečného specifického označení. Použijte požadované množství buněk a reagencie, jak je popsáno pro příslušnou aplikaci.

Potřebné materiály CliniMACS

Materiál	Katalogové číslo	Množství	Separační program
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1	–
CliniMACS CD8 Reagent	275-01	1 injekční lahvička	–
Souprava CliniMACS Tubing Set	161-01	1 hadičková souprava	ENRICHMENT 1.1
Souprava CliniMACS Tubing Set LS	162-01	1 hadičková souprava	DEPLETION 2.1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	Vaky do 3×1000 mL[1]	–

1 Viz Tabulka 6.20 až Tabulka 6.22. Před použitím doplňte pufr CliniMACS PBS/EDTA Buffer pomocí HSA na konečnou koncentraci 0,5 % (hm./obj.)

Tabulka 6.19: Materiály CliniMACS potřebné pro obohacení/depleci CD8 pozitivních buněk

Další potřebné materiály

- **Cell Preparation Bag:**
  jeden 600 mL přenosový vak, vhodný pro centrifugaci, dále jedna spojka pro odběrové místo a jedna sada pro přenos plazmy pro použití během procesu přípravy buněk

- **Plasma Waste Bag a Wash Waste Bag:**
  dva 600 mL přenosové vaky vhodné pro centrifugaci
- **Cell Collection Bag:**
  jeden 600 mL přenosový vak v kombinaci s propojovací spojkou Luer/Spike Interconnector pro připojení vaku Cell Collection Bag k soupravě hadiček (viz Tabulka 6.21 a Tabulka 6.22)
- **V případě, že je nezbytná náhrada vaků Negative Fraction Bag a Buffer Waste Bag:**
  dva 1000 mL přenosové vaky v kombinaci se dvěma propojovacími spojkami Luer/Spike Interconnector pro připojení vaků k soupravě hadiček (viz Tabulka 6.21 a Tabulka 6.22)
- **Pokud je pro separaci zapotřebí více než jeden litr pufru:**
  jedna sada pro přenos plazmy pro připojení vaků na pufr (viz Tabulka 6.21 a Tabulka 6.22)
- jeden předřazený systémový filtr
- uzavírací kleště
- injekční stříkačky (různé velikosti) a hypodermické jehly o velikosti 20
- lidský sérový albumin (HSA) pro přidání k pufru Pufr CliniMACS PBS/EDTA Buffer na koncovou koncentraci 0,5 % (hm./obj.)
- zkumavky vzorků

DŮLEŽITÉ

Po zadání parametrů vzorku (KROK 2) software CliniMACS Plus vypočítá objemy, které budou odebrány ve vacích Priming Waste Bag, Cell Collection Bag, Negative Fraction Bag a Buffer Waste Bag. Pokud objem vypočtené kapaliny překročí standardní objem 500 mL, je nutná výměna vaků podle následujícího přehledu požadovaných materiálů.

Přehled požadovaných materiálů

Příprava buněk	
Celkové buňky	≤40×10^9
Označené buňky	≤4×10^9
Počet injekčních lahviček s reagenciemi	1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 mL
Sada pro přenos plazmy	1
Objem naplnění vzorkem	100 mL

Tabulka 6.20: Materiály potřebné pro přípravu buněk CD8 pozitivních buněk

Separace (ENRICHMENT 1.1)		
Označené buňky	<2×10^9	2–4×10^9
Negative Fraction Bag	–	Nahraďte originální vaky hadičkové soupravy 1000 mL přenosovými vaky
Buffer Waste Bag	–	
Priming Waste Bag	–	–
Cell Collection Bag	600 mL	600 mL
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 mL	2000 mL
Luer/Spike Interconnector	1	3
Sada pro přenos plazmy	–	1

Tabulka 6.21: Materiály potřebné pro obohacování CD8 pozitivních buněk

Separace (DEPLETION 2.1)	
Označené buňky	≤4×10^9
Negative Fraction Bag	Výměna vaku není zapotřebí
Buffer Waste Bag	
Priming Waste Bag	
Cell Collection Bag	600 mL
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 mL
Luer/Spike Interconnector	1

Tabulka 6.22: Materiály potřebné pro obohacování CD8 pozitivních buněk

▶ Příprava vaků

Určete hmotnost prázdného vaku Cell Collection Bag a vaku Cell Preparation Bag, jak je popsáno v bodě 7.1.1 na straně 119.

Magnetické značení buněk

Podrobný popis následujících kroků naleznete v bodě 7.1 „KROK 1: Příprava buněk a magnetické značení“ na straně 119.

▶ Analýza buněčného výchozího produktu

▶ Přenos výchozího buněčného produktu do vaku Cell Preparation Bag

▶ Naředění buněčného výchozího produktu

Přidejte pufr: Hmotnost pufru, který se má přidat = hmotnost buněčného výchozího produktu × 2

▶ Odstřeďování

Centrifugujte při 300×g, bez brzdy, 15 minut, pokojová teplota pokojová teplota (RT: +19 °C až +25 °C [+66 °F až +77 °F]

▶ **Úprava objemu: objem značení 95 g (±5 g)**

1. Zcela odstraňte supernatant a dejte pozor, abyste neresuspendovali buněčnou peletu.
2. Po odstranění supernatantu buněčnou peletu opatrně resuspendujte.
3. Upravte hmotnost vaku Cell Preparation Bag (CPB) přidáním pufru. Vypočítejte cílovou hmotnost CPB naplněného naředěným buněčným produktem pomocí rovnice: Cílová hmotnost plněného CPB = 95 g – hmotnost prázdného CPB
4. Buněčné pelety resuspendujte.

▶ **Inkubace reagencií CliniMACS CD8 Reagent**

1. Přidejte 1 injekční lahvičku reagencie CliniMACS CD8 Reagent. Obsah jemně promíchejte.
2. Inkubujte na orbitálním rotátoru (25 ot/min) 30 minut při pokojové teplotě.

▶ **Odstranění přebytečné reagencie**

1. Naplňte pufrem vak Cell Preparation Bag.
2. Centrifugujte (300×g, bez brzdy, 15 minut, pokojová teplota).
3. Odstraňte co nejvíce supernatantu. **Poznámka:** Odstraňte nejméně 500 g supernatantu. Pokud je odstraněno méně než 500 g supernatantu, doporučují se celkem dva promývací kroky (místo pouze jednoho). Jinak může být odstranění nenavázané reagencie nedostatečné.
4. Buněčné pelety resuspendujte.
5. Upravte objem naplnění vzorkem na 100 g.

6.8.2 KROK 2: Volba separačního programu

▶ **Zapněte přístroj CliniMACS Plus Instrument.**

▶ **Volba separačního programu ENRICHMENT 1.1 nebo DEPLETION 2.1**

▶ **Vstup parametru vzorku**

Viz bod 7.2.3 na straně 134 nebo 7.2.5 na straně 141.

6.8.3 KROK 3: Instalace hadičkových souprav CliniMACS

▶ **Souprava CliniMACS Tubing Set a CliniMACS Tubing Set LS**

Viz bod 7.3.1 na straně 151.

6.8.4 KROK 4: Separace CliniMACS Plus

- **Provedení separace**
- **Odpojení vaků a zaznamenání procesního kódu**
- **Vyjměte sadu hadiček a vypněte**
- **Analýza buněk**

Viz bod 7.4.2 na straně 189 nebo 7.4.4 na straně 197.

6.9 Obohacení/deplece CD25 pozitivními buňkami

Systém CliniMACS Plus CD25 včetně přístroje CliniMACS Plus Instrument, reagencie CliniMACS CD25 Reagent, sady hadiček CliniMACS Tubing Set nebo CliniMACS Tubing Set LS a pufru CliniMACS PBS/EDTA Buffer je určen pro *in vitro* obohacování nebo depleci lidských CD25 pozitivních buněk – nejlépe buněk s vysokou expresí CD25 – z heterogenních hematologických buněčných populací.

6.9.1 KROK 1: Příprava buněk a magnetické značení

Vyžadované první činnosti

Kapacita použití

- **Obohacení:**
  CD25 pozitivní buňky nebo buňky s vysokou expresí CD25: až $0{,}6\times10^9$ označených buněk z až 40×10^9 celkových buněk (WBC) využívajících soupravu CliniMACS Tubing Set
- **Deplece:**
  Použití v normálním měřítku: až 6×10^9 CD25 pozitivních buněk z až 40×10^9 celkových buněk (WBC) za použití soupravy CliniMACS Tubing Set LS
  Použití ve velkém měřítku: více než 6×10^9 a až 12×10^9 CD25 pozitivních buněk z více než 40×10^9 a až 80×10^9 celkových buněk (WBC) za použití soupravy CliniMACS Tubing Set LS

⚠ UPOZORNĚNÍ

Riziko provedení nedostatečné separace označených buněk. Při překročení specifikací použití existuje riziko nedostatečného specifického označení. Použijte požadované množství buněk a reagencie, jak je popsáno pro příslušnou aplikaci.

Potřebné materiály CliniMACS

Materiál	Katalogové číslo	Množství	Separační program
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1	–
CliniMACS CD25 Reagent	274-01	• 1 injekční lahvička (normální rozsah) • 2 injekční lahvičky (velký rozsah)	–
Souprava CliniMACS Tubing Set	161-01	1 hadičková souprava	ENRICHMENT 3.2
Souprava CliniMACS Tubing Set LS	162-01	1 hadičková souprava	DEPLETION 2.1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	Vaky do 4× 1000 mL[1]	–

1 Viz Tabulka 6.24 až Tabulka 6.27. Před použitím doplňte pufr CliniMACS PBS/EDTA Buffer pomocí HSA na konečnou koncentraci 0,5 % (hm./obj.)

Tabulka 6.23: Materiály CliniMACS potřebné pro obohacení/depleci CD25 pozitivních buněk

Další potřebné materiály

- **Cell Preparation Bag:**
  jeden 600 mL přenosový vak, vhodný pro centrifugaci, dále jedna spojka pro odběrové místo a jedna až dvě sady pro přenos plazmy pro použití během procesu přípravy buněk
- **Plasma Waste Bag a Wash Waste Bag:**
  dva 600 mL (nebo dva 1000 mL) přenosové vaky vhodné pro centrifugaci
- **Cell Collection Bag:**
  jeden 150 mL nebo jeden až dva 600 mL přenosové vaky v kombinaci s propojovací spojkou Luer/Spike Interconnector pro připojení vaku Cell Collection Bag k soupravě hadiček

  Pokud jsou pro separaci vyžadovány dva vaky Cell Collection Bags, použijte k propojení obou vaků sadu pro přenos plazmy (viz Tabulka 6.25 a Tabulka 6.27).
- **V případě, že je nezbytná náhrada vaků Negative Fraction Bag a Buffer Waste Bag:**
  dva 1000 mL přenosové vaky v kombinaci se dvěma propojovacími spojkami Luer/Spike Interconnector pro připojení vaků k soupravě hadiček (viz Tabulka 6.25 a Tabulka 6.27)
- **Pokud je pro separaci zapotřebí více než jeden litr pufru:**
  jedna sada pro přenos plazmy pro připojení vaků na pufr (viz Tabulka 6.25 a Tabulka 6.27)
- jeden předřazený systémový filtr
- uzavírací kleště
- injekční stříkačky (různé velikosti) a hypodermické jehly o velikosti 20
- lidský sérový albumin (HSA) pro přidání k pufru Pufr CliniMACS PBS/EDTA Buffer na koncovou koncentraci 0,5 % (hm./obj.)
- zkumavky vzorků

DŮLEŽITÉ

Po zadání parametrů vzorku (KROK 2) software CliniMACS Plus vypočítá objemy, které budou odebrány ve vacích Priming Waste Bag, Cell Collection Bag, Negative Fraction Bag a Buffer Waste Bag. Pokud objem vypočtené kapaliny překročí standardní objem 500 mL, je nutná výměna vaků podle následujícího přehledu požadovaných materiálů.

Přehled požadovaných materiálů

Příprava buněk (ENRICHMENT 3.2)		
Použití	**Obohacení CD25 pozitivními buňkami**	**Obohacení buňkami s vysokou expresí CD25**
Buňky celkem (WBC)	$\leq 40\times10^9$	$\leq 40\times10^9$
Označené buňky	$\leq 0{,}6\times10^9$	$\leq 0{,}6\times10^9$
Počet injekčních lahviček s reagenciemi	1	1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000–2000 mL	2000 mL
Sada pro přenos plazmy	1–2	2
Objem značení	190 mL	380 mL
Teplota značení	Pokojová teplota	+4 °C až +8 °C (+39 °F až +46 °F)

Tabulka 6.24: Materiály potřebné pro přípravu buněk CD25 pozitivních buněk / buněk s vysokou expresí (ENRICHMENT 3.2)

Separace (ENRICHMENT 3.2)		
Použití	**Obohacení CD25 pozitivními buňkami**	**Obohacení buňkami s vysokou expresí CD25**
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 mL	1000 mL
Negative Fraction Bag	Výměna vaku není zapotřebí	
Buffer Waste Bag		
Priming Waste Bag		
Cell Collection Bag	150 mL	150 mL
Luer/Spike Interconnector	1	1

Tabulka 6.25: Materiály potřebné pro obohacování CD25 pozitivních buněk / buněk s vysokou expresí (ENRICHMENT 3.2)

Příprava buněk (DEPLETION 2.1)		
Buňky celkem (WBC)	≤40×10^9	>40–80×10^9
Označené buňky	≤6×10^9	>6–12×10^9
Počet injekčních lahviček s reagenciemi	1	2
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000–2000 mL	1000–2000 mL
Sada pro přenos plazmy	1–2	1–2
Objem značení	95 mL	190 mL
Teplota značení	Pokojová teplota	Pokojová teplota

Tabulka 6.26: Materiály potřebné pro přípravu buněk CD25 pozitivních buněk (DEPLETION 2.1)

Separace (DEPLETION 2.1)		
Buňky celkem (WBC)	≤40×10^9	>40–80×10^9
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 mL pro < 5×10^9 značených buněk	2000 mL pro 5–12×10^9 značených buněk
Negative Fraction Bag	–	Nahraďte originální vaky hadičkové soupravy 1000 mL přenosovými vaky
Buffer Waste Bag	–	
Priming Waste Bag	–	–
Cell Collection Bag	600 mL	2× 600 mL
Luer/Spike Interconnector	1	3
Sada pro přenos plazmy	–	2

Tabulka 6.27: Materiály potřebné pro depleci CD25 pozitivních buněk (DEPLETION 2.1)

▶ Příprava vaků

Určete hmotnost prázdného vaku Cell Collection Bag a vaku Cell Preparation Bag, jak je popsáno v bodě 7.1.1 na straně 119.

Magnetické značení buněk

Podrobný popis následujících kroků naleznete v bodě 7.1 „KROK 1: Příprava buněk a magnetické značení“ na straně 119.

DŮLEŽITÉ

- *Pufr pro přípravu buněk pro obohacení nebo depleci CD25 pozitivních buněk skladujte při +19 °C až +25 °C (+66 °F až +77 °F).*
- *Magnetické značení během přípravy buněk pro obohacení buněk vysoce exprimujících CD25 musí být provedeno pomocí studeného pufru (+4 °C až +8 °C [+39 °F až +46 °F]). Nižší nebo vyšší teploty mohou mít za následek nižší čistotu a výtěžek cílových buněk.*

▶ Analýza buněčného výchozího produktu

▶ Přenos výchozího buněčného produktu do vaku Cell Preparation Bag

Naředění buněčného výchozího produktu

Přidejte pufr: Hmotnost pufru, který se má přidat = hmotnost buněčného výchozího produktu × 2

Odstřeďování

Centrifugujte při 300×g, bez brzdy, 15 minut, pokojová teplota pokojová teplota (RT: +19 °C až +25 °C [+66 °F až +77 °F]

Úprava objemu: objem značení

obohacení CD25 pozitivními buňkami: 190 g (±5 g)
obohacení buňkami s vysokou expresí CD25: 380 g (±5 g)[1]
deplece CD25 pozitivních buněk (použití v normálním měřítku): 95 g
deplece CD25 pozitivních buněk (použití ve velkém měřítku): 190 g

1. Zcela odstraňte supernatant a dejte pozor, abyste neresuspendovali buněčnou peletu.
2. Po odstranění supernatantu buněčnou peletu opatrně resuspendujte.
3. Upravte hmotnost vaku Cell Preparation Bag (CPB) přidáním pufru podle následující rovnice: Cílová hmotnost plněného CPB = objem značení + hmotnost prázdného CPB
4. Buněčné pelety resuspendujte.

Inkubace reagencií CliniMACS CD25 Reagent

1. Přidejte 1 nebo 2 injekční lahvičky reagencie CliniMACS CD25 Reagent (viz Tabulka 6.24 a Tabulka 6.26). Obsah jemně promíchejte.
2. Inkubujte na orbitálním rotátoru (25 ot/min):
   a) obohacení nebo deplece CD25 pozitivních buněk: 30 minut při pokojové teplotě
   b) obohacení buňkami s vysokou expresí CD25 15 minut při +4 °C až +8 °C (+39 °F až +46 °F)

Odstranění přebytečné reagencie

1. Naplňte pufrem vak Cell Preparation Bag.
2. Centrifugujte (300×g, bez brzdy, 15 minut, pokojová teplota).
3. Odstraňte co nejvíce supernatantu. **Poznámka:** Odstraňte nejméně 500 g supernatantu. Pokud je odstraněno méně než 500 g supernatantu, doporučují se celkem dva promývací kroky (místo pouze jednoho). Jinak může být odstranění nenavázané reagencie nedostatečné.
4. Buněčné pelety resuspendujte.
5. Upravte objem vzorku na 100 g (aplikace v běžném měřítku) nebo 200 g (aplikace ve velkém měřítku).

1 Magnetické značení pro obohacení buněk vysoce exprimujících CD25 musí být provedeno pomocí studeného pufru (+4 °C až +8 °C [+39 °F až +46 °F]).

6.9.2 KROK 2: Volba separačního programu

- **Zapněte přístroj CliniMACS Plus Instrument.**
- **Volba separačního programu ENRICHMENT 3.2 nebo DEPLETION 2.1**
- **Vstup parametru vzorku**
  (ne pro ENRICHMENT 3.2)

Viz bod 7.2.4 na straně 139 nebo 7.2.5 na straně 141.

6.9.3 KROK 3: Instalace hadičkových souprav CliniMACS

- **Souprava CliniMACS Tubing Set a CliniMACS Tubing Set LS**

Viz bod 7.3.1 na straně 151.

6.9.4 KROK 4: Separace CliniMACS Plus

- **Separační postup**
- **Odpojte vaky a zaznamenejte procesní kód**
- **Vyjměte sadu hadiček a vypněte**
- **Analýza buněk**

Viz bod 7.4.3 na straně 193 nebo 7.4.4 na straně 197.

6.10 Obohacení/deplece CD4 pozitivními buňkami

Systém CliniMACS Plus CD4 včetně přístroje CliniMACS Plus Instrument, reagencie CliniMACS CD4 Reagent, sady hadiček CliniMACS Tubing Set nebo CliniMACS Tubing Set LS a pufru CliniMACS PBS/EDTA Buffer je určen pro *in vitro* obohacování nebo depleci lidských CD4 pozitivních buněk z heterogenních hematologických buněčných populací.

6.10.1 KROK 1: Příprava buněk a magnetické značení

Vyžadované první činnosti

Kapacita použití

- **Obohacení:** až 5×10^9 označených buněk z až 40×10^9 celkových buněk (WBC) využívajících soupravu CliniMACS Tubing Set
- **Deplece:** až 12×10^9 označením buněk z až 40×10^9 celkových buněk (WBC) využívajících soupravu CliniMACS Tubing Set LS

Poznámka: Pokud počet vypočtených buněk překročí kapacitu aplikace, rozdělte vzorek a pokračujte s každým vzorkem samostatně, s použitím nové sady hadiček pro každý běh přístroje CliniMACS Plus Instrument.

⚠ UPOZORNĚNÍ

Riziko provedení nedostatečné separace označených buněk. Při překročení specifikací použití existuje riziko nedostatečného specifického označení. Použijte požadované množství buněk a reagencie, jak je popsáno pro příslušnou aplikaci.

Potřebné materiály CliniMACS

Materiál	Katalogové číslo	Množství	Separační program
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1	–
CliniMACS CD4 Reagent	276-01	1 injekční lahvička	–
Souprava CliniMACS Tubing Set	161-01	1 hadičková souprava	ENRICHMENT 1.1
Souprava CliniMACS Tubing Set LS	162-01	1 hadičková souprava	DEPLETION 2.1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	Vaky do 4× 1000 mL[1]	–

1 Viz Tabulka 6.29 až Tabulka 6.32. Před použitím doplňte pufr CliniMACS PBS/EDTA Buffer pomocí HSA na konečnou koncentraci 0,5 % (hm./obj.)

Tabulka 6.28: Materiály CliniMACS potřebné pro obohacení/depleci CD4 pozitivních buněk

Další potřebné materiály

- **Cell Preparation Bag:**
  jeden 600 mL přenosový vak, vhodný pro centrifugaci, dále jedna spojka pro odběrové místo a jedna sada pro přenos plazmy pro použití během procesu přípravy buněk
- **Plasma Waste Bag a Wash Waste Bag:**
  dva 600 mL (nebo dva 1000 mL) přenosové vaky vhodné pro centrifugaci
- **Cell Collection Bag:**
  jeden 150 mL nebo jeden až dva 600 mL přenosové vaky v kombinaci s propojovací spojkou Luer/Spike Interconnector pro připojení vaku Cell Collection Bag k soupravě hadiček

  Pokud jsou pro separaci vyžadovány dva vaky Cell Collection Bag, použijte k propojení obou vaků sadu pro přenos plazmy (viz Tabulka 6.30 a Tabulka 6.32).
- **V případě, že je nezbytná náhrada vaků Negative Fraction Bag, Buffer Waste Bag a Priming Waste Bag:**
  až tři 1000 mL přenosové vaky v kombinaci se dvěma propojovacími spojkami Luer/Spike Interconnector pro připojení vaků k soupravě hadiček (viz Tabulka 6.30 a Tabulka 6.32)

  Vyměňte vak Priming Waste Bag pomocí sterilního konektoru hadiček.
- **Pokud je pro separaci zapotřebí více než jeden litr pufru:**
  jedna až dvě sady pro přenos plazmy pro připojení vaků na pufr (viz Tabulka 6.30 a Tabulka 6.32)
- jeden předřazený systémový filtr
- uzavírací kleště
- injekční stříkačky (různé velikosti) a hypodermické jehly o velikosti 20
- lidský sérový albumin (HSA) pro přidání k pufru Pufr CliniMACS PBS/EDTA Buffer na koncovou koncentraci 0,5 % (hm./obj.)
- zkumavky vzorků

DŮLEŽITÉ

Po zadání parametrů vzorku (KROK 2) software CliniMACS Plus vypočítá objemy, které budou odebrány ve vacích Priming Waste Bag, Cell Collection Bag, Negative Fraction Bag a Buffer Waste Bag. Pokud objem vypočtené kapaliny překročí standardní objem 500 mL, je nutná výměna vaků podle následujícího přehledu požadovaných materiálů.

Přehled požadovaných materiálů

Příprava buněk (ENRICHMENT 1.1)	
Buňky celkem (WBC)	≤40×10^9
Označené buňky	≤5×10^9
Počet injekčních lahviček s reagenciemi	1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 mL
Sada pro přenos plazmy	1

Tabulka 6.29: Materiály potřebné pro buněčnou přípravu CD4 pozitivních buněk (ENRICHMENT 1.1)

Separace (ENRICHMENT 1.1)		
Označené buňky	≤2×10^9	>2–5×10^9
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 mL	2000 mL
Negative Fraction Bag	–	Nahraďte originální vaky hadičkové soupravy 1000 mL přenosovými vaky
Buffer Waste Bag	–	
Priming Waste Bag	–	–
Cell Collection Bag	150 mL	600 mL
Luer/Spike Interconnector	1	3
Sada pro přenos plazmy	–	1

Tabulka 6.30: Materiály potřebné pro obohacování CD4 pozitivních buněk (ENRICHMENT 1.1)

Příprava buněk (DEPLETION 2.1)	
Buňky celkem (WBC)	≤40×10^9
Označené buňky	≤12×10^9
Počet injekčních lahviček s reagenciemi	1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 mL
Sada pro přenos plazmy	1

Tabulka 6.31: Materiály potřebné pro buněčnou přípravu CD4 pozitivních buněk (DEPLETION 2.1)

Separace (DEPLETION 2.1)		
Označené buňky	<5×10^9	5–12×10^9
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 mL	2000 mL
Negative Fraction Bag	–	Nahraďte originální vaky hadičkové soupravy 1000 mL přenosovými vaky
Buffer Waste Bag	–	
Priming Waste Bag	–	–
Cell Collection Bag	1× 600 mL	1–2× 600 mL
Luer/Spike Interconnector	1	3
Sada pro přenos plazmy	–	1–2

Tabulka 6.32: Materiály potřebné pro depleci CD4 pozitivních buněk (DEPLETION 2.1)

▶ Příprava vaků

Určete hmotnost prázdného vaku Cell Collection Bag a vaku Cell Preparation Bag, jak je popsáno v bodě 7.1.1 na straně 119.

Magnetické značení buněk

Podrobný popis následujících kroků naleznete v bodě 7.1 „KROK 1: Příprava buněk a magnetické značení“ na straně 119.

▶ Analýza buněčného výchozího produktu

▶ Přenos výchozího buněčného produktu do vaku Cell Preparation Bag

▶ Naředění buněčného výchozího produktu

Přidejte pufr: Hmotnost pufru, který se má přidat = hmotnost buněčného výchozího produktu × 2

▶ Odstřeďování

Centrifugujte při 300×g, bez brzdy, 15 minut, pokojová teplota pokojová teplota (RT: +19 °C až +25 °C [+66 °F až +77 °F]

▶ Úprava objemu: objem značení 95 g (±5 g)

1. Odeberte supernatant a upravte vzorek pomocí následující rovnice: Hmotnost supernatantu, který má být odstraněn = hmotnost naředěného buněčného produktu – objem značení – 95 g
2. Buněčné pelety resuspendujte.

▶ Inkubace reagencií CliniMACS CD4 Reagent

1. Přidejte 1 injekční lahvičku reagencie CliniMACS CD4 Reagent. Obsah jemně promíchejte.
2. Inkubujte na orbitálním rotátoru (25 ot/min) 30 minut při pokojové teplotě.

▶ Odstranění přebytečné reagencie

1. Naplňte pufrem vak Cell Preparation Bag.
2. Centrifugujte (300×g, bez brzdy, 15 minut, pokojová teplota).
3. Odstraňte co nejvíce supernatantu. **Poznámka:** Odstraňte nejméně 500 g supernatantu. Pokud je odstraněno méně než 500 g supernatantu, doporučují se celkem dva promývací kroky (místo pouze jednoho). Jinak může být odstranění nenavázané reagencie nedostatečné.
4. Buněčné pelety resuspendujte.
5. Upravte objem naplnění vzorkem na 100 g.

6.10.2 KROK 2: Volba separačního programu

- **Zapněte přístroj CliniMACS Plus Instrument.**
- **Volba separačního programu ENRICHMENT 1.1 nebo DEPLETION 2.1**
- **Vstup parametru vzorku**

Viz bod 7.2.3 na straně 134 a 7.2.5 na straně 141.

6.10.3 KROK 3: Instalace hadičkových souprav CliniMACS

- **Souprava CliniMACS Tubing Set a CliniMACS Tubing Set LS**

Viz bod 7.3.1 na straně 151.

6.10.4 KROK 4: Separace CliniMACS Plus

- **Provedení separace**
- **Odpojení vaků a zaznamenání procesního kódu**
- **Vyjměte sadu hadiček a vypněte**
- **Analýza buněk**

Viz bod 7.4.2 na straně 189 nebo 7.4.4 na straně 197.

6.11 Deplece CD4 pozitivních buněk a CD8 pozitivních buněk

Systém CliniMACS Plus CD4/CD8 včetně přístroje CliniMACS Plus Instrument, reagencie CliniMACS CD4 Reagent, reagencie CliniMACS CD8 Reagent, sady hadiček CliniMACS Depletion Tubing Set LS a pufru CliniMACS PBS/EDTA Buffer je určen pro *in vitro* depleci lidských CD4 pozitivních buněk a lidských CD8 pozitivních buněk z heterogenních hematologických buněčných populací.

6.11.1 KROK 1: Příprava buněk a magnetické značení

Vyžadované první činnosti

Kapacita použití

Až 4×10^9 CD4 pozitivních buněk a až 5×10^9 CD8 pozitivních buněk z až 40×10^9 celkových buněk (WBC)

Poznámka: Pokud počet vypočtených buněk překročí kapacitu aplikace, rozdělte vzorek a pokračujte s každým vzorkem samostatně, s použitím nové sady hadiček pro každý běh přístroje CliniMACS Plus Instrument.

⚠ UPOZORNĚNÍ

Riziko provedení nedostatečné separace označených buněk. Při překročení specifikací použití existuje riziko nedostatečného specifického označení. Použijte požadované množství buněk a reagencie, jak je popsáno pro příslušnou aplikaci.

Potřebné materiály CliniMACS

Materiál	Katalogové číslo	Množství
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS CD4 Reagent	276-01	1 injekční lahvička
CliniMACS CD8 Reagent	275-01	1 injekční lahvička
Souprava CliniMACS Tubing Set LS	162-01	1 hadičková souprava
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	Vaky do 4× 1000 mL[1]

1 Viz Tabulka 6.34 až Tabulka 6.35. Před použitím doplňte pufr CliniMACS PBS/EDTA Buffer pomocí HSA na konečnou koncentraci 0,5 % (hm./obj.)

Tabulka 6.33: Materiály CliniMACS potřebné pro depleci CD4 pozitivních buněk a CD8 pozitivních buněk

Další potřebné materiály

- **Cell Preparation Bag:**
  jeden 600 mL přenosový vak, vhodný pro centrifugaci, dále jedna spojka pro odběrové místo a jedna sada pro přenos plazmy pro použití během procesu přípravy buněk
- **Plasma Waste Bag a Wash Waste Bag:**
  dva 600 mL (nebo dva 1000 mL) přenosové vaky vhodné pro centrifugaci
- **Cell Collection Bag:**
  jeden až dva 600 mL přenosové vaky v kombinaci s propojovací spojkou Luer/Spike Interconnector pro připojení vaku Cell Collection Bag k soupravě hadiček

  Pokud jsou pro separaci vyžadovány dva vaky Cell Collection Bags, použijte k propojení obou vaků sadu pro přenos plazmy (viz Tabulka 6.35).

- **V případě, že je nezbytná náhrada vaků Negative Fraction Bag, Buffer Waste Bag a Priming Waste Bag:**
  až tři 1000 mL přenosové vaky v kombinaci se dvěma propojovacími spojkami Luer/Spike Interconnector pro připojení vaků k soupravě hadiček (viz Tabulka 6.35)

  Vyměňte vak Priming Waste Bag pomocí sterilního konektoru hadiček.
- **Pokud je pro separaci zapotřebí více než jeden litr pufru:**
  jedna až dvě sady pro přenos plazmy pro připojení vaků na pufr (viz Tabulka 6.35)
- jeden předřazený systémový filtr
- uzavírací kleště
- injekční stříkačky (různé velikosti) a hypodermické jehly o velikosti 20
- lidský sérový albumin (HSA) pro přidání k pufru Pufr CliniMACS PBS/EDTA Buffer na koncovou koncentraci 0,5 % (hm./obj.)
- zkumavky vzorků

DŮLEŽITÉ

Po zadání parametrů vzorku (KROK 2) software CliniMACS Plus vypočítá objemy, které budou odebrány ve vacích Priming Waste Bag, Cell Collection Bag, Negative Fraction Bag a Buffer Waste Bag. Pokud objem vypočtené kapaliny překročí standardní objem 500 mL, je nutná výměna vaků podle následujícího přehledu požadovaných materiálů.

Přehled požadovaných materiálů

Příprava buněk	
Buňky celkem (WBC)	$\leq 40\times10^9$
Označené buňky	$\leq 12\times10^9$ CD4 pozitivních buněk a $\leq 4\times10^9$ CD8 pozitivních buněk
Počet injekčních lahviček s reagenciemi	1 injekční lahvička reagencie CliniMACS CD4 Reagent a 1 injekční lahvička reagencie CliniMACS CD8 Reagent
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 mL
Sada pro přenos plazmy	1

Tabulka 6.34: Materiály potřebné pro přípravu buněk CD4 pozitivních a CD8 pozitivních buněk

Separace			
Označené buňky	$<5\times10^9$	$5–13\times10^9$	$>13–16\times10^9$
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 mL	2000 mL	3000 mL
Negative Fraction Bag	–	Nahraďte originální vaky hadičkové soupravy 1000 mL přenosovými vaky	Nahraďte originální vaky hadičkové soupravy 1000 mL přenosovými vaky
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
Sada pro přenos plazmy	–	1–2	3

Tabulka 6.35: Materiály potřebné pro depleci CD4 pozitivních a CD8 pozitivních buněk

▶ Příprava vaků

Určete hmotnost prázdného vaku Cell Collection Bag a vaku Cell Preparation Bag, jak je popsáno v bodě 7.1.1 na straně 119.

Magnetické značení buněk

Podrobný popis následujících kroků naleznete v bodě 7.1 „KROK 1: Příprava buněk a magnetické značení“ na straně 119.

▶ Analýza buněčného výchozího produktu

▶ Přenos výchozího buněčného produktu do vaku Cell Preparation Bag

▶ Naředění buněčného výchozího produktu

Přidejte pufr: Hmotnost pufru, který se má přidat = hmotnost buněčného výchozího produktu × 2

▶ Odstřeďování

Centrifugujte při 300×g, bez brzdy, 15 minut, pokojová teplota pokojová teplota (RT: +19 °C až +25 °C [+66 °F až +77 °F]

▶ Úprava objemu: objem značení 88 g (±5 g)

1. Odeberte supernatant a upravte vzorek pomocí následující rovnice: Hmotnost supernatantu, který má být odstraněn = hmotnost naředěného buněčného produktu – objem značení
2. Buněčné pelety resuspendujte.

▶ Inkubace reagenciemi CliniMACS CD4 Reagent a CliniMACS CD8 Reagent

1. Přidejte 1 injekční lahvičku reagencie CliniMACS CD4 Reagent a 1 injekční lahvičku reagencie CliniMACS CD8 Reagent. Obsah jemně promíchejte.
2. Inkubujte na orbitálním rotátoru (25 ot/min) 30 minut při pokojové teplotě.

▶ **Odstranění přebytečné reagencie**

1. Naplňte pufrem vak Cell Preparation Bag.
2. Centrifugujte (300×g, bez brzdy, 15 minut, pokojová teplota).
3. Odstraňte co nejvíce supernatantu. **Poznámka:** Odstraňte nejméně 500 g supernatantu. Pokud je odstraněno méně než 500 g supernatantu, doporučují se celkem dva promývací kroky (místo pouze jednoho). Jinak může být odstranění nenavázané reagencie nedostatečné.
4. Buněčné pelety resuspendujte.
5. Upravte objem naplnění vzorkem na 100 g.

6.11.2 KROK 2: Volba separačního programu

▶ **Zapněte přístroj CliniMACS Plus Instrument.**

▶ **Volba separačního programu DEPLETION 2.1**

▶ **Vstup parametru vzorku**

Viz bod 7.2.5 na straně 141.

6.11.3 KROK 3: Instalace hadičkových souprav CliniMACS

▶ **Souprava CliniMACS Tubing Set a CliniMACS Tubing Set LS**

Viz bod 7.3.1 na straně 151.

6.11.4 KROK 4: Separace CliniMACS Plus

▶ **Provedení separace**

▶ **Odpojení vaků a zaznamenání procesního kódu**

▶ **Vyjměte sadu hadiček a vypněte**

▶ **Analýza buněk**

Viz bod 7.4.4 na straně 197.

6.12 Obohacení CD1c (BDCA-1) pozitivních buněk – část 1: Deplece CD19 pozitivních buněk a značení CD1c (BDCA-1) pozitivních buněk

Systém CliniMACS Plus CD1c (BDCA-1)-Biotin včetně přístroje CliniMACS Plus Instrument, reagencií CliniMACS CD1c (BDCA-1)-Biotin, CliniMACS CD19 Reagent a CliniMACS Anti-Biotin Reagent, sady hadiček CliniMACS Tubing Set LS nebo sady hadiček CliniMACS Tubing Set a pufru CliniMACS PBS/EDTA Buffer je určen pro *in vitro* obohacení lidských CD1c (BDCA-1) pozitivních buněk z heterogenních hematologických buněčných populací po depleci CD19 pozitivních buněk.

6.12.1 KROK 1: Příprava buněk a magnetické značení

Vyžadované první činnosti

Kapacita použití

Deplece až 5×10^9 CD19 pozitivních buněk a značení až $0{,}2\times10^9$ CD1c (BDCA-1) pozitivních buněk z až 40×10^9 celkových buněk (WBC)

⚠ UPOZORNĚNÍ

Riziko provedení nedostatečné separace označených buněk. Při překročení specifikací použití existuje riziko nedostatečného specifického označení. Použijte požadované množství buněk a reagencie, jak je popsáno pro příslušnou aplikaci.

Potřebné materiály CliniMACS

Materiál	Katalogové číslo	Množství
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS CD1c (BDCA-1)-Biotin	277-01	1 injekční lahvička
CliniMACS CD19 Reagent	179-01	1 injekční lahvička
Souprava CliniMACS Tubing Set LS	162-01	1 hadičková souprava
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	Vaky 2×1000 mL[1]

1 Před použitím doplňte pufr pomocí HSA na konečnou koncentraci 0,5 % (hm./obj.)

Tabulka 6.36: Materiály CliniMACS potřebné pro obohacení CD1c (BDCA-1) pozitivních buněk (část 1)

Další potřebné materiály (pro část 1 a část 2)

- **Cell Preparation Bag:**
  dva 600 mL přenosové vaky vhodné pro centrifugaci dále dvě spojky pro odběrové místo a tři sady pro přenos plazmy pro použití během procesů přípravy buněk

- **Vaky Plasma Waste Bag a Wash Waste Bag:**
  pět 600 mL přenosových vaků vhodných pro centrifugaci
- **Vak Cell Collection Bag (část 1):**
  jeden 600 mL přenosový vak, vhodný pro centrifugaci v kombinaci s propojovací spojkou Luer/Spike Interconnector pro připojení vaku Cell Collection Bag k soupravě hadiček
- **Vak Cell Collection Bag (část 2):**
  jeden 150 mL přenosový vak, vhodný pro centrifugaci v kombinaci s propojovací spojkou Luer/Spike Interconnector pro připojení přenosového vaku k soupravě hadiček
- dva předřazené systémové filtry
- uzavírací kleště
- injekční stříkačky (různé velikosti) a hypodermické jehly o velikosti 20
- lidský sérový albumin (HSA) pro přidání k pufru Pufr CliniMACS PBS/EDTA Buffer na koncovou koncentraci 0,5 % (hm./obj.)
- zkumavky vzorků

Magnetické značení buněk (část 1)

Podrobný popis následujících kroků naleznete v bodě 7.1 „KROK 1: Příprava buněk a magnetické značení“ na straně 119.

▶ Analýza buněčného výchozího produktu

▶ Přenos výchozího buněčného produktu do vaku Cell Preparation Bag

▶ Naředění buněčného výchozího produktu

Přidejte pufr: Hmotnost pufru, který se má přidat = hmotnost buněčného výchozího produktu × 2

▶ Odstřeďování

Centrifugujte při 200×g, bez brzdy, 15 minut, pokojová teplota pokojová teplota (RT: +19 °C až +25 °C [+66 °F až +77 °F]

▶ Úprava objemu: objem značení 90 g (±5 g)

1. Po odstranění supernatantu buněčnou peletu opatrně resuspendujte.
2. Upravte hmotnost vaku Cell Preparation Bag část 1 (CPB) přidáním pufru podle následující rovnice: Cílová hmotnost plněného CPB část 1= 90 g + hmotnost prázdného CPB
3. Buněčné pelety resuspendujte.

▶ **Inkubace reagenciemi CliniMACS CD34 Reagent a CliniMACS CD1c (BDCA-1)-Biotin**

1. Přidejte 1 injekční lahvičku reagencie CliniMACS CD19 Reagent a 1 injekční lahvičku reagencie CliniMACS CD1c (BDCA-1)-Biotin. Obsah jemně promíchejte.
2. Inkubujte na orbitálním rotátoru (25 ot/min) 30 minut při pokojové teplotě.

▶ **Odstranění přebytečné reagencie**

1. Naplňte pufrem vak Cell Preparation Bag část 1.
2. Centrifugujte (300×g, bez brzdy, 15 minut, pokojová teplota).
3. Odstraňte co nejvíce supernatantu. **Poznámka:** Odstraňte nejméně 500 g supernatantu. Pokud je odstraněno méně než 500 g supernatantu, doporučují se celkem dva promývací kroky (místo pouze jednoho). Jinak může být odstranění nenavázané reagencie nedostatečné.
4. Buněčné pelety resuspendujte.
5. Upravte objem naplnění vzorkem na 100 g.

6.12.2 KROK 2: Volba separačního programu

▶ **Zapněte přístroj CliniMACS Plus Instrument.**

▶ **Volba separačního programu DEPLETION 2.1**

▶ **Vstup parametru vzorku**

Viz bod 7.2.5 na straně 141.

6.12.3 KROK 3: Instalace hadičkových souprav CliniMACS

- **Souprava CliniMACS Tubing Set a CliniMACS Tubing Set LS**

Viz bod 7.3.1 na straně 151.

6.12.4 KROK 4: Separace CliniMACS Plus

- **Provedení separace**
- **Odpojení vaků a zaznamenání procesního kódu**
- **Vyjměte sadu hadiček a vypněte**
- **Analýza buněk**

Viz bod 7.4.4 na straně 197.

6.13 Obohacení CD1c (BDCA-1) pozitivních buněk – část 2: Flexible Labeling System

Systém CliniMACS Plus CD1c (BDCA-1)-Biotin včetně přístroje CliniMACS Plus Instrument, reagencií CliniMACS CD1c (BDCA-1)-Biotin, CliniMACS CD19 Reagent a CliniMACS Anti-Biotin Reagent, sady hadiček CliniMACS Tubing Set LS nebo sady hadiček CliniMACS Tubing Set a pufru CliniMACS PBS/EDTA Buffer je určen pro *in vitro* obohacení lidských CD1c (BDCA-1) pozitivních buněk z heterogenních hematologických buněčných populací po depleci CD19 pozitivních buněk.

6.13.1 KROK 1: Příprava buněk a magnetické značení

Vyžadované první činnosti

Kapacita použití

Až $0{,}2\times10^9$ CD1c (BDCA-1) pozitivních buněk z až 40×10^9 celkových buněk (WBC)

⚠ UPOZORNĚNÍ

Riziko provedení nedostatečné separace označených buněk. Při překročení specifikací použití existuje riziko nedostatečného specifického označení. Použijte požadované množství buněk a reagencie, jak je popsáno pro příslušnou aplikaci.

Potřebné materiály CliniMACS

Materiál	Katalogové číslo	Množství
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS Anti-Biotin Reagent	173-01	1 injekční lahvička
Souprava CliniMACS Tubing Set	161-01	1 hadičková souprava
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	Vaky 3×1000 mL[1]

1 Před použitím doplňte pufr pomocí HSA na konečnou koncentraci 0,5 % (hm./obj.)

Tabulka 6.37: Materiály CliniMACS potřebné pro obohacení CD1c (BDCA-1) pozitivních buněk (část 2)

Další potřebné materiály

Další požadované materiály naleznete v bodě 1.

▶ Příprava vaků

Určete hmotnost prázdného vaku Cell Collection Bag a vaku Cell Preparation Bag, jak je popsáno v bodě 7.1.1 na straně 119.

Magnetické značení buněk (buněčný produkt s ochuzeným CD19 (část 2))

Podrobný popis následujících kroků naleznete v bodě 7.1 „KROK 1: Příprava buněk a magnetické značení“ na straně 119.

▶ Přenesení výchozího buněčného produktu s ochuzeným CD19 do vaku Cell Preparation Bag, část 2

▶ Ředění buněčného výchozího produktu s ochuzeným CD19

Přidejte pufr: Hmotnost pufru, který se má přidat = 600 g – hmotnost buněčného výchozího produktu s ochuzeným CD19

▶ Odstřeďování

Centrifugujte při 300×g, bez brzdy, 15 minut, pokojová teplota pokojová teplota (RT: +19 °C až +25 °C [+66 °F až +77 °F]

▶ Úprava objemu: objem značení 95 g (±5 g)

1. Odeberte supernatant a upravte vzorek pomocí následující rovnice: Hmotnost supernatantu, který má být odstraněn = hmotnost naředěného buněčného produktu – objem značení
2. Buněčné pelety resuspendujte.

▶ Inkubace reagencií CliniMACS Anti-Biotin Reagent

1. Přidejte 1 injekční lahvičku reagencie CliniMACS Anti-Biotin Reagent. Obsah jemně promíchejte.

2. Inkubujte na orbitálním rotátoru (25 ot/min) 30 minut při pokojové teplotě.

▶ **Odstranění přebytečné reagencie**

1. Naplňte pufrem vak Cell Preparation Bag část 2.
2. Centrifugujte (300×g, bez brzdy, 15 minut, pokojová teplota).
3. Odstraňte co nejvíce supernatantu.
4. Buněčné pelety resuspendujte.
5. Naplňte pufrem vak Cell Preparation Bag část 2.
6. Centrifugujte (300×g, bez brzdy, 15 minut, pokojová teplota).
7. Odstraňte co nejvíce supernatantu.
8. Buněčné pelety resuspendujte.
9. Upravte objem naplnění vzorkem na 100 g.

6.13.2 KROK 2: Volba separačního programu

▶ **Zapněte přístroj CliniMACS Plus Instrument.**

▶ **Volba separačního programu ENRICHMENT 3.2**

Viz bod 7.2.4 na straně 139.

6.13.3 KROK 3: Instalace hadičkových souprav CliniMACS

▶ **Souprava CliniMACS Tubing Set a CliniMACS Tubing Set LS**

Viz bod 7.3.1 na straně 151.

6.13.4 KROK 4: Separace CliniMACS Plus

▶ **Provedení separace**

▶ **Odpojení vaků a zaznamenání procesního kódu**

▶ **Vyjměte sadu hadiček a vypněte**

▶ **Analýza buněk**

Viz bod 7.4.3 na straně 193.

6.14 Obohacení CD304 (BDCA-4) pozitivních buněk

Systém CliniMACS Plus CD304 (BDCA-4) včetně přístroje CliniMACS Plus Instrument, reagencie CliniMACS CD304 (BDCA-4) Reagent, sady hadiček CliniMACS Tubing Set a pufru CliniMACS PBS/EDTA Buffer je určen pro *in vitro* obohacení lidských CD304 (BDCA-4) pozitivních buněk z heterogenních hematologických buněčných populací.

6.14.1 KROK 1: Příprava buněk a magnetické značení

Vyžadované první činnosti

Kapacita použití

Až $0{,}2\times10^9$ CD304 (BDCA-4) pozitivních buněk z až 40×10^9 celkových buněk (WBC)

⚠ UPOZORNĚNÍ

Riziko provedení nedostatečné separace označených buněk. Při překročení specifikací použití existuje riziko nedostatečného specifického označení. Použijte požadované množství buněk a reagencie, jak je popsáno pro příslušnou aplikaci.

Potřebné materiály CliniMACS

Materiál	Katalogové číslo	Množství
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS CD304 (BDCA-4) Reagent	278-01	1 injekční lahvička
Souprava CliniMACS Tubing Set	161-01	1 hadičková souprava
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	Vaky 4×1000 mL[1]

1 Před použitím doplňte pufr CliniMACS PBS/EDTA Buffer pomocí HSA na konečnou koncentraci 0,5 % (hm./obj.)

Tabulka 6.38: Materiály CliniMACS potřebné pro obohacení CD304 (BDCA-4) pozitivních buněk

Další potřebné materiály

- **Cell Preparation Bag:**
  jeden 600 mL přenosový vak, vhodný pro centrifugaci, dále jedna spojka pro odběrové místo a tři sady pro přenos plazmy pro použití během procesů přípravy buněk
- **Vaky Plasma Waste Bag a Wash Waste Bag:**
  pět 600 mL přenosových vaků vhodných pro centrifugaci
- **Cell Collection Bag:**
  jeden 150 mL přenosový vak v kombinaci s propojovací spojkou Luer/Spike Interconnector pro připojení vaku Cell Collection Bag k soupravě hadiček

- jeden předřazený systémový filtr
- uzavírací kleště
- injekční stříkačky (různé velikosti) a hypodermické jehly o velikosti 20
- lidský sérový albumin (HSA) pro přidání k pufru Pufr CliniMACS PBS/EDTA Buffer na koncovou koncentraci 0,5 % (hm./obj.)
- zkumavky vzorků

▶ Příprava vaků

Určete hmotnost prázdného vaku Cell Collection Bag a vaku Cell Preparation Bag, jak je popsáno v bodě 7.1.1 na straně 119.

Magnetické značení buněk

Podrobný popis následujících kroků naleznete v bodě 7.1 „KROK 1: Příprava buněk a magnetické značení“ na straně 119.

▶ Analýza buněčného výchozího produktu

▶ Přenos výchozího buněčného produktu do vaku Cell Preparation Bag

▶ Ředění ochuzeného buněčného výchozího produktu

Přidejte pufr: Hmotnost pufru, který se má přidat = 600 g – hmotnost buněčného výchozího produktu

▶ Odstřeďování

Centrifugujte při 200×g, bez brzdy, 15 minut, pokojová teplota pokojová teplota (RT: +19 °C až +25 °C [+66 °F až +77 °F]

▶ Dvakrát opakujte kroky „Naředění buněčného výchozího produktu“ a „Odstřeďování“

1. Naplňte jeden přenosový vak na 600 g
2. Centrifugujte při 300×g, bez brzdy, 15 minut, pokojová teplota pokojová teplota (RT: +19 °C až +25 °C [+66 °F až +77 °F]
3. Odstraňte supernatant.

▶ **Úprava objemu: objem značení 95 g (±5 g)**

1. Zcela odstraňte supernatant a dejte pozor, abyste neresuspendovali buněčnou peletu.
2. Po odstranění supernatantu buněčnou peletu opatrně resuspendujte.
3. Upravte hmotnost vaku Cell Preparation Bag (CPB) přidáním pufru podle následující rovnice: Cílová hmotnost plněného CPB = 95 g + hmotnost prázdného CPB.
4. Buněčné pelety resuspendujte.

▶ **Inkubace reagencií CliniMACS CD304 (BDCA-4) Reagent**

1. Přidejte 1 injekční lahvičku reagencie CliniMACS CD304 (BDCA-4) Reagent. Obsah jemně promíchejte.
2. Inkubujte na orbitálním rotátoru (25 ot/min) 30 minut při pokojové teplotě.

▶ **Odstranění přebytečné reagencie**

1. Naplňte pufrem vak Cell Preparation Bag.
2. Centrifugujte (300×g, bez brzdy, 15 minut, pokojová teplota).
3. Odstraňte co nejvíce supernatantu.
4. Buněčné pelety resuspendujte.
5. Upravte objem naplnění vzorkem na 100 g.

6.14.2 KROK 2: Volba separačního programu

▶ **Zapněte přístroj CliniMACS Plus Instrument.**

▶ **Volba separačního programu ENRICHMENT 3.2**

Viz bod 7.2.4 na straně 139.

6.14.3 KROK 3: Instalace hadičkových souprav CliniMACS

▶ **Souprava CliniMACS Tubing Set a CliniMACS Tubing Set LS**

Viz bod 7.3.1 na straně 151.

6.14.4 KROK 4: Separace CliniMACS Plus

- **Provedení separace**
- **Odpojení vaků a zaznamenání procesního kódu**
- **Vyjměte sadu hadiček a vypněte**
- **Analýza buněk**

Viz bod 7.4.3 na straně 193.

6.15 Deplece TCRα/β pozitivních buněk

Systém CliniMACS Plus TCRα/β-Biotin včetně přístroje CliniMACS Plus Instrument, reagencií CliniMACS TCRα/β-Biotin, CliniMACS Anti-Biotin Reagent, sady hadiček CliniMACS Depletion Tubing Set a pufru CliniMACS PBS/EDTA Buffer je určen pro *in vitro* depleci lidských TCRα/β pozitivních buněk z heterogenních hematologických buněčných populací.

6.15.1 KROK 1: Příprava buněk a magnetické značení

Vyžadované první činnosti

Kapacita použití

Až 24×10^9 TCRα/β pozitivních buněk z až 60×10^9 celkových buněk (WBC)

⚠ UPOZORNĚNÍ

Riziko provedení nedostatečné separace označených buněk. Při překročení specifikací použití existuje riziko nedostatečného specifického označení. Použijte požadované množství buněk a reagencie, jak je popsáno pro příslušnou aplikaci.

Potřebné materiály CliniMACS

Materiál	Katalogové číslo	Množství
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS TCRα/β-Biotin	701-48	1 injekční lahvička
CliniMACS Anti-Biotin Reagent	173-01	2 injekční lahvičky
Hadičková souprava CliniMACS Depletion Tubing Set	261-01	1 hadičková souprava
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	Vaky do 4×1000 mL[1]

1 Před použitím doplňte pufr CliniMACS PBS/EDTA Buffer pomocí HSA na konečnou koncentraci 0,5 % (hm./obj.)

Tabulka 6.39: Materiály CliniMACS potřebné pro depleci TCRα/β pozitivních buněk

Další potřebné materiály

- **Cell Preparation Bag:**
  jeden 600 mL přenosový vak, vhodný pro centrifugaci, dále jedna spojka pro odběrové místo a dvě sady pro přenos plazmy pro použití během procesu přípravy buněk
- **Vaky Plasma Waste Bag a Wash Waste Bag:**
  čtyři 600 mL (nebo 1000 mL) přenosové vaky vhodné pro centrifugaci
- **Cell Collection Bag:**
  Jeden 600 mL vak Cell Collection Bag je již přimontován k soupravě CliniMACS Depletion Tubing Set.
- jeden předřazený systémový filtr
- uzavírací kleště
- injekční stříkačky (různé velikosti) a hypodermické jehly o velikosti 20
- lidský sérový albumin (HSA) pro přidání k pufru Pufr CliniMACS PBS/EDTA Buffer na koncovou koncentraci 0,5 % (hm./obj.)
- zkumavky vzorků

▶ Příprava vaků

Určete hmotnost prázdného vaku Cell Collection Bag a vaku Cell Preparation Bag, jak je popsáno v bodě 7.1.1 na straně 119.

Magnetické značení buněk

Podrobný popis následujících kroků naleznete v bodě 7.1 „KROK 1: Příprava buněk a magnetické značení“ na straně 119.

▶ Analýza buněčného výchozího produktu

Určete procento/celkový počet všech buněk značených TCRα/β (včetně nespecifické vazby TCRα/β, nejen skutečných TCRα/β pozitivních buněk). Toto číslo zvažte pro specifikace aplikace a vstup parametrů vzorku (viz KROK 2).

▶ Přenos výchozího buněčného produktu do vaku Cell Preparation Bag

▶ Naředění buněčného výchozího produktu

Přidejte pufr: Hmotnost pufru, který se má přidat = hmotnost buněčného výchozího produktu × 2

▶ Odstřeďování

1. Centrifugujte při 200×g, bez brzdy, 15 minut, pokojová teplota pokojová teplota (RT: +19 °C až +25 °C [+66 °F až +77 °F]
2. Odstraňte supernatant.

Úprava objemu: objem značení 95 g (±5 g)

1. Zcela odstraňte supernatant a dejte pozor, abyste neresuspendovali buněčnou peletu.
2. Po odstranění supernatantu buněčnou peletu opatrně resuspendujte.
3. Upravte hmotnost vaku Cell Preparation Bag (CPB) přidáním pufru podle následující rovnice: Cílová hmotnost plněného CPB = 95 g + hmotnost prázdného CPB
4. Buněčné pelety resuspendujte.

Značení buněk: inkubace reagencií CliniMACS TCRα/β-Biotin

1. Přidejte 1 injekční lahvičku reagencie CliniMACS TCRα/β-Biotin. Obsah jemně promíchejte.
2. Inkubujte na orbitálním rotátoru (25 ot/min) 30 minut při pokojové teplotě.

Odstraňte přebytek konjugátu: tento krok opakujte

1. Naplňte pufrem vak Cell Preparation Bag.
2. Centrifugujte (300×g, bez brzdy, 15 minut, pokojová teplota).
3. Odstraňte co nejvíce supernatantu.
4. Buněčné pelety resuspendujte a upravte hmotnost na 190 g po druhém promytí.

Magnetické značení buněk: inkubace pomocí reagencie CliniMACS Anti-Biotin Reagent

1. Přidejte 2 injekční lahvičky reagencie CliniMACS Anti-Biotin Reagent. Obsah jemně promíchejte.
2. Inkubujte na orbitálním rotátoru (25 ot/min) 30 minut při pokojové teplotě.

Odstranění přebytečné reagencie

1. Naplňte pufrem vak Cell Preparation Bag.
2. Centrifugujte (300×g, bez brzdy, 15 minut, pokojová teplota).
3. Odstraňte co nejvíce supernatantu. **Poznámka:** Odstraňte nejméně 500 g supernatantu. Pokud je odstraněno méně než 500 g supernatantu, doporučují se celkem dva promývací kroky (místo pouze jednoho). Jinak může být odstranění nenavázané reagencie nedostatečné.
4. Buněčné pelety resuspendujte.
5. Upravte objem naplnění vzorkem na 150 g. Doporučuje se maximální koncentrace WBC $0{,}4\times10^9$ WBC/mL.

6.15.2 KROK 2: Volba separačního programu

- **Zapněte přístroj CliniMACS Plus Instrument.**
- **Volba separačního programu DEPLETION 3.1**
- **Vstup parametru vzorku**

Viz bod 7.2.6 na straně 146.

6.15.3 KROK 3: Instalace hadičkových souprav CliniMACS

- **Hadičková souprava CliniMACS Depletion Tubing Set**

Viz bod 7.3.3 na straně 171.

6.15.4 KROK 4: Separace CliniMACS Plus

- **Provedení separace**
- **Odpojení vaků a zaznamenání procesního kódu**
- **Vyjměte sadu hadiček a vypněte**
- **Analýza buněk**

Viz bod 7.4.5 na straně 201.

6.16 Deplece CD45RA pozitivních buněk

Systém CliniMACS Plus CD45RA včetně přístroje CliniMACS Plus Instrument, reagencie CliniMACS CD45RA Reagent, sady hadiček CliniMACS Depletion Tubing Set a pufru CliniMACS PBS/EDTA Buffer je určen pro *in vitro* depleci lidských CD45RA pozitivních z heterogenních hematologických buněčných populací.

6.16.1 KROK 1: Příprava buněk a magnetické značení

Vyžadované první činnosti

Kapacita použití

Až 20×10^9 CD45RA pozitivních buněk z až 50×10^9 celkových buněk (WBC)

⚠ UPOZORNĚNÍ

Riziko provedení nedostatečné separace označených buněk. Při překročení specifikací použití existuje riziko nedostatečného specifického označení. Použijte požadované množství buněk a reagencie, jak je popsáno pro příslušnou aplikaci.

Potřebné materiály CliniMACS

Materiál	Katalogové číslo	Množství
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS CD45RA Reagent	701-46	1 injekční lahvička
Hadičková souprava CliniMACS Depletion Tubing Set	261-01	1 hadičková souprava
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	Vaky 3×1000 mL[1]

1 Před použitím doplňte pufr CliniMACS PBS/EDTA Buffer pomocí HSA na konečnou koncentraci 0,5 % (hm./obj.)

Tabulka 6.40: Materiály CliniMACS potřebné pro depleci CD45RA pozitivních buněk

Další potřebné materiály

- **Cell Preparation Bag:**
  jeden 600 mL přenosový vak, vhodný pro centrifugaci, dále jedna spojka pro odběrové místo a dvě sady pro přenos plazmy pro použití během procesu přípravy buněk
- **Plasma Waste Bag a Wash Waste Bag:**
  dva 600 mL přenosové vaky vhodné pro centrifugaci
- **Cell Collection Bag:**
  Jeden 600 mL vak Cell Collection Bag je již přimontován k soupravě CliniMACS Depletion Tubing Set.
- jeden předřazený systémový filtr
- uzavírací kleště

- injekční stříkačky (různé velikosti) a hypodermické jehly o velikosti 20
- lidský sérový albumin (HSA) pro přidání k pufru Pufr CliniMACS PBS/EDTA Buffer na koncovou koncentraci 0,5 % (hm./obj.)
- zkumavky vzorků

DŮLEŽITÉ

Alternativním výchozím buněčným zdrojem může být necílová buněčná frakce separace CliniMACS Plus CD34. Použití reagencie CliniMACS CD45RA Reagent se doporučuje pouze pro výchozí buněčné produkty obsahující CD45RA pozitivní buňky v normálním frekvenčním rozsahu (až 80 %). Vyšší frekvence byly pozorovány u několika dárců, kde je CD45RA exprimován téměř všemi PBMC kvůli vzácné mutaci v genu CD45. V takových případech může být účinnost deplece a/nebo obnova nedostatečná.

▶ Příprava vaků

Určete hmotnost prázdného vaku Cell Collection Bag a vaku Cell Preparation Bag, jak je popsáno v bodě 7.1.1 na straně 119.

Magnetické značení buněk

Podrobný popis následujících kroků naleznete v bodě 7.1 „KROK 1: Příprava buněk a magnetické značení“ na straně 119.

▶ Analýza buněčného výchozího produktu

Určete procento/celkový počet všech buněk značených CD45RA (včetně nespecifické vazby CD45RA, nejen skutečných CD45RA pozitivních buněk). Toto číslo zvažte pro specifikace aplikace a vstup parametrů vzorku (viz KROK 2).

▶ Přenos výchozího buněčného produktu do vaku Cell Preparation Bag

▶ Ředění ochuzeného buněčného výchozího produktu

Přidejte pufr: Hmotnost pufru, který se má přidat = hmotnost buněčného výchozího produktu × 2

▶ Odstřeďování

Centrifugujte při 200×g, bez brzdy, 15 minut, pokojová teplota pokojová teplota (RT: +19 °C až +25 °C [+66 °F až +77 °F]

Pokud je jako alternativní výchozí zdroj buněk použita necílová buněčná frakce separace CliniMACS CD34, lze krok ředění přeskočit. Pokračujte krokem centrifugace a centrifugujte buňky při 300 x g (bez brzdění) po dobu 15 minut při teplotě místnosti.

▶ Úprava objemu: objem značení 95 g (±5 g)

1. Zcela odstraňte supernatant a dejte pozor, abyste neresuspendovali buněčnou peletu.
2. Po odstranění supernatantu buněčnou peletu opatrně resuspendujte.
3. Upravte hmotnost vaku Cell Preparation Bag (CPB) přidáním pufru podle následující rovnice: Cílová hmotnost plněného CPB = 95 g + hmotnost prázdného CPB
4. Buněčné pelety resuspendujte.

▶ Inkubace reagencií CliniMACS CD45RA Reagent

1. Přidejte 1 injekční lahvičku reagencie CliniMACS CD45RA Reagent. Obsah jemně promíchejte.
2. Inkubujte na orbitálním rotátoru (25 ot/min) 30 minut při pokojové teplotě.

▶ Odstranění přebytečné reagencie

1. Naplňte pufrem vak Cell Preparation Bag.
2. Centrifugujte (300×g, bez brzdy, 15 minut, pokojová teplota).
3. Odstraňte co nejvíce supernatantu. **Poznámka:** Odstraňte nejméně 500 g supernatantu. Pokud je odstraněno méně než 500 g supernatantu, doporučují se celkem dva promývací kroky (místo pouze jednoho). Jinak může být odstranění nenavázané reagencie nedostatečné.
4. Buněčné pelety resuspendujte.
5. Upravte objem naplnění vzorkem. Vypočítejte hmotnost pufru potřebnou k úpravě hmotnosti buněčné suspenze na přibližně 125 g. Koncentrace buněk by neměla překročit 0,4 x 10^9 WBC/mL: hmotnost pufru, který se má přidat (g) = 125 g – hmotnost buněčného produktu po promytí (g)

6.16.2 KROK 2: Volba separačního programu

▶ Zapněte přístroj CliniMACS Plus Instrument.

▶ Volba separačního programu DEPLETION 3.1

▶ Vstup parametru vzorku

Viz bod 7.2.6 na straně 146.

6.16.3 KROK 3: Instalace hadičkových souprav CliniMACS

- **Hadičková souprava CliniMACS Depletion Tubing Set**

Viz bod 7.3.3 na straně 171.

6.16.4 KROK 4: Separace CliniMACS Plus

- **Provedení separace**
- **Odpojení vaků a zaznamenání procesního kódu**
- **Vyjměte sadu hadiček a vypněte**
- **Analýza buněk**

Viz bod 7.4.5 na straně 201.

6.17 Obohacení lidských buněk vylučujících IFN-gama systémem CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma)

Systém CliniMACS Plus CCS (IFN-gamma) System včetně přístroje CliniMACS Plus Instrument, systému CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma), sady hadiček CliniMACS Tubing Set a pufru CliniMACS PBS/EDTA Buffer je určen pro *in vitro* obohacení lidských buněk vylučujících IFN-gama z heterogenních hematologických buněčných populací.

6.17.1 KROK 1: Příprava buněk a magnetické značení

Vyžadované první činnosti

Kapacita použití

buňky vylučující IFN-gama z až 1×10^9 celkových buněk (WBC)

⚠ UPOZORNĚNÍ

Riziko provedení nedostatečné separace označených buněk. Při překročení specifikací použití existuje riziko nedostatečného specifického označení. Použijte požadované množství buněk a reagencie, jak je popsáno pro příslušnou aplikaci.

Potřebné materiály CliniMACS

Materiál	Katalogové číslo	Množství
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma)	279-01	1 souprava
Souprava CliniMACS Tubing Set	161-01	1 hadičková souprava
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	Vaky 3×1000 mL[1]

1 Před použitím doplňte pufr CliniMACS PBS/EDTA Buffer pomocí HSA na konečnou koncentraci 0,5 % (hm./obj.)

Tabulka 6.41: Materiály CliniMACS potřebné pro obohacení lidských buněk vylučujících IFN-gama

DŮLEŽITÉ

Pufr pro přípravu buněk skladujte v chladu při +2 °C až +8 °C (+36 °F až +46 °F). Teploty prostředí nižší nebo vyšší než teplota místnosti mohou mít za následek nižší čistotu a výtěžek cílových buněk.

Další potřebné materiály

- **Cell Preparation Bag:**
  dva 600 mL přenosové vaky vhodné pro centrifugaci dále dvě spojky pro odběrové místo a dvě sady pro přenos plazmy pro použití během procesů přípravy buněk
- **Plasma Waste Bag a Wash Waste Bag:**
  devět 600 mL přenosových vaků vhodných pro centrifugaci
- **Vak s médiem:**
  osm 600 mL přenosových vaků vhodných pro centrifugaci
- **Cell Collection Bag (část 2):**
  jeden 150 mL přenosový vak, vhodný pro centrifugaci v kombinaci s propojovací spojkou Luer/Spike Interconnector pro připojení přenosového vaku k soupravě hadiček
- jeden 100 mL vak s buněčnou kulturou propustný pro plyn
- jeden předřazený systémový filtr
- uzavírací kleště
- injekční stříkačky (různé velikosti) a hypodermické jehly o velikosti 20
- lidský sérový albumin (HSA) pro přidání k pufru Pufr CliniMACS PBS/EDTA Buffer na koncovou koncentraci 0,5 % (hm./obj.)
- zkumavky vzorků
- 120 mL AB séra nebo alternativně autologního séra jako doplněk k použitému médiu
- 1000 mL buněčného kultivačního média (RPMI 1640), +4 °C (+39 °F)

- 1000 mL buněčného kultivačního média (RPMI 1640), +37 °C (+99 °F) doplněných 10% (v/v) AB sérem nebo alternativně autologním sérem
- 500 mL buněčného kultivačního média (RPMI 1640), +4 °C (+39 °F) 2% (v/v) AB sérem nebo alternativně autologním sérem

▶ Požadované vybavení

Informace týkající se vybavení potřebného pro separaci CliniMACS Plus naleznete v bodě 4.7.

Další vybavení požadované pro aplikaci využívající systém CliniMACS Plus CCS (IFN-gamma) System:

- kultivační nádobka s 24 jamkami
- Separační jednotka MiniMACS
- MS Columns
- předřazený separační filtr (pouze pro kolony MS Columns)
- MACSmix Tube Rotator

▶ Příprava vaků

Určete hmotnost prázdného vaku Cell Collection Bag a vaku Cell Preparation Bag, jak je popsáno v bodě 7.1.1 na straně 119.

Poznámka: Předem ochlaďte centrifugu na +4 °C (+39 °F). Po sekreční fázi je zapotřebí třetí vak Cell Preparation Bag pro rekombinaci buněčných suspenzí. Označte proto jeden ze čtyř 600 mL přenosových vaků (připravený se 125 mL média (RPMI) doplněného 10% AB sérem) jako **buněčný přípravek č. 3 (separace)**.

Příprava buněčného výchozího produktu

Následující části popisují doporučený postup ve vaku pro přípravu výchozího buněčného produktu pomocí konektoru sterilní hadičky.

- Obsluha musí být obeznámena s provozem a používáním konektoru sterilní hadičky.
- Před zahájením postupu značení buněk a separace se ujistěte, že jsou k dispozici všechny potřebné zásoby a vybavení.

Přeneste výchozí buněčný produkt do vaku Cell Preparation Bag č. 1

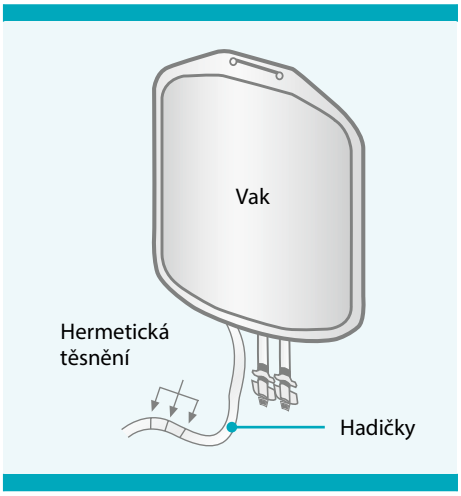
1. Před zahájením přípravy buněčného výchozího produktu si zaznamenejte datum a čas zahájení.
2. Určete objem původního buněčného výchozího produktu odhadem 1 mL původního produktu jako ekvivalentu 1 g (1 g ≙ 1 mL).

3. Oběma rukama držte vak obsahující buněčný výchozí produkt a jemným otáčivým pohybem obsah důkladně promíchejte.

4. Pomocí konektoru sterilní hadičky připojte vak Cell Preparation Bag č. 1 k vaku obsahujícímu buněčný výchozí produkt.

5. Otevřete zamykací kleště, abyste přenesli příslušnou hmotnost buněčného výchozího produktu (obsahujícího maximálně 1×10^9 buněk podle dříve stanovené frekvence leukocytů) do vačku Cell Preparation Bag č. 1. Vizuálně zkontrolujte (sledováním váhy), že byla přenesena příslušná hmotnost. Zavřete zamykací kleště vedle vaku Cell Preparation Bag.

6. Uzavřete hadičky a oddělte vaky, přičemž na vaku Cell Preparation Bag č. 1 ponechte alespoň 15 cm hadičky pro další připojení (viz Obrázek 6.1). Pomocí tepelného svařovacího zařízení vytvořte tři sousední těsnění v hadičce. Dbejte na důkladné provedení těsnění. Oddělte ve středním těsnění. Uchovávejte vak, který obsahoval výchozí buněčný produkt, dokud nebude dokončena separace a konečná analýza všech buněk.



Obrázek 6.1: Utěsnění vaku

7. Vytárujte váhy. Položte naplněný vak Cell Preparation Bag č. 1 na váhu, hadičku nechte ležet na stole. Zaznamenejte hmotnost naplněného vaku Cell Preparation Bag č. 1.

8. Určete hmotnost buněčného výchozího produktu odečtením hmotnosti prázdného vaku Cell Preparation Bag č. 1 od hmotnosti vaku Cell Preparation Bag č. 1 naplněného původním výchozím buněčným produktem. Zaznamenejte vypočítanou hmotnost.

Hmotnost buněčného výchozího produktu (g)	=	Hmotnost naplněného vaku Cell Preparation Bag č. 1(g)	–	Hmotnost prázdného vaku Cell Preparation Bag č. 1(g)

Naředění buněčného výchozího produktu

Buněčný výchozí produkt musí být naředěn kulturním médiem. Nařeďte produkt studeným médiem (+2 °C až +8 °C [+36 °F až +46 °F]) na celkový objem 500 mL. Vypočítejte hmotnost média, které se má přidat, pomocí následující rovnice a zaznamenejte ji.

Hmotnost média, které se má přidat (g)	=	500 g	–	Hmotnost naředěného buněčného výchozího produktu (g)

1. Vezměte jeden z vaků s médiem a připojte jej k vaku Cell Preparation Bag č. 1 pomocí konektoru sterilní hadičky.

2. Umístěte vak Cell Preparation Bag č. 1 na váhy a vytárujte váhy. Zavěste střední vak na držák na vak.
3. Otevřete zamykací kleště vedle vaku Cell Preparation Bag č. 1. Vizuálním sledováním hmotnosti na váze přeneste vypočítanou hmotnost média do vaku Cell Preparation Bag č. 1.
4. Po přenesení vhodné hmotnosti média zavřete uzavírací kleště vedle vaku Cell Preparation Bag č. 1, abyste zastavili průtok kapaliny.
5. Pomocí tepelného svařovacího zařízení uzavřete hadičky a na vaku Cell Preparation Bag č. 1 ponechte alespoň 15 cm hadičky pro další připojení. Odpojte vak s médiem.
6. Oběma rukama držte vak Cell Preparation Bag č. 1 a jemným otáčivým pohybem obsah důkladně promíchejte. Vyvarujte se intenzivního míchání buněk.
7. Vytárujte váhy a zvažte naplněný vak Cell Preparation Bag č. 1. Zaznamenejte hmotnost.
8. Určete hmotnost naředěného buněčného výchozího produktu odečtením hmotnosti prázdného vaku Cell Preparation Bag č. 1 od hmotnosti naplněného vaku Cell Preparation Bag č. 1. Zaznamenejte vypočítanou hmotnost.

Hmotnost naředěného buněčného výchozího produktu (g)	=	Hmotnost naplněného vaku Cell Preparation Bag č. 1 (g)	–	Hmotnost prázdného vaku Cell Preparation Bag č. 1 (g)

⚠ VAROVÁNÍ

Riziko kontaminace. Pokud nejsou vaky vhodné pro přípravu buněk nebo nejsou správně umístěny do nádobky na odstřeďování, existuje riziko kontaminace v důsledku poškození vaku. Použijte vhodné vaky, sklopte všechny volné části vaků nebo hadiček směrem dolů, dejte pozor, abyste nenarušili integritu vaku, a vaky bezpečně umístěte do nádobky odstřeďování.

⚠ UPOZORNĚNÍ

Riziko nižší účinnosti separace buněk. Pokud nejsou vaky správně umístěny do nádobky na odstřeďování, existuje riziko ztráty buněk během odstraňování supernatantu. Sklopte všechny volné části vaků nebo hadiček směrem dolů a vaky bezpečně umístěte do nádobky odstřeďování.

Odstřeďování

1. Pomocí sterilního konektoru hadičky připojte prázdný vak Plasma Waste Bag č. 1 k vaku Cell Preparation Bag č. 1.
2. Přeložte všechny volné části vaku Cell Preparation Bag č. 1 nebo hadičky dolů. Umístěte dva vaky bezpečně do nádobky na odstřeďování.
3. Vyvažte naplněnou nádobku nádobkou o vhodné hmotnosti. Je nezbytné, aby byla centrifuga přesně vyvážena.
4. Centrifugujte při 200×g (bez brzdy) 10 minut při pokojové teplotě (+19 °C až +25 °C [+66 °F až +77 °F]).

5. Vyjměte vaky z centrifugy a dejte pozor, abyste neporušili buněčnou peletu. Umístěte vak Cell Preparation Bag č. 1 na extraktor plazmy.
6. Otevřete zamykací kleště vedle vaku Cell Preparation Bag č. 1. Odstraňte úplně supernatant, dejte pozor, abyste během odstraňování supernatantu znovu nesuspendovali buněčnou peletu. Po odstranění supernatantu zavřete uzavírací kleště vedle vaku Cell Preparation Bag č. 1, abyste zastavili průtok kapaliny.
7. Pomocí tepelného svařovacího zařízení uzavřete hadičky a na vaku Cell Preparation Bag č. 1 ponechte alespoň 15 cm hadičky pro další připojení. Vak Plasma Waste Bag č. 1 odpojte.
8. Opakujte ředění a centrifugaci s použitím druhého vaku na médium připraveného pomocí studeného média a vaku Plasma Waste Bag č. 2.
9. Uchovávejte vak Plasma Waste Bags, který obsahoval výchozí buněčný produkt, dokud nebude dokončena separace a konečná analýza všech buněk.

Úprava objemu

1. Pro *in vitro* restimulaci buněk musí být objem vzorku buněk upraven na 100 mL. Po odstranění supernatantu peletu opatrně resuspendujte.
2. Upravte hmotnost vaku Cell Preparation Bag č. 1 přidáním kultivačního média s kulturou. Vypočítejte hmotnost média, které se má přidat, pomocí následující rovnice:

Hmotnost naplněného vaku Cell Preparation Bag č. 1 po úpravě objemu (g)	=	100 g	+	Hmotnost prázdného vaku Cell Preparation Bag č. 1 (g)

3. Pomocí konektoru sterilní hadičky připojte vak Cell Preparation Bag č. 1 k připravenému vaku Medium Bag 10 % (obsahujícímu 600 mL předehřátého kultivačního média doplněného 10 % AB séra). Zavěste vak Medium Bag 10% na držák na vak.
4. Vytárujte váhy. Umístěte vak Cell Preparation Bag č. 1 s buněčnou peletou na váhy.
5. Otevřete zamykací kleště vedle vaku Cell Preparation Bag č. 1. Naplňte vak Cell Preparation Bag č. 1 médiem, dokud nebude dosaženo vypočítané „Hmotnosti naplněného vaku Cell Preparation Bag č. 1 po úpravě objemu“. Zavřete uzavírací kleště vedle vaku Cell Preparation Bag č. 1, aby se zastavil průtok kapaliny.
6. Pomocí tepelného svařovacího zařízení uzavřete hadičky a na vaku Cell Preparation Bag ponechte alespoň 15 cm hadičky pro další připojení. Odpojte vak Medium Bag 10%.
7. Pomocí konektoru sterilní hadičky připojte naplněný vak Cell Preparation Bag č. 1 ke 100 mL kultivačnímu vaku propustnému pro plyn. Otevřete uzavírací kleště vedle vaku Cell Preparation Bag č. 1 a plně převeďte obsah.

⚠ UPOZORNĚNÍ

Riziko nižší účinnosti Pokud nejsou vaky vhodné pro přípravu buněk, existuje riziko kontaminace v důsledku poškození vaku. Použijte pro plyn propustné kultivační vaky vhodné pro přípravu buněk.

Označování buněk

Jeden systém CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gama), sestávající ze dvou injekčních lahviček (každá 7,5 mL), je připraven k použití a stačí pro jednu aplikaci, jak je popsáno níže. Reagencie nejsou k parenterálnímu podání.

Cílový vzorek a kontrolní vzorek

Protokol popisuje postup značení „cílového vzorku" a „kontrolního vzorku". Oba vzorky jsou zpracovány paralelně, přičemž kontrolní vzorek je zpracován přesně stejně jako cílový vzorek, ale bez přidání antigenu. Proto analýza kontrolního vzorku poskytuje informaci o spontánní sekreci cytokinů.

Opakovaná stimulace *in vitro*

DŮLEŽITÉ

- *Měl by být zahrnut malý negativní kontrolní vzorek (kontrolní vzorek), ošetřený přesně stejně jako cílový vzorek stimulovaný antigenem, ale bez přidání antigenu, jako míra spontánní sekrece cytokinů.*
- *Pro in vitro restimulaci je optimální hustota buněk 0,5–1×10^9 buněk/cm^2 a 1×10^9 buněk/mL.*

1. Pomocí sterilní injekční stříkačky (1 mL) s jehlou 20 gauge odeberte malý alikvot (např. 1 mL = přibližně 1×10^9 buněk) buněk, který bude **sloužit jako kontrolní vzorek (nestimulovaný).**
2. Kultivujte alikvot za optimálních podmínek v jedné jamce 24jamkové kultivační misky.
3. Injikujte antigen do vaku s buněčnou kultury, který je propustný pro plyn, **(cílový vzorek)** v předem stanovené koncentraci přes jeden z otvorů pomocí injekční stříkačky.
4. Oba vzorky inkubujte při +37 °C (+99 °F) a 5–7,5 % CO_2 po vhodnou dobu v inkubátoru. Pokud se jako antigeny použijí proteiny nebo buněčné lyzáty, je inkubační doba mezi 4 a 16 hodinami. U peptidů je inkubační doba 3 až 6 hodin. Vzhledem k tomu, že optimální doba stimulace je ovlivněna specifickými vlastnostmi antigenu, společnost Miltenyi Biotec doporučuje provádět specializované validační postupy pro dosažení nejlepšího výsledku.

Značení reagencií CliniMACS IFN-gamma Catchmatrix Reagent

Zaznamenejte číslo šarže a dobu použitelnosti reagencie CliniMACS IFN-gamma Catchmatrix Reagent.

Cílový vzorek

DŮLEŽITÉ

Pro sekreční fázi musí mít zvolená nádoba dostatečnou velikost, aby umožnila přidání alespoň 1 objemu studeného pufru na konci sekreční fáze. Hustota buněk nesmí překročit 1 x 10^9/mL. Proto je nutné inkubovat 1×10^9 buněk pro sekreci v celkem 1000 mL teplého kultivačního média.

1. Pomocí konektoru sterilní hadičky připojte kultivační vak k vaku Cell Preparation Bag č. 2 (sekrece) a přeneste buňky. Zajistěte úplný přenos buněk do vaku Cell Preparation Bag č. 2. Zavřete uzavírací kleště vedle vaku Cell Preparation Bag č. 2, aby se zastavil průtok kapaliny.
2. Použijte tepelné svařovací zařízení pro uzavření hadičky a na vaku Cell Preparation Bag č. 2 ponechte alespoň 15 cm hadičky pro další připojení. Odpojte prázdný kultivační vak.
3. Pomocí konektoru sterilní hadičky připojte připravený vak Medium Bag 2% (obsahující 500 mL studeného (+2 až +8 °C [+36 °F až +46 °F]) kultivačního média doplněného 2% AB sérem) k vaku Cell Preparation Bag č. 2.
4. Otevřete zamykací kleště vedle vaku Cell Preparation Bag č. 2. Naplňte vak Cell Preparation Bag č. 2 až do 600 mL. Po přenesení vhodné hmotnosti média zavřete uzavírací kleště vedle vaku Cell Preparation Bag č. 2, abyste zastavili průtok kapaliny.
5. Použijte tepelné svařovací zařízení pro uzavření hadičky a na vaku Cell Preparation Bag č. 2 ponechte alespoň 15 cm hadičky pro další připojení. Odpojte vak Medium Bag 2%.
6. Pomocí tepelného svařovacího zařízení připojte prázdný vak Plasma Waste Bag č. 1 k vaku Cell Preparation Bag č. 2.
7. Přeložte všechny volné části vaku nebo hadičky dolů. Umístěte dva vaky bezpečně do nádobky na odstřeďování.
8. Vyvažte naplněnou nádobku nádobkou o vhodné hmotnosti. Je nezbytné, aby byla centrifuga přesně vyvážena.
9. Centrifugujte buňky při 300×g (bez brzdy) 10 minut při + 4 °C až +8 °C(+39 °F až +46 °F.
10. Položte vak Cell Preparation Bag č. 2 na extraktor plazmy. Otevřete zamykací kleště vedle vaku Cell Preparation Bag č. 2. Zcela odstraňte supernatant, dávejte pozor, abyste neporušili buněčnou peletu. Zavřete uzavírací kleště vedle vaku Cell Preparation Bag č. 2, aby se zastavil průtok kapaliny.
11. Použijte tepelné svařovací zařízení pro uzavření hadičky a na vaku Cell Preparation Bag č. 2 ponechte alespoň 15 cm hadičky pro další připojení. Vak Wash Waste Bag č. 1 odpojte.
12. Po odstranění supernatantu resuspendujte buněčnou peletu ve zbytkovém objemu.
13. K vaku Cell Preparation Bag č. 2 připevněte spojku pro odběr vzorků na stanovišti a dezinfikujte přepážku. Použijte vhodnou sterilní injekční stříkačku a jehlu k odebrání 7,425 mL z injekční lahvičky reagencie CliniMACS IFN-gama

Catchmatrix Reagent. 10 mL injekční stříkačka stačí na odstranění obsahu jedné injekční lahvičky reagencie. Stříkačka by měla být vybavena jehlou 20 gauge.

14. Oběma rukama držte vak Cell Preparation Bag č. 2 a jemným otáčivým pohybem obsah důkladně promíchejte.
15. Pomocí injekčního portu na spojce pro odběr vzorků na stanovišti vstříkněte celý objem činidla do vaku Cell Preparation Bag č. 2. Dávejte pozor, abyste vak neprorazili.
16. Resuspendujte buňky a inkubujte je 5 minut na ledu. Zaznamenejte inkubační dobu.

Kontrolní vzorek (nestimulovaný)

1. Přeneste buňky do 15 mL uzavíratelné zkumavky.
2. Přidejte studené (+2 °C až +8 °C [+36 °F až +46 °F]) kultivační médium doplněné 2% AB sérem do objemu 15 mL.
3. Centrifugujte buňky při 300×g (bez brzdy) 10 minut při + 4 °C až +8 °C (+39 °F až +46 °F a opatrně úplně odstraňte supernatant.
4. Resuspendujte buněčnou peletu ve 100 µl studeného (+2 °C až +8 °C [+36 °F až +46 °F]) kultivačního média doplněného 2% AB sérem.
5. Přidejte zbývajících 75 µl reagencie CliniMACS IFN-gama Catchmatrix Reagent a inkubujte suspenzi po dobu 5 minut na ledu.

Sekreční fáze

Cílový vzorek

1. Vezměte čtyři předplněné přenosové vaky (včetně označeného vaku Cell Preparation Bag č. 3) obsahující 125 mL teplého (+37 °C [+99 °F]) kultivačního média doplněného 10% AB sérem.
2. Pomocí konektoru sterilní hadičky připojte vak Cell Preparation Bag č. 2 k připravenému vaku Medium Bag 10% (obsahujícímu předehřáté (+37 °C [+99 °F]) kultivační médium doplněné 10% AB sérem).
3. Přidejte 500 mL předehřátého kultivačního média ke vzorku buněk ve vaku Cell Preparation Bag č. 2. Ihned začněte měřit 45minutovou inkubační dobu.
4. Rozdělte 125 mL výsledné buněčné suspenze do každého ze čtyř přenosových vaků tak, že do série připojíte přenosové vaky k vaku Cell Preparation Bag č. 2 pomocí konektoru sterilní hadičky. Za vizuálního sledování hmotnosti na váze přeneste vhodnou hmotnost buněčné suspenze. Výsledkem tohoto postupu je celkem 250 g buněčné suspenze v každém ze čtyř přenosových vaků. Po přenosu utěsněte hadičky, abyste odpojili přenosové vaky pomocí tepelného svařovacího zařízení.
5. Inkubujte buňky při +37 °C (+99 °F) po zbytek 45minutového období za nepřetržitého pomalého otáčení (max 50 ot./min) až do konce inkubační doby. Zaznamenejte inkubační dobu.

6. Vezměte sadu pro přenos plazmy a dbejte na to, aby byla svorka v uzavřené poloze. Vložte propichovací kolík sady pro přenos plazmy do otvoru vaku na pufr.
7. Po 45 minutách připojte vak na pufr k vaku Cell Preparation Bag č. 3 pomocí konektoru sterilní hadičky. Přidejte studený (+2 °C až +8 °C [+36 °F až +46 °F]) pufr do každého ze čtyř přenosových vaků (alespoň jeden objem, tj. každý 250 mL) sériovým připojením přenosových vaků k vyrovnávacímu vaku. Nechte buňky vychladnout umístěním vaků na led po dobu 10 minut.
8. Pomocí konektoru sterilní hadičky připojte jeden vak Wash Waste Bag (promyjte vaky Wash Waste Bag č. 2 až 5) ke každému ze čtyř přenosových vaků.
9. Centrifugujte buňky při 300×g (bez brzdy) 10 minut při + 4 °C (+39 °F). Pomocí plazmového extraktoru úplně odstraňte supernatant ze všech vaků.
10. Pomocí tepelného svařovacího zařízení utěsněte hadičky každého vaku. Vaky Wash Waste Bag odpojte.
11. Vezměte sadu pro přenos plazmy a dbejte na to, aby byla svorka v uzavřené poloze. Vložte propichovací kolík sady pro přenos plazmy do otvoru vaku na pufr.
12. Pomocí sterilního konektoru hadičky připojte vak na pufr k vaku Cell Preparation Bag č. 3.
13. Posuňte svorku na sadě pro přenos plazmy do otevřené polohy a naplňte vak Cell Preparation Bag č. 3 200 mL pufru.
14. Po přenesení příslušné hmotnosti pufru posuňte svorku na sadě pro přenos plazmy do uzavřené polohy, aby se zastavil průtok kapaliny.
15. Pomocí tepelného svařovacího zařízení uzavřete hadičky a na vaku Cell Preparation Bag č. 3 ponechte alespoň 15 cm hadičky. Odpojte vak na pufr.
16. Pomocí konektoru sterilní hadičky připojte jeden z dalších tří přenosových vaků obsahujících buňky k vaku Cell Preparation Bag č. 3 a obě suspenze znovu spojte.

    DŮLEŽITÉ

    Rozdělené vzorky musí být před centrifugací rekombinovány ve vaku Cell Preparation Bag č. 3.
17. Tento postup opakujte, dokud se buněčné suspenze ze všech čtyř přenosových vaků znovu nespojí ve vaku Cell Preparation Bag č. 3.
18. Poté, co proběhla rekombinace buněk, připojte vak na pufr k vaku Cell Preparation Bag č. 3 pomocí konektoru sterilní hadičky.
19. Posuňte svorku na sadě pro přenos plazmy do otevřené polohy. Naplňte vak Cell Preparation Bag pufrem až do 500 mL.
20. Po přenesení příslušné hmotnosti pufru posuňte svorku na sadě pro přenos plazmy do uzavřené polohy, aby se zastavil průtok kapaliny. Uzavřete zamykací kleště vedle vaku Cell Preparation Bag č. 3.

21. Pomocí tepelného svařovacího zařízení uzavřete hadičky mezi dvěma svorkami a na vaku Cell Preparation Bag č. 3 ponechte alespoň 15 cm hadičky pro další připojení. Odpojte vak na pufr.
22. Pomocí sterilního konektoru hadičky připojte prázdný vak Wash Waste Bag č. 6 k vaku Cell Preparation Bag č. 3.
23. Přeložte všechny volné části vaku Cell Preparation Bag č. 3 nebo hadičky dolů. Umístěte dva vaky bezpečně do nádobky na odstřeďování.
24. Vyvažte naplněnou nádobku nádobkou o vhodné hmotnosti. Je nezbytné, aby byla centrifuga přesně vyvážena.
25. Centrifugujte buňky při 300×g (bez brzdy) 10 minut při + 4 °C (+39 °F).

Kontrolní vzorek (nestimulovaný)

1. Přidejte teplé (+37 °C [+99 °F]) kultivační médium doplněné 10% AB sérem k naředění vzorku na maximálně 1×10^6 buněk/mL, tj. musí být použit celkový objem 10 mL pro 1×10^9 buněk.
2. Inkubujte buňky v uzavřené zkumavce po dobu 45 minut při +37 °C (+99 °F) za pomalého nepřetržitého otáčení pomocí rotátoru MACSmix Tube Rotator (max. 50 ot./min.).
3. Po 45 minutách naplňte zkumavku studeným (+4 °C [+39 °F]) pufrem a umístěte zkumavku na 5–10 minut na led.
4. Centrifugujte buňky při 300×g (bez brzdy) 10 minut při + 4 °C až +8 °C (+39 °F až +46 °F.

Magnetické značení buněk reagencií CliniMACS IFN-gamma Enrichment Reagent

Zaznamenejte číslo šarže a dobu použitelnosti reagencie CliniMACS IFN-gamma Enrichment Reagent.

Cílový vzorek

1. Po centrifugačním kroku opatrně odstraňte supernatant pomocí plazmového extraktoru, jak je popsáno výše, a resuspendujte ve zbytkovém objemu. Uzavřete uzavřete zamykací kleště vedle vaku Cell Preparation Bag č. 3.
2. Použijte tepelné svařovací zařízení pro uzavření hadičky a na vaku Cell Preparation Bag č. 3 ponechte alespoň 15 cm hadičky pro další připojení. Vak Wash Waste Bag č. 6 odpojte.
3. K vaku Cell Preparation Bag č. 3 připevněte spojku pro odběr vzorků na stanovišti a dezinfikujte přepážku. Použijte vhodnou sterilní injekční stříkačku a jehlu k odebrání 7,425 mL z injekční lahvičky reagencie CliniMACS IFN-gama Enrichment Reagent. 10 mL injekční stříkačka stačí na odstranění obsahu jedné injekční lahvičky reagencie. Stříkačka by měla být vybavena jehlou 20 gauge.

4. Pomocí injekčního portu na spojce pro odběr vzorků na stanovišti vstříkněte reagencii do vaku Cell Preparation Bag č. 3. Dávejte pozor, abyste vak neprorazili. Okamžitě zahajte počítání 15 minut inkubační doby. Zaznamenejte čas zahájení inkubace.
5. Oběma rukama držte vak Cell Preparation Bag a jemným otáčivým pohybem obsah důkladně promíchejte.
6. Buňky inkubujte 15 minut na ledu. Zaznamenejte čas zastavení inkubace.
7. Pomocí sterilního konektoru hadičky připojte vak na pufr k vaku Cell Preparation Bag č. 3.
8. Otevřete zamykací kleště vedle vaku Cell Preparation Bag č. 3. Posuňte svorku na sadě pro přenos plazmy do otevřené polohy. Naplňte vak Cell Preparation Bag č. 3 až do 500 mL studeným (+2 °C to +8 °C [+36 °F to +46 °F]) pufrem.
9. Po přenesení příslušné hmotnosti pufru posuňte svorku na sadě pro přenos plazmy do uzavřené polohy. Uzavřete zamykací kleště vedle vaku Cell Preparation Bag č. 3. Pomocí tepelného svařovacího zařízení uzavřete hadičky mezi oběma svorkami. Odpojte vak na pufr.
10. Pomocí sterilního konektoru hadičky připojte prázdný vak Wash Waste Bag č. 7 k vaku Cell Preparation Bag č. 3.
11. Přeložte všechny volné části vaku nebo hadičky dolů. Umístěte dva vaky bezpečně do nádobky na odstřeďování.
12. Vyvažte naplněnou nádobku nádobkou o vhodné hmotnosti. Je nezbytné, aby byla centrifuga přesně vyvážena.
13. Centrifugujte při 300×g (bez brzdy) 10 minut při + 4 °C (+39 °F).
14. Opatrně odstraňte supernatant, jak je popsáno výše, a resuspendujte buňky ve 100 mL studeného (+2 °C až +8 °C [+36 °F až +46 °F]) pufru.
15. Dezinfikujte přepážku spojky místa odběru vzorků. Zasuňte jehlu s vhodnou injekční stříkačkou do spojky pro odběr vzorků na stanovišti vaku Cell Preparation Bag a odeberte objem 0,5 mL označeného produktu. Dávejte pozor, abyste vak neprorazili. Přeneste vzorek do zkumavky na vzorky. Označte zkumavku jako ORIGINÁLNÍ CÍLOVÝ VZOREK (měl by obsahovat identifikaci pacienta).

   DŮLEŽITÉ

   Před odběrem vzorku se ujistěte, že jsou buňky důkladně promíchány. Abyste získali reprezentativní vzorek, použijte injekční stříkačku o objemu alespoň 5 mL.
16. Uchovejte vzorek buněk pro analýzu buněk v chladu (+2 °C až +8 °C [+36 °F až +46 °F]).

Kontrolní vzorek (nestimulovaný)

1. Po odstředění opatrně odstraňte supernatant.
2. Resuspendujte buňky ve 100 µl studeného pufru (+2 °C až +8 °C [+36 °F až +46 °F]).

3. Přidejte 75 µl zbývající reagencie CliniMACS IFN-gama Enrichment Reagent.
4. Buňky inkubujte 15 minut na ledu.
5. Naplňte nádobu studeným pufrem (+2 °C až +8 °C [+36 °F až +46 °F]) a centrifugujte při 300×g (bez brzdy) po dobu 10 minut při +4 °C (+39 ° F).
6. Opatrně odstraňte supernatant a resuspendujte buňky ve 100 mL studeného (+2 °C až +8 °C [+36 °F až +46 °F]) pufru.
7. Odeberte malý vzorek (přibližně 100 µl) buněčné suspenze a před separací jej přeneste do zkumavky označené jako frakce ORIGINAL CONTROL SAMPLE. Do analýzy uchovávejte v chladu.

Magnetická separace

Cílový vzorek

Magnetická separace cílového vzorku se provádí pomocí přístroje CliniMACS Plus Instrument. Po separační proceduře zpracujte kontrolní vzorek, jak je popsáno níže.

Kontrolní vzorek (nestimulovaný)

1. Připravte dvě kolony MS Columns tak, že je propláchnete 500 µl studeného (+2 °C až +8 °C [+36 °F až +46 °F]) pufru a zlikvidujete výtok.
2. Umístěte první sloupec do magnetického pole separátoru MiniMACS.
3. Buňky nechte projít předseparačním filtrem, abyste odstranili shluky.
4. Naneste buněčnou suspenzi na kolonu.
5. Odeberte celkový výtok (obsahující neznačenou buněčnou frakci). Promyjte kolonu přidáním 500 µl studeného pufru na kolonu. Jakmile je zásobník kolony prázdný, proveďte celkem tři promývací kroky postupným nanesením 500 µl pufru na kolonu.
6. Vyjměte kolonu ze separátoru, vložte druhou kolonu do separátoru a umístěte první kolonu na horní část kolony druhé.
7. Do první kolony napipetujte 1 mL studeného pufru. Okamžitě propláchněte frakci s magneticky označenými buňkami pevným přiložením plunžru dodaného s kolonou přímo na druhý sloupec.
8. Odeberte neznačené buňky, které prošly skrz, a promyjte kolonu 500 µl studeného pufru. Jakmile je zásobník kolony prázdný, proveďte celkem tři promývací kroky postupným nanesením 500 µl pufru na kolonu.
9. Vyjměte druhou kolonu ze separátoru a umístěte kolonu na vhodnou odběrovou zkumavku označenou jako pozitivní frakce.
10. Do kolony napipetujte 0,5 mL studeného pufru. Okamžitě propláchněte frakci s magneticky označenými buňkami pevným přiložením plunžru dodaného s kolonou.
11. Frakci cílových buněk uchovávejte v chladu až do analýzy.

6.17.2 KROK 2: Volba separačního programu

- **Volba separačního programu ENRICHMENT 3.2**

Viz bod 7.2.4 na straně 139.

6.17.3 KROK 3: Instalace hadičkových souprav CliniMACS

- **Souprava CliniMACS Tubing Set a CliniMACS Tubing Set LS**

Viz bod 7.3.1 na straně 151.

6.17.4 KROK 4: Separace CliniMACS Plus

- **Provedení separace**
- **Odpojení vaků a zaznamenání procesního kódu**
- **Vyjměte sadu hadiček a vypněte**
- **Analýza buněk**

Viz bod 7.4.3 na straně 193.

7 Podrobné vysvětlení KROKŮ 1–4

7.1 KROK 1: Příprava buněk a magnetické značení

Tato kapitola poskytuje podrobné vysvětlení postupů, které jsou potřebné pro separaci buněk pomocí systému CliniMACS Plus.

7.1.1 Vyžadované první činnosti

Materiály potřebné pro konkrétní aplikaci naleznete v bodě specifické pro aplikaci (viz bod 5.2 na straně 37).

Příprava pufru CliniMACS PBS/EDTA Buffer

Doplňte pufr CliniMACS PBS/EDTA Buffer HSA na konečnou koncentraci 0,5 % (hm./obj.).

Příprava vaků

Informace ohledně potřebných vaků najdete v bodě specifické pro aplikaci:

- **Cell Preparation Bag** Vložte spojku pro odběr vzorků na stanovišti (nebo ekvivalent) do vnějšího vstupního otvoru vaku Cell Preparation Bag. Umístěte uzamykací kleště na hadičku blízko vaku a zavřete uzamykací kleště. Zvažte prázdný vak Cell Preparation Bag s uzamykacími kleštěmi umístěnými blízko vaku a hadičkou zavěšenou na stole vedle váhy. Zaznamenejte hmotnost.

  DŮLEŽITÉ
  Vzhledem k tomu, že délka hadičky se může během preparace lišit, buďte opatrní při určování hmotnosti vaku Cell Preparation Bag. Chcete-li získat přesné údaje, potvrďte, že uzamykací kleště jsou vždy umístěny blízko vaku a leží na váze a zbytek hadičky leží na stole vedle váhy.

- **Cell Collection Bag:**
  - Souprava CliniMACS Tubing Set / CliniMACS Tubing Set LS: Vložte spojku Luer/Spike Interconnector (nebo ekvivalent) do vnějšího vstupního otvoru vaku Cell Collection Bag. Umístěte uzamykací kleště na hadičku blízko vaku a zavřete uzamykací kleště. Zvažte prázdný vak Cell Collection Bag s uzamykacími kleštěmi umístěnými blízko vaku a hadičkou zavěšenou na stole vedle váhy. Zaznamenejte hmotnost.
  - Hadičková souprava CliniMACS Depletion Tubing Set: Jeden vak Cell Collection Bag je již připojen k soupravě hadiček. Vložte spojku Luer/Spike Interconnector (nebo ekvivalent) do vnějšího vstupního otvoru vaku Cell Collection Bag. Umístěte uzamykací kleště na hadičku blízko vaku a zavřete uzamykací kleště. Zvažte prázdný vak Cell Collection Bag s uzamykacími kleštěmi umístěnými blízko vaku a hadičkou zavěšenou na stole vedle váhy. Zaznamenejte hmotnost.

7.1.2 Magnetické značení buněk

Následující části popisují doporučený postup přípravy buněčného produktu ve vaku pomocí sterilního konektoru hadičky.

- Obsluha musí být obeznámena s provozem a používáním konektoru sterilní hadičky.
- Před zahájením postupu značení buněk a separace se ujistěte, že jsou k dispozici všechny potřebné zásoby a vybavení.

DŮLEŽITÉ

- *Veškerá manipulace s vaky by měla být prováděna ve sterilním prostředí (např. digestoř s laminárním prouděním) za použití aseptických technik. Připojení hadiček pomocí sterilního hadicového konektoru může být provedeno mimo digestoř s laminárním prouděním.*
- *Proveďte přípravu vzorku a separaci buněk za teplotních podmínek definovaných v bodě specifické pro aplikaci. Teploty nižší nebo vyšší než teplota místnosti způsobí nižší čistotu a výtěžek cílových buněk.*

Stručně řečeno, magnetické značení buněčného produktu se provádí pomocí následujících kroků:

1. analýza buněčného výchozího produktu
2. přenos výchozího buněčného produktu do vaku Cell Preparation Bag
3. ředění buněčného výchozího produktu
4. odstředění
5. pouze pro systémy CliniMACS Plus Anti-Biotin a CliniMACS Plus TCRα/β-Biotin: značení buněk (inkubace primární protilátkou/CliniMACS TCRα/β-Biotin) a odstranění přebytečného konjugátu (1. promytí)
6. úprava objemu
7. pouze pro systémy CliniMACS Plus CD3 a CD3/CD19: inkubace imunoglobulinem pro klinické použití
8. magnetické značení buněk (inkubace reagencií CliniMACS Reagent)
9. odstranění přebytečné reagencie
10. úprava objemu pro separaci buněk

Analýza buněčného výchozího produktu

Před zahájením přípravy buněčného výchozího produktu určete následující parametry:

- celkový počet leukocytů
- procento buněk, jež se mají označit
- celkový počet leukocytů, jež se mají označit
- životaschopnost

Zajistěte zpracování v rámci specifikací aplikace.

Po postupu značení znovu zkontrolujte parametry. To je nezbytné pro programy postupného načítání (ENRICHMENT 1.1/DEPLETION 2.1/DEPLETION 3.1), protože následující tři parametry vzorku je nutné zadat do softwaru během nastavování přístroje CliniMACS Plus Instrument před zavedením soupravy hadiček do přístroje:

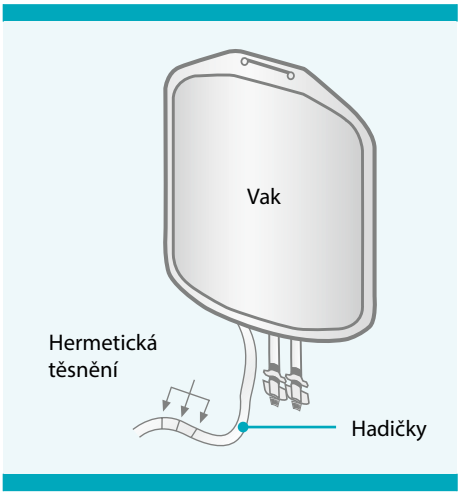
- koncentrace leukocytů na mL
- procento buněk, jež se mají označit
- konečný objem buněčného vzorku (objem naplnění vzorkem)

Mohou být vyžadovány další testy v závislosti na zamýšleném použití buněk (např. počet T buněk, fenotyp). Zaznamenejte všechny údaje.

Přenos výchozího buněčného produktu do vaku Cell Preparation Bag

1. Před zahájením přípravy buněčného výchozího produktu si zaznamenejte datum a čas zahájení.
2. Určete objem původního buněčného výchozího produktu na základě předpokladu, že 1 mL původního produktu je ekvivalentní 1 g (1 g ≙ 1 mL).
3. Oběma rukama držte vak s buněčným výchozím produktem a jemným otáčivým pohybem obsah důkladně promíchejte.
4. Připojte vak Cell Preparation Bag k vaku původního buněčného výchozího produktu pomocí sterilního konektoru hadiček.
5. Otevřete uzavírací kleště pro přenos buněčného výchozího produktu do vaku Cell Preparation Bag. K očištění hadiček od jakékoliv zbývající krve použijte nástroj na stripping hadiček. Zavřete uzavírací kleště na hadičkách co nejblíže k vaku.

6. Uzavřete hadičky a oddělte vaky, přičemž na vaku Cell Preparation Bag č. 1 ponechte alespoň 15 cm hadičky pro další připojení (viz Obrázek 7.1). Pomocí tepelného svařovacího zařízení vytvořte tři sousední těsnění v hadičce. Dbejte na důkladné provedení těsnění. Oddělte ve středním těsnění. Uchovávejte původní vak na leukaferézu / výchozí buněčný vak, dokud nebude dokončena separace a konečná analýza všech buněk.



Obrázek 7.1: Těsnění vaku.

7. Pro odběr vzorku dezinfikujte přepážku spojky místa odběru vzorků. Promíchejte obsah vaku. Zasuňte jehlu s vhodnou injekční stříkačkou do spojky pro odběr vzorků na stanovišti vaku Cell Preparation Bag a odeberte objem 0,5 mL. Přeneste vzorek do zkumavky na vzorky. Zkumavku označte jako LEUKAFERÉZA/VÝCHOZÍ BUNĚČNÝ PRODUKT (měl by obsahovat identifikaci pacienta) a uschovejte pro buněčnou analýzu.

DŮLEŽITÉ

Před odběrem vzorku se ujistěte, že je buněčný výchozí produkt důkladně promíchán. Abyste získali reprezentativní vzorek, použijte injekční stříkačku o objemu alespoň 5 mL.

8. Vytárujte váhy. Položte naplněný vak Cell Preparation Bag na váhu, hadičku nechte ležet na stole. Zaznamenejte hmotnost.

9. Určete hmotnost buněčného výchozího produktu odečtením hmotnosti prázdného vaku Cell Preparation Bag od hmotnosti vaku Cell Preparation Bag naplněného původním výchozím buněčným produktem. Zaznamenejte vypočítanou hmotnost.

Hmotnost buněčného výchozího produktu (g)	=	Hmotnost naplněného vaku Cell Preparation Bag (g)	–	Hmotnost prázdného vaku Cell Preparation Bag (g)

Naředění buněčného výchozího produktu

Informace ohledně potřebných ředicích poměrů najdete v bodě specifické pro aplikaci:

Buněčný výchozí produkt musí být před magnetickým značením ředěn pufrem CliniMACS PBS/EDTA Buffer (doplněným HSA na konečnou koncentraci 0,5 % (hm./obj.). Vypočítejte hmotnost pufru, který se má přidat, pomocí kterékoliv z následujících rovnic (1 nebo 2) v závislosti na aplikaci a zaznamenejte ji.

(1) Hmotnost pufru, který se má přidat (g)	=	600 g	−	Hmotnost buněčného výchozího produktu (g)	
(2) Hmotnost pufru, který se má přidat (g)	=	Hmotnost buněčného výchozího produktu (g)	×	2	

1. Vezměte sadu pro přenos plazmy a zajistěte, aby byla svorka v uzavřené poloze. Vložte propichovací kolík sady pro přenos plazmy do otvoru vaku na pufr.
2. Pomocí sterilního konektoru hadičky připojte vak na pufr k vaku Cell Preparation Bag. Zavěste vak s pufrem na držák na vak.
3. Umístěte vak Cell Preparation Bag na váhu a vytárujte váhu.
4. Otevřete zamykací kleště vedle vaku Cell Preparation Bag. Posuňte svorku na sadě pro přenos plazmy do otevřené polohy. Vizuálním sledováním hmotnosti na váze přeneste vypočítanou hmotnost média do vaku Cell Preparation Bag.
5. Po přenesení pufru o příslušné hmotnosti posuňte svorku na sadě pro přenos plazmy do uzavřené polohy, aby se zastavil průtok kapaliny. Zavřete uzavírací kleště na hadičce co nejblíže k vaku.
6. Pomocí tepelného svařovacího zařízení uzavřete hadičku mezi svorkou a uzavíracími kleštěmi, na vaku Cell Preparation Bag ponechte alespoň 15 cm hadičky pro další připojení. Odpojte vak na pufr.
7. Oběma rukama držte vak Cell Preparation Bag a jemným otáčivým pohybem obsah důkladně promíchejte. Vyvarujte se intenzivního míchání buněk.
8. Vytárujte váhu a zvažte naplněný vak Cell Preparation Bag. Zaznamenejte hmotnost.
9. Určete hmotnost naředěného buněčného výchozího produktu odečtením hmotnosti prázdného vaku Cell Preparation Bag od hmotnosti naplněného vaku Cell Preparation Bag. Zaznamenejte vypočítanou hmotnost.

Hmotnost naředěného buněčného výchozího produktu (g)	=	Hmotnost naplněného vaku Cell Preparation Bag (g)	−	Hmotnost prázdného vaku Cell Preparation Bag (g)

Odstřeďování

⚠ VAROVÁNÍ

Riziko kontaminace. Pokud nejsou vaky vhodné pro přípravu buněk nebo nejsou správně umístěny do nádobky na odstřeďování, existuje riziko kontaminace v důsledku poškození vaku. Použijte vhodné vaky, sklopte všechny volné části vaků nebo hadiček směrem dolů, dejte pozor, abyste nenarušili integritu vaku, a vaky bezpečně umístěte do nádobky odstřeďování.

⚠ UPOZORNĚNÍ

Riziko nižší účinnosti separace buněk. Pokud nejsou vaky správně umístěny do nádobky na odstřeďování, existuje riziko ztráty buněk během odstraňování supernatantu. Sklopte všechny volné části vaků nebo hadiček směrem dolů a vaky bezpečně umístěte do nádobky odstřeďování.

1. Pomocí sterilního konektoru hadičky připojte prázdný vak Plasma Waste Bag k vaku Cell Preparation Bag.
2. Přeložte všechny volné části vaku Cell Preparation Bag nebo hadičky dolů. Umístěte dva vaky bezpečně do nádobky na odstřeďování.
3. Vyvažte naplněnou nádobku nádobkou o vhodné hmotnosti. Je nezbytné, aby byla centrifuga přesně vyvážena.
4. Centrifugujte buňky za podmínek definovaných v bodě specifické pro aplikaci. Zaznamenejte podmínky centrifugace.
5. Vyjměte vaky z centrifugy a dejte pozor, abyste neporušili buněčnou peletu. Položte vak Cell Preparation Bag na plazmový extraktor a připojený odpadový vak na desku stolní váhy.

Úprava objemu

Pro magnetické značení buněk se optimální hmotnost buněčného produktu liší v závislosti na aplikaci. Viz objem značení v bodě specifické pro aplikaci.

V závislosti na aplikaci může být nutné buď odstranit pouze určité množství supernatantu, aby se dosáhlo objemu značení (odstranění supernatantu na míru), nebo odstranit supernatant úplně a přidat pufr, aby se dosáhlo objemu značení (úplné odstranění supernatantu). Informace ohledně ředicích poměrů aplikace najdete v bodě specifické pro aplikaci:

DŮLEŽITÉ

- *Pomocí plazmového extraktoru udržujte stálou kontrolu nad uvolňovací rukojetí extraktoru a před zahájením přenosu se ujistěte, že uzavírací kleště vedle vaku Cell Preparation Bag jsou otevřené. Pomalu uvolněte rukojeť extraktoru.*
- *Během odstraňování supernatantu buďte opatrní, abyste neztratili buňky.*

Odstranění supernatantu šité na míru

Vypočítejte hmotnost supernatantu, který má být odstraněn, abyste upravili vzorek na objem značení pomocí následující rovnice:

Hmotnost supernatantu, který se má odstranit (g)	=	Hmotnost buněčného produktu po promývání (g)	–	Objem značení (g)

Zaznamenejte hmotnost supernatantu, který se má odstranit.

1. Umístěte prázdný vak Plasma Waste Bag nebo Wash Waste Bag č. 1 na váhy a váhy vytárujte.
2. Otevřete zamykací kleště vedle vaku Cell Preparation Bag. Za vizuálního sledování stupnice na váze odstraňte supernatant pomocí plazmového extraktoru. Opatrně vytlačte přebytek supernatantu, dokud nedosáhnete vypočítané „hmotnosti supernatantu, který má být odstraněn".
3. Po odstranění vhodné hmotnosti supernatantu zavřete uzavírací kleště vedle vaku Cell Preparation Bag, abyste zastavili průtok kapaliny. Zaznamenejte hmotnost odstraněného supernatantu.
4. Pomocí tepelného svařovacího zařízení uzavřete hadičky a na vaku Cell Preparation Bag ponechte alespoň 15 cm hadičky pro další připojení. Vak Plasma Waste Bag nebo Wash Waste Bag č. 1 odpojte.
5. Opatrně resuspendujte buňky ve vaku Cell Preparation Bag. Vyvarujte se intenzivního míchání buněk. Ujistěte se, že jsou všechny buňky resuspendovány.
6. Vytárujte váhu a zvažte naplněný vak Cell Preparation Bag. Zaznamenejte hmotnost.
7. Určete hmotnost buněčného produktu po úpravě objemu odečtením hmotnosti prázdného vaku Cell Preparation Bag od hmotnosti naplněného vaku Cell Preparation Bag. Zaznamenejte vypočítanou hmotnost.

Hmotnost buněčného produktu po úpravě objemu (g)	=	Hmotnost naplněného vaku Cell Preparation Bag (g)	–	Hmotnost prázdného vaku Cell Preparation Bag (g)

8. Uchovávejte vak Plasma Waste Bag nebo Wash Waste Bag, dokud se neuskuteční konečná separace a analýza všech buněk.

Dokončete odstranění supernatantu

Odstraňte úplně supernatant, dejte pozor, abyste během odstraňování supernatantu znovu nesuspendovali buněčnou peletu. Po odstranění supernatantu zavřete uzavírací kleště vedle vaku Cell Preparation Bag, abyste zastavili průtok kapaliny. Pomocí tepelného svařovacího zařízení uzavřete hadičky a na vaku Cell Preparation Bag ponechte alespoň 15 cm hadičky pro další připojení. Vak Plasma Waste Bag odpojte. Peletu opatrně resuspendujte.

Upravte hmotnost vaku Cell Preparation Bag přidáním pufru. Vypočítejte cílovou hmotnost vaku Cell Preparation Bag (CPB) naplněného naředěným buněčným produktem pomocí následující rovnice:

Cílová hmotnost CPB naplněného promytým buněčným produktem (g)	=	Objem značení (g)	+	Hmotnost prázdného CPB

1. Vložte propichovací kolík sady pro přenos plazmy do vstupního otvoru vaku na pufr. Potvrďte si, že je svorka na sadě pro přenos plazmy v uzavřené poloze.
2. Pomocí sterilního konektoru hadičky připojte vak na pufr k vaku Cell Preparation Bag. Zavěste vak s pufrem na držák na vak.
3. Vytárujte váhy. Umístěte vak Cell Preparation Bag s buněčnou peletou na váhy.
4. Otevřete zamykací kleště vedle vaku Cell Preparation Bag. Posuňte svorku na sadě pro přenos plazmy do otevřené polohy. Naplňte vak Cell Preparation Bag pufrem, dokud nebude dosaženo vypočítané „Cílové hmotnosti naplněného vaku Cell Preparation Bag naplněného promytým buněčným produktem". Posuňte svorku na sadě pro přenos plazmy do uzavřené polohy, aby se zastavil průtok kapaliny. Zavřete zamykací kleště vedle vaku Cell Preparation Bag.
5. Pomocí tepelného svařovacího zařízení uzavřete hadičky a na vaku Cell Preparation Bag ponechte alespoň 15 cm hadičky pro další připojení. Odpojte vak na pufr.
6. Opatrně resuspendujte buňky ve vaku Cell Preparation Bag. Vyvarujte se intenzivního míchání buněk. Ujistěte se, že jsou všechny buňky resuspendovány.
7. Vytárujte váhu a zvažte naplněný vak Cell Preparation Bag. Zaznamenejte hmotnost.
8. Určete hmotnost buněčného produktu po úpravě objemu odečtením hmotnosti prázdného vaku Cell Preparation Bag od hmotnosti naplněného vaku Cell Preparation Bag. Zaznamenejte vypočítanou hmotnost.

Hmotnost buněčného produktu po úpravě objemu (g)	=	Hmotnost naplněného vaku Cell Preparation Bag (g)	–	Hmotnost prázdného vaku Cell Preparation Bag (g)

9. Uchovávejte vak Plasma Waste Bags, který obsahoval výchozí buněčný produkt, dokud nebude dokončena separace a konečná analýza všech buněk.

Značení buněk (pouze pro systém CliniMACS Plus Anti-Biotin a systém CliniMACS Plus TCRα/β-Biotin)

Inkubace reagencií CliniMACS TCRα/β-Biotin

Lahvička CliniMACS TCRα/β-Biotin je připravena k použití a dostačující pro aplikaci, jak je popsáno níže. Konjugát není určen k parenterálnímu podání.

Konjugát uchovávejte při +2 °C až +8 °C (+36 °F až +46 °F). CHRAŇTE před mrazem. Konjugát se musí používat studený přímo z chladničky. Před použitím NEZAHŘÍVEJTE. Číslo šarže a datum spotřeby konjugátu jsou vytištěny na štítku injekční lahvičky. NEPOUŽÍVEJTE konjugát po datu použitelnosti.

1. Zaznamenejte číslo šarže a dobu použitelnosti reagencie CliniMACS TCRα/β-Biotin.
2. Dezinfikujte přepážku spojky místa odběru vzorků. Použijte vhodnou sterilní stříkačku a jehlu k odstranění celého objemu z jedné injekční lahvičky (7,5 mL). 10 mL injekční stříkačka stačí na odstranění obsahu jedné injekční lahvičky reagencie. Stříkačka by měla být vybavena jehlou 20 gauge.
3. Pomocí injekčního portu na spojce místa odběru vzorku vstříkněte celý objem konjugátu do vaku Cell Preparation Bag (volitelně přeneste obsah vaku Cell Preparation Bag do nového přenosového vaku, abyste zajistili vysokou účinnost deplece). Okamžitě zahajte inkubační dobu 30 minut.
4. Oběma rukama držte vak Cell Preparation Bag a jemným otáčivým pohybem obsah důkladně promíchejte. Zaznamenejte čas zahájení inkubace.
5. Umístěte vak Cell Preparation Bag naplocho na orbitální rotátor, nastavte rychlost přibližně 25 ot./min. a ujistěte se, že vak není pomačkaný nebo ohnutý. Inkubujte vak celkem 30 minut při kontrolované pokojové teplotě (+19 °C až +25 °C [+66 °F až +77 °F]). Zaznamenejte čas zastavení inkubace.

Inkubace primární protilátkou (biotinylovaná protilátka jiného výrobce)

1. Resuspendujte buněčnou peletu a označte buňky primární biotinylovanou protilátkou v čase a titru doporučeném výrobcem protilátky. Ujistěte se, že jsou všechny buňky resuspendovány. (Primární protilátka by měla být použita v jejím optimálním titru, tj. s optimální intenzitou barvení a bez barvení pozadí. Postupujte podle návodu k použití poskytnutého výrobcem primární protilátky.)
2. Inkubujte vak Cell Preparation Bag na orbitální třepačce při 25 ot./min. Postupujte podle návodu k použití poskytnutého výrobcem primární protilátky.

Odstranění přebytečného konjugátu (1. promytí) (pouze pro systém CliniMACS Plus Anti-Biotin a systém CliniMACS Plus TCRα/β-Biotin)

Buněčný produkt nařeďte pufrem na celkovou hmotnost 600 g. Vypočítejte hmotnost pufru, který se má přidat, pomocí následující rovnice a zaznamenejte ji.

Hmotnost pufru, který se má přidat (g)	=	600 g	–	Hmotnost značeného buněčného produktu (g)

1. Nařeďte buněčný produkt podle kroků popsaných v kroku „Ředění buněčného výchozího produktu“ (kroky 1–8) na celkovou hmotnost 600 g.
2. Určete hmotnost buněčného produktu po odstranění přebytečného konjugátu (1. promytí), promytím tím, že odečtete hmotnost prázdného vaku Cell Preparation Bag od hmotnosti naplněného vaku Cell Preparation Bag. Zaznamenejte vypočítanou hmotnost.

Hmotnost buněčného produktu po odstranění přebytečného konjugátu (1. promytí) (g)	=	Hmotnost naplněného vaku Cell Preparation Bag (g)	–	Hmotnost prázdného vaku Cell Preparation Bag (g)

3. Pomocí sterilního konektoru hadičky připojte prázdný vak Wash Waste Bag k vaku Cell Preparation Bag.
4. Přeložte všechny volné části vaku Cell Preparation Bag nebo hadičky dolů. Umístěte dva vaky bezpečně do nádobky na odstřeďování.
5. Vyvažte naplněnou nádobku nádobkou o vhodné hmotnosti. Je nezbytné, aby byla centrifuga přesně vyvážena.
6. Centrifugujte buňky v podmínkách definovaných v bodě specifické pro aplikaci.
7. Vyjměte vaky z centrifugy a dejte pozor, abyste neresuspendovali buněčnou peletu. Položte vak Cell Preparation Bag na plazmový extraktor a připojený odpadový vak na desku stolní váhy.
8. Požadovaný počet promytí naleznete v sekci specifické pro aplikaci.
9. Upravte hmotnost buněčné suspenze podle popisu v bodě „Úprava objemu“ na přibližně 190 g pro magnetické značení buněk pomocí reagencie CliniMACS Anti-Biotin Reagent.

Inkubace pomocí imunoglobulinu pro klinické použití (pouze pro systémy CliniMACS Plus CD3 nebo CD3/CD19)

DŮLEŽITÉ

Všimněte si, že lidský IgG není součástí systému CliniMACS. Používejte pouze lidský IgG farmaceutické kvality schválený ve vaší zemi. Pečlivě si přečtěte příbalový leták použitého lidského IgG; zejména část týkající se reakcí z přecitlivělosti a rizika infekce, které lidský IgG jakožto produkt odvozený z krve přináší všem pacientům. Veškerá rizika vyplývající z těchto materiálů musí posoudit uživatel.

Dezinfikujte přepážku spojky místa odběru vzorku vaku Cell Preparation Bag. Použijte vhodnou sterilní stříkačku a jehlu k přidání 1,5 mg lidského IgG na mL buněčného produktu (např. 1,6 mL Gamunex 10% na 95 mL buněčného produktu). Obsah důkladně promíchejte. Inkubujte po dobu 5 minut při kontrolované pokojové teplotě jemným otáčivým pohybem (např. 25 ot./min na orbitálním rotátoru).

Magnetické značení buněk: inkubace reagencií CliniMACS Reagent

Injekční lahvičky reagencie CliniMACS jsou připraveny k použití a jsou dostačující pro aplikaci, jak je popsáno níže. Reagencie nejsou k parenterálnímu podání.

Reagencie uchovávejte při +2 °C až +8 °C (+36 °F až +46 °F). CHRAŇTE před mrazem. Reagencie se musí používat studené přímo z chladničky. Před použitím NEZAHŘÍVEJTE. Číslo šarže a datum spotřeby reagencií jsou vytištěny na štítku injekční lahvičky. NEPOUŽÍVEJTE reagencie po datu použitelnosti.

1. Zaznamenejte číslo šarže a dobu použitelnosti reagencie(í) CliniMACS.
2. Dezinfikujte přepážku spojky místa odběru vzorků. Použijte vhodnou sterilní stříkačku a jehlu k odstranění celého objemu z a) jedné injekční lahvičky nebo b) dvou injekčních lahviček reagencií (každá 7,5 mL). K odstranění obsahu jedné lahvičky postačí 10 mL injekční stříkačka, resp. 20 mL injekční stříkačka k odstranění obsahu dvou injekčních lahviček s reagenciemi. Stříkačka by měla být vybavena jehlou 20 gauge.
3. Pomocí injekčního portu na spojce místa odběru vzorku vstříkněte celý objem reagencie do vaku Cell Preparation Bag (volitelně při deplečních aplikacích přeneste obsah vaku Cell Preparation Bag do nového přenosového vaku, abyste zajistili vysokou účinnost deplece). V tomto bodě začíná běžet čas inkubace.
4. Oběma rukama držte vak Cell Preparation Bag a jemným otáčivým pohybem obsah důkladně promíchejte.
5. Umístěte vak Cell Preparation Bag naplocho na orbitální rotátor, nastavte rychlost přibližně 25 ot./min. a ujistěte se, že vak není pomačkaný nebo ohnutý. Inkubujte vak za podmínek a dobu trvání definovaných v bodě specifické pro aplikaci.

Odstranění přebytečné reagencie

K odstranění nenavázané reagencie po dokončení inkubace je nutné promytí buněk. Informace ohledně potřebného počtu promytí najdete v bodě specifické pro aplikaci.

1. Vložte propichovací kolík sady pro přenos plazmy do otvoru vaku na pufr obsahujícího nejméně 500 mL pufru. Potvrďte si, že je svorka na sadě pro přenos plazmy v uzavřené poloze.
2. Pomocí sterilního konektoru hadičky připojte vak na pufr k vaku Cell Preparation Bag. Zavěste vak s pufrem na držák na vak.
3. Umístěte vak Cell Preparation Bag na váhu a vytárujte váhu.
4. Otevřete zamykací kleště vedle vaku Cell Preparation Bag. Posuňte svorku na sadě pro přenos plazmy do otevřené polohy. Naplňte vak Cell Preparation Bag pufrem až do 600 mL. Posuňte svorku na sadě pro přenos plazmy do uzavřené polohy, aby se zastavil průtok kapaliny. Zavřete zamykací kleště vedle vaku Cell Preparation Bag. Zaznamenejte hmotnost naplněného vaku Cell Preparation Bag.
5. Uzavřete hadičky mezi oběma svorkami a na vaku Cell Preparation Bag č. 1 ponechte alespoň 15 cm hadičky pro další připojení. Odpojte vak na pufr.
6. Oběma rukama držte vak Cell Preparation Bag a obsah jemným otáčivým pohybem důkladně promíchejte.
7. Pomocí sterilního konektoru hadičky připojte prázdný vak Wash Waste Bag k vaku Cell Preparation Bag.
8. Přeložte všechny volné části vaků nebo hadičky dolů. Přeneste vak Cell Preparation Bag a vak Wash Waste Bag bezpečně do nádobky odstředivky.
9. Odstřeďujte buňky za podmínek a dobu trvání definovanou v bodě specifické pro aplikaci.
10. Dbejte na to, abyste nenarušili buněčnou peletu, vyjměte vaky z centrifugy
11. Opatrně zavěste vak Cell Preparation Bag na extraktor plazmy.
12. Umístěte vak Wash Waste Bag na váhu a vytárujte váhu.
13. Otevřete zamykací kleště vedle vaku Cell Preparation Bag. Pomocí plazmového extraktoru odstraňte co nejvíce supernatantu z vaku Cell Preparation Bag. Zavřete uzavírací kleště vedle vaku Cell Preparation Bag, aby se zastavil průtok kapaliny.
14. Pomocí tepelného svařovacího zařízení uzavřete hadičky a na vaku Cell Preparation Bag ponechte alespoň 15 cm hadičky pro další připojení. Vak Wash Waste Bag odpojte.
15. Uchovávejte vak Wash Waste Bags, který obsahoval výchozí buněčný produkt, dokud nebude dokončena separace a konečná analýza všech buněk.

16. Opatrně resuspendujte buněčnou peletu ve vaku Cell Preparation Bag. Vyvarujte se intenzivního míchání buněk. Ujistěte se, že jsou všechny buňky resuspendovány.

17. Pokud je zapotřebí více promytí (např. pro obohacení CD34 pozitivních buněk), opakujte kroky 1–16.

18. Vytárujte váhu a zvažte naplněný vak Cell Preparation Bag. Zaznamenejte hmotnost.

19. Určete hmotnost buněčného produktu po promytí odečtením hmotnosti prázdného vaku Cell Preparation Bag od hmotnosti naplněného vaku Cell Preparation Bag. Zaznamenejte vypočítanou hmotnost.

Hmotnost buněčného produktu po promývání (g)	=	Hmotnost naplněného vaku Cell Preparation Bag (g)	–	Hmotnost prázdného vaku Cell Preparation Bag (g)

20. Upravte objem naplnění vzorkem: Vypočítejte hmotnost pufru potřebnou k úpravě hmotnosti buněčné suspenze na příslušný objem vzorku podle aplikace pomocí následující rovnice. Pro naplnění označených a promytých buněk do soupravy hadiček se doporučuje maximální koncentrace buněk $0{,}4\times10^9$ buněk na mL.

Hmotnost pufru, který se má přidat (g)	=	Objem naplnění vzorkem (podle aplikace)	–	Hmotnost buněčného produktu po promývání (g)

21. Pomocí sterilního konektoru hadičky připojte vak na pufr k vaku Cell Preparation Bag. Zavěste vak s pufrem na držák na vak.

22. Umístěte vak Cell Preparation Bag na váhu a vytárujte váhu.

23. Otevřete zamykací kleště vedle vaku Cell Preparation Bag. Posuňte svorku na sadě pro přenos plazmy do otevřené polohy. Vizuálním sledováním hmotnosti na váze přeneste vypočítanou hmotnost média do vaku Cell Preparation Bag.

24. Po přenesení pufru o příslušné hmotnosti posuňte svorku na sadě pro přenos plazmy do uzavřené polohy, aby se zastavil průtok kapaliny. Zavřete zamykací kleště vedle vaku Cell Preparation Bag.

25. Pomocí tepelného svařovacího zařízení uzavřete hadičky mezi oběma svorkami. Odpojte vak na pufr.

26. Opatrně resuspendujte buněčnou peletu ve vaku Cell Preparation Bag. Vyvarujte se intenzivního míchání buněk. Ujistěte se, že jsou všechny buňky resuspendovány.

27. Dezinfikujte přepážku spojky místa odběru vzorků. Zasuňte jehlu s vhodnou injekční stříkačkou do spojky pro odběr vzorků na stanovišti vaku Cell Preparation Bag a odeberte objem 0,5 mL označeného produktu. Přeneste vzorek do zkumavky na vzorky. Zkumavku označte jako ORIGINÁL (měl by obsahovat identifikaci pacienta) a uschovejte pro buněčnou analýzu.

28. Vytárujte váhu a zvažte naplněný vak Cell Preparation Bag. Zaznamenejte hmotnost.

29. Určete hmotnost buněčného produktu po přidání pufru (objem naplnění vzorkem) odečtením hmotnosti prázdného vaku Cell Preparation Bag od hmotnosti naplněného vaku Cell Preparation Bag. Zaznamenejte vypočítanou hmotnost.

Hmotnost buněčného produktu po přidání pufru (g)	=	Hmotnost naplněného vaku Cell Preparation Bag (g)	–	Hmotnost prázdného vaku Cell Preparation Bag (g)

▶ **Přistupte ke KROKU 2.**

NEPŘIPOJUJTE vak Cell Preparation Bag ke soupravě hadiček, dokud se neobjeví příkaz k provedení takového kroku na displeji přístroje.

7.2 KROK 2: Volba separačního programu

7.2.1 Zapněte přístroj CliniMACS Plus Instrument.

Zapněte přístroj CliniMACS Plus Instrument použitím vypínače ON/OFF umístěným na zadním panelu přístroje. Zaznamenejte dobu spuštění chodu přístroje.

Okno označuje hlavní obrazovku v bodě „Instalace“ uživatelské příručky přístroje CliniMACS Plus Instrument.

Pro pokračování na programovou nabídku klepněte na **ENT**.

7.2.2 CD34 SELECTION 1/2

DŮLEŽITÉ

- *CD34 SELECTION 1 musí být použit pouze v kombinaci se soupravou hadiček CliniMACS Tubing Set (REF 161-01), zatímco CD34 SELECTION 2 musí být použit pouze v kombinaci se soupravou hadiček CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01). Před instalací pečlivě zkontrolujte soupravu hadic.*
- *V okně displeje se zobrazí výzvy na obrazovce a diagramy sloužící jako průvodce postupy. Než přistoupíte k dalšímu kroku, proveďte a zkontrolujte každý krok podle pokynů v příručce. Chcete-li opravit chybu během zadávání dat, stiskněte tlačítko „Vrátit změnu“ (viz bod „Popis“ v uživatelské příručce k přístroji CliniMACS Plus Instrument).*

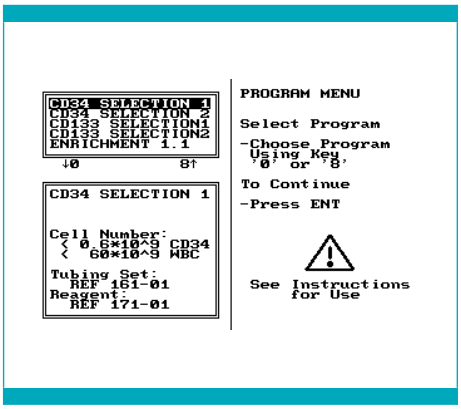
Volba separačního programu CD34 SELECTION 1/2

Okno označuje Obrazovka 7.1.

V závislosti na aplikaci zvolte CD34 SELECTION 1 nebo CD34 SELECTION 2.

Chcete-li zvolit separační program, zvýrazněte název programu černým pruhem. Pohybujte lištou nahoru a dolů pomocí kláves **0** a **8**.

Pro pokračování na zvýrazněný program stiskněte **ENT**.



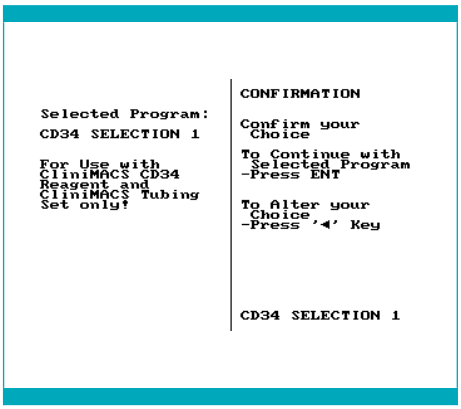
Obrazovka 7.1: Volba separačního programu

Potvrzení

Okno označuje Obrazovka 7.2.

Pro potvrzení separačního programu a pokračování stiskněte **ENT**.

Pokud ne, stiskněte ◄ pro návrat k předchozímu kroku, abyste mohli volbu upravit.



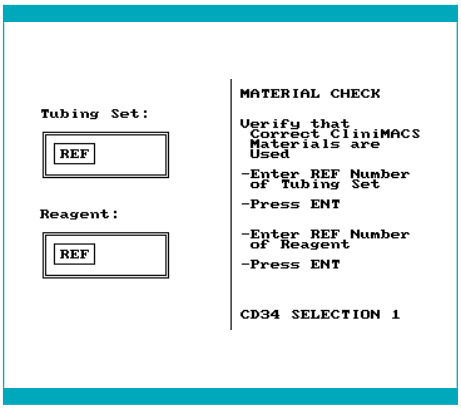
Obrazovka 7.2: Potvrzení

Kontrola materiálu

Okno označuje Obrazovka 7.3.

CD34 SELECTION 1 a CD34 SELECTION 2 jsou optimalizovány pro obohacení CD34 pozitivních buněk.

Chcete-li potvrdit, že je k dispozici vhodná souprava hadiček a že pro značení buněk byla použita správná reagencie, zadejte do pole dotazu příslušné katalogové číslo (REF). Software přístroje zkontroluje, zda lze materiály použít v kombinaci se zvoleným programem.



Obrazovka 7.3: Kontrola materiálu

1. Zadejte katalogové číslo soupravy hadiček, která se má použít pro automatickou separaci buněk. Pro potvrzení a pokračování stiskněte **ENT**.
2. Zadejte katalogové číslo reagencie, která se má použít pro značení buněk. Pro potvrzení a pokračování stiskněte **ENT**.

Pokud bylo zadáno katalogové číslo soupravy hadiček nebo reagencie, která není specifikována pro vybraný separační program, zobrazí se zpráva. Stiskněte ENT pro potvrzení a zadejte znovu správné katalogové číslo. Pokud je zadané číslo stále nesprávné, zpráva se zobrazí podruhé. Po stisknutí ENT se program automaticky vrátí do programové nabídky (viz Obrazovka 7.1).

DŮLEŽITÉ

- *CD34 SELECTION 1 musí být použit pouze v kombinaci se soupravou hadiček CliniMACS Tubing Set (REF 161-01), zatímco CD34 SELECTION 2 musí být použit pouze v kombinaci se soupravou hadiček CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01). Před instalací pečlivě zkontrolujte soupravu hadic.*
- *Chcete-li opravit chybu během zadávání dat, stiskněte tlačítko „Vrátit změnu“ (viz bod „Popis“ v uživatelské příručce k přístroji CliniMACS Plus Instrument).*

Pokud byla kontrola materiálu úspěšná, program automaticky pokračuje podle pokynů k instalaci soupravy hadic.

▶ **Přistupte ke KROKU 3.**

7.2.3 ENRICHMENT 1.1

DŮLEŽITÉ

- *Separační program ENRICHMENT 1.1 musí být použit pouze se soupravou hadiček CliniMACS Tubing Set (REF 161-01).*
- *V okně displeje se zobrazí výzvy na obrazovce a diagramy sloužící jako průvodce postupy. Než přistoupíte k dalšímu kroku, proveďte a zkontrolujte každý krok podle pokynů v příručce. Chcete-li opravit chybu během zadávání dat, stiskněte tlačítko „Vrátit změnu“ (viz bod „Popis“ v uživatelské příručce k přístroji CliniMACS Plus Instrument).*

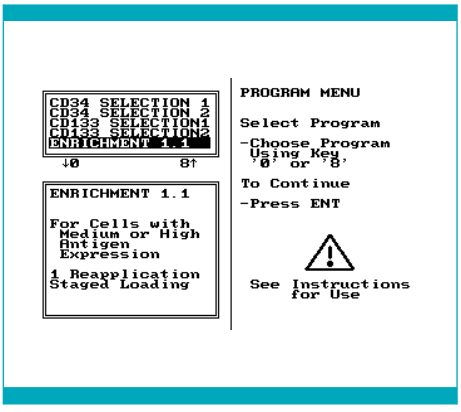
Volba separačního programu ENRICHMENT 1.1

Okno označuje Obrazovka 7.4.

Zvolte ENRICHMENT 1.1.

Chcete-li zvolit separační program, zvýrazněte název programu černým pruhem. Pohybujte lištou nahoru a dolů pomocí kláves 0 a 8.

Pro pokračování na zvýrazněný program stiskněte ENT.



Obrazovka 7.4: Volba separačního programu

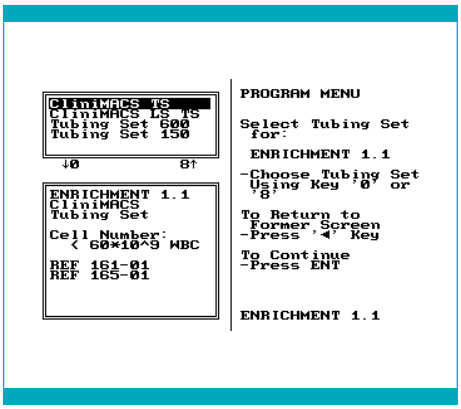
Výběr soupravy hadiček

Okno označuje Obrazovka 7.5.

Potvrďte, že byl vybrán správný program. Pokud ne, stiskněte ◄ pro návrat k předchozímu kroku, abyste mohli volbu upravit.

Vyberte soupravu hadiček tak, že ji zvýrazníte v rámečku na levé straně nahoře černým pruhem. Pohybujte lištou nahoru a dolů pomocí kláves 0 a 8.

Níže uvedené okno ukazuje příslušné údaje, jako je kapacita a katalogové číslo vybrané soupravy hadiček.



Obrazovka 7.5: Výběr soupravy hadiček

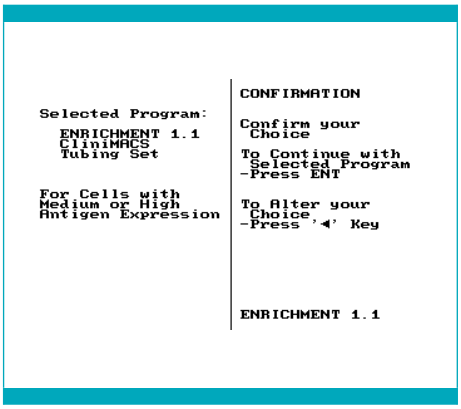
Chcete-li pokračovat s vybranou kombinací separačního programu a soupravy hadiček, stiskněte ENT.

Potvrzení

Okno označuje Obrazovka 7.6.

Pro potvrzení separačního programu a soupravy hadiček a pro pokračování stiskněte ENT.

Pokud ne, stiskněte ◄ pro návrat k předchozímu kroku, abyste mohli volbu upravit.



Obrazovka 7.6: Potvrzení

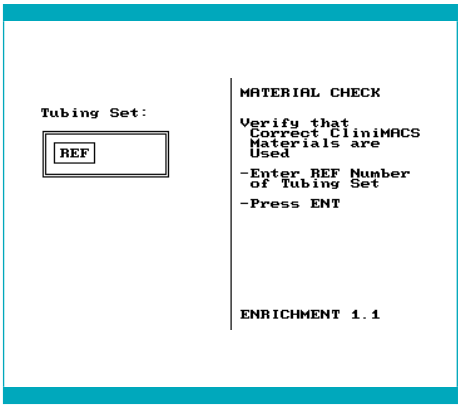
Kontrola materiálu

Okno označuje Obrazovka 7.7.

Dotaz na katalogové číslo (REF) soupravy hadiček slouží jako bezpečnostní kontrola, která zajistí, že vybranou sadu hadiček lze použít se zvoleným programem.

Zadejte katalogové číslo vybrané soupravy hadiček a pokračujte stisknutím ENT.

Pokud bylo zadáno neodpovídající katalogové číslo, zobrazí se zpráva. Pro potvrzení stiskněte ENT a zadejte správné katalogové číslo. Pokud je zadané číslo stále chybné, zpráva se zobrazí podruhé. Po stisknutí ENT se program automaticky vrátí do programové nabídky (viz Obrazovka 7.4).

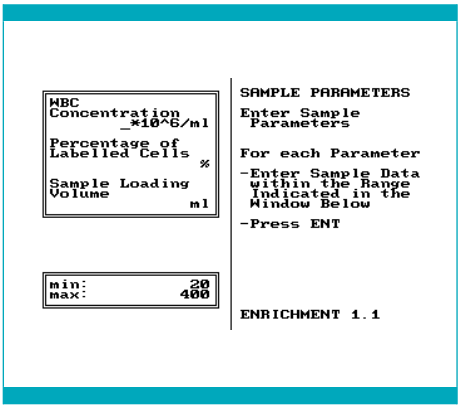


Obrazovka 7.7: Kontrola materiálu

Vstup parametru vzorku

Pokud byla kontrola materiálu úspěšná, program automaticky pokračuje dotazem na parametry vzorku, které jsou nutné pro přizpůsobení separace každému jednotlivému vzorku a pro poskytnutí důležitých informací operátorovi o požadovaných objemech pufru a vaků.

Okno označuje Obrazovka 7.8.



Obrazovka 7.8: Vstup parametru vzorku

1. Začněte zadáním koncentrace WBC ve vzorku. Povolený rozsah je zobrazen v rámečku vlevo dole. Stiskněte ◄ pro opravu chybného zadání.

   Potvrďte, že zadaná hodnota odpovídá hodnotě vzorku. Jinak nemusí být zpracování vzorků optimální. Pro pokračování dalším vstupem stiskněte ENT.

   DŮLEŽITÉ

   Všechny požadované parametry vzorku se vztahují k postupu značení buněk a promývání vzorku. Povolený rozsah zobrazený v poli vlevo dole vždy zohledňuje předchozí zadání. Po každém vstupu software vypočítá a upraví přijatelný rozsah dalšího dotazu.

   ⚠ UPOZORNĚNÍ

   Zadání nesprávných parametrů může vést k neoptimálnímu zpracování vzorku a může zvýšit riziko ztráty cílové buňky. Zadání hodnot koncentrace WBC a/nebo procenta označených buněk, které jsou nižší než skutečné hodnoty vzorku, může vést ke ztrátě buněk v důsledku přetížení systému. Zadání menšího objemu vzorku může vést ke ztrátě buněk v důsledku přetížení nebo dokonce k neúplnému zpracování vzorku. Pokud je specifikace kteréhokoli ze tří parametrů příliš vysoká, bude to mít za následek delší dobu zpracování a zvětšený objem frakce cílových buněk. Vždy se ujistěte, že zadáváte správné parametry.

2. Zadejte procento značených buněk. Potvrďte, že zadaná hodnota odpovídá hodnotě vzorku. Jinak nemusí být zpracování vzorků optimální (viz„Důležité“). Pro pokračování dalším vstupem stiskněte ENT.

3. Zadejte konečný objem vzorku buňky. Potvrďte, že zadaná hodnota odpovídá hodnotě vzorku. Jinak nemusí být zpracování vzorků optimální (viz„Důležité“).

Chcete-li pokračovat, stiskněte ENT.

Výpočet

Software CliniMACS Plus vypočítá celkový počet označených buněk, aby zkontroloval, zda je separační kapacita dostatečná.

Výsledek se zobrazí na jedné ze dvou možných obrazovek:

- Výsledek výpočtu se zobrazí na obrazovce podobné Obrazovka 7.9. Ujistěte se, že vypočítaný počet označených buněk je správný.

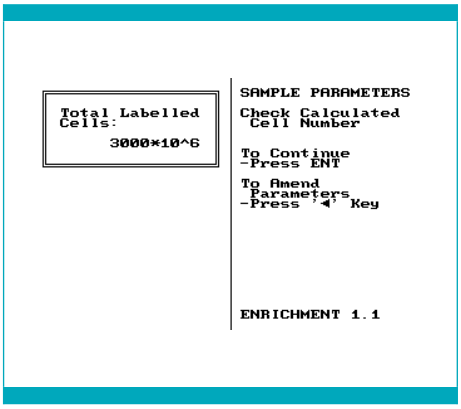
  Chcete-li pokračovat, stiskněte **ENT**.

  Je možná oprava údajů. Stisknutím ◄ se vrátíte na předchozí obrazovku pro opravu.

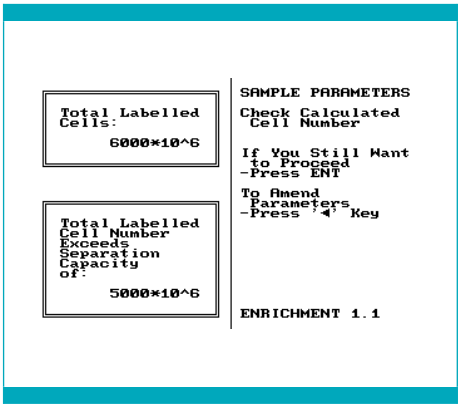
- Pokud vypočítaný počet označených buněk překročí separační kapacitu systému CliniMACS Plus, zobrazí se obrazovka podobná Obrazovka 7.10. Ujistěte se, že byly zadány správné parametry vzorku a že vypočtený počet buněk je správný. Stisknutím ◄ se vrátíte na předchozí Obrazovka 7.8 a opravíte parametry vzorku.

  Aby nedošlo k přetížení systému, rozdělte vzorek a určete objem každé části. Stisknutím ◄ se vrátíte na předchozí Obrazovka 7.8. Zadejte parametry vzorku pro první alikvot vzorku a pokračujte v separaci této části. Po dokončení separace začněte druhou separaci s druhým alikvotem pomocí nové soupravy hadiček.

  Chcete-li pokračovat, stiskněte **ENT**.



Obrazovka 7.9: Výpočet



Obrazovka 7.10: Výpočet: Počet buněk překračuje separační kapacitu

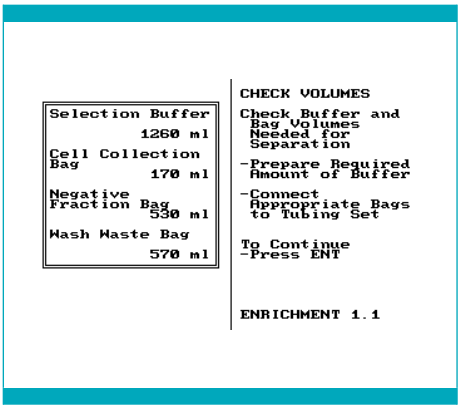
Informace o objemu

Z celkového počtu značených buněk (viz bod „Výpočet“) software vypočítá počet separačních stupňů, množství pufru potřebné pro celou separaci a objemy kapaliny, které budou shromážděny ve vaku Negative Fraction Bag, vaku Buffer Waste Bag a vaku Cell Collection Bag.

Standardní hodnoty jsou následující:

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

Pokud jedna z vypočtených hodnot překročí tyto standardní hodnoty, zdá se, že Obrazovka 7.11 informuje o množství kapaliny, které bude potřeba a nahromaděné během separačního procesu. Pokud je výměna nutná, vyměňte vaky dodané se soupravou hadiček za alternativní vaky vhodné velikosti (kapacita přibližně 500 mL). Vaky původně připojené k soupravě hadiček jsou spojeny luerovými spojkami. Vaky, které nahrazují původní vaky, by měly mít zástrčkový konektor typu luer. Standardní vaky lze propojit pomocí propojky Luer/Spike Interconnector.



Obrazovka 7.11: Zkontrolujte objemy

1. Potvrďte, že je k dispozici požadované množství pufru. Nepřipevňujte na držák na vaky více než tři litry pufru.

   OZNÁMENÍ

   Riziko poškození přístroje. Přetížení držáky na vaky může poškodit přístroj. Nosnost jednoho držáku na vak je 3 kg. Držáky na vak nepřetěžujte.

2. Otevřete zásobník soupravy hadiček za sterilních podmínek a v případě potřeby vyměňte původní vaky za větší. Zajistěte neomezený průtok do těchto vaků.

3. Připojte vak Cell Collection Bag dostatečné velikosti k volnému konektoru typu luer. Pokud není uvedeno na Obrazovka 7.11, maximální eluční objem frakce cílových buněk je 150 mL. Ujistěte se, že je možný neomezený průtok do vaku Cell Collection Bag.

DŮLEŽITÉ

- *Ujistěte se, že je k dispozici požadované množství pufru a že objem vaků uvedený na Obrazovka 7.11 je dostatečný. Jinak může dojít k narušení bezpečnosti a účinnosti přístroje.*
- *Jakékoli úpravy souprav hadiček CliniMACS by měly být prováděny za sterilních podmínek, např. v digestoři s laminárním prouděním.*
- *Pro další analýzu nebo zpracování buněk si uvědomte, že uvedené objemy na Obrazovka 7.11 nejsou přesné objemy, ale objemy v rámci bezpečnostních požadavků.*

4. Zkontrolujte připojení zámku luer na kolonách. Zámky luer se musí těsně uzavřít.

Chcete-li pokračovat, stiskněte **ENT**.

Program automaticky pokračuje podle pokynů k instalaci sady hadiček do přístroje.

▶ **Přistupte ke KROKU 3.**

7.2.4 ENRICHMENT 3.2

DŮLEŽITÉ

- *Separační program ENRICHMENT 3.2 musí být použit pouze se soupravou hadiček CliniMACS Tubing Set (REF 161-01).*
- *V okně displeje se zobrazí výzvy na obrazovce a diagramy sloužící jako průvodce postupy. Než přistoupíte k dalšímu kroku, proveďte a zkontrolujte každý krok podle pokynů v příručce. Chcete-li opravit chybu během zadávání dat, stiskněte tlačítko „Vrátit změnu“ (viz bod „Popis“ v uživatelské příručce k přístroji CliniMACS Plus Instrument).*

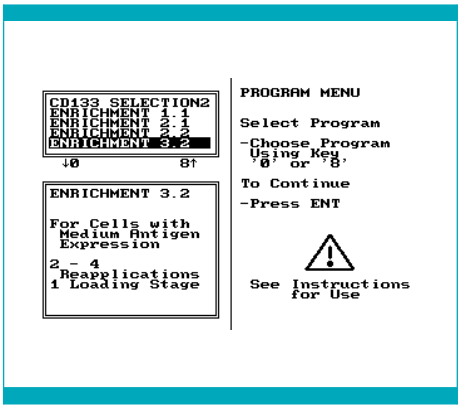
Volba separačního programu ENRICHMENT 3.2

Okno označuje Obrazovka 7.12.

Zvolte ENRICHMENT 3.2.

Chcete-li zvolit separační program, zvýrazněte název programu černým pruhem. Pohybujte lištou nahoru a dolů pomocí kláves **0** a **8**.

Pro pokračování na zvýrazněný program stiskněte **ENT**.



Obrazovka 7.12: Volba separačního programu

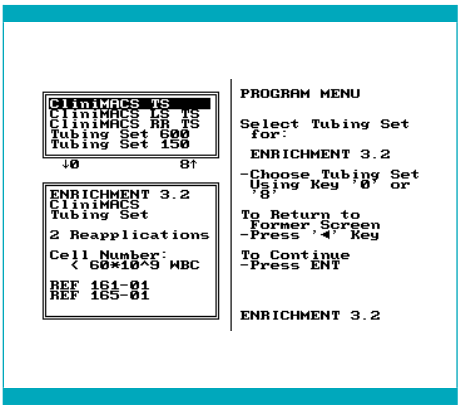
Výběr soupravy hadiček

Okno označuje Obrazovka 7.13.

Potvrďte, že byl vybrán správný program. Pokud ne, stiskněte ◄ pro návrat k předchozímu kroku, abyste mohli volbu upravit.

Vyberte soupravu hadiček tak, že ji zvýrazníte v rámečku na levé straně s černým pruhem. Pohybujte lištou nahoru a dolů pomocí kláves **0** a **8**.

Níže uvedené okno ukazuje příslušné údaje, jako je kapacita a katalogové číslo vybrané soupravy hadiček.



Obrazovka 7.13: Výběr soupravy hadiček

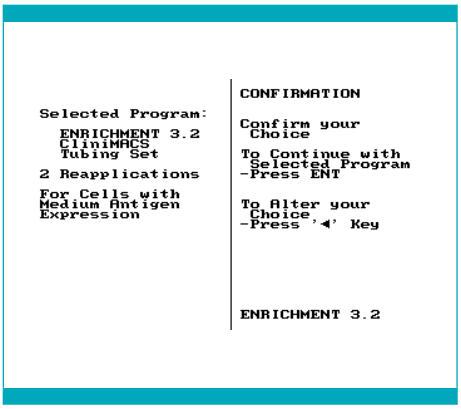
Chcete-li pokračovat s vybranou kombinací separačního programu a soupravy hadiček, stiskněte **ENT**.

Potvrzení

Okno označuje Obrazovka 7.14.

Pro potvrzení separačního programu a soupravy hadiček a pro pokračování stiskněte **ENT**.

Pokud ne, stiskněte ◄ pro návrat k předchozímu kroku, abyste mohli volbu upravit.



Obrazovka 7.14: Potvrzení

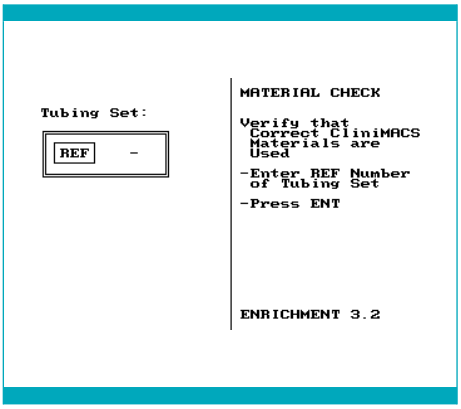
Kontrola materiálu

Okno označuje Obrazovka 7.15.

Dotaz na katalogové číslo (REF) soupravy hadiček slouží jako bezpečnostní kontrola, která zajistí, že vybranou sadu hadiček lze použít se zvoleným programem.

Zadejte katalogové číslo vybrané soupravy hadiček a pokračujte stisknutím **ENT**.

Pokud bylo zadáno neodpovídající katalogové číslo, zobrazí se zpráva.



Obrazovka 7.15: Kontrola materiálu

Pro potvrzení stiskněte **ENT** a zadejte správné katalogové číslo. Pokud je zadané číslo stále chybné, zpráva se zobrazí podruhé. Po stisknutí **ENT** se program automaticky vrátí do programové nabídky (viz Obrazovka 7.12).

Pokud byla kontrola materiálu úspěšná, program automaticky pokračuje podle pokynů k instalaci soupravy hadic.

▶ **Přistupte ke KROKU 3.**

7.2.5 DEPLETION 2.1

DŮLEŽITÉ

- *Separační program DEPLETION 2.1 musí být použit pouze se soupravou hadiček CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01).*
- *V okně displeje se zobrazí výzvy na obrazovce a diagramy sloužící jako průvodce postupy. Než přistoupíte k dalšímu kroku, proveďte a zkontrolujte každý krok podle pokynů v příručce. Chcete-li opravit chybu během zadávání dat, stiskněte tlačítko „Vrátit změnu“ (viz bod „Popis“ v uživatelské příručce k přístroji CliniMACS Plus Instrument).*

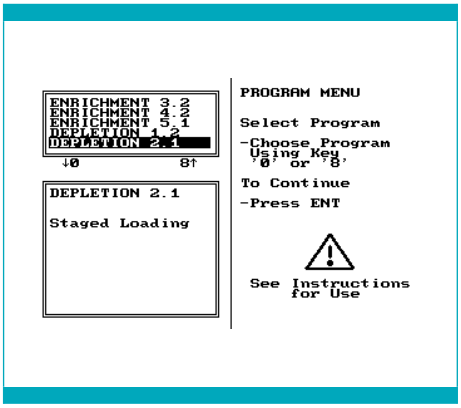
Volba separačního programu DEPLETION 2.1

Okno označuje Obrazovka 7.16.

Vyberte DEPLETION 2.1.

Chcete-li zvolit separační program, zvýrazněte název programu černým pruhem. Pohybujte lištou nahoru a dolů pomocí kláves **0** a **8**.

Pro pokračování na zvýrazněný program stiskněte **ENT**.



Obrazovka 7.16: Volba separačního programu

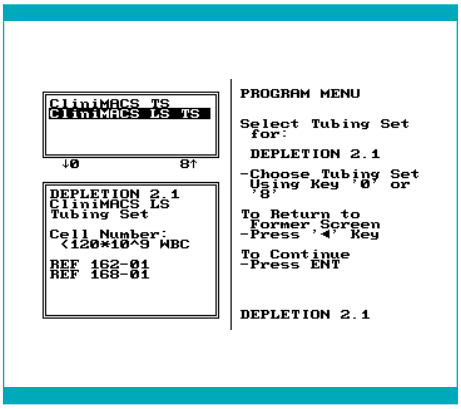
Výběr soupravy hadiček

Okno označuje Obrazovka 7.17.

Potvrďte, že byl vybrán správný program.

Pokud ne, stiskněte ◀ pro návrat k předchozímu kroku, abyste mohli volbu upravit.

Vyberte soupravu hadiček tak, že ji zvýrazníte v rámečku na levé straně nahoře černým pruhem. Pohybujte lištou nahoru a dolů pomocí kláves **0** a **8**.



Obrazovka 7.17: Výběr soupravy hadiček

Níže uvedené okno ukazuje příslušné údaje, jako je kapacita a katalogové číslo vybrané soupravy hadiček.

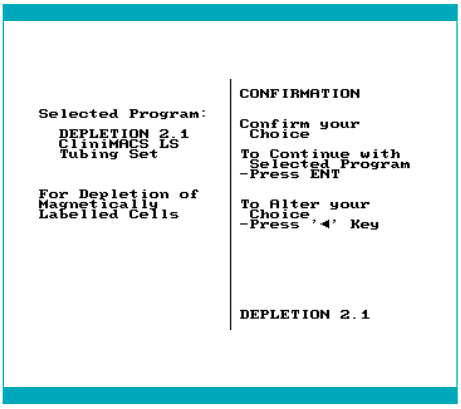
Chcete-li pokračovat s vybranou kombinací separačního programu a soupravy hadiček, stiskněte ENT.

Potvrzení

Okno označuje Obrazovka 7.18.

Pro potvrzení separačního programu a soupravy hadiček a pro pokračování stiskněte ENT.

Pokud ne, stiskněte ◄ pro návrat k předchozímu kroku, abyste mohli volbu upravit.



Obrazovka 7.18: Potvrzení

Kontrola materiálu

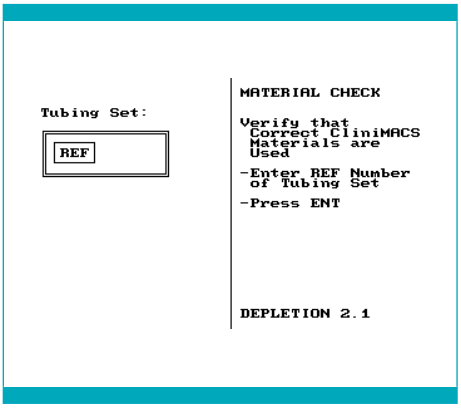
Okno označuje Obrazovka 7.19.

Dotaz na katalogové číslo (REF) soupravy hadiček slouží jako bezpečnostní kontrola, která zajistí, že vybranou sadu hadiček vybranou obsluhou lze použít.

Zadejte katalogové číslo vybrané soupravy hadiček a pokračujte stisknutím ENT.

Pokud bylo zadáno neodpovídající katalogové číslo, zobrazí se zpráva.

Pro potvrzení stiskněte ENT a zadejte správné katalogové číslo. Pokud je zadané číslo stále chybné, zpráva se zobrazí podruhé. Po stisknutí ENT se program automaticky vrátí do programové nabídky (viz Obrazovka 7.16).

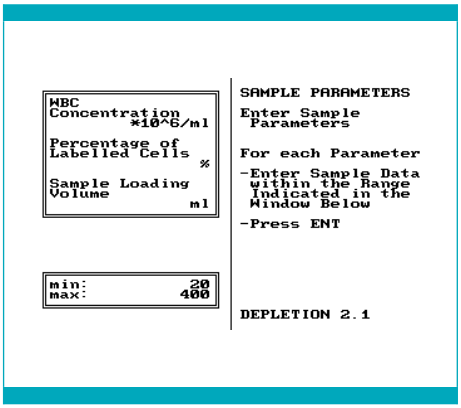


Obrazovka 7.19: Kontrola materiálu

Vstup parametru vzorku

Pokud byla kontrola materiálu úspěšná, program automaticky pokračuje dotazem na parametry vzorku, které jsou nutné pro přizpůsobení separace každému jednotlivému vzorku a pro poskytnutí důležitých informací operátorovi o požadovaných objemech pufru a vaků.

Okno označuje Obrazovka 7.20.



Obrazovka 7.20: Vstup parametru vzorku

1. Začněte zadáním koncentrace WBC ve vzorku. Povolený rozsah je zobrazen v rámečku vlevo dole. Stiskněte ◄ pro opravu chybného zadání.

   Potvrďte, že zadaná hodnota odpovídá hodnotě vzorku. Jinak nemusí být zpracování vzorků optimální.

   DŮLEŽITÉ

   Všechny požadované parametry vzorku se vztahují k postupu značení buněk a promývání vzorku. Povolený rozsah zobrazený v poli vlevo dole vždy zohledňuje předchozí zadání. Po každém vstupu software vypočítá a upraví přijatelný rozsah dalšího dotazu.

   ⚠ UPOZORNĚNÍ

   Zadání nesprávných parametrů může vést k neoptimálnímu zpracování vzorku a může zvýšit riziko ztráty cílové buňky. Zadání hodnot koncentrace WBC a/nebo procenta označených buněk, které jsou nižší než skutečné hodnoty vzorku, může vést ke ztrátě buněk v důsledku přetížení systému. Zadání menšího objemu vzorku může vést ke ztrátě buněk v důsledku přetížení nebo dokonce k neúplnému zpracování vzorku. Pokud je specifikace kteréhokoli ze tří parametrů příliš vysoká, bude to mít za následek delší dobu zpracování a zvětšený objem frakce cílových buněk. Vždy se ujistěte, že zadáváte správné parametry.

   Pro pokračování dalším vstupem stiskněte **ENT**.

2. Zadejte procento značených buněk. Potvrďte, že zadaná hodnota odpovídá hodnotě vzorku. Jinak nemusí být zpracování vzorků optimální (viz„Důležité“).

   Pro pokračování dalším vstupem stiskněte **ENT**.

3. Zadejte konečný objem vzorku buňky. Potvrďte, že zadaná hodnota odpovídá hodnotě vzorku. Jinak nemusí být zpracování vzorků optimální (viz„Důležité“).

Chcete-li pokračovat, stiskněte **ENT**.

Výpočet

Software CliniMACS Plus vypočítá celkový počet označených buněk, aby zkontroloval, zda je separační kapacita dostatečná.

Výsledek se zobrazí na jedné ze dvou možných obrazovek:

- Výsledek výpočtu se zobrazí na obrazovce podobné Obrazovka 7.21. Ujistěte se, že vypočítaný počet označených buněk je správný.

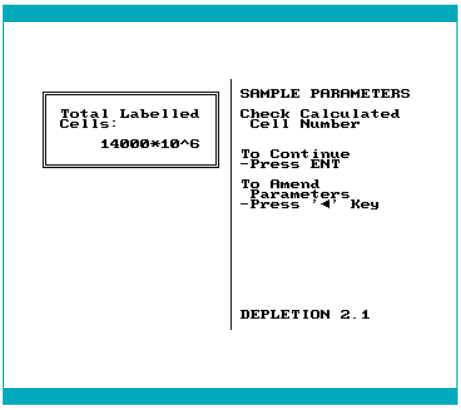
  Chcete-li pokračovat, stiskněte **ENT**.

  Je možná oprava údajů. Stisknutím ◄ se vrátíte na předchozí obrazovku pro opravu.

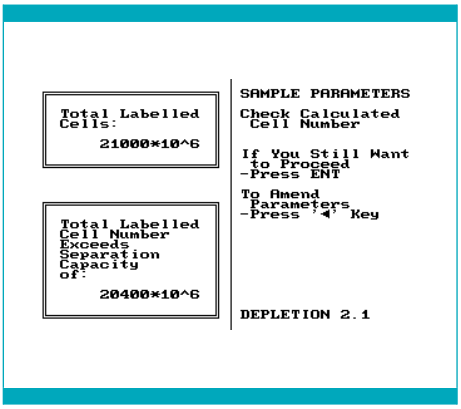
- Pokud vypočítaný počet označených buněk překročí separační kapacitu systému CliniMACS Plus, zobrazí se obrazovka podobná Obrazovka 7.22. Ujistěte se, že byly zadány správné parametry vzorku a že vypočtený počet buněk je správný. Stisknutím ◄ se vrátíte na předchozí obrazovky a opravte parametry vzorku.

  Aby nedošlo k přetížení systému, rozdělte vzorek a určete objem každé části. Stisknutím ◄ se vrátíte na předchozí Obrazovka 7.20. Zadejte parametry vzorku pro první alikvot vzorku a pokračujte v separaci této části. Po dokončení separace začněte druhou separaci s druhým alikvotem pomocí nové soupravy hadiček.

  Chcete-li pokračovat, stiskněte **ENT**.



Obrazovka 7.21: Výpočet



Obrazovka 7.22: Výpočet: Počet buněk překračuje separační kapacitu

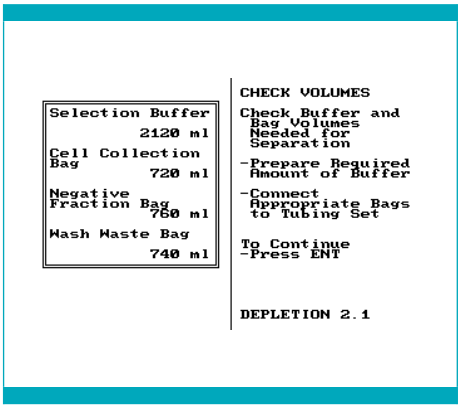
Informace o objemu

Z celkového počtu značených buněk (viz bod „Výpočet“) software vypočítá počet separačních stupňů, množství pufru potřebné pro celou separaci a objemy kapaliny, které budou shromážděny ve vaku Negative Fraction Bag, vaku Buffer Waste Bag a vaku Cell Collection Bag.

Standardní hodnoty jsou následující:

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

Pokud jedna z vypočtených hodnot překročí tyto standardní hodnoty, zdá se, že Obrazovka 7.23 informuje o množství kapaliny, které bude potřeba a nahromaděné během separačního procesu. Pokud je výměna nutná, vyměňte vaky dodané se soupravou hadiček za alternativní vaky vhodné velikosti (kapacita přibližně 500 mL). Vaky původně připojené k soupravě hadiček jsou spojeny luerovými spojkami. Vaky, které nahrazují původní vaky, by měly mít zástrčkový konektor typu luer. Standardní vaky lze propojit pomocí propojky Luer/Spike Interconnector.



Obrazovka 7.23: Zkontrolujte objemy

1. Potvrďte, že je k dispozici požadované množství pufru. Nepřipevňujte na držák na vaky více než tři litry pufru.

   OZNÁMENÍ

   Riziko poškození přístroje. Přetížení držáky na vaky může poškodit přístroj. Nosnost jednoho držáku na vak je 3 kg. Držáky na vak nepřetěžujte.

2. Otevřete zásobník soupravy hadiček za sterilních podmínek a v případě potřeby vyměňte původní vaky za větší. Zajistěte neomezený průtok do těchto vaků.

3. Připojte vak Cell Collection Bag dostatečné velikosti k volnému konektoru typu luer. Pokud není uvedeno na Obrazovka 7.23, maximální eluční objem frakce cílových buněk je 150 mL. Ujistěte se, že je možný neomezený průtok do vaku Cell Collection Bag.

   DŮLEŽITÉ

   - *Ujistěte se, že je k dispozici požadované množství pufru a že objem vaků uvedený na Obrazovka 7.23 je dostatečný. Jinak může dojít k narušení bezpečnosti a účinnosti přístroje.*
   - *Jakékoli úpravy souprav hadiček CliniMACS by měly být prováděny za sterilních podmínek, např. v digestoři s laminárním prouděním.*
   - *Pro další analýzu nebo zpracování buněk si uvědomte, že uvedené objemy na Obrazovka 7.23 nejsou přesné objemy, ale objemy v rámci bezpečnostních požadavků.*

4. Zkontrolujte připojení zámku luer na kolonách. Zámky luer se musí těsně uzavřít.

Chcete-li pokračovat, stiskněte **ENT**.

Program automaticky pokračuje podle pokynů k instalaci sady hadiček do přístroje.

▶ **Přistupte ke KROKU 3.**

7.2.6 DEPLETION 3.1

DŮLEŽITÉ

- *Separační program DEPLETION 3.1 musí být použit pouze se soupravou hadiček CliniMACS Tubing Set (REF 261-01).*
- *V okně displeje se zobrazí výzvy na obrazovce a diagramy sloužící jako průvodce postupy. Než přistoupíte k dalšímu kroku, proveďte a zkontrolujte každý krok podle pokynů v příručce. Chcete-li opravit chybu během zadávání dat, stiskněte tlačítko „Vrátit změnu“ (viz bod „Popis“ v uživatelské příručce k přístroji CliniMACS Plus Instrument).*

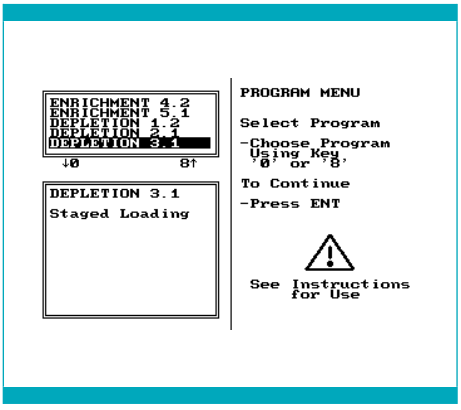
Volba separačního programu DEPLETION 3.1

Okno označuje Obrazovka 7.24.

Vyberte DEPLETION 3.1.

Chcete-li zvolit separační program, zvýrazněte název programu černým pruhem. Pohybujte lištou nahoru a dolů pomocí kláves **0** a **8**.

Pro pokračování na zvýrazněný program stiskněte **ENT**.



Obrazovka 7.24: Volba separačního programu

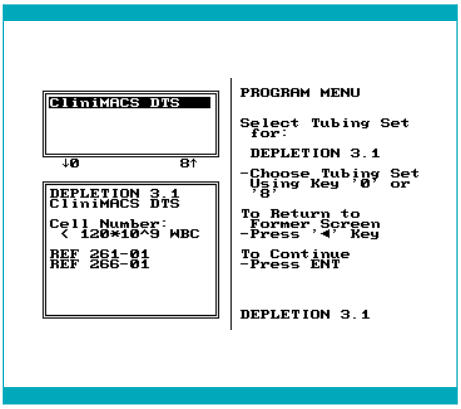
Výběr soupravy hadiček

Okno označuje Obrazovka 7.25.

Potvrďte, že byl vybrán správný program. Pokud ne, stiskněte ◄ pro návrat k předchozímu kroku, abyste mohli volbu upravit.

Vyberte soupravu hadiček tak, že ji zvýrazníte v rámečku na levé straně nahoře černým pruhem. Pohybujte lištou nahoru a dolů pomocí kláves **0** a **8**.

Níže uvedené okno ukazuje příslušné údaje, jako je kapacita a katalogové číslo vybrané soupravy hadiček.



Obrazovka 7.25: Výběr soupravy hadiček

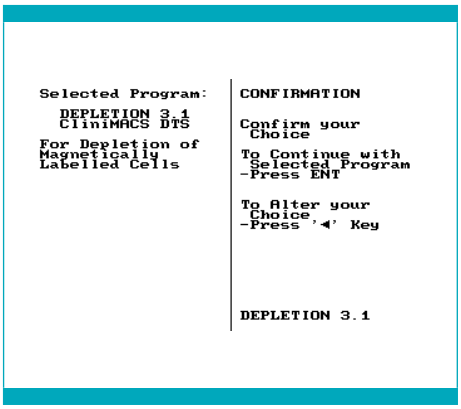
Chcete-li pokračovat s vybranou kombinací separačního programu a soupravy hadiček, stiskněte **ENT**.

Potvrzení

Okno označuje Obrazovka 7.26.

Pro potvrzení separačního programu a soupravy hadiček a pro pokračování stiskněte **ENT**.

Pokud ne, stiskněte ◄ pro návrat k předchozímu kroku, abyste mohli volbu upravit.



Obrazovka 7.26: Potvrzení

Kontrola materiálu

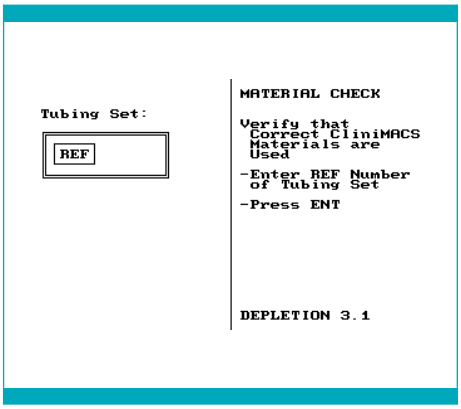
Okno označuje Obrazovka 7.27.

Dotaz na katalogové číslo (REF) soupravy hadiček slouží jako bezpečnostní kontrola, která zajistí, že vybranou sadu hadiček vybranou obsluhou lze použít.

Zadejte katalogové číslo vybrané soupravy hadiček a pokračujte stisknutím **ENT**.

Pokud bylo zadáno neodpovídající katalogové číslo, zobrazí se zpráva.

Pro potvrzení stiskněte **ENT** a zadejte správné katalogové číslo. Pokud je zadané číslo stále chybné, zpráva se zobrazí podruhé. Po stisknutí **ENT** se program automaticky vrátí do programové nabídky (viz Obrazovka 7.25).

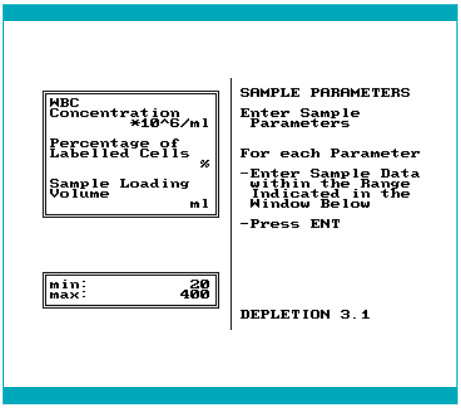


Obrazovka 7.27: Kontrola materiálu

Vstup parametru vzorku

Pokud byla kontrola materiálu úspěšná, program automaticky pokračuje dotazem na některé parametry vzorku, které jsou nutné pro přizpůsobení separace každému jednotlivému vzorku a pro poskytnutí důležitých informací operátorovi o požadovaných objemech pufru a vaků.

Okno označuje Obrazovka 7.28.



Obrazovka 7.28: Vstup parametru vzorku

1. Začněte zadáním koncentrace WBC ve vzorku. Povolený rozsah je zobrazen v rámečku vlevo dole. Stiskněte ◄ pro opravu chybného zadání.

   Potvrďte, že zadaná hodnota odpovídá hodnotě vzorku. Jinak nemusí být zpracování vzorků optimální.

   DŮLEŽITÉ

   Všechny požadované parametry vzorku se vztahují k postupu značení buněk a promývání vzorku. Povolený rozsah zobrazený v poli vlevo dole vždy zohledňuje předchozí zadání. Po každém vstupu software vypočítá a upraví přijatelný rozsah dalšího dotazu.

   ⚠ UPOZORNĚNÍ

   Zadání nesprávných parametrů může vést k neoptimálnímu zpracování vzorku a může zvýšit riziko ztráty cílové buňky. Zadání hodnot koncentrace WBC a/nebo procenta označených buněk, které jsou nižší než skutečné hodnoty vzorku, může vést ke ztrátě buněk v důsledku přetížení systému. Zadání menšího objemu vzorku může vést ke ztrátě buněk v důsledku přetížení nebo dokonce k neúplnému zpracování vzorku. Pokud je specifikace kteréhokoli ze tří parametrů příliš vysoká, bude to mít za následek delší dobu zpracování a zvětšený objem frakce cílových buněk. Vždy se ujistěte, že zadáváte správné parametry.

   Pro pokračování dalším vstupem stiskněte **ENT**.

2. Zadejte procento značených buněk. Potvrďte, že zadaná hodnota odpovídá hodnotě vzorku. Jinak nemusí být zpracování vzorků optimální (viz„Důležité“).

   Pro pokračování dalším vstupem stiskněte **ENT**.

3. Zadejte konečný objem vzorku buňky. Potvrďte, že zadaná hodnota odpovídá hodnotě vzorku. Jinak nemusí být zpracování vzorků optimální (viz„Důležité“).

Chcete-li pokračovat, stiskněte **ENT**.

Výpočet

Software CliniMACS Plus vypočítá celkový počet označených buněk, aby zkontroloval, zda je separační kapacita dostatečná.

Výsledek se zobrazí na jedné ze dvou možných obrazovek:

- Výsledek výpočtu se zobrazí na obrazovce podobné Obrazovka 7.29. Ujistěte se, že vypočítaný počet označených buněk je správný.

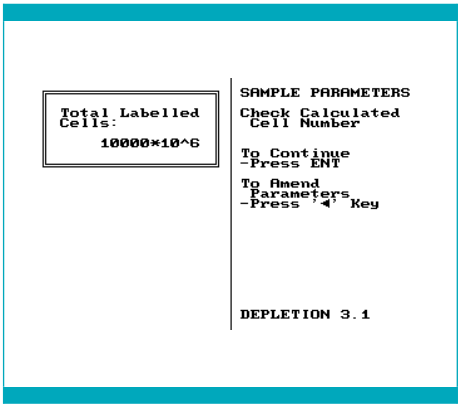
  Chcete-li pokračovat, stiskněte **ENT**.

  Je možná oprava údajů. Stisknutím ◄ se vrátíte na předchozí obrazovku pro opravu.

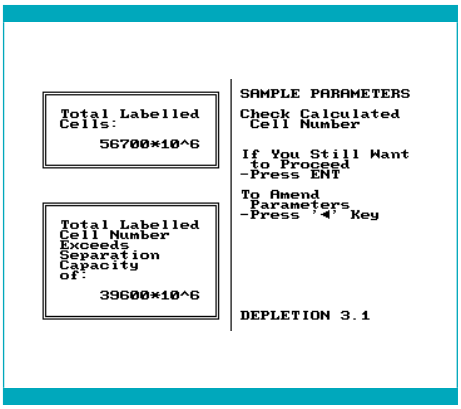
- Pokud vypočítaný počet označených buněk překročí separační kapacitu systému CliniMACS Plus, zobrazí se obrazovka podobná Obrazovka 7.30. Ujistěte se, že byly zadány správné parametry vzorku a že vypočtený počet buněk je správný. Stisknutím ◄ se vrátíte na předchozí obrazovky a opravte parametry vzorku.

  Aby nedošlo k přetížení systému, rozdělte vzorek a určete objem každé části. Stisknutím ◄ se vrátíte na předchozí Obrazovka 7.28. Zadejte parametry vzorku pro první alikvot vzorku a pokračujte v separaci této části. Po dokončení separace začněte druhou separaci s druhým alikvotem pomocí nové soupravy hadiček.

  Chcete-li pokračovat, stiskněte **ENT**.



Obrazovka 7.29: Výběr soupravy hadiček



Obrazovka 7.30: Výpočet: Počet buněk překračuje separační kapacitu

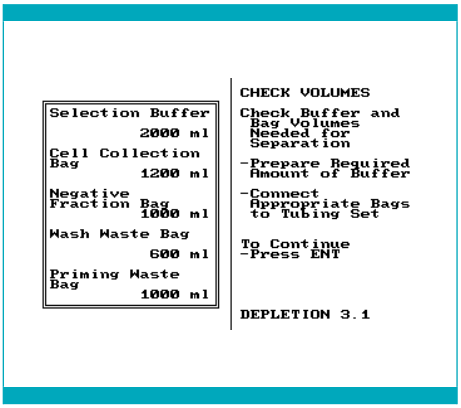
Informace o objemu

Z celkového počtu značených buněk (viz bod „Výpočet“) software vypočítá počet separačních stupňů, množství pufru potřebné pro celou separaci a objemy kapaliny, které budou shromážděny ve vaku Cell Collection Bag, vaku Non-Target Cell Bag a vaku Reapplication Bag.

DŮLEŽITÉ

- *Vak Negative Fraction Bag odpovídá vaku Non-Target Cell Bag.*
- *Vak Priming Waste Bag odpovídá vaku Reapplication Bag.*

Pokud jedna z vypočtených hodnot překročí tyto standardní hodnoty, objeví se obrazovka podobná Obrazovka 7.31, aby informovala o množství kapaliny, které bude potřeba a nahromaděné během separačního procesu. Pokud je výměna nutná, vyměňte sáčky dodané se sadou hadiček za alternativní sáčky vhodné velikosti. Vaky původně připojené k soupravě hadiček jsou spojeny luerovými spojkami. Vaky, které nahrazují původní vaky, by měly mít zástrčkový konektor typu luer. Standardní vaky lze propojit pomocí propojky Luer/Spike Interconnector.



Obrazovka 7.31: Zkontrolujte objemy

1. Potvrďte, že je k dispozici požadované množství pufru. Nepřipevňujte na držák na vaky více než tři litry pufru.

   OZNÁMENÍ

   Riziko poškození přístroje. Přetížení držáky na vaky může poškodit přístroj. Nosnost jednoho držáku na vak je 3 kg. Držáky na vak nepřetěžujte.

2. Otevřete zásobník soupravy hadiček za sterilních podmínek a v případě potřeby vyměňte původní vaky za větší. Zajistěte neomezený průtok do těchto vaků.

3. Je-li nutná výměna, vyměňte vak Cell Collection Bag soupravy hadiček za přenosový vak dostatečné velikosti. Určete hmotnost nového prázdného vaku Cell Collection Bag a zaznamenejte ji. Ujistěte se, že je možný neomezený průtok do vaku Cell Collection Bag. Alternativně připojte další 600 mL přenosový vak k prvnímu vaku Cell Collection Bag, např. pomocí sady pro přenos plazmy.

   DŮLEŽITÉ

   - *Ujistěte se, že je k dispozici požadované množství pufru a že objem vaků uvedený na Obrazovka 7.31 je dostatečný. Jinak může dojít k narušení bezpečnosti a účinnosti přístroje.*
   - *Jakékoli úpravy souprav hadiček CliniMACS by měly být prováděny za sterilních podmínek, např. v digestoři s laminárním prouděním.*
   - *Pro další analýzu nebo zpracování buněk si uvědomte, že uvedené objemy na Obrazovka 7.31 nejsou přesné objemy, ale objemy v rámci bezpečnostních požadavků.*

4. Zkontrolujte připojení zámku luer na kolonách. Zámky luer se musí těsně uzavřít.

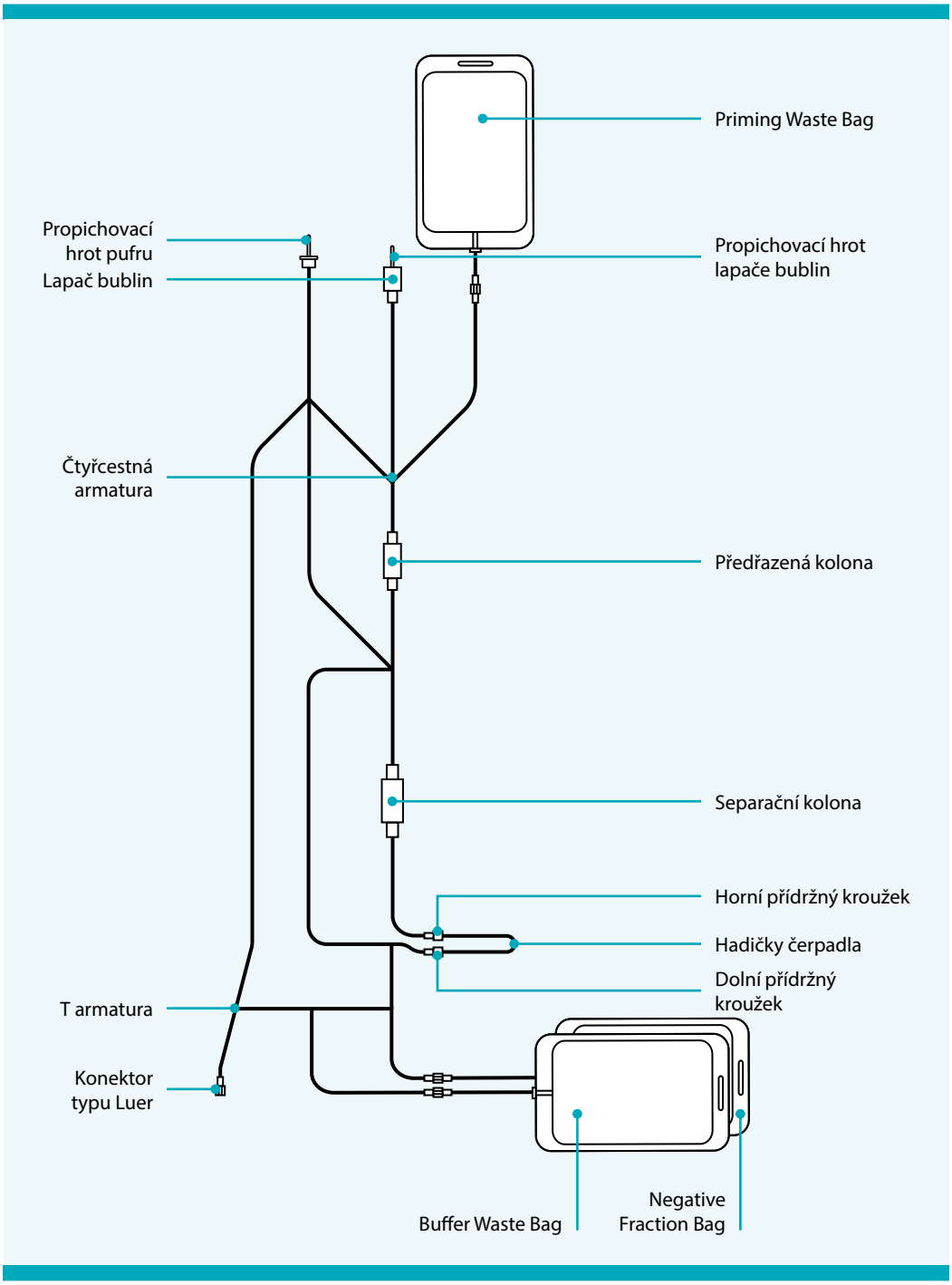
Chcete-li pokračovat, stiskněte **ENT**.

Program automaticky pokračuje podle pokynů k instalaci sady hadiček do přístroje.

▶ **Přistupte ke KROKU 3.**

7.3 KROK 3: Instalace hadičkových souprav CliniMACS

7.3.1 Souprava CliniMACS Tubing Set a CliniMACS Tubing Set LS

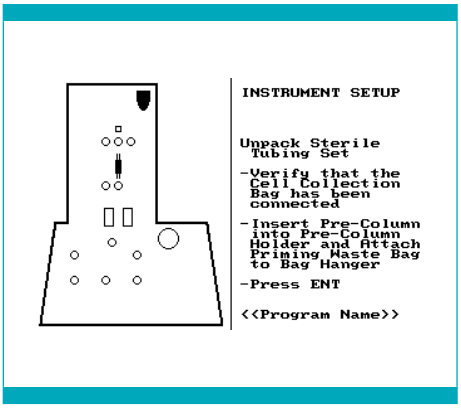


Obrázek 7.2: Celková konstrukce soupravy CliniMACS Tubing Set (např. CliniMACS Tubing Set)

Příprava na instalaci soupravy hadiček

Okno označuje Obrazovka 7.32.

Pokyn je zobrazen napravo a diagram odpovídající pokynu na levé straně obrazovky. Blikající prvky na obrazovce označují oblasti pozornosti.



Obrazovka 7.32: Vybalení hadičkové soupravy

Souprava CliniMACS Tubing Set a souprava CliniMACS Tubing Set LS jsou každá dodávána v uzavřených, sterilizovaných obalech. Každá souprava hadiček obsahuje předem sestavené hadičky a kolony pro jednu separaci buněk (viz Obrázek 7.2). Když je obal neporušený, je zajištěna cesta sterilní tekutiny.

⚠ VAROVÁNÍ

Riziko kontaminace. Poškozený obal znamená, že sada hadiček již nemusí být sterilní, a proto se nesmí používat. Pečlivě zkontrolujte obal, zda není poškozený, proražený nebo natržený. Výrobek používejte, pouze pokud je obal nepoškozený a zapečetěný.

Poznámka: Přístroj CliniMACS Plus Instrument zobrazuje název zvoleného programu, např. CD34 SELECTION 1, ve spodním řádku obrazovky přístroje. V kterémkoli kroku během instalace soupravy hadiček lze stisknout tlačítko „Vrátit změnu“ (viz bod „Popis“ v uživatelské příručce k přístroji CliniMACS Plus Instrument) pro návrat k předchozímu kroku.

1. Zaznamenejte číslo šarže a dobu použitelnosti soupravy hadiček.

   Vybalte sadu sterilních hadiček za sterilních podmínek (např. digestoř s laminárním prouděním). Před použitím sady hadiček odstraňte svírací svorku použitou pro balení soupravy hadiček CliniMACS Tubing Set LS. Svorka je označena nápisem „Před montáží přístroje CliniMACS Plus Instrument“.

2. Zkontrolujte připojení zámku luer k vakům. Zámky luer se musí těsně uzavřít.

Připojte vak Cell Collection Bag

1. Zaznamenejte hmotnost prázdného vaku Cell Preparation Bag.
2. V aseptickém prostředí sejměte víčka a před vložením soupravy hadiček do přístroje CliniMACS Plus Instrument připojte sterilní vak Cell Collection Bag vybavený propojovacím konektorem Luer/Spike Interconnector. Ujistěte se, že původní hadička vaku Cell Collection Bag je buď sevřená, nebo utěsněná.

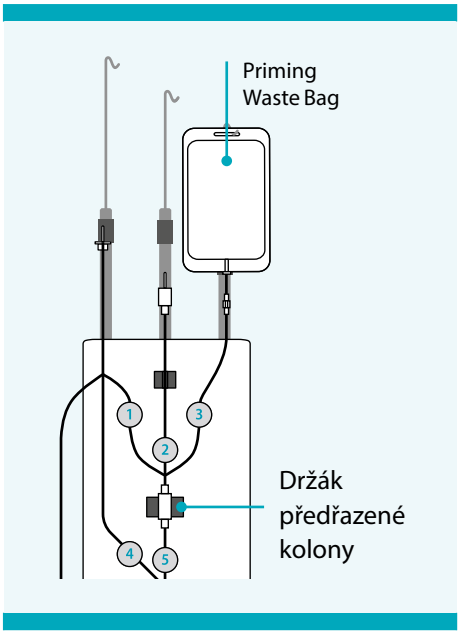
   Pokud je pro separaci zapotřebí více než jeden vak Cell Collection Bag, propojte vaky pomocí sady pro přenos plazmy. Ujistěte se, že jsou všechna připojení pevně uzavřena.
3. Ujistěte se, že je možný neomezený průtok do vaku Cell Collection Bag.
4. Pokračujte v instalaci soupravy hadiček pomocí buď postupu popsaného níže, nebo v „Alternativní instalace pro soupravy hadiček CliniMACS Tubing Set".

Připevněte vak Priming Waste Bag a vložte předřazenou kolonu

Okno označuje Obrazovka 7.32.

1. Připevněte vak Priming Waste Bag k pravému držáku na vak na přístroji (viz Obrázek 7.3).
2. Upravte výšku na držáku na vak. Zvedněte nebo spusťte držák na vak, aby se výška přizpůsobila velikosti vaku Priming Waste Bag. Ujistěte se, že je umístěn dostatečně vysoko, aby se zabránilo silnému ohnutí hadičky, které by mohlo omezit průtok, a zda je dostatečně nízko, aby se zabránilo natažení hadičky nebo spojů.
3. Umístěte předřazený sloup do držáku (viz Obrázek 7.4).

Chcete-li přistoupit k dalším krokům, stiskněte **ENT**.



Obrázek 7.3: Připevněte vak Priming Waste Bag k držáku na vak

Vložte separační kolonu a naplňte ventil č. 5

Okno označuje Obrazovka 7.33.

Ventily zobrazené černě na obrazovce se automaticky otevřou, aby se usnadnilo zavádění hadičky.

1. Vložte separační kolonu do držáku separační kolony (viz Obrázek 7.4).

   ⚠ VAROVÁNÍ

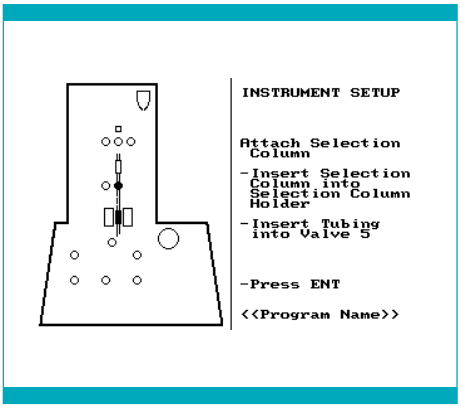
   Riziko poranění. Pokud je separační kolona vkládána nebo vysouvána při zapnuté magnetické jednotce, hrozí nebezpečí zranění osob. Separační kolonu vkládejte nebo vysouvejte pouze tehdy, pokud je magnetická jednotka vypnutá.

2. Zaveďte hadičku do ventilu č. 5.

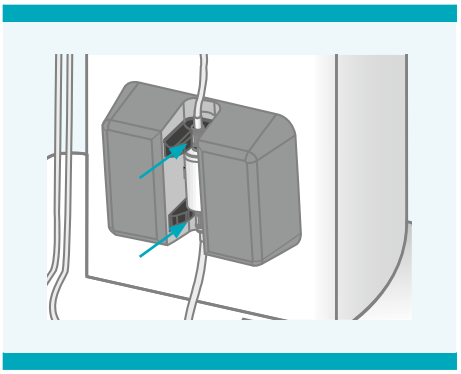
DŮLEŽITÉ

- *Při provádění každého kroku zkontrolujte všechny hadičky a nástavce, zda nejsou zalomené nebo nemají silné ohyby, které by mohly omezit průtok kapaliny hadičkou. Zkontrolujte všechny ventily, abyste se ujistili, že hadička pevně sedí.*
- *Soupravu hadiček vkládejte pouze do otevřených ventilů (když je tlačítko zatlačeno dovnitř). Pokud je hadička vložena do uzavřeného ventilu, nezapadne správně.*
- *Pokud je nutné nastavit hadičku po uzavření ventilu, netahejte za hadičku, aniž byste stiskli tlačítko ventilu pro otevření ventilu (viz Obrázek 7.5).*

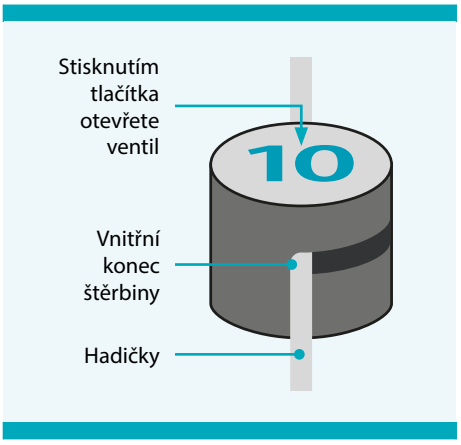
Chcete-li přistoupit k dalším krokům, stiskněte **ENT**.



Obrazovka 7.33: Vložte separační kolonu a naplňte ventil č. 5



Obrázek 7.4: Separační kolona v držáku separační kolony



Obrázek 7.5: Správně vložené hadičky

Naplňte ventily č. 1, 2, 3 a 4

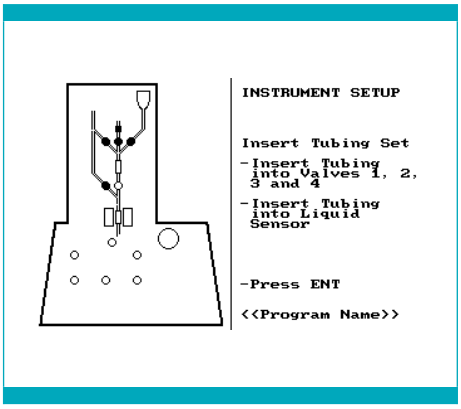
Okno označuje Obrazovka 7.34.

1. Zaveďte hadičku do ventilu č. 4. Ujistěte se, že je hadička bezpečně umístěna v otvoru ventilu (viz Obrázek 7.5). Zvláštní pozornost věnujte oblasti mezi ventily č. 4 a 5 (viz Obrázek 7.6) a držte čtyřcestnou armaturu ve svislé poloze.
2. Zasuňte hadičku do ventilu č. 1.
3. Čtyřcestnou armaturu umístěte těsně pod ventil č. 2. Zvláštní pozornost věnujte oblasti pod ventilem č. 2.
4. Zasuňte hadičky do ventilů č. 2 a 3.
5. Namontujte hadičku mezi ventil č. 2 a lapač bublin do senzoru kapaliny. Ujistěte se, že je hadička správně umístěna v armatuře senzoru.

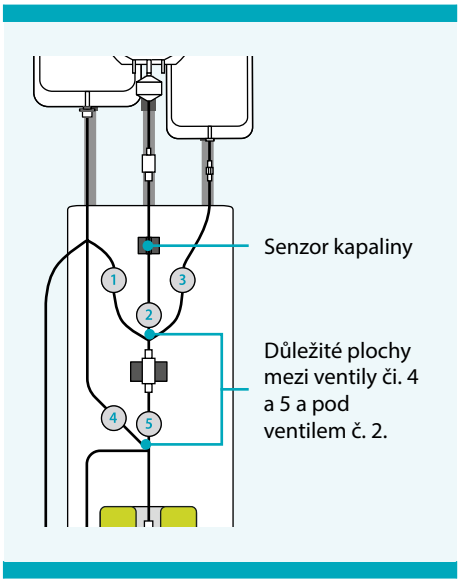
   DŮLEŽITÉ

   Aby byla zajištěna správná funkce, musí být senzor kapaliny i vkládaná hadička suché. Pečlivě oba zkontrolujte. Pokud je přítomna kapalina, osušte oblast měkkým hadříkem, který nepouští vlákna.

Chcete-li přistoupit k dalším krokům, stiskněte **ENT**.



Obrazovka 7.34: Naplňte ventily č. 1, 2, 3, 4 a senzor kapaliny

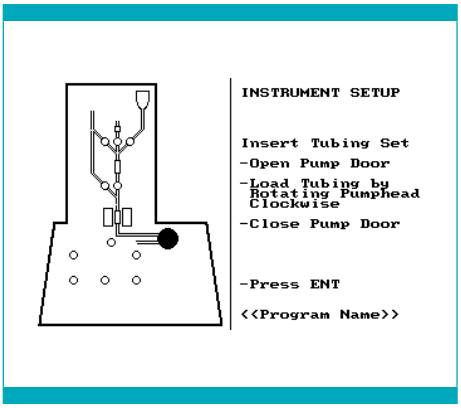


Obrázek 7.6: Hadičky ve ventilech

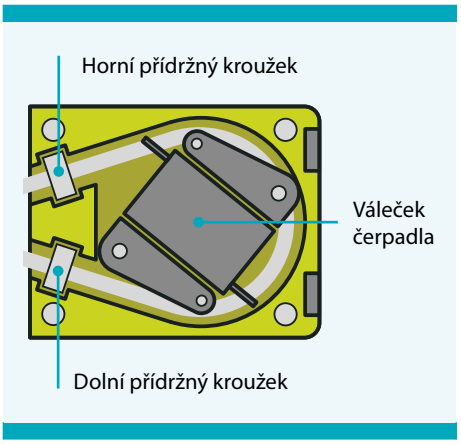
Vložte hadičky čerpadla

Okno označuje Obrazovka 7.35.

1. Otevřete dvířka čerpadla zvednutím za levý okraj.
2. Vložte horní pojistný kroužek na hadici čerpadla do drážky pojistného kroužku na uchycení čerpadla (viz Obrázek 7.7).
3. Otáčejte válečkem pumpy ve směru hodinových ručiček, dokud se hadička nezasune mezi obě sady vodících kolíků hadičky a hadička těsně nezapadne kolem válečku pumpy. Ujistěte se, že hadička není přiskřípnuta na konci vodicích kolíků. Pokud je nutné upravit hadičku uvnitř čerpadla, hadičku lze vyjmout zvednutím spodního konce a otočením válečku čerpadla proti směru hodinových ručiček.
4. Vložte dolní pojistný kroužek na hadici čerpadla do drážky pojistného kroužku na uchycení čerpadla.
5. Otáčejte válečkem čerpadla po směru a proti směru hodinových ručiček, abyste zajistili, že se váleček čerpadla volně pohybuje.
6. Uzavřete dvířka čerpadla.



Obrazovka 7.35: Vložte hadičky čerpadla



Obrázek 7.7: Vložte hadičky čerpadla

DŮLEŽITÉ

Během programu separace buněk čerpadlo okamžitě zastaví chod, kdykoli se otevře pouzdro čerpadla. Pokud zůstane otevřený déle než 600 sekund, přístroj přeruší probíhající běh.

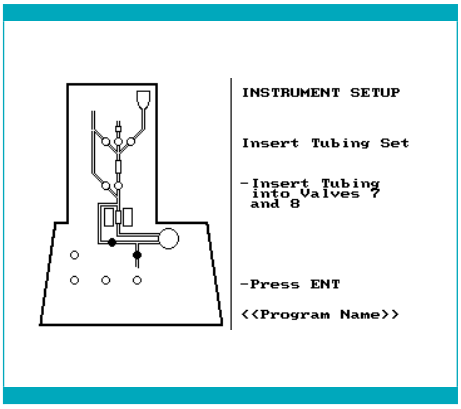
Chcete-li přistoupit k dalším krokům, stiskněte **ENT**.

Čísla plnicích ventilů 7 a 8

Okno označuje Obrazovka 7.36.

1. Zaveďte hadičku do ventilu č. 7.
2. Zaveďte hadičku do ventilu č. 8.

Chcete-li přistoupit k dalším krokům, stiskněte **ENT**.



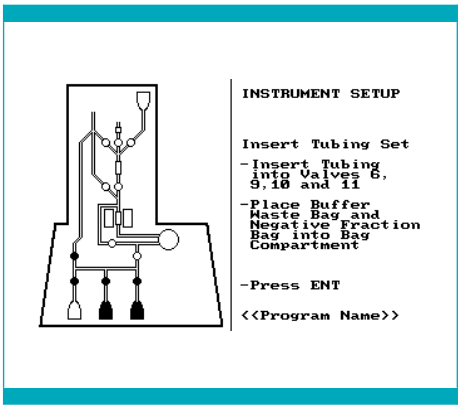
Obrazovka 7.36: Čísla plnicích ventilů 7 a 8

Čísla plnicích ventilů 6, 9, 10 a 11

Okno označuje Obrazovka 7.37.

1. Vložte hadičky do ventilů č. 6, 9, 10 a 11.
2. Vložte vak Negative Fraction Bag a vak Buffer Waste Bag do přihrádky na vak. Ujistěte se, že hadička není stlačena pod víkem přihrádky na vak.

Chcete-li přistoupit k dalším krokům, stiskněte **ENT**.



Obrazovka 7.37: Čísla plnicích ventilů 6, 9, 10 a 11

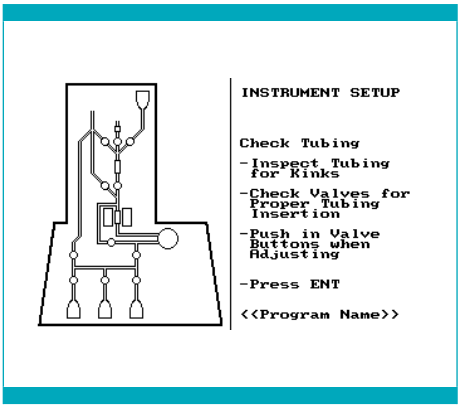
Znovu zkontrolujte všechny hadičky a nástavce

Okno označuje Obrazovka 7.38.

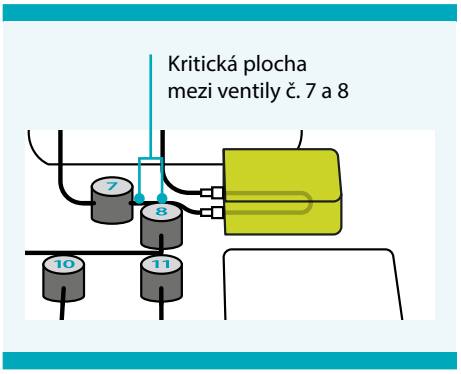
Před zahájením separace buněk znovu zkontrolujte všechny hadičky a nástavce.

Poznámka: Zkontrolujte všechny ventily, zda jsou správně zasunuty hadičky. Ujistěte se, že jsou hadičky rozmístěny rovnoměrně a že v hadičce nejsou žádné zlomy nebo natažené oblasti. Věnujte zvláštní pozornost oblasti před kolonou a také oblasti mezi čerpadlem a ventily č. 7 a 8 (viz Obrázek 7.8) a mezi ventily č. 4 a 5 (viz Obrázek 7.6). Pokud je nutné nastavit hadičku po uzavření ventilu, netahejte za hadičku, aniž byste stiskli tlačítko ventilu pro otevření ventilu. Pokud byla hadička nastavena, je bezpodmínečně nutné dvakrát pevně stisknout odpovídající ventily.

Chcete-li přistoupit k dalším krokům, stiskněte **ENT**.



Obrazovka 7.38: Znovu zkontrolujte všechny hadičky a nástavce



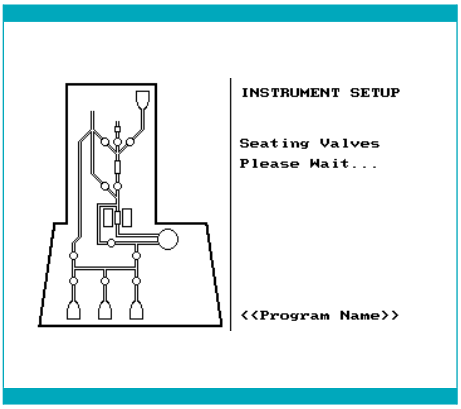
Obrázek 7.8: Hadičky ve ventilech

Usazení ventilů

Okno označuje Obrazovka 7.39.

Aby bylo zajištěno správné usazení hadiček ve ventilech, bude přístroj ovládat všechny ventily postupně, dvakrát. Sledujte a poslouchejte, abyste se ujistili, že všechny ventily fungují správně. Pokud některý ventil nepracuje správně, viz kapitola 8 „Řešení problémů“ na straně 205. Tento krok lze opakovat stisknutím ◀ a následným stisknutím **ENT** (viz bod „Popis“ v uživatelské příručce přístroje CliniMACS Plus Instrument).

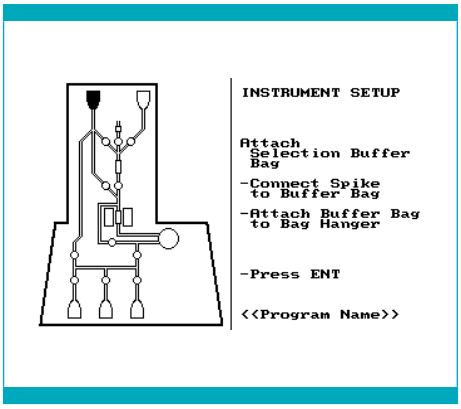
Během této kontrolní sekvence bude také testován magnetický pohon.



Obrazovka 7.39: Usazení ventilů

Připojte pufr CliniMACS PBS/EDTA Buffer

Okno označuje Obrazovka 7.40.



Obrazovka 7.40: Připevněte vak pufru

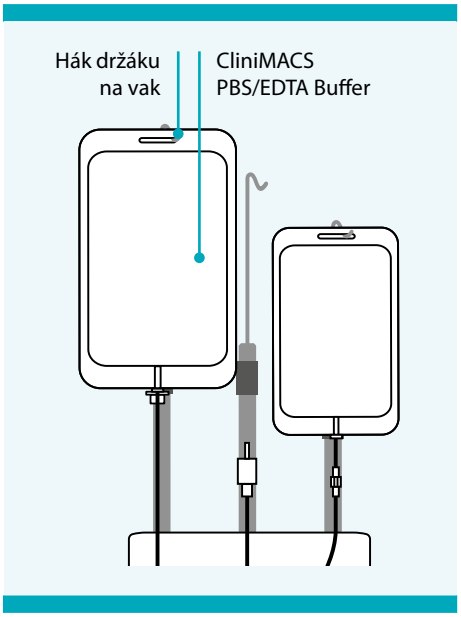
Předepsaným pufrem pro separace CliniMACS Plus je pufr CliniMACS PBS/EDTA Buffer doplněný HSA na konečnou koncentraci 0,5 % (hm./obj.).

1. Pomocí aseptických technik sejměte uzávěr z propichovacího hrotu na soupravě hadiček (viz Obrázek 7.2 na straně 151) a připojte jej k vaku na pufr. Ujistěte se, že je přepážka propíchnutá, což umožňuje volný průtok kapaliny. Jemně vak zmáčkněte, abyste se ujistili, že propichovací hrot pronikl do vaku.

   Pokud je pro separaci zapotřebí více než jeden litr pufru, propojte dva pufrovací vaky pomocí sady pro přenos plazmy.

2. Připevněte vak na pufr k háku vaku na pufr na závěsu vaku (viz Obrázek 7.9).

3. Upravte výšku držáku na závěs vaku. Zvedněte nebo spusťte držáku na závěs vaku, aby se výška přizpůsobila velikosti vaku na pufr. Ujistěte se, že je umístěn dostatečně vysoko, aby se zabránilo silnému ohnutí hadičky, které by mohlo omezit průtok, a zda je dostatečně nízko, aby se zabránilo natažení hadičky nebo spojů.



Obrázek 7.9: Připevněte vak pufru

OZNÁMENÍ

Riziko poškození přístroje. Přetížení držáky na vaky může poškodit přístroj. Nosnost jednoho držáku na vak je 3 kg. Držáky na vak nepřetěžujte.

Chcete-li přistoupit k dalším krokům, stiskněte **ENT**.

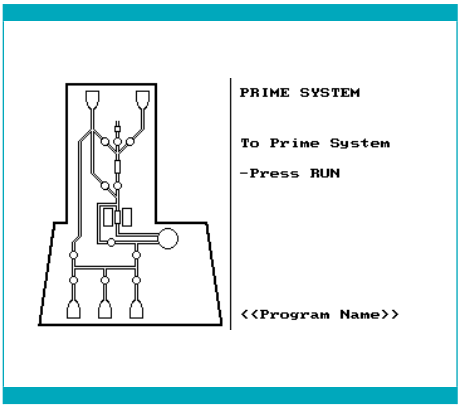
Spusťte plnění

Okno označuje Obrazovka 7.41.

Plnění spustíte stisknutím **RUN**.

Okno označuje Obrazovka 7.42.

Během fáze plnění je souprava hadiček naplněna pufrem. Pufr bude cirkulovat přes soupravu hadiček zahrnující jak předřazenou kolonu, tak separační kolonu. Odpad z plnění je shromažďován ve vaku Priming Waste Bag a vaku Buffer Waste Bag (viz Obrázek 7.2 na straně 151). Cykly plnění budou pokračovat a budou se opakovat řady kroků. Fáze plnění bude přibližně trvat 1 minutu. Stav plnění bude na displeji aktualizován.



Obrazovka 7.41: Spusťte plnění

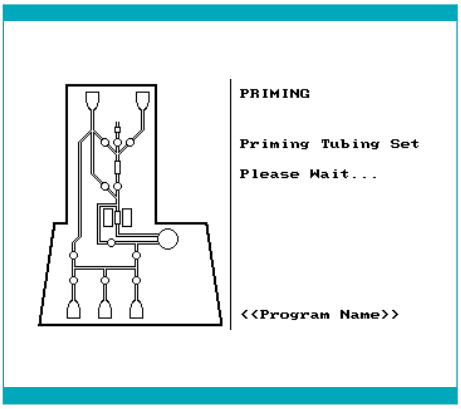
Kontrola během plnění

Během plnicí fáze zkontrolujte všechny hadičky, armatury, ventily a kolony, zda nevykazují nějaké netěsnosti nebo přítomnost záhybů, které by mohly blokovat průtok tekutiny.

Pokud budou zjištěny netěsnosti nebo chybné funkce, chod zastavíte stisknutím **STOP**.

Obsluha má 600 sekund na vyřešení problému.

Proces obnovte stisknutím **RUN**.



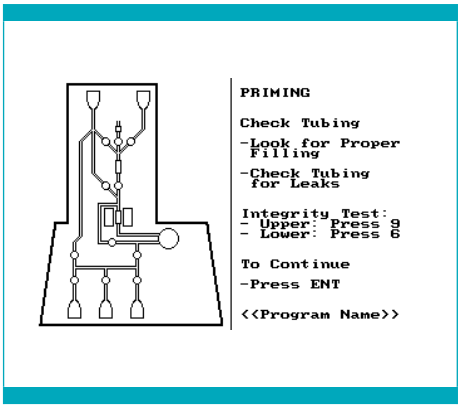
Obrazovka 7.42: Plnění probíhá

Po 600 sekundách bude separace zrušena. Pokud obsluha nemůže problém vyřešit nebo pokud je sada hadiček vadná, vyjměte sadu hadic a nahraďte ji novou.

Poznámka: Jakmile začne plnění, není možné se vrátit k postupu nastavení přístroje.

Konečná kontrola všech hadiček a nástavců

Okno označuje Obrazovka 7.43.



Obrazovka 7.43: Konečná kontrola hadiček

Před pokračováním programu zkontrolujte následující:

- kapalina ve všech částech hadičkové soupravy (s výjimkou předřazeného systémového filtru)
- bez přebytečného vzduchu v hadičkové soupravě
- kapalina ve vaku Priming Waste Bag a vaku Buffer Waste Bag
- bez kapaliny ve vaku Negative Fraction Bag nebo ve vaku Cell Collection Bag

Zatím nestiskněte ENT.

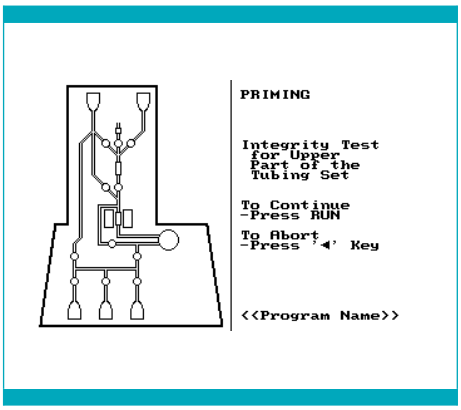
Test neporušenosti

V zájmu zvýšené bezpečnosti musí být proveden test neporušenosti pro zkoušku hadičkové soupravy na netěsnost. Zkušební sekvence se skládá ze dvou automatizovaných dílčích sekvencí, které umožňují natlakovat a samostatně pozorovat jak horní, tak spodní část sady hadiček.

Test neporušenosti pro horní část hadičkové soupravy.

1. Když obsluha provádí „Konečnou kontrolu všech hadiček a nástavců“, okno ukazuje Obrazovka 7.43.
2. Po provedení „Konečné kontroly všech hadiček a nástavců“ pokračujte v provádění testu neporušenosti. **Nestiskněte** ENT.
3. Chcete-li provést test neporušenosti pro horní část, stiskněte **9**.

   Okno označuje Obrazovka 7.44.



Obrazovka 7.44: Spusťte test neporušenosti pro horní část

4. Chcete-li spustit zkušební sekvenci, stiskněte **RUN**.

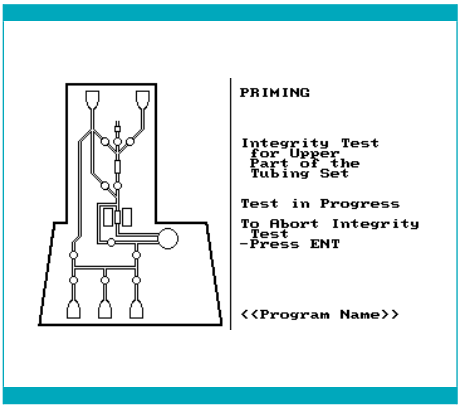
   Pro návrat na Obrazovka 7.43, stiskněte ◄ .

5. Jakmile bylo stisknuto RUN, přístroj spustí automatickou zkušební sekvenci pro horní část hadičkové soupravy.

   Okno označuje Obrazovka 7.45.

   Vznikne přetlak a bude se udržet dvě minuty. Během této doby by měla obsluha sledovat všechny spojky nad horním připojením hadiček čerpadla.

   V každém bodě lze dokončit zkušební sekvence stisknutím ENT.



Obrazovka 7.45: Test neporušenosti pro horní část probíhá

6. Po dvou minutách se tlak uvolní automaticky a okno ukazuje Obrazovka 7.43.

   Zkontrolujte, zda během zkušební sekvence nenastaly nějaké netěsnosti. Pokud bude zjištěna netěsnost v jakékoliv spojce hadičkové soupravy, hadičková souprava musí být odstraněna a nahrazena novou. Kontaktujte technickou podporu Miltenyi Biotec Technical Support ohledně vrácení vadné hadičkové soupravy.

7. Pokud nebudou zjištěny žádné netěsnosti, pokračujte v testu neporušenosti dolní části hadičkové soupravy.

Test neporušenosti pro dolní část hadičkové soupravy

Okno označuje Obrazovka 7.46.

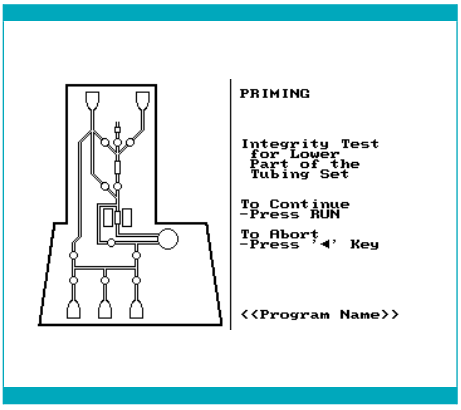
1. Chcete-li zadat test neporušenosti pro dolní část, stiskněte 6.
   Nestiskněte ENT.

   Okno označuje Obrazovka 7.46.

2. Chcete-li spustit zkušební sekvenci, stiskněte RUN.

   Pro návrat na Obrazovka 7.43, stiskněte ◄ .

3. Jakmile bylo stisknuto RUN, přístroj spustí automatickou zkušební sekvenci pro dolní část hadičkové soupravy.

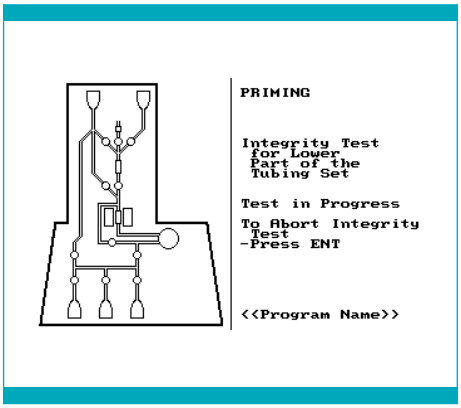


Obrazovka 7.46: Spusťte test neporušenosti pro dolní část

Okno označuje Obrazovka 7.47.

Vznikne přetlak a bude se udržovat 30 sekund. Během této doby by měla obsluha sledovat přípojku hadiček čerpadla a armatury ve tvaru T mezi ventily č. 6, 8, 9, 10 a 11.

V každém bodě lze dokončit zkušební sekvence stisknutím **ENT**.



Obrazovka 7.47: Test neporušenosti pro dolní část probíhá

4. Po 30 sekundách se tlak uvolní automaticky a okno ukazuje Obrazovka 7.43.

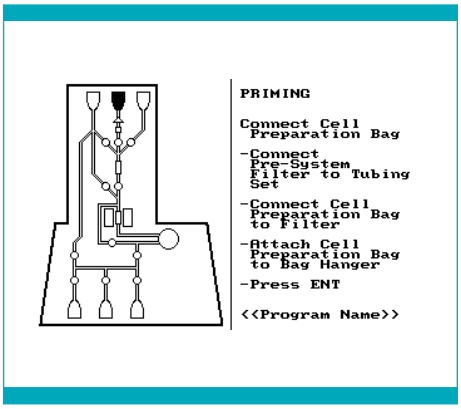
   Zkontrolujte, zda během zkušební sekvence nenastaly nějaké netěsnosti. Pokud bude zjištěna netěsnost v jakékoliv spojce hadičkové soupravy, hadičková souprava musí být odstraněna a nahrazena novou. Kontaktujte technickou podporu Miltenyi Biotec Technical Support ohledně vrácení vadné hadičkové soupravy.

5. Pokud nebudou zpozorovány žádné netěsnosti, obsluha nyní může pokračovat dalším krokem stisknutím **ENT**.

Připojte vak Cell Preparation Bag

Okno označuje Obrazovka 7.48.

Připojte vak Cell Preparation Bag obsahující snadno označený buněčný produkt:



Obrazovka 7.48: Připojte vak Cell Preparation Bag

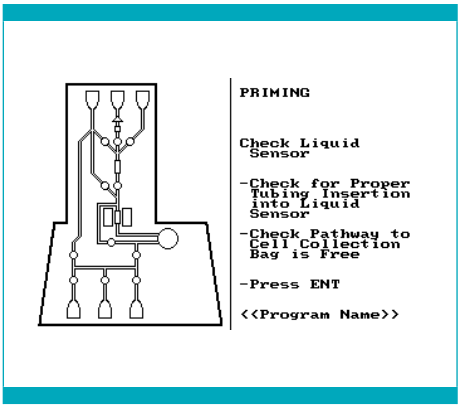
1. Odstraňte krytku z hrotu lapače bublin hadičkové soupravy (viz Obrázek 7.2).
2. Odstraňte krytku z tupého konce předřazeného systémového filtru (viz Obrázek 7.10). Pevně zasuňte hrot do předřazeného systémového filtru.
3. Odstraňte krytku z hrotu předřazeného systémového filtru.
4. Propíchněte předřazený systémový filtr do nepoužitého vstupního otvoru vaku Cell Preparation Bag a ujistěte se, že je přepážka propíchnutá, což umožňuje volný průtok kapaliny. Jemně vak zmáčkněte, abyste se ujistili, že propichovací hrot pronikl do vaku.
5. Pečlivě zkontroluje spojku mezi předřazeným systémovým filtrem a hadičkovou soupravou, aby byla spojka zabezpečená.
6. Zavěste vak Cell Preparation Bag na centrální držák na vak.
7. Nastavte držák na vak pro vak Cell Preparation Bag, aby držel vak Cell Preparation Bag ve svislé poloze.

Chcete-li přistoupit k dalším krokům, stiskněte **ENT**.

Konečná kontrola senzoru kapaliny

Okno označuje Obrazovka 7.49.

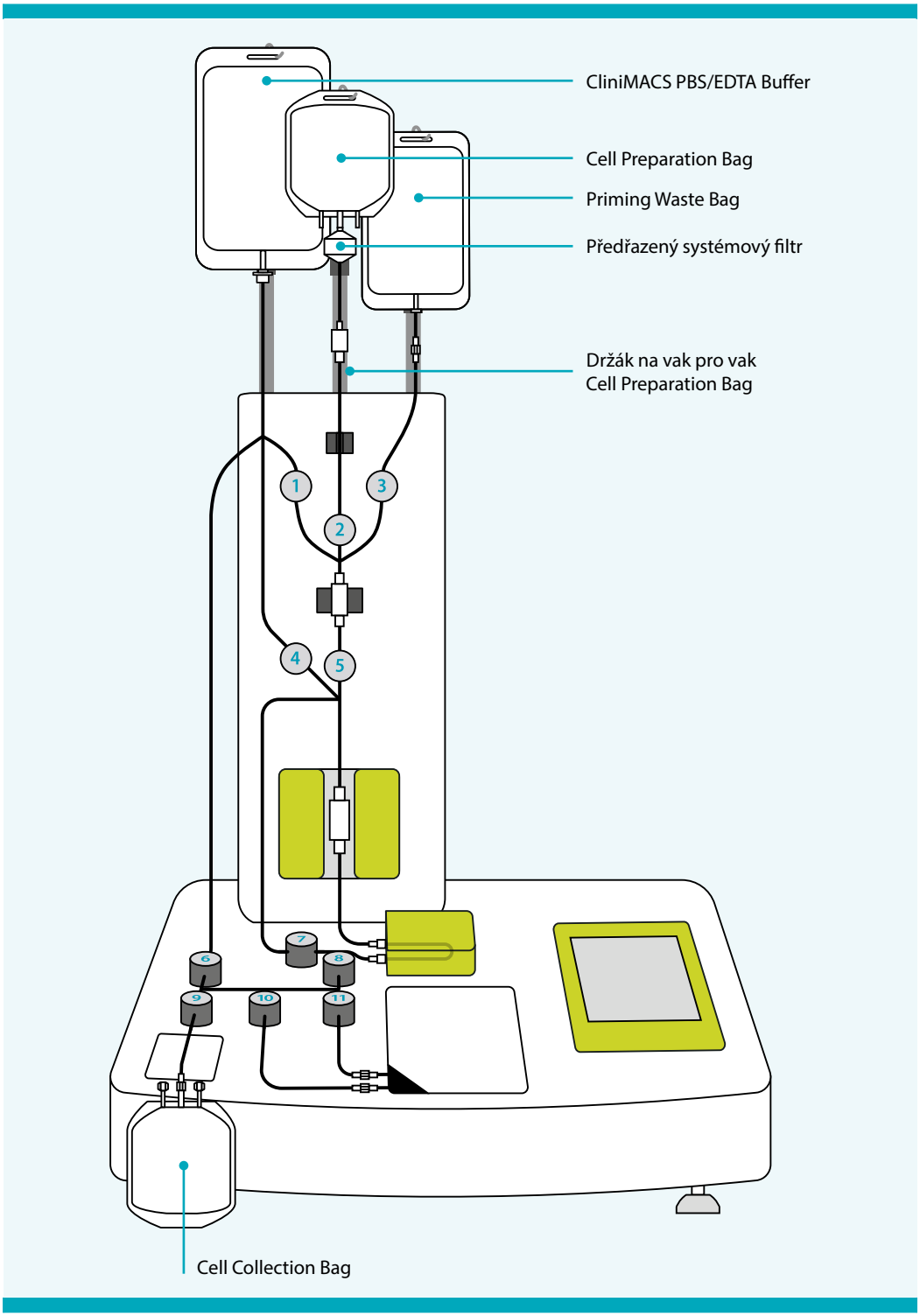
1. Zkontrolujte hadičky senzoru kapaliny. Zajistěte, že je hadička správně zasunuta, že je zbavena jakékoliv externí kapaliny a nebyla vytlačené z určené polohy během postupu zavádění.
2. Ověřte si, že je možný neomezený průtok vakem Cell Collection Bag (např. otevřená svorka pod ventilem 9).



Obrazovka 7.49: Konečná kontrola senzoru kapaliny

Chcete-li přistoupit k dalším krokům, stiskněte **ENT**.

▶ **Přistupte ke KROKU 4.**



Obrázek 7.10: Přístroj CliniMACS Plus Instrument se soupravou CliniMACS Tubing Set, pufrem CliniMACS PBS/EDTA Buffer, vaky Cell Preparation Bag, a Cell Collection Bag

7.3.2 Alternativní instalace hadičkových souprav CliniMACS Tubing Set

Pokyny v KROKU 3 a obrazovky zobrazené přístrojem CliniMACS Plus Instrument popisují instalaci souprav hadiček CliniMACS za sterilních podmínek (čistá místnost).

Samotný systém CliniMACS Plus je uzavřený systém, který nemusí být nutně provozován v čisté místnosti. Pokud je však provozován mimo čistou místnost, je třeba upravit instalační postup sady hadiček, aby byla zaručena sterilita procesu separace buněk.

Sterilita procesu buněčné separace může být narušena během připojení vaku Cell Collection Bag, pufru CliniMACS PBS/EDTA Buffer, předřazeného systémového filtru a vaku Cell Preparation Bag. Aby bylo zajištěno, že systém zůstane sterilní, musí být tyto součásti připojeny k hadičkové soupravě za sterilních podmínek (např. digestoř s laminárním prouděním). Když jsou součásti připojeny k soupravě hadiček před instalací na přístroj CliniMACS Plus Instrument, pořadí instrukcí poskytovaných přístrojem a instrukcí v KROKU 3 se musí změnit a provést další kroky.

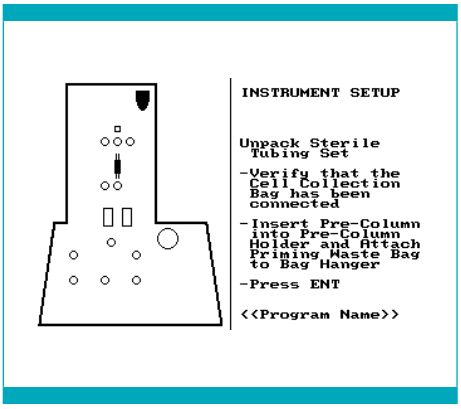
Při používání přístroje CliniMACS Plus Instrument mimo čistou místnost postupujte podle následujících dodatečných pokynů a změňte pokyny v KROKU 3.

Příprava na instalaci soupravy hadiček

Okno označuje Obrazovka 7.50.

Jak je popsáno, vak Cell Collection Bag, pufr CliniMACS PBS/EDTA Buffer, předřazený systémový filtr a vak Cell Preparation Bag musí být připojeny k soupravě hadiček před instalací hadičkové soupravy do přístroje za sterilních podmínek.

Vybalte hadičkovou soupravu za sterilních podmínek a následující součásti připevněte za sterilních podmínek.



Obrazovka 7.50: Vybalení hadičkové soupravy

- **Připojte vak Cell Collection Bag**

  Viz strana 153.

Připojení pufru CliniMACS PBS/EDTA Buffer

DŮLEŽITÉ

Před připojením pufru CliniMACS PBS/EDTA k soupravě hadiček upněte hadičky pod hrotem pufru uzavíracími kleštěmi, aby se zabránilo vytékání pufru do sady hadiček před instalací (viz svorka 1, Obrázek 7.11 na straně 170).

Pomocí aseptických technik sejměte uzávěr z propichovacího hrotu na soupravě hadiček a připojte jej k vaku na pufr. Ujistěte se, že je přepážka propíchnutá, což umožňuje volný průtok kapaliny. Jemně vak zmáčkněte, abyste se přesvědčili, že propichovací hrot pronikl do vaku.

Připojení předřazeného systémového filtru

Odstraňte krytku z hrotu lapače bublin. Odstraňte krytku z dolního otvoru předřazeného systémového filtru.

Pevně zasuňte hrot do předřazeného systémového filtru. NEODSTRAŇUJTE horní krytku předřazeného systémového filtru. Uzavřete hadičku hned pod lapačem bublin uzavíracími kleštěmi (viz svorka 2, Obrázek 7.11 na straně 170). Zabrání se tím vniknutí připravené buněčné suspenze ve vaku Cell Preparation Bag do předřazeného systémového filtru a hadičkové soupravy.

Připojení vaku Cell Preparation Bag

Připojte vak Cell Preparation Bag obsahující magneticky značené a promyté buňky k hadičkové soupravě. Propíchněte vak Cell Preparation Bag s předřazeným systémovým filtrem a zajistěte, že je přepážka propíchnutá, což umožňuje volný průtok kapaliny. Jemně vak zmáčkněte, abyste se přesvědčili, že propichovací hrot pronikl do vaku.

Instalaci na přístroji CliniMACS Plus Instrument.

Zavěste vak pufru na levý držák na vak, vak Cell Preparation Bag na střední držák na vak a vak Priming Waste Bag na pravý držák na vak na přístroji.

Chcete-li přistoupit k dalším krokům, stiskněte **ENT**.

- **Připevněte vak Priming Waste Bag a vložte předřazenou kolonu**

  Viz strana 153.

- **Vložte separační kolonu a naplňte ventil č. 5**

  Viz strana 154.

- **Naplňte ventily č. 1, 2, 3 a 4**

  Viz strana 155.

- **Vložte hadičky čerpadla**

  Viz strana 156.

▶ Čísla plnicích ventilů 7 a 8

Viz strana 157.

▶ Čísla plnicích ventilů 6, 9, 10 a 11

Viz strana 157.

▶ Znovu zkontrolujte všechny hadičky a nástavce

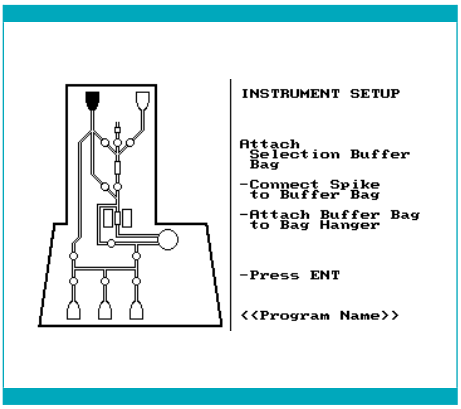
Viz strana 158.

▶ Usazení ventilů

Viz strana 158.

Připojte pufr CliniMACS PBS/EDTA Buffer

Okno označuje Obrazovka 7.51.



Obrazovka 7.51: Připevněte vak pufru

1. Vak pufru byl připojen během „Přípravy na instalaci soupravy hadiček“. Proto může být nutné upravit pouze výšku závěsu vaku. Zvedněte nebo snižte závěs tak, aby se přizpůsobil velikosti vaku na pufr, a ujistěte se, že přidělená výška je dostatečně vysoká, aby se zabránilo silnému ohnutí hadičky, které by mohlo omezovat průtok kapaliny, a dostatečně nízká, aby nedošlo k natažení hadičky nebo spojů.
2. Odstraňte uzavírací kleště z hadičky těsně pod hrotem pufru.

Chcete-li přistoupit k dalším krokům, stiskněte **ENT**.

▶ Spusťte plnění

Viz strana 160.

▶ Kontrola během plnění

Viz strana 160.

▶ Konečná kontrola všech hadiček a nástavců

Viz strana 161.

▶ Test neporušenosti

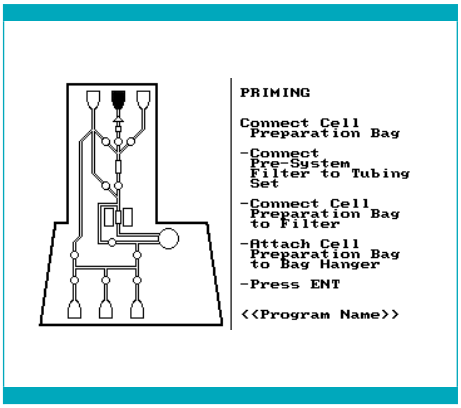
Viz strana 161.

Připojte vak Cell Preparation Bag (a předřazený systémový filtr)

Okno označuje Obrazovka 7.52.

1. Vak Cell Preparation Bag a předřazený systémový filtr byly připojeny během „Přípravy na instalaci soupravy hadiček“.
2. Odstraňte uzavírací kleště pod lapačem bublin.

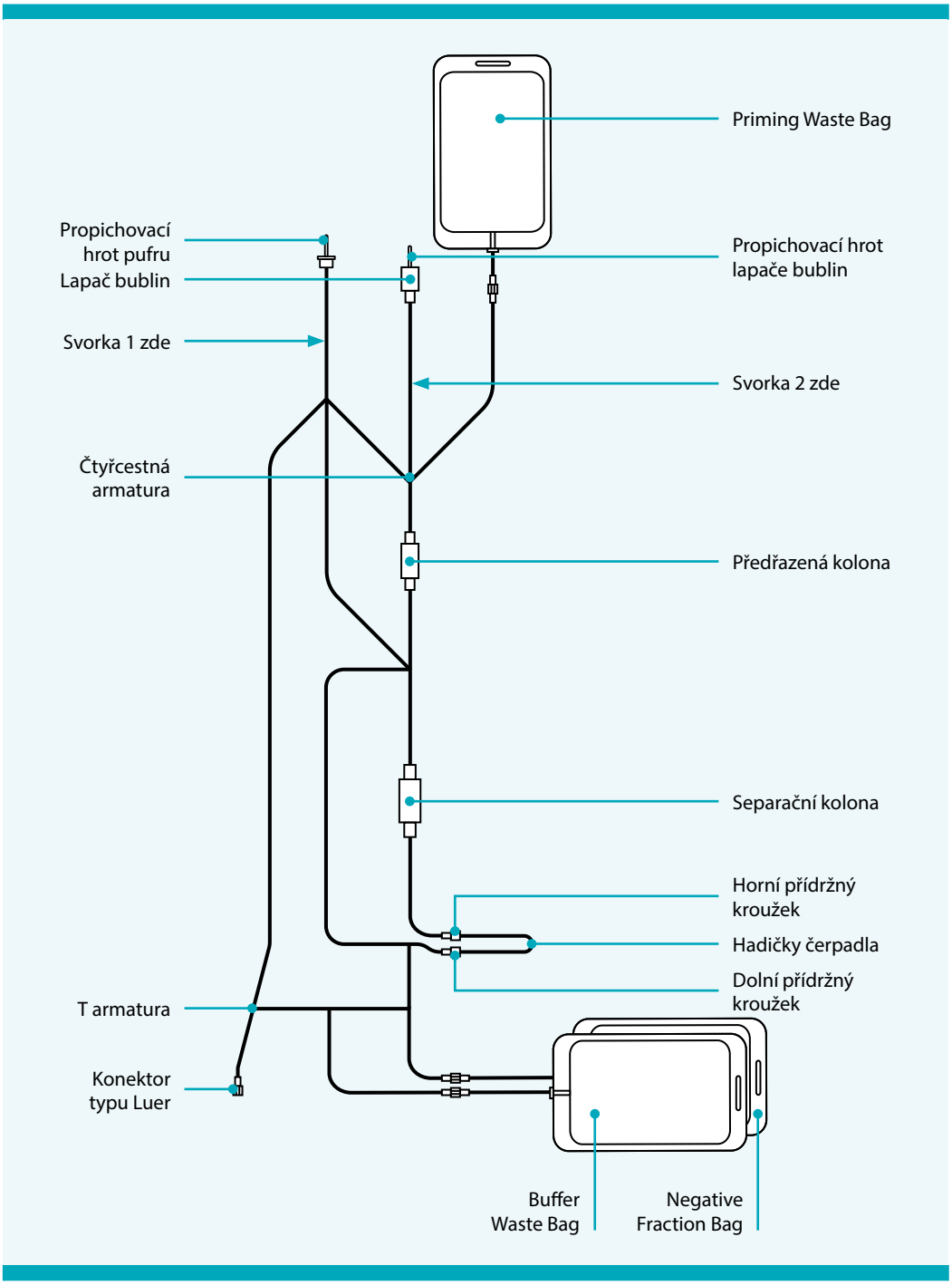
Chcete-li přistoupit k dalším krokům, stiskněte **ENT**.



Obrazovka 7.52: Připojte vak Cell Preparation Bag

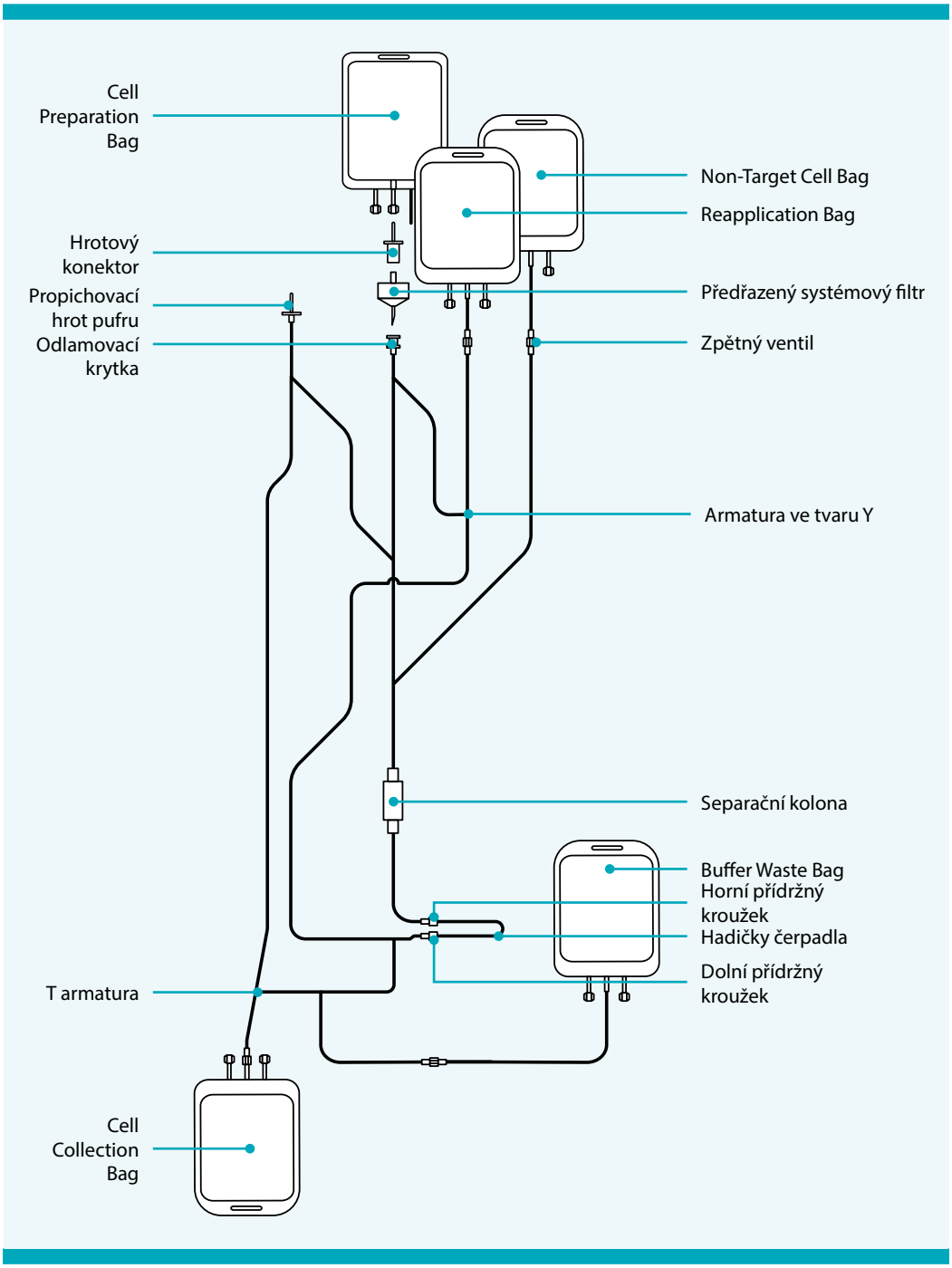
▶ Konečná kontrola senzoru kapaliny

Viz strana 164.



Obrázek 7.11: Celková konstrukce soupravy CliniMACS Tubing Set (např. CliniMACS Tubing Set) s polohami svorek 1 a 2

7.3.3 Hadičková souprava CliniMACS Depletion Tubing Set

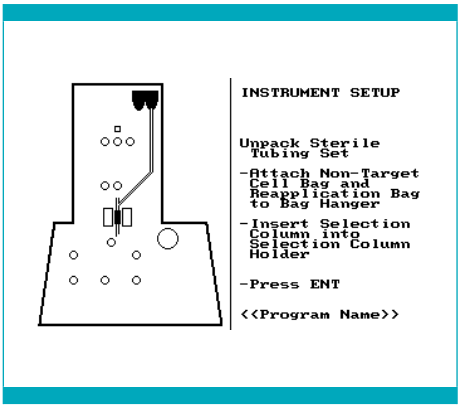


Obrázek 7.12: Celková konstrukce soupravy CliniMACS Depletion Tubing Set

Příprava na instalaci soupravy hadiček

Okno označuje Obrazovka 7.53.

Pokyn je zobrazen napravo a diagram odpovídající pokynu je zobrazen na levé straně. Blikající prvky na obrazovce označují oblasti pozornosti.



Obrazovka 7.53: Vybalení hadičkové soupravy

Hadičková souprava CliniMACS Depletion Tubing Set je dodávána v uzavřeném, sterilizovaném obalu. Každá souprava hadiček obsahuje předem sestavené hadičky a kolonu a vaky pro jednu separaci buněk (viz Obrázek 7.12). Když je obal neporušený, je zajištěna cesta sterilní tekutiny.

Poznámka: Přístroj CliniMACS Plus Instrument zobrazuje název zvoleného programu, např. DEPLETION 3.1, ve spodním řádku. V kterémkoli kroku během instalace soupravy hadiček lze stisknout tlačítko „Vrátit změnu“ (viz bod „Popis“ v uživatelské příručce k přístroji CliniMACS Plus Instrument) pro návrat k předchozímu kroku.

1. Zaznamenejte číslo šarže a dobu použitelnosti soupravy hadiček.

   Vybalte sadu sterilních hadiček za sterilních podmínek (např. digestoř s laminárním prouděním). Před použitím soupravy hadiček odstraňte svírací svorku použitou pro balení soupravy hadiček. Svorka je označena nápisem „Před montáží přístroje CliniMACS Plus Instrument“.

2. Zkontrolujte připojení zámku luer k vakům. Zámky luer se musí těsně uzavřít.

Cell Collection Bag

Hadičková souprava CliniMACS Depletion Tubing Set je dodávána s připojeným vakem Cell Collection Bag. Zaznamenejte hmotnost prázdného vaku Cell Preparation Bag. Pokud je pro separaci zapotřebí více než jeden vak Cell Collection Bag, propojte vaky pomocí sady pro přenos plazmy. Ujistěte se, že jsou všechna připojení pevně uzavřena. Zaznamenejte hmotnost prázdného vaku(ů) Cell Collection Bag.

Připojte vak Non-Target Cell Bag, vak Reapplication Bag a vložte separační kolonu

1. Připevněte vak Non-Target Cell Bag a vak Reapplication Bag k pravému držáku na vak na přístroji (viz Obrázek 7.13).
2. Upravte výšku držáku na vak. Zvedněte nebo spusťte držáky na vak, aby se výška přizpůsobila velikosti vaků Non-Target Cell Bag a Reapplication Bag. Ujistěte se, že jsou umístěny dostatečně vysoko, aby se zabránilo silnému ohnutí hadičky, které by mohlo omezit průtok, a zda je dostatečně nízko, aby se zabránilo natažení hadičky nebo spojů.

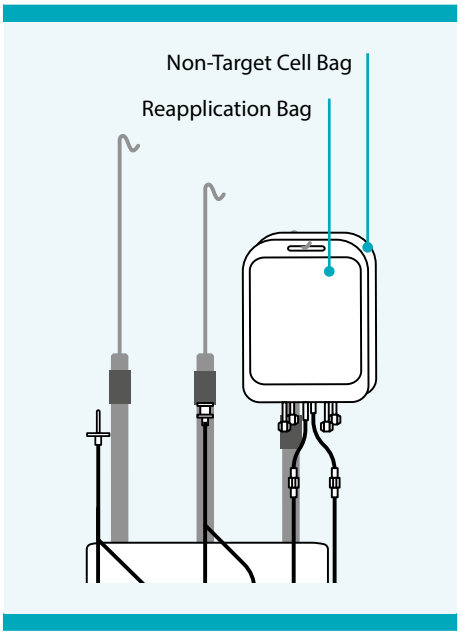
   OZNÁMENÍ

   Riziko poškození přístroje. Přetížení držáky na vaky může poškodit přístroj. Nosnost jednoho držáku na vak je 3 kg. Držáky na vak nepřetěžujte.
3. Vložte separační kolonu do držáku separační kolony (viz Obrázek 7.14).

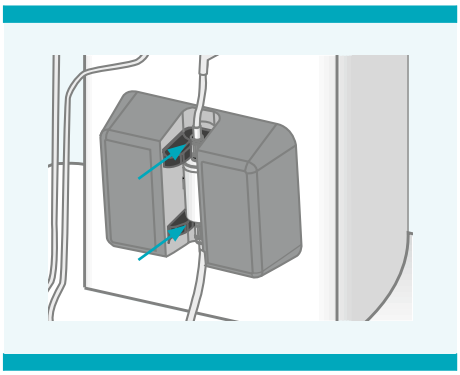
   ⚠ VAROVÁNÍ

   Riziko poranění. Pokud je separační kolona vkládána nebo vysouvána při zapnuté magnetické jednotce, hrozí nebezpečí zranění osob. Separační kolonu vkládejte nebo vysouvejte pouze tehdy, pokud je magnetická jednotka vypnutá.

Chcete-li přistoupit k dalším krokům, stiskněte **ENT**.



Obrázek 7.13: Připevněte Non-Target Cell Bag a Reapplication Bag



Obrázek 7.14: Separační kolona v držáku separační kolony

Naplňte ventily č. 1, 2, 3, 4 a 5

Okno označuje Obrazovka 7.54.

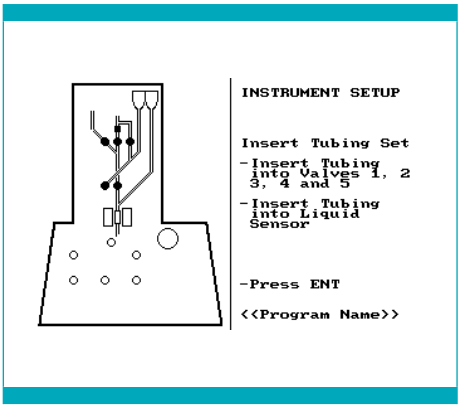
Ventily zachycené na obrazovce se automaticky otevřou.

1. Zaveďte hadičku do ventilů č. 1, 2, 3, 4 a 5
2. Vlože hadičku nad ventil č. 2 do senzoru kapaliny (viz Obrázek 7.15).

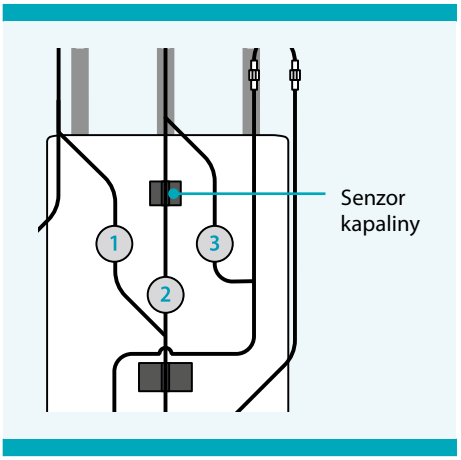
DŮLEŽITÉ

- *Aby byla zajištěna správná funkce, musí být senzor kapaliny i vkládaná hadička suché. Pečlivě oba zkontrolujte. Pokud je přítomna kapalina, osušte oblast měkkým hadříkem, který nepouští vlákna.*
- *Při provádění každého kroku zkontrolujte všechny hadičky a nástavce, zda nejsou zalomené nebo nemají silné ohyby, které by mohly omezit průtok kapaliny hadičkou. Zkontrolujte všechny ventily, abyste se ujistili, že hadička pevně sedí.*
- *Soupravu hadiček vkládejte pouze do otevřených ventilů (když je tlačítko zatlačeno dovnitř). Pokud je hadička vložena do uzavřeného ventilu, nezapadne správně.*
- *Pokud je nutné nastavit hadičku po uzavření ventilu, netahejte za hadičku, aniž byste stiskli tlačítko ventilu pro otevření ventilu (viz Obrázek 7.16).*

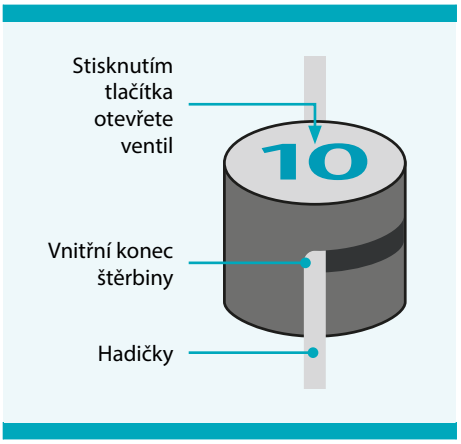
Chcete-li přistoupit k dalším krokům, stiskněte **ENT**.



Obrazovka 7.54: Čísla plnicích ventilů 1, 2, 3, 4 a 5



Obrázek 7.15: Hadičky ve ventilech

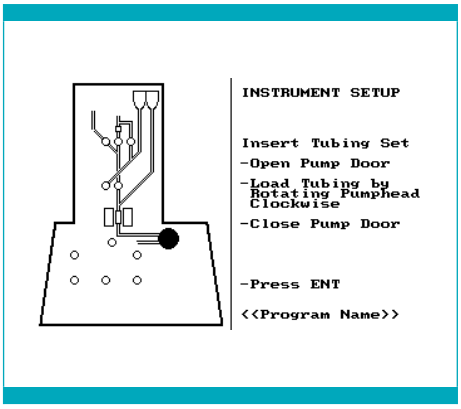


Obrázek 7.16: Správně vložené hadičky

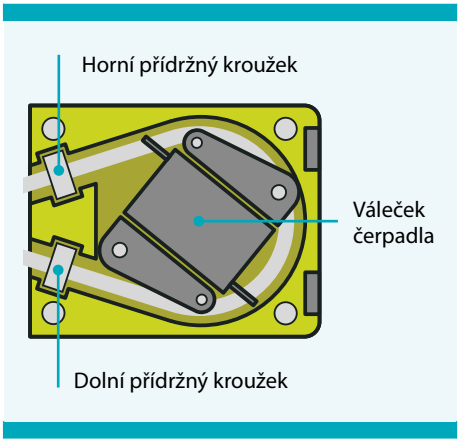
Vložte hadičky čerpadla

Okno označuje Obrazovka 7.55.

1. Otevřete dvířka čerpadla zvednutím za levý okraj.
2. Vložte horní pojistný kroužek na hadici čerpadla do drážky pojistného kroužku na uchycení čerpadla (viz Obrázek 7.17).
3. Otáčejte válečkem pumpy ve směru hodinových ručiček, dokud se hadička nezasune mezi obě sady vodících kolíků hadičky a hadička těsně nezapadne kolem válečku pumpy. Ujistěte se, že hadička není přiskřípnuta na konci vodicích kolíků. Pokud je nutné upravit hadičku uvnitř čerpadla, hadičku lze vyjmout zvednutím spodního zakončení a otočením válečku čerpadla proti směru hodinových ručiček.
4. Vložte dolní pojistný kroužek na hadici čerpadla do drážky pojistného kroužku na uchycení čerpadla.
5. Opakujte otáčení válečku čerpadla ve směru hodinových ručiček, aby bylo zajištěno, že se váleček čerpadla volně pohybuje.
6. Uzavřete dvířka čerpadla.



Obrazovka 7.55: Vložte hadičky čerpadla



Obrázek 7.17: Vložte hadičky čerpadla

DŮLEŽITÉ

Během separace buněk čerpadlo okamžitě zastaví chod, kdykoli se otevře pouzdro čerpadla. Pokud zůstane otevřený déle než 600 sekund, přístroj přeruší probíhající běh.

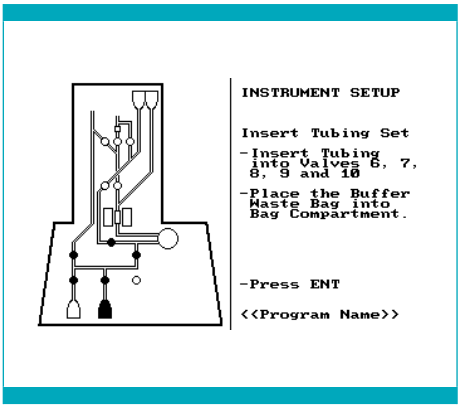
Chcete-li přistoupit k dalším krokům, stiskněte **ENT**.

Čísla plnicích ventilů 6, 7, 8, 9 a10

Okno označuje Obrazovka 7.56.

1. Zaveďte hadičku do ventilů č. 6, 7, 8, 9 a10. Zajistěte, že je hadička bezpečně umístěna v otvoru ventilu.
2. Do přihrádky na vak vložte vak Buffer Waste Bag. Ujistěte se, že hadička není stlačena pod víkem přihrádky na vak.
3. Ujistěte se, že je možný neomezený průtok do vaku Cell Collection Bag.

Chcete-li přistoupit k dalším krokům, stiskněte **ENT**.



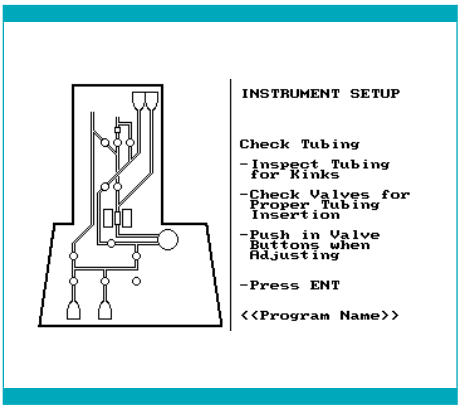
Obrazovka 7.56: Čísla plnicích ventilů 6, 7, 8, 9 a10

Znovu zkontrolujte všechny hadičky a nástavce

Okno označuje Obrazovka 7.57.

1. Počínaje ventilem č. 1, ověřte, že hadička správně sedí a je správně umístěna v každém ventilu.

   Znovu prohlédněte hadičku v každém ventilu. Ujistěte se, že hadička vstupuje a vystupuje z každého ventilu přes rozšíření na vnitřním konci štěrbiny (viz Obrázek 7.16).
2. Zkontrolujte, zda hadička není zalomená nebo zkroucená.



Obrazovka 7.57: Znovu zkontrolujte všechny hadičky a nástavce

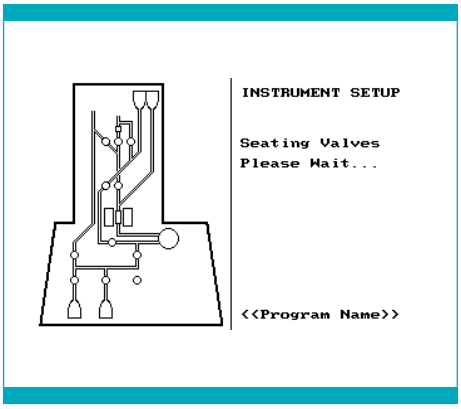
Poznámka: Pokud je nutné nastavit hadičku po uzavření ventilu, netahejte za hadičku, aniž byste stiskli tlačítko ventilu pro otevření ventilu.

Chcete-li přistoupit k dalším krokům, stiskněte **ENT**.

Usazení ventilů

Okno označuje Obrazovka 7.58.

Aby bylo zajištěno správné usazení hadiček ve ventilech, bude postupně dvakrát přístroj ovládat všechny ventily. Sledujte a poslouchejte, abyste se ujistili, že všechny ventily fungují správně. Pokud některý ventil nepracuje správně, viz kapitola 8 „Řešení problémů“ na straně 205. Tento krok lze opakovat stisknutím ◄ a následně stisknutím **ENT** (viz bod „Popis“ v uživatelské příručce přístroje CliniMACS Plus Instrument).



Obrazovka 7.58: Usazení ventilů

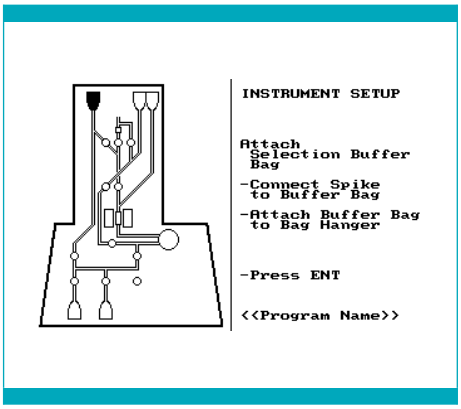
Během této kontrolní sekvence bude také testován magnetický pohon.

Připojte pufr CliniMACS PBS/EDTA Buffer

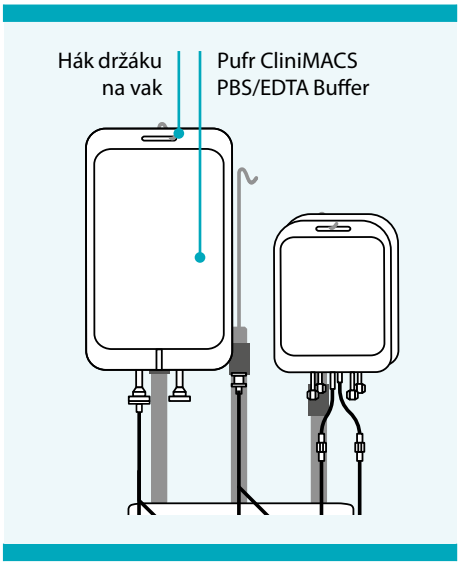
Okno označuje Obrazovka 7.59.

Předepsaným pufrem pro separace CliniMACS Plus je pufr CliniMACS PBS/EDTA Buffer doplněný HSA na konečnou koncentraci 0,5 % (hm./obj.).

1. Pomocí aseptických technik sejměte krytku z propichovacího hrotu na soupravě hadiček (viz Obrázek 7.12 na straně 171) a připojte jej k vaku na pufr. Ujistěte se, že je přepážka propíchnutá, což umožňuje volný průtok kapaliny. Jemně vak zmáčkněte, abyste se ujistili, že propichovací hrot pronikl do vaku bez úniku do vnějšího prostoru.
2. Připevněte vak na pufr k háku vaku na pufr na závěsu vaku (viz Obrázek 7.18).
3. Upravte výšku držáku na závěs vaku. Zvedněte nebo spusťte držáku na závěs vaku, aby se výška přizpůsobila velikosti vaku na pufr. Ujistěte se, že je umístěn dostatečně vysoko, aby nedošlo k silnému ohnutí hadičky, které by mohlo omezit průtok, a zda je dostatečně nízko, aby se zabránilo natažení hadičky nebo spojů.



Obrazovka 7.59: Připevněte vak pufru



Obrázek 7.18: Připevněte vak pufru

DŮLEŽITÉ

Kvůli několika krokům gravimetrického plnění a proplachování je nezbytné, aby byl vak s pufrem umístěn co nejvýše a zajistilo se, že je výše než vak Reapplication Bag a vak Non-Target Cell Bag (viz Obrázek 7.20 na straně 182).

Chcete-li přistoupit k dalším krokům, stiskněte **ENT**.

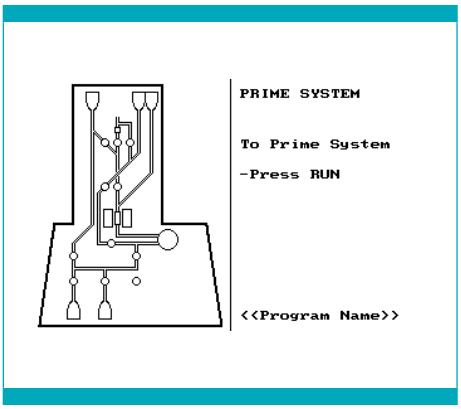
Spusťte plnění

Okno označuje Obrazovka 7.60.

Plnění spustíte stisknutím **RUN**.

Okno označuje Obrazovka 7.61.

Během fáze plnění je souprava hadiček naplněna pufrem CliniMACS PBS/EDTA Buffer. Pufr bude cirkulovat přes soupravu hadiček včetně separační kolony. Plnicí kapalina se shromažďuje ve vaku Buffer Waste Bag, vaku Reapplication Bag a vaku Non-Target Cell Bag, zatímco vak Cell Collection Bag zůstává prázdný (viz Obrázek 7.12 na straně 171). Cykly plnění budou pokračovat a budou se opakovat řady kroků.



Obrazovka 7.60: Spusťte plnění

Fáze plnění bude přibližně trvat 2,5 minuty. Stav plnění bude na displeji aktualizován.

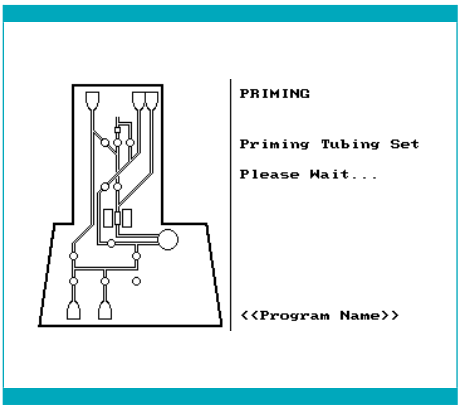
Kontrolujte během plnění

Během plnicí fáze zkontrolujte všechny hadičky, armatury, ventily a separační kolonu, zda nevykazují nějaké netěsnosti nebo přítomnost záhybů, které by mohly blokovat průtok tekutiny.

Pokud budou zjištěny netěsnosti nebo chybné funkce, chod zastavíte stisknutím **STOP**.

Obsluha má 600 sekund na vyřešení problému.

Proces obnovte stisknutím **RUN**.



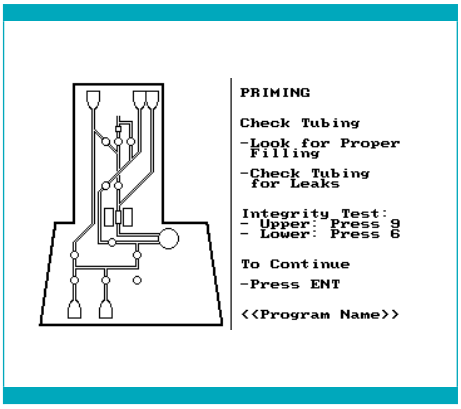
Obrazovka 7.61: Plnění probíhá

Po 600 sekundách bude separace zrušena. Pokud obsluha nemůže problém vyřešit nebo pokud je sada hadiček vadná, vyjměte sadu hadic a nahraďte ji novou.

Poznámka: Jakmile začne plnění, není možné se vrátit k postupu nastavení přístroje.

Konečná kontrola všech hadiček a nástavců

Okno označuje Obrazovka 7.62.



Obrazovka 7.62: Konečná kontrola všech hadiček a nástavců

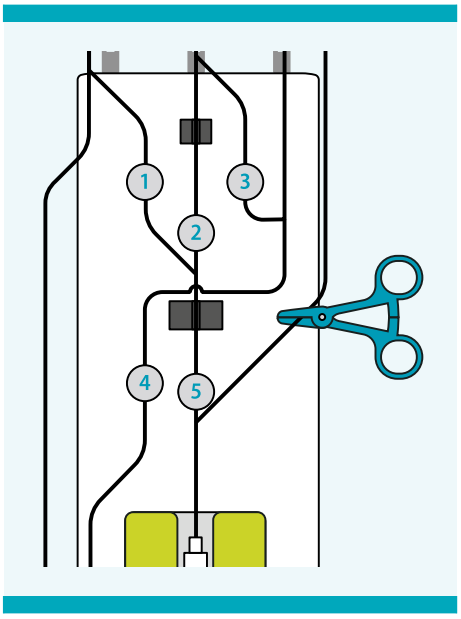
Před zahájením chodu zkontrolujte následující:

- kapalina ve všech částech hadičkové soupravy s výjimkou hadiček nad ventily č. 2 a 3.
- bez přebytečného vzduchu v hadičkové soupravě
- kapalina ve vacích Reapplication Bag, Buffer Waste Bag a Non-Target Cell Bag
- vak Cell Collection Bag bez kapaliny

Zatím nestiskněte **ENT**.

Test neporušenosti

V zájmu zvýšené bezpečnosti musí být proveden test neporušenosti pro zkoušku hadičkové soupravy na netěsnost. Zkušební sekvence se skládá ze dvou automatizovaných sekvencí, které umožňují natlakovat a samostatně pozorovat jak horní, tak spodní část sady hadiček.



Obrázek 7.19: Příprava na test neporušenosti

⚠ UPOZORNĚNÍ

Riziko zpoždění procesu. Pokud svorka pod vakem Non-Target Cell Bag nebyla po dokončení testu neporušenosti odstraněna, necílové (označené) buňky nemohly být odstraněny ze separační kolony během eluce. Další zadržování necílových buněk je pak nemožné. Separační postup se musí opakovat. Po dokončení testu neporušenosti svorku odstraňte.

DŮLEŽITÉ

Test neporušenosti bude správně fungovat pouze v případě, že je hadička sevřena svorkou pod vakem Non-Target Cell Bag. Před zahájením testu neporušenosti upněte hadičku pod vakem Non-Target Cell Bag. Po dokončení testu neporušenosti svorku odstraňte.

Test neporušenosti pro horní část hadičkové soupravy.

1. Když obsluha provádí„Konečnou kontrolu všech hadiček a nástavců“, okno ukazuje Obrazovka 7.63.

2. Po provedení „Konečné kontroly všech hadiček a nástavců“ **nestiskněte** ENT.

3. Chcete-li zadat test neporušenosti pro horní část, stiskněte 9.

   Okno označuje Obrazovka 7.64.

   DŮLEŽITÉ

   Upněte hadičku pod zpětným ventilem vaku Non-Target Cell Bag.

4. Chcete-li spustit zkušební sekvenci, stiskněte RUN.

   Pro návrat na Obrazovka 7.63, stiskněte ◄ .

5. Jakmile bylo stisknuto RUN, přístroj spustí automatickou zkušební sekvenci pro horní část hadičkové soupravy.

   Okno označuje Obrazovka 7.65.

   Vznikne přetlak a bude se udržet dvě minuty. Během této doby by měla obsluha sledovat všechny spojky nad horním připojením hadiček čerpadla.

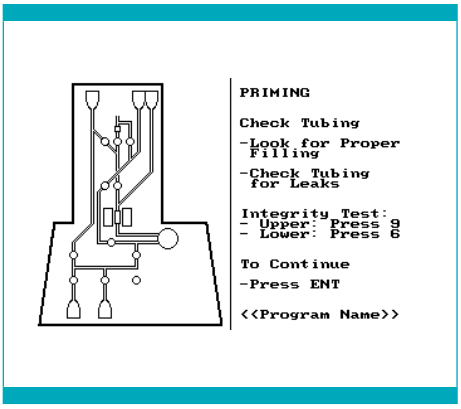
   V každém bodě lze dokončit zkušební sekvence stisknutím ENT.

6. Po dvou minutách se tlak uvolní automaticky a okno ukazuje Obrazovka 7.63.

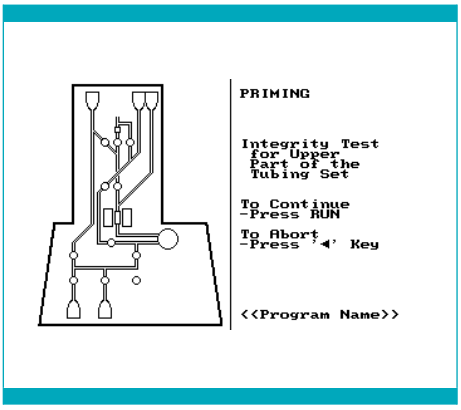
   Zkontrolujte, zda během zkušební sekvence nenastaly nějaké netěsnosti. Pokud bude zjištěna netěsnost v jakékoliv spojce hadičkové soupravy, hadičková souprava musí být odstraněna a nahrazena novou.

   Kontaktujte technickou podporu Miltenyi Biotec Technical Support ohledně vrácení vadné hadičkové soupravy.

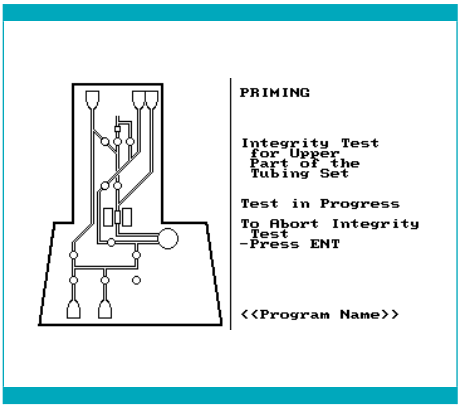
7. Pokud nebudou zjištěny žádné úniky, pokračujte v testu neporušenosti dolní části hadičkové soupravy.



Obrazovka 7.63: Spusťte test neporušenosti pro horní část



Obrazovka 7.64: Spusťte test neporušenosti pro horní část



Obrazovka 7.65: Spusťte test neporušenosti pro horní část

Test neporušenosti pro dolní část hadičkové soupravy

Okno označuje Obrazovka 7.63.

1. Pro zadání testu neporušenosti stiskněte **6**.
   Nestiskněte ENT.

   Okno označuje Obrazovka 7.66.

2. Chcete-li spustit zkušební sekvenci, stiskněte **RUN**.

   Pro návrat na Obrazovka 7.63, stiskněte ◄ .

3. Jakmile bylo stisknuto **RUN**, přístroj spustí automatickou zkušební sekvenci pro dolní část hadičkové soupravy.

   Okno označuje Obrazovka 7.67.

   Vznikne přetlak a bude se udržovat 30 sekund.

   Během této doby by měla obsluha sledovat přípojku hadiček čerpadla a armatury ve tvaru T mezi ventily č. 6, 8, 9 a 10

   V každém bodě lze dokončit zkušební sekvence stisknutím **ENT**.

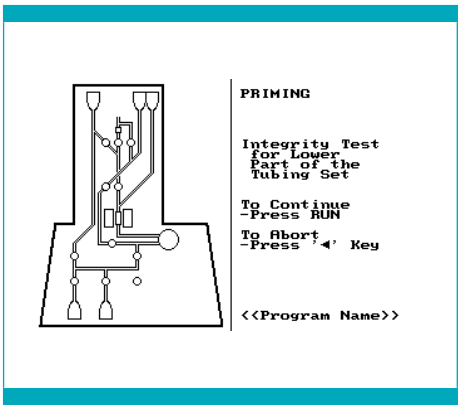
4. Po 30 sekundách se tlak uvolní automaticky a okno ukazuje Obrazovka 7.63.

   Obsluha musí zkontrolovat, zda během zkušební sekvence nenastaly nějaké netěsnosti. Pokud bude zjištěna netěsnost v jakékoliv spojce hadičkové soupravy, hadičková souprava musí být odstraněna a nahrazena novou.

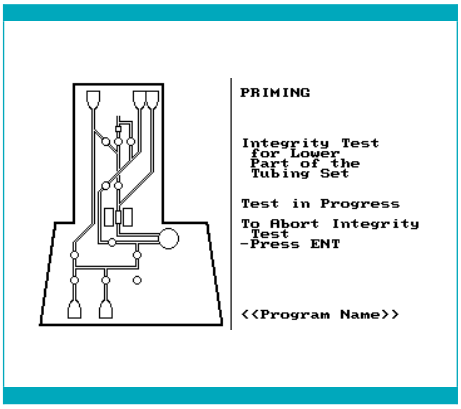
   Kontaktujte technickou podporu Miltenyi Biotec Technical Support ohledně vrácení vadné hadičkové soupravy.

5. **Otevřete dráhu k vaku Non-Target Cell Bag odstraněním svorky pod zpětným ventilem.**

6. Pokud nebudou zpozorovány žádné úniky, obsluha nyní může pokračovat dalším krokem stisknutím **ENT**.



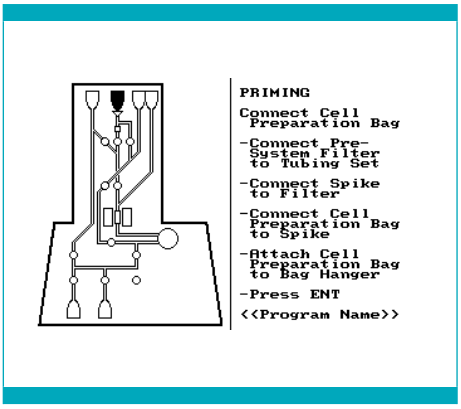
Obrazovka 7.66: Spusťte test neporušenosti pro dolní část



Obrazovka 7.67: Test neporušenosti pro dolní část probíhá

Připojte vak Cell Preparation Bag

Okno označuje Obrazovka 7.68.



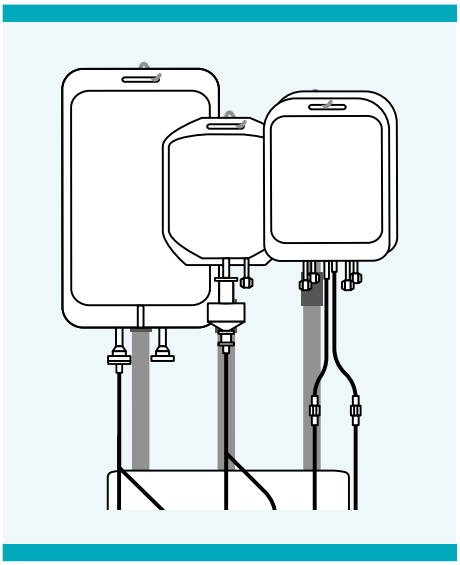
Obrazovka 7.68: Připojte vak Cell Preparation Bag

Připojte vak Cell Preparation Bag obsahující magneticky značené buňky) k hadičkové soupravě:

1. Odstraňte odlamovací krytku (viz Obrázek 7.12 na straně 171) z hadičkové soupravy.
2. Odstraňte krytku z hrotu předřazeného systémového filtru. Pevně zasuňte hrot předřazeného systémového filtru do sady hadiček a ujistěte se, že je přepážka proražená.
3. Odstraňte uzávěry z předřazeného systémového filtru a tupého konce hrotového konektoru a spojte obě části k sobě.
4. Odstraňte druhou krytku z konektoru hrotu a připojte hrot k vaku Cell Preparation Bag, aby bylo jisté, že je přepážka propíchnutá, což umožňuje volný průtok kapaliny. Jemně vak zmáčkněte, abyste se přesvědčili, že propichovací hrot pronikl do vaku.
5. Zkontroluje spojku mezi vakem Cell Preparation Bag, spojkou hrotu, předřazeným systémovým filtrem a hadičkovou soupravou, aby se potvrdilo, že je spojka zabezpečená.
6. Zavěste vak Cell Preparation Bag na držák na vak (viz Obrázek 7.21).
7. Ujistěte se, že vaky a hadičky připojené k držáky na vaky nejsou natažené ani ohnuté.

   Vzhledem k gravimetrickému plnění a proplachování prováděným během automatické separace je velmi důležité, aby byly vaky správně vyrovnány. Pro zajištění úplného zpracování vzorku je také důležité umístit vaky Reapplication Bag a Non-Target Cell Bag výše než vak Cell Preparation Bag (viz Obrázek 7.20):

   - **Nejvyšší poloha:** vak s pufrem
   - **Střední poloha:** Vak Reapplication Bag a Non-Target Cell Bag
   - **Nejnižší poloha:** Cell Preparation Bag



Obrázek 7.20: Správně vyrovnané vaky

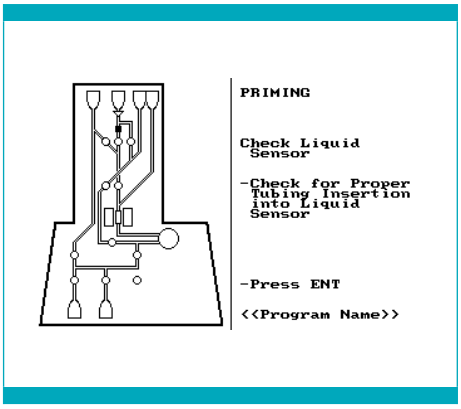
Chcete-li přistoupit k dalším krokům, stiskněte **ENT**.

Konečná kontrola senzoru kapaliny

Okno označuje Obrazovka 7.69.

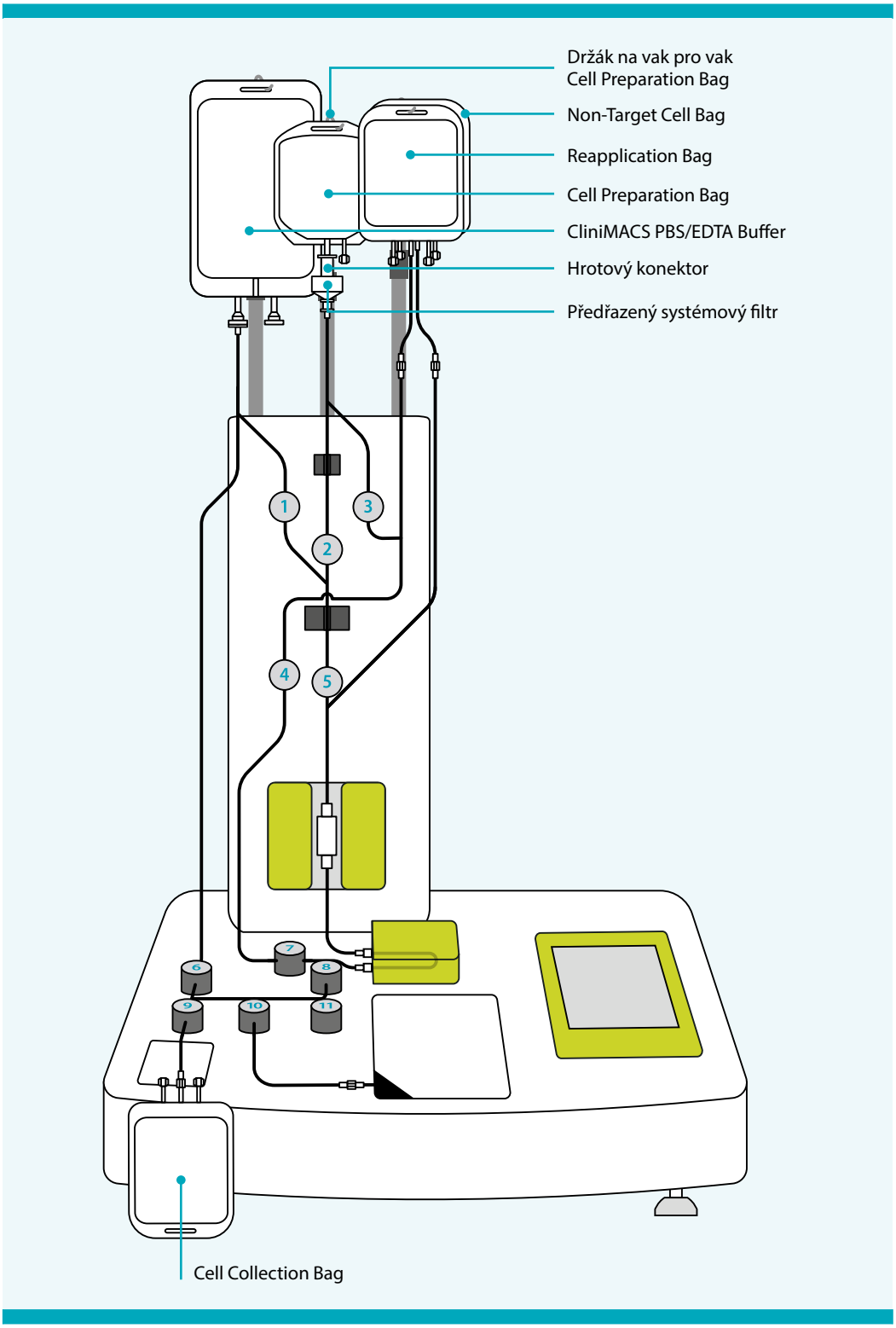
1. Zkontrolujte hadičky senzoru kapaliny. Zajistěte, aby byla hadička správně zasunuta, že je zbavena jakékoliv externí kapaliny a nebyla vytlačené z určené polohy během postupu zavádění.
2. Ověřte si, že je možný neomezený průtok kapaliny do každého vaku.

Chcete-li přistoupit k dalším krokům, stiskněte **ENT**.



Obrazovka 7.69: Konečná kontrola senzoru kapaliny

▶ **Přistupte ke KROKU 4.**



Obrázek 7.21: Přístroj CliniMACS Plus Instrument se soupravou CliniMACS Depletion Tubing Set, pufrem CliniMACS PBS/EDTA Buffer, vaky Cell Preparation Bag, a Cell Collection Bag

7.4 KROK 4: Separace CliniMACS Plus

7.4.1 CD34 SELECTION 1/2

Po dokončení závěrečné kontroly je přístroj CliniMACS Plus Instrument připraven zahájit separaci. Okno označuje Obrazovka 7.70.

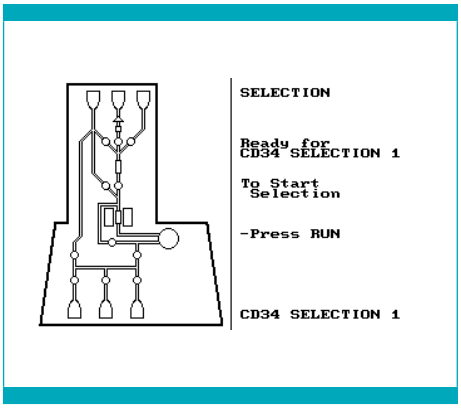
Chcete-li přistoupit k dalším krokům, stiskněte **RUN**.

Po stisknutí **RUN** přístroj automaticky provede zvolenou separační proceduru.

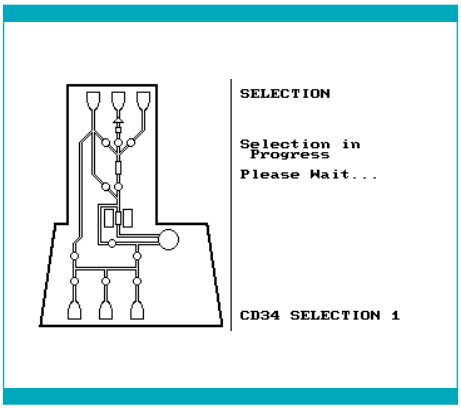
V každé fázi operace se zobrazí obrazovka podobná Obrazovka 7.71, která ukazuje stav separačního postupu.

Indikátor polohy magnetu je zobrazen jako dvě černá políčka vedle separační kolonu, když je magnet „ON“, to znamená, že byl posunut dopředu, aby se separační kolona zmagnetizovala. Pokud je indikátor polohy magnetu průhledný (např. Obrazovka 7.70), magnet je „OFF“, to znamená, že byl přesunut do zadní části přístroje. S vytaženým magnetem je separační kolona mimo magnetické pole a již není magnetizována.

Poznámka: Na obrazovce se může zobrazit jiný název programu v závislosti na zvoleném separačním programu (CD34 SELECTION 1 nebo 2).



Obrazovka 7.70: Spusťte separaci



Obrazovka 7.71: Separace probíhá

Separační postup

Naplnění buňkami

Proces separace začíná naplněním předřazeného systémového filtru, aby se odstranil zbývající vzduch z předřazeného systémového filtru.

Poté začíná separace označených buněk. Čerpadlo nasaje obsah vaku Cell Preparation Bag do sady hadiček a naplní buněčný produkt přes předřazenou kolonu na separační koloně. Magneticky značené buňky (cílové buňky) jsou zadrženy v separační koloně umístěné v magnetickém poli, zatímco neznačené buňky (necílové buňky) procházejí skrz a shromažďují se ve vaku Negative Fraction Bag. Když je vak Cell Preparation Bag prázdný (automaticky detekován snímačem kapaliny), předřazený systémový filtr se dvakrát propláchne pufrem.

Promývání kolony I

Předřazená kolona a separační kolona se důkladně promyjí, aby se odstranily všechny neznačené buňky. Promývací pufr se shromažďuje ve vaku Buffer Waste Bag. Když se spustí „Promývání kolony I“, zobrazí se celkový zbývající čas do konce separační procedury.

DŮLEŽITÉ

Na začátku separace je pufr čerpán směrem nahoru k vaku pro přípravu buněk, aby se naplnil předřazený systémový filtr. Několikrát jemně poklepejte na stranu filtru, abyste odstranili všechny bubliny, které by se mohly zachytit ve filtru.

Uvolnění buněk I

Magnet se přesune do zadní části přístroje (poloha „OFF“). Zadržené buňky se uvolňují při vysoké rychlosti průtoku, ale buňky zůstávají uvnitř cyklu vnitřních hadiček.

Opakované naplnění buňkami I

Magnet se opět přesune do polohy „ON“, aby se zmagnetizovala separační kolona a buňky jsou znovu naneseny na separační kolonu.

Promývání kolony II

Po opětovném naplnění buněk následuje druhý promývací krok k odstranění zbývajících neznačených buněk. Také všechny hadičky jsou několikrát propláchnuty.

Uvolnění buněk II, opětovné naplnění buněk II, promytí kolony III

Buňky se uvolní a znovu se nanesou na separační kolonu podruhé, aby se odstranily všechny neznačené buňky, které nespecificky ulpívají na matrici kolony. Poté se separační kolona znovu promyje.

Uvolnění buněk III, opětovné naplnění buněk III, promytí kolony IV

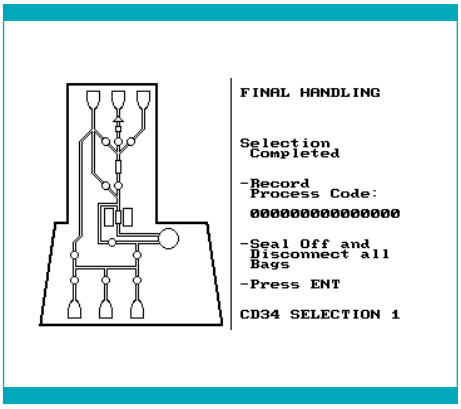
Separační program CD34 SELECTION 2 navíc zahrnuje třetí krok uvolnění a opětovné aplikace.

Konečná eluce buněk

Magnet se přesune do polohy „OFF“ a magneticky značené buňky se uvolní ze separační kolony a shromáždí se v připevněném vaku Cell Collection Bag.

Odpojte vaky a zaznamenejte procesní kód

Po dokončení běhu se v okně zobrazí Obrazovka 7.72.

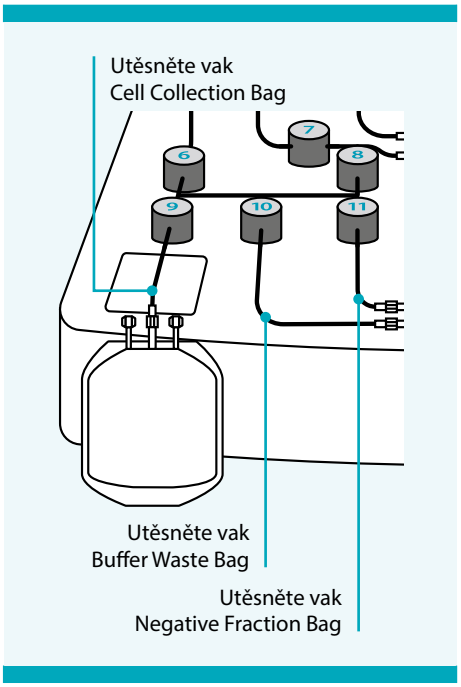


Obrazovka 7.72: Odpojte vaky a zaznamenejte procesní kód

1. Zaznamenejte si kód procesu.
2. Upněte nebo utěsněte hadičku nad zámkem luer spojujícím vak Cell Collection Bag se sadou hadiček (viz Obrázek 7.22).

   Udělejte tři hermetické uzávěry v hadici přímo pod ventilem č. 9. Opatrně odřízněte střední těsnění, abyste odpojili vak pro odběr buněk od sady hadiček.
3. Zvažte naplněný vak Cell Collection Bag. Zaznamenejte hmotnost.

   Určete hmotnost frakce cílových buněk odečtením hmotnosti prázdného vaku Cell Collection Bag od hmotnosti vaku Cell Collection Bag obsahujícím cílové buňky. Zaznamenejte hmotnost.
4. Důkladně promíchejte suspenzi cílových buněk otáčením vaku. Vezměte vhodné množství, např. 0,5 mL a uchovejte pro analýzu.
5. Pomocí tepelného svařovacího zařízení utěsněte hadičku nad zámkem luer vaku Negative Fraction Bag. Udělejte v hadičce tři hermetické uzávěry. Oddělte střední těsnění, abyste odpojili vak Negative Fraction Bag.
6. Odpojte stejným způsobem vak Buffer Waste Bag.
7. Odstraňte vaky Negative Fraction Bag a Buffer Waste Bag. Uchovávejte všechny vaky, dokud nebude dokončena konečná analýza všech buněk.



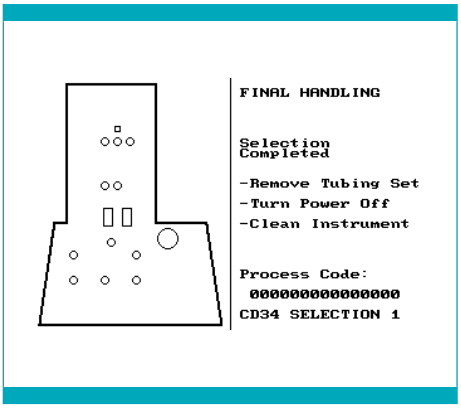
Obrázek 7.22: Odpojte vaky

Cílové buňky mohou být nyní zpracovány v souladu s klinickými protokoly.

Chcete-li přistoupit k dalším krokům, stiskněte **RUN**.

Vyjměte sadu hadiček a vypněte

Okno označuje Obrazovka 7.73.



Obrazovka 7.73: Vyjměte sadu hadiček a vypněte

1. Odstraňte sadu hadiček: Počínaje ventilem č. 6, 9, 10 a 11 a směrem nahoru uvolněte hadičku od senzoru kapaliny a od ventilů zatlačením na ventily. Uvolněte kolony z držáků kolon. Soupravu hadiček zlikvidujte jako biologicky nebezpečnou v souladu se standardními nemocničními postupy.
2. Vypněte přístroj CliniMACS Plus Instrument.
3. Vyčistěte nástroj podle pokynů pro čištění, viz bod „Čištění a dezinfekce“ v uživatelské příručce k přístroji CliniMACS Plus Instrument. Dodržujte standardní postupy pro ošetření infekčního materiálu.

Analýza buněk

DŮLEŽITÉ

- *Pufr CliniMACS PBS/EDTA Buffer nemusí být odstraněn před podáním separovaným cílových buněk, pokud objem nepřekročí 100 mL na transplantát při vhodných rychlostech infuze. Je třeba vzít v úvahu stav ledvin pacienta a účinky na krevní elektrolyty. Zejména u dětí je třeba odpovídajícím způsobem upravit rychlost infuze.*
- *Pokud objem frakce cílových buněk překročí 100 mL, musí být redukován vhodnými prostředky, např. centrifugací nebo výměnou pufru, na infuzní roztok schválený v zemi uživatele.*

⚠ UPOZORNĚNÍ

Riziko snížené kvality cílových buněk. Cílové buňky je třeba analyzovat a je třeba potvrdit, zda splňují uživatelovy požadavky, jinak může být narušena vhodnost cílových buněk pro klinické použití. Prověřte kvalitu a kvantitu cílových buněk s ohledem na zamýšlené použití.

Musí obsahovat následující parametry:

- celkový počet leukocytů
- životaschopnost a celkový počet cílových buněk
- čistota a obnova cílových buněk

Doporučuje se také stanovit celkový počet leukocytů a životaschopnost frakce necílových buněk. Seznam je příkladem a měly by být zahrnuty další testy na základě zamýšleného použití a klinických protokolů. Zaznamenejte údaje z analýzy.

7.4.2 ENRICHMENT 1.1

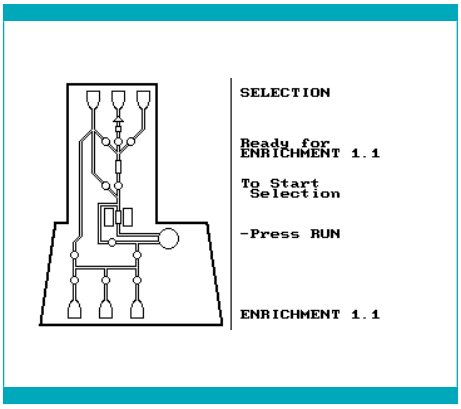
Po dokončení závěrečné kontroly je přístroj CliniMACS Plus Instrument připraven zahájit separaci. Okno označuje Obrazovka 7.74.

Chcete-li přistoupit k dalším krokům, stiskněte **RUN**.

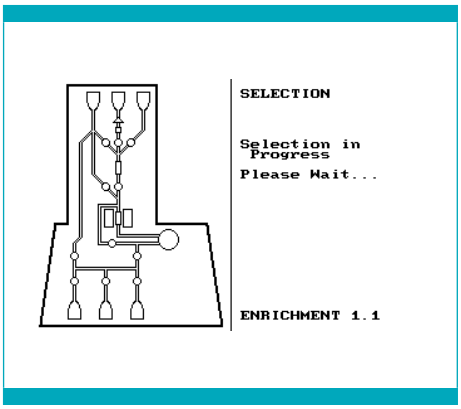
Po stisknutí **RUN** přístroj automaticky provede zvolenou separační proceduru.

V každé fázi operace se zobrazí obrazovka podobná Obrazovka 7.75, která ukazuje stav separačního postupu.

Indikátor polohy magnetu je zachycen jako dvě černá políčka vedle separační kolonu, když je magnet „ON“, to znamená, že byl posunut dopředu, aby se separační kolona zmagnetizovala. Pokud je indikátor polohy magnetu průhledný (např. Obrazovka 7.74), magnet je „OFF“, to znamená, že byl přesunut do zadní části přístroje. S vytaženým magnetem je separační kolona mimo magnetické pole a není magnetizována.



Obrazovka 7.74: Spusťte separaci



Obrazovka 7.75: Separace probíhá

Separační postup

Naplnění buňkami

Proces separace začíná naplněním předřazeného systémového filtru, aby se odstranil zbývající vzduch z předřazeného systémového filtru. Poté začíná separace označených buněk. Čerpadlo nasaje obsah vaku Cell Preparation Bag do sady hadiček a naplní buněčný produkt přes předřazenou kolonu na separační koloně. Magneticky značené buňky (cílové buňky) jsou zadrženy v separační koloně umístěné v magnetickém poli, zatímco neznačené buňky (necílové buňky) procházejí skrz a shromažďují se ve vaku Negative Fraction Bag.

DŮLEŽITÉ

Na začátku separace je pufr čerpán směrem nahoru k vaku pro přípravu buněk, aby se naplnil předřazený systémový filtr. Několikrát jemně poklepejte na stranu filtru, abyste odstranili všechny bubliny, které by se mohly zachytit ve filtru.

Poznámka:

- Pokud počet magneticky označených buněk (vypočítaný softwarem CliniMACS Plus) překročí vazebnou kapacitu separační kolony, separační program automaticky načte a oddělí vzorek buněk ve vhodných podílech („postupné plnění“).
- Plnění se zastaví, když je dosaženo kapacity separační kolony a separační program postoupí k dalšímu kroku separace. Po dokončení posledního kroku (konečná eluce buněk) bude další část vzorku nanesena na kolonu a odpovídajícím způsobem zpracována.

Promývání kolony I

Předřazená kolona a separační kolona se důkladně promyjí, aby se odstranily všechny neznačené buňky. Promývací pufr se shromažďuje ve vaku Buffer Waste Bag.

Uvolnění buněk

Magnet se přesune do zadní části přístroje (poloha „OFF“). Zadržené buňky se uvolňují při vysoké rychlosti průtoku, ale zůstávají uvnitř cyklu vnitřních hadiček.

Opakované naplnění buňkami

Magnet se opět přesune do polohy „ON“, aby se zmagnetizovala separační kolona a buňky jsou znovu naneseny na separační kolonu.

Promývání kolony II

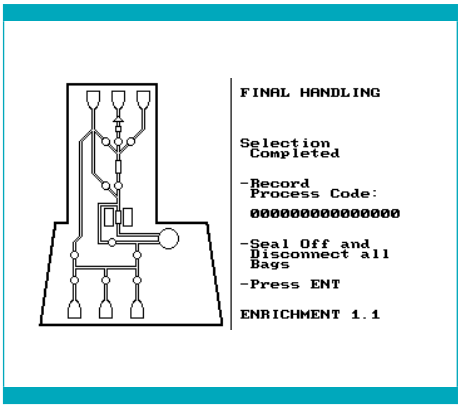
Po opětovném naplnění buněk následuje druhý promývací krok v koloně k odstranění zbývajících neznačených buněk. Propláchnuty jsou několikrát také všechny hadičky.

Konečná eluce buněk

Když se magnet přesune do polohy „OFF“, magneticky značené buňky (cílové buňky) se uvolní ze separační kolony a shromáždí se ve vaku Cell Collection Bag.

Odpojte vaky a zaznamenejte procesní kód

Po dokončení běhu se v okně zobrazí Obrazovka 7.76.

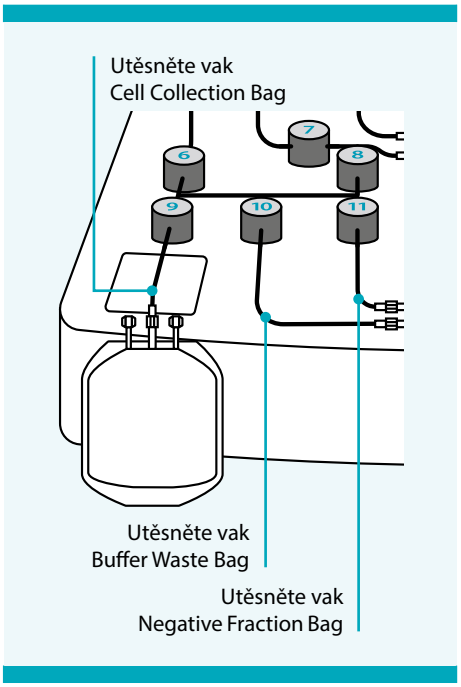


Obrazovka 7.76: Odpojte vaky a zaznamenejte procesní kód

1. Zaznamenejte si kód procesu.
2. Upněte nebo utěsněte hadičku nad zámkem luer spojujícím vak Cell Collection Bag se sadou hadiček (viz Obrázek 7.23).

   Udělejte tři hermetické uzávěry v hadici přímo pod ventilem č. 9. Opatrně odřízněte střední těsnění, abyste odpojili vak pro odběr buněk od sady hadiček.
3. Zvažte naplněný vak Cell Collection Bag. Zaznamenejte hmotnost.

   Určete hmotnost frakce cílových buněk odečtením hmotnosti prázdného vaku Cell Collection Bag od hmotnosti vaku Cell Collection Bag obsahujícím cílové buňky. Zaznamenejte hmotnost.
4. Důkladně promíchejte suspenzi cílových buněk otáčením vaku. Vezměte vhodné množství, např. 0,5 mL a uchovejte pro analýzu.
5. Pomocí tepelného svařovacího zařízení utěsněte hadičku nad zámkem luer vaku Negative Fraction Bag. Udělejte v hadičce tři hermetické uzávěry. Oddělte střední těsnění, abyste odpojili vak Negative Fraction Bag.
6. Odpojte stejným způsobem vak Buffer Waste Bag.
7. Odstraňte vaky Negative Fraction Bag a Buffer Waste Bag. Uchovávejte všechny vaky, dokud nebude dokončena konečná analýza všech buněk.



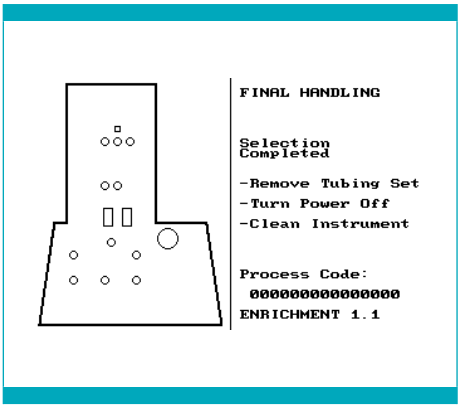
Obrázek 7.23: Odpojte vaky

Cílové buňky mohou být nyní zpracovány v souladu s klinickými protokoly.

Chcete-li přistoupit k dalším krokům, stiskněte **ENT**.

Vyjměte sadu hadiček a vypněte

Okno označuje Obrazovka 7.77.



Obrazovka 7.77: Vyjměte sadu hadiček a vypněte

1. Odstraňte sadu hadiček: Začněte ventily č. 6, 9 a 10 a směrem nahoru uvolněte hadičku od senzoru kapaliny a od ventilů zatlačením na ventily. Uvolněte kolony z držáků kolon. Soupravu hadiček zlikvidujte jako biologicky nebezpečnou v souladu se standardními nemocničními postupy.
2. Vypněte přístroj CliniMACS Plus Instrument.
3. Vyčistěte nástroj podle pokynů pro čištění, viz bod „Čištění a dezinfekce“ v uživatelské příručce k přístroji CliniMACS Plus Instrument. Dodržujte standardní postupy pro ošetření infekčního materiálu.

Analýza buněk

DŮLEŽITÉ

- *Pufr CliniMACS PBS/EDTA Buffer nemusí být odstraněn před podáním separovaným cílových buněk, pokud objem nepřekročí 100 mL na transplantát při vhodných rychlostech infuze. Je třeba vzít v úvahu stav ledvin pacienta a účinky na krevní elektrolyty. Zejména u dětí je třeba odpovídajícím způsobem upravit rychlost infuze.*
- *Pokud objem frakce cílových buněk překročí 100 mL, musí být redukován vhodnými prostředky, např. centrifugací nebo výměnou pufru, na infuzní roztok schválený v zemi uživatele.*

⚠ UPOZORNĚNÍ

Riziko snížené kvality cílových buněk. Cílové buňky je třeba analyzovat a je třeba potvrdit, zda splňují uživatelovy požadavky, jinak může být narušena vhodnost cílových buněk pro klinické použití. Prověřte kvalitu a kvantitu cílových buněk s ohledem na zamýšlené použití.

Musí obsahovat následující parametry:

- celkový počet leukocytů
- životaschopnost a celkový počet cílových buněk
- čistota (účinnost deplece) a obnova cílových buněk

Doporučuje se také stanovit celkový počet leukocytů a životaschopnost frakce necílových buněk. Seznam je příkladem a měly by být zahrnuty další testy na základě zamýšleného použití a klinických protokolů. Zaznamenejte údaje z analýzy.

7.4.3 ENRICHMENT 1.1

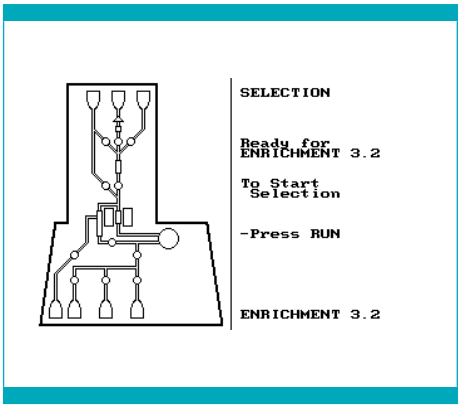
Po dokončení závěrečné kontroly je přístroj CliniMACS Plus Instrument připraven zahájit separaci. Okno označuje Obrazovka 7.78.

Chcete-li přistoupit k dalším krokům, stiskněte **RUN**.

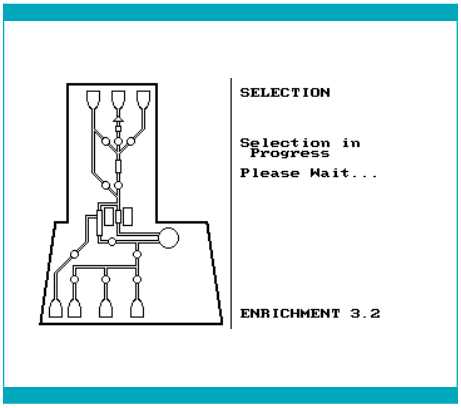
Po stisknutí **RUN** přístroj automaticky provede zvolenou separační proceduru.

V každé fázi operace se zobrazí obrazovka podobná Obrazovka 7.79, která ukazuje stav separačního postupu.

Indikátor polohy magnetu je zachycen jako dvě černá políčka vedle separační kolonu, když je magnet „ON“, to znamená, že byl posunut dopředu, aby se separační kolona zmagnetizovala. Pokud je indikátor polohy magnetu průhledný (např. Obrazovka 7.78), magnet je „OFF“, to znamená, že byl přesunut do zadní části přístroje. S vytaženým magnetem je separační kolona mimo magnetické pole a není magnetizována.



Obrazovka 7.78: Spusťte separaci



Obrazovka 7.79: Separace probíhá

Separační postup

Naplnění buňkami

Proces separace začíná naplněním předřazeného systémového filtru, aby se odstranil zbývající vzduch z předřazeného systémového filtru. Poté začíná separace označených buněk. Čerpadlo nasaje obsah vaku Cell Preparation Bag do sady hadiček a naplní buněčný produkt přes předřazenou kolonu na separační koloně. Magneticky značené buňky (cílové buňky) jsou zadrženy v separační koloně umístěné v magnetickém poli, zatímco neznačené buňky (necílové buňky) procházejí skrz a shromažďují se ve vaku Negative Fraction Bag. Když je vak Cell Preparation Bag prázdný (automaticky detekován snímačem kapaliny), předřazený systémový filtr se dvakrát propláchne pufrem.

DŮLEŽITÉ

Na začátku separace je pufr čerpán směrem nahoru k vaku pro přípravu buněk, aby se naplnil předřazený systémový filtr. Několikrát jemně poklepejte na stranu filtru, abyste odstranili všechny bubliny, které by se mohly zachytit ve filtru.

Promývání kolony I

Předřazená kolona a separační kolona se důkladně promyjí, aby se odstranily všechny neznačené buňky. Promývací pufr se shromažďuje ve vaku Buffer Waste Bag.

Uvolnění buněk I

Magnet se přesune do zadní části přístroje (poloha „OFF“). Zadržené buňky se uvolňují při vysoké rychlosti průtoku, ale buňky zůstávají uvnitř cyklu vnitřních hadiček.

Opakované naplnění buňkami I

Magnet se opět přesune do polohy „ON“, aby se zmagnetizovala separační kolona a buňky jsou znovu naneseny na separační kolonu.

Promývání kolony II

Po opětovném naplnění buněk následuje druhý promývací krok k odstranění zbývajících neznačených buněk. Propláchnuty jsou také několikrát všechny hadičky.

Uvolnění buněk II, opětovné naplnění buněk II, promytí kolony III

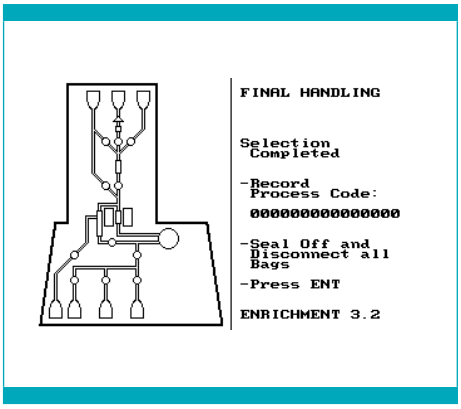
Buňky se uvolní a znovu se nanesou na separační kolonu podruhé, aby se odstranily všechny neznačené buňky, které nespecificky ulpí na matrici kolony. Poté se separační kolona znovu promyje.

Konečná eluce buněk

Když se magnet přesune do polohy „OFF“, magneticky označené buňky (cílové buňky) se uvolní a shromáždí se ve vaku Cell Collection Bag.

Odpojte vaky a zaznamenejte procesní kód

Po dokončení běhu se v okně zobrazí Obrazovka 7.80.

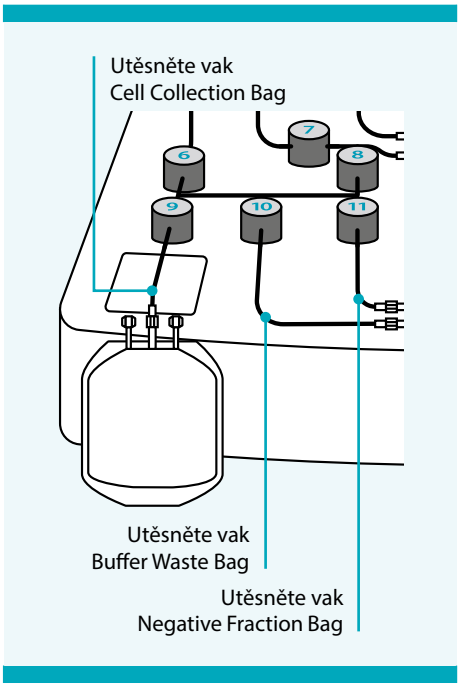


Obrazovka 7.80: Odpojte vaky a zaznamenejte procesní kód

1. Zaznamenejte si kód procesu.
2. Upněte nebo utěsněte hadičku nad zámkem luer spojujícím vak Cell Collection Bag se sadou hadiček (viz Obrázek 7.24).

   Udělejte tři hermetické uzávěry v hadici přímo pod ventilem č. 9. Opatrně odřízněte střední těsnění, abyste odpojili vak pro odběr buněk od sady hadiček.
3. Zvažte naplněný vak Cell Collection Bag. Zaznamenejte hmotnost.

   Určete hmotnost frakce cílových buněk odečtením hmotnosti prázdného vaku Cell Collection Bag od hmotnosti vaku Cell Collection Bag obsahujícím cílové buňky. Zaznamenejte hmotnost.
4. Důkladně promíchejte suspenzi cílových buněk otáčením vaku. Vezměte vhodné množství, např. 0,5 mL a uchovejte pro analýzu.
5. Pomocí tepelného svařovacího zařízení utěsněte hadičku nad zámkem luer vaku Negative Fraction Bag. Udělejte v hadičce tři hermetické uzávěry. Oddělte střední těsnění, abyste odpojili vak Negative Fraction Bag.
6. Odpojte stejným způsobem vak Buffer Waste Bag.
7. Odstraňte vaky Negative Fraction Bag a Buffer Waste Bag. Uchovávejte všechny vaky, dokud nebude dokončena konečná analýza všech buněk.



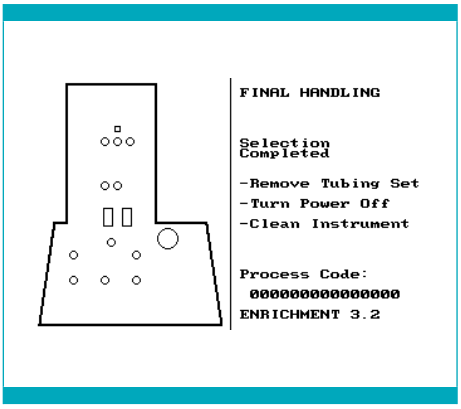
Obrázek 7.24: Odpojte vaky

Cílové buňky mohou být nyní zpracovány v souladu s klinickými protokoly.

Chcete-li přistoupit k dalším krokům, stiskněte **ENT**.

Vyjměte sadu hadiček a vypněte

Okno označuje Obrazovka 7.81.



Obrazovka 7.81: Vyjměte sadu hadiček a vypněte

1. Odstraňte sadu hadiček: Začněte ventily č. 6, 9, 10 a 11 a směrem nahoru uvolněte hadičku od senzoru kapaliny a od ventilů zatlačením na ventily. Uvolněte kolony z držáků kolon. Soupravu hadiček zlikvidujte jako biologicky nebezpečnou v souladu se standardními nemocničními postupy.
2. Vypněte přístroj CliniMACS Plus Instrument.
3. Vyčistěte nástroj podle pokynů pro čištění, viz bod „Čištění a dezinfekce“ v uživatelské příručce k přístroji CliniMACS Plus Instrument. Dodržujte standardní postupy pro ošetření infekčního materiálu.

Analýza buněk

DŮLEŽITÉ

- *Pufr CliniMACS PBS/EDTA Buffer nemusí být odstraněn před podáním separovaným cílových buněk, pokud objem nepřekročí 100 mL na transplantát při vhodných rychlostech infuze. Je třeba vzít v úvahu stav ledvin pacienta a účinky na krevní elektrolyty. Zejména u dětí je třeba odpovídajícím způsobem upravit rychlost infuze.*
- *Pokud objem frakce cílových buněk překročí 100 mL, musí být redukován vhodnými prostředky, např. centrifugací nebo výměnou pufru, na infuzní roztok schválený v zemi uživatele.*

⚠ UPOZORNĚNÍ

Riziko snížené kvality cílových buněk. Cílové buňky je třeba analyzovat a je třeba potvrdit, zda splňují uživatelovy požadavky, jinak může být narušena vhodnost cílových buněk pro klinické použití. Prověřte kvalitu a kvantitu cílových buněk s ohledem na zamýšlené použití.

Musí obsahovat následující parametry:

- celkový počet leukocytů
- životaschopnost a celkový počet cílových buněk
- čistota a obnova cílových buněk

Doporučuje se také stanovit celkový počet leukocytů a životaschopnost frakce necílových buněk. Seznam je příkladem a měly by být zahrnuty další testy na základě zamýšleného použití a klinických protokolů. Zaznamenejte údaje z analýzy.

7.4.4 DEPLETION 2.1

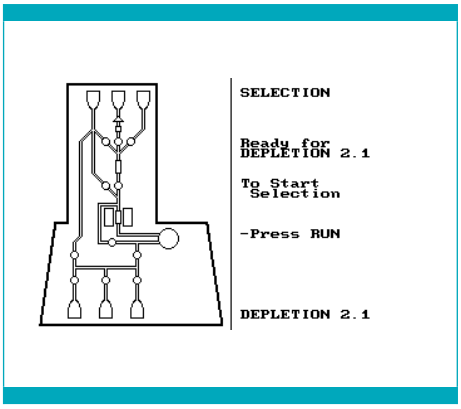
Po dokončení závěrečné kontroly je přístroj CliniMACS Plus Instrument připraven zahájit separaci. Okno označuje Obrazovka 7.82.

Chcete-li přistoupit k dalším krokům, stiskněte **RUN**.

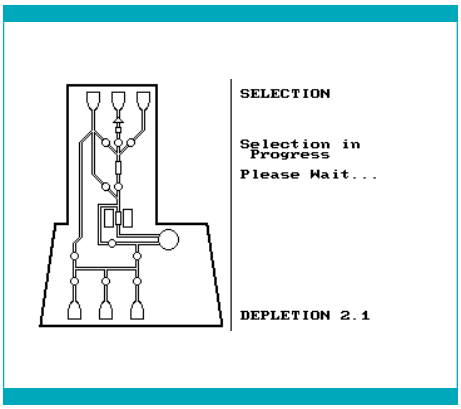
Po stisknutí **RUN** přístroj automaticky provede zvolenou separační proceduru.

V každé fázi operace se zobrazí obrazovka podobná Obrazovka 7.83, která ukazuje stav separačního postupu.

Indikátor polohy magnetu je zachycen jako dvě černá políčka vedle separační kolonu, když je magnet „ON“, to znamená, že byl posunut dopředu, aby se separační kolona zmagnetizovala. Pokud je indikátor polohy magnetu průhledný (např. Obrazovka 7.82), magnet je „OFF“, to znamená, že byl přesunut do zadní části přístroje. S vytaženým magnetem je separační kolona mimo magnetické pole a není magnetizována.



Obrazovka 7.82: Spusťte separaci



Obrazovka 7.83: Separace probíhá

Separační postup

Naplnění buňkami

Proces separace začíná naplněním předřazeného systémového filtru, aby se plnění systému dokončilo. Poté začíná separace označených buněk. Čerpadlo nasává obsah vaku Cell Collection Bag do sady hadiček. Magneticky značené buňky (necílové buňky) jsou zadrženy v separační koloně umístěné v magnetickém poli, zatímco neznačené buňky (necílové buňky) procházejí skrz a shromažďují se ve vaku Cell Collection Bag.

DŮLEŽITÉ

Na začátku separace je pufr čerpán směrem nahoru k vaku pro přípravu buněk, aby se naplnil předřazený systémový filtr. Několikrát jemně poklepejte na stranu filtru, abyste odstranili všechny bubliny, které by se mohly zachytit ve filtru.

Proplachování předřazeného systémového filtru

Poté, co byl vzorek buněk zcela naplněn od soupravy hadiček, předřazený systémový filtr se dvakrát propláchne pufrem, aby se snížila ztráta buněk ve filtru.

Poznámka:

- Pokud počet magneticky označených buněk (vypočítaný softwarem CliniMACS Plus) překročí vazebnou kapacitu separační kolony, separační program automaticky načte a oddělí vzorek buněk v menších podílech („postupné plnění“).
- Plnění se zastaví, když je dosaženo kapacity separační kolony a separační program postoupí k dalšímu kroku separace. Po dokončení posledního kroku (konečná eluce buněk) bude další část vzorku nanesena na kolonu.

Promývání kolony

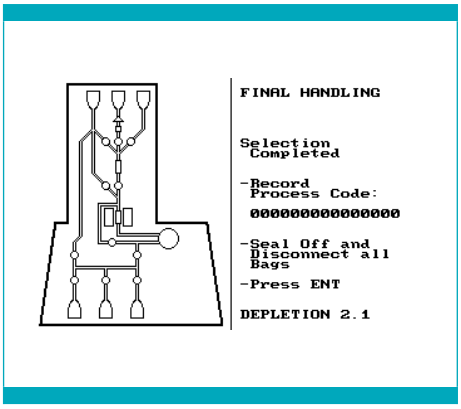
Předřazená kolona a separační kolona se důkladně promyjí, aby se odstranily všechny neznačené buňky. Promývací pufr se shromažďuje ve vaku Buffer Waste Bag.

Konečná eluce buněk

Magnet se přesune do polohy „OFF“. Nejprve jsou magneticky značené buňky eluovány do vaku Priming Waste Bag. Teprve po dokončení poslední fáze plnění se všechny magneticky označené buňky (necílové buňky) uvolní ze separační kolony a shromáždí se ve vaku Negative Fraction Bag, aby se snížil přenos s označenými buňkami v hadičce čerpadla.

Odpojte vaky a zaznamenejte procesní kód

Po dokončení běhu se v okně zobrazí Obrazovka 7.84.

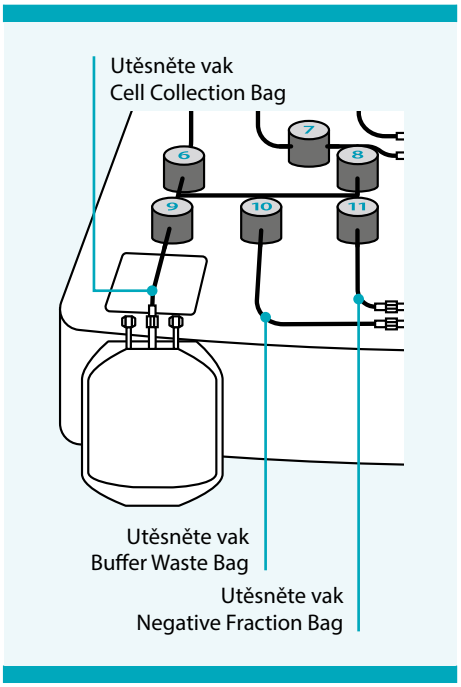


Obrazovka 7.84: Odpojte vaky a zaznamenejte procesní kód

1. Zaznamenejte si kód procesu.
2. Upněte nebo utěsněte hadičku nad zámkem luer spojujícím vak Cell Collection Bag se sadou hadiček (viz Obrázek 7.25).

   Udělejte tři hermetické uzávěry v hadici přímo pod ventilem č. 9. Opatrně odřízněte střední těsnění, abyste odpojili vak pro odběr buněk od sady hadiček.
3. Zvažte naplněný vak Cell Collection Bag. Zaznamenejte hmotnost.

   Určete hmotnost frakce cílových buněk odečtením hmotnosti prázdného vaku Cell Collection Bag od hmotnosti vaku Cell Collection Bag obsahujícím cílové buňky. Zaznamenejte hmotnost.
4. Důkladně promíchejte suspenzi cílových buněk otáčením vaku. Vezměte vhodné množství, např. 0,5 mL a uchovejte pro analýzu.
5. Pomocí tepelného svařovacího zařízení utěsněte hadičku nad zámkem luer vaku Negative Fraction Bag. Udělejte v hadičce tři hermetické uzávěry. Oddělte střední těsnění, abyste odpojili vak Negative Fraction Bag.
6. Odpojte stejným způsobem vak Buffer Waste Bag.
7. Odstraňte vaky Negative Fraction Bag a Buffer Waste Bag. Uchovávejte všechny vaky, dokud nebude dokončena konečná analýza všech buněk.



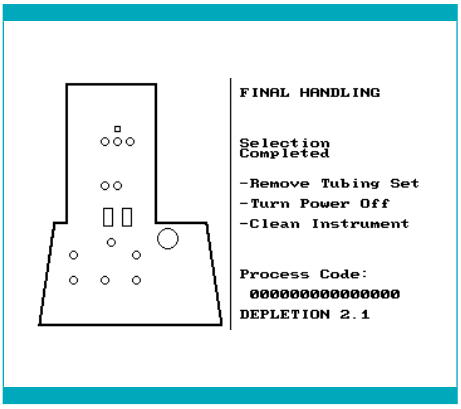
Obrázek 7.25: Odpojte vaky

Cílové buňky mohou být nyní zpracovány v souladu s klinickými protokoly.

Chcete-li přistoupit k dalším krokům, stiskněte **ENT**.

Vyjměte sadu hadiček a vypněte

Okno označuje Obrazovka 7.85.



Obrazovka 7.85: Vyjměte sadu hadiček a vypněte

1. Odstraňte sadu hadiček: Začněte ventily č. 6, 9 a 10 a směrem nahoru uvolněte hadičku od senzoru kapaliny a od ventilů zatlačením na ventily. Uvolněte kolonu z držáků kolon. Soupravu hadiček zlikvidujte jako biologicky nebezpečnou v souladu se standardními nemocničními postupy.
2. Vypněte přístroj CliniMACS Plus Instrument.
3. Vyčistěte nástroj podle pokynů pro čištění, viz bod „Čištění a dezinfekce“ v uživatelské příručce k přístroji CliniMACS Plus Instrument. Dodržujte standardní postupy pro ošetření infekčního materiálu.

Analýza buněk

DŮLEŽITÉ

- *Pufr CliniMACS PBS/EDTA Buffer nemusí být odstraněn před podáním separovaným cílových buněk, pokud objem nepřekročí 100 mL na transplantát při vhodných rychlostech infuze. Je třeba vzít v úvahu stav ledvin pacienta a účinky na krevní elektrolyty. Zejména u dětí je třeba odpovídajícím způsobem upravit rychlost infuze.*
- *Pokud objem frakce cílových buněk překročí 100 mL, musí být redukován vhodnými prostředky, např. centrifugací nebo výměnou pufru, na infuzní roztok schválený v zemi uživatele.*

⚠ UPOZORNĚNÍ

Riziko snížené kvality cílových buněk. Cílové buňky je třeba analyzovat a je třeba potvrdit, zda splňují uživatelovy požadavky, jinak může být narušena vhodnost cílových buněk pro klinické použití. Prověřte kvalitu a kvantitu cílových buněk s ohledem na zamýšlené použití.

Musí obsahovat následující parametry:

- celkový počet leukocytů
- životaschopnost a celkový počet cílových buněk
- účinnost deplece

Doporučuje se také stanovit celkový počet leukocytů a životaschopnost frakce necílových buněk. Seznam je příkladem a měly by být zahrnuty další testy na základě zamýšleného použití a klinických protokolů. Zaznamenejte údaje z analýzy.

7.4.5 DEPLETION 3.1

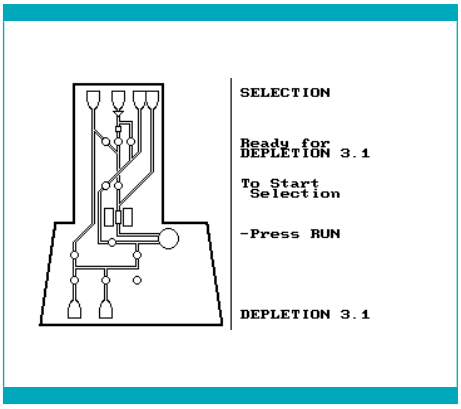
Po dokončení závěrečné kontroly je přístroj CliniMACS Plus Instrument připraven zahájit separaci. Okno označuje Obrazovka 7.86.

Chcete-li přistoupit k dalším krokům, stiskněte **RUN**.

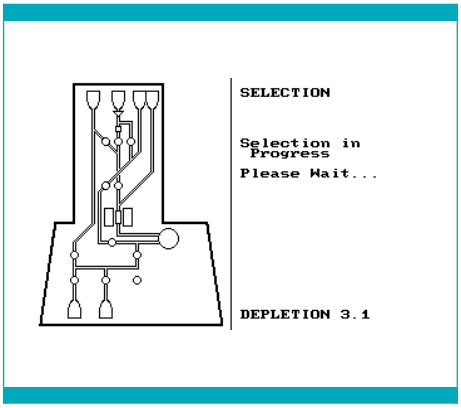
Po stisknutí **RUN** přístroj automaticky provede zvolenou separační proceduru.

V každé fázi operace se zobrazí obrazovka podobná Obrazovka 7.87, která ukazuje stav separačního postupu.

Indikátor polohy magnetu je zachycen jako dvě černá políčka vedle separační kolonu, když je magnet „ON“, to znamená, že byl posunut dopředu, aby se separační kolona zmagnetizovala. Pokud je indikátor polohy magnetu průhledný (např. Obrazovka 7.86), magnet je „OFF“, to znamená, že byl přesunut do zadní části přístroje. S vytaženým magnetem je separační kolona mimo magnetické pole a není magnetizována



Obrazovka 7.86: Spusťte separaci



Obrazovka 7.87: Separace probíhá

Separační postup

Deplece 3.1 je dvoustupňový depleční program, tj. buňky jsou na separační kolonu aplikovány dvakrát.

V první části procesu je většina značených buněk podrobena depleci (Staged Cell Loading [Bulk Loading Stage]). V druhé části procesu je několik málo zbývajících značených buněk podrobeno depleci (Staged Cell Loading [Bulk Loading Stage]).

DŮLEŽITÉ

Na začátku separace je pufr čerpán směrem nahoru k vaku pro přípravu buněk, aby se naplnil předřazený systémový filtr. Několikrát jemně poklepejte na stranu filtru, abyste odstranili všechny bubliny, které by se mohly zachytit ve filtru.

Poznámka: Pokud počet magneticky označených buněk (vypočítaný softwarem CliniMACS Plus) překročí vazebnou kapacitu separační kolony, separační program automaticky načte a oddělí vzorek buněk v menších podílech („postupné plnění“). Mezi každým stupněm plnění se separační kolona promyje, aby se odstranily všechny označené buňky. Označené buňky budou eluovány a drženy ve vaku Non-Target Cell Bag. Promývací pufr se shromažďuje ve vaku Reapplication Bag.

Staged Cell Loading (Bulk Loading Stage)

Proces separace začíná naplněním předřazeného systémového filtru, aby se plnění systému dokončilo. Poté začíná separace označených buněk. Čerpadlo nasává obsah vaku Cell Collection Bag do sady hadiček. Magneticky značené buňky (necílové buňky) jsou zadrženy v separační koloně umístěné v magnetickém poli, zatímco neznačené buňky (necílové buňky) procházejí skrz a shromažďují se ve vaku Reapplication Bag.

Sensitive Sample Loading (Sensitive Loading Stage)

Pro další depleci jsou buňky ve vaku Reapplication Bag znovu vkládány do separační kolony nižší rychlostí. Zatímco několik zbývajících označených buněk je nyní zadrženo na koloně, neznačené buňky (cílové buňky) protékají magnetickým polem a jsou shromažďovány ve vaku Cell Collection Bag.

Proplachování předřazeného systémového filtru a vaku Reapplication Bag

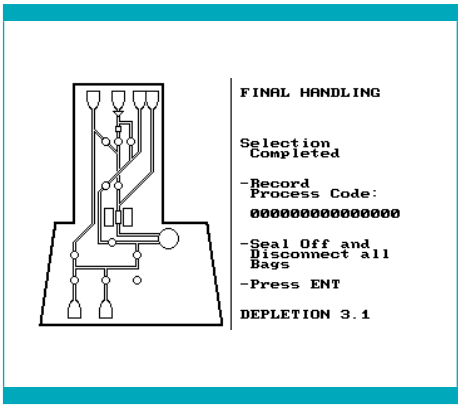
Poté, co vzorek buněk dokončí jak hromadnou, tak citlivou depleci, předřazený systémový filtr a vak Reapplication Bag budou dvakrát propláchnuty pufrem, aby se snížila ztráta buněk v systému.

Odstranění necílových buněk

Magnet se přesune do polohy „OFF“. Magneticky označené buňky (necílové buňky) se uvolní ze separační kolony a shromáždí se ve vaku Non-Target Cell Bag po každém stádiu naplnění.

Odpojte vaky a zaznamenejte procesní kód

Po dokončení běhu se v okně zobrazí Obrazovka 7.88.

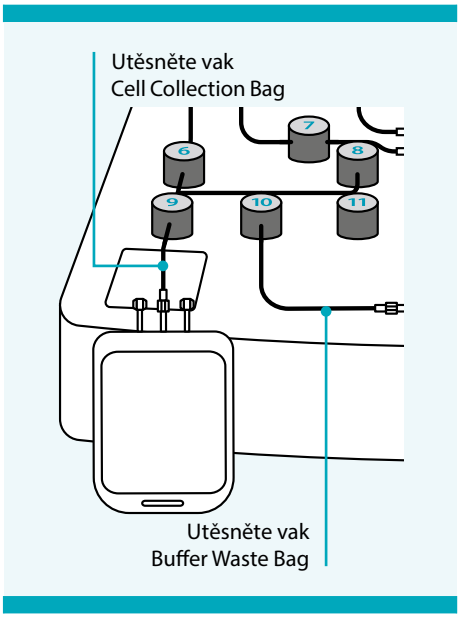


Obrazovka 7.88: Odpojte vaky a zaznamenejte procesní kód

1. Zaznamenejte si kód procesu.
2. Upněte nebo utěsněte hadičku nad zámkem luer spojujícím vak Cell Collection Bag se sadou hadiček (viz Obrázek 7.26).

   Udělejte tři hermetické uzávěry v hadici přímo pod ventilem č. 9. Opatrně odřízněte střední těsnění, abyste odpojili vak pro odběr buněk od sady hadiček.
3. Zvažte naplněný vak Cell Collection Bag. Zaznamenejte hmotnost.

   Určete hmotnost frakce cílových buněk odečtením hmotnosti prázdného vaku Cell Collection Bag od hmotnosti vaku Cell Collection Bag obsahujícím cílové buňky. Zaznamenejte hmotnost.
4. Důkladně promíchejte suspenzi cílových buněk otáčením vaku. Vezměte vhodné množství, např. 0,5 mL a uchovejte pro analýzu.
5. Pomocí tepelného svařovacího zařízení utěsněte hadičku nad zámkem luer vaku Buffer Waste Bag. Udělejte v hadičce tři hermetické uzávěry. Oddělte střední těsnění, abyste odpojili vak Buffer Waste Bag.
6. Odpojte stejným způsobem vak Non-Target Cell Bag.
7. Odstraňte vaky Non-Target Cell Bag a Buffer Waste Bag. Uchovávejte všechny vaky, dokud nebude dokončena konečná analýza všech buněk.



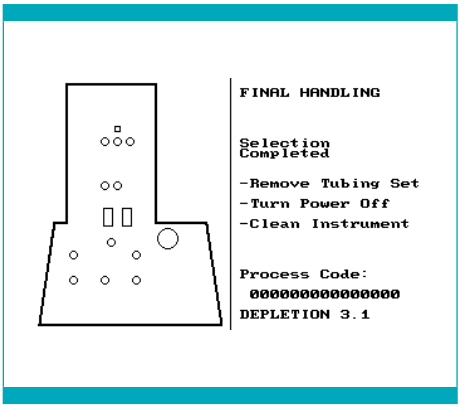
Obrázek 7.26: Odpojte vaky

Cílové buňky mohou být nyní zpracovány v souladu s klinickými protokoly.

Chcete-li přistoupit k dalším krokům, stiskněte **ENT**.

Vyjměte sadu hadiček a vypněte

Okno označuje Obrazovka 7.89.



Obrazovka 7.89: Vyjměte sadu hadiček a vypněte

1. Odstraňte sadu hadiček: Začněte ventily č. 6, 9 a 10 a směrem nahoru uvolněte hadičku od senzoru kapaliny a od ventilů zatlačením na ventily. Uvolněte kolonu z držáků kolon. Soupravu hadiček zlikvidujte jako biologicky nebezpečnou v souladu se standardními nemocničními postupy.
2. Vypněte přístroj CliniMACS Plus Instrument.
3. Vyčistěte nástroj podle pokynů pro čištění, viz bod „Čištění a dezinfekce“ v uživatelské příručce k přístroji CliniMACS Plus Instrument. Dodržujte standardní postupy pro ošetření infekčního materiálu.

Analýza buněk

DŮLEŽITÉ

- *Pufr CliniMACS PBS/EDTA Buffer nemusí být odstraněn před podáním separovaným cílových buněk, pokud objem nepřekročí 100 mL na transplantát při vhodných rychlostech infuze. Je třeba vzít v úvahu stav ledvin pacienta a účinky na krevní elektrolyty. Zejména u dětí je třeba odpovídajícím způsobem upravit rychlost infuze.*
- *Pokud objem frakce cílových buněk překročí 100 mL, musí být redukován vhodnými prostředky, např. centrifugací nebo výměnou pufru, na infuzní roztok schválený v zemi uživatele.*

⚠ UPOZORNĚNÍ

Riziko snížené kvality cílových buněk. Cílové buňky je třeba analyzovat a je třeba potvrdit, zda splňují uživatelovy požadavky, jinak může být narušena vhodnost cílových buněk pro klinické použití. Prověřte kvalitu a kvantitu cílových buněk s ohledem na zamýšlené použití.

Musí obsahovat následující parametry:

- celkový počet leukocytů
- životaschopnost a celkový počet cílových buněk
- účinnost deplece

Doporučuje se také stanovit celkový počet leukocytů a životaschopnost frakce necílových buněk. Seznam je příkladem a měly by být zahrnuty další testy na základě zamýšleného použití a klinických protokolů. Zaznamenejte údaje z analýzy.

8 Řešení problémů

Tato kapitola má sloužit jako odkaz, který poskytuje informace o možných neočekávaných událostech, které mohou nastat, a navrhuje vhodná nápravná opatření. Pro informace, které nejsou uvedeny v následující kapitole, kontaktujte co nejdříve technickou podporu Miltenyi Biotec Technical Support.

Poznámka: Uspořádání této kapitoly odpovídá skutečné sekvenci separace.

8.1 Miltenyi Biotec Technical Support

V případě vadné funkce přístroje nebo selhání procesu, které obsluha nemůže opravit (chybové zprávy), kontaktujte Miltenyi Biotec Technical Support:

+49 2204 8306-3803
technicalsupport@miltenyi.com

Kontaktní údaje ohledně lokální Miltenyi Biotec Technical Support naleznete na stránkách www.miltenyibiotec.com.

8.2 Příprava produktu leukaferézy

Přijatý vzorek se zředí

V ideálním případě se magnetické značení provádí ve zředěném produktu leukaferézy. Upravte produkt leukaferézy na konečné ředění přibližně 1:3. Pokud má přijatý vzorek naředění vyšší než 1:3 nebo pokud operátor přesně nezná koncentraci plazmy ve vzorku, přidejte do vzorku před přidáním činidla imunoglobulin (doporučená koncentrace imunoglobulinu ve značícím objemu: 1,5 mg/mL). Během značení je důležité mít ve vzorku určité množství imunoglobulinu, aby se minimalizovala nespecifická vazba reagencie.

Počet cílových buněk je v produktu leukaferézy nízký

Mobilizace kmenových buněk byla nedostatečná. Zkontrolujte analýzu produktu leukaferézy.

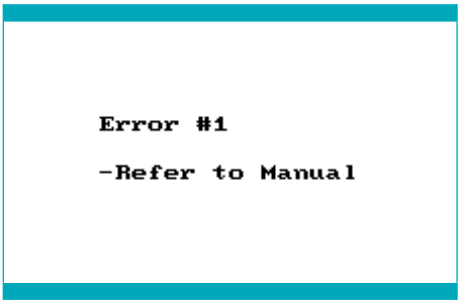
Slabá životaschopnost produktu leukaferézy

Produkt leukaferézy mohl být shromážděn, skladován nebo přepravován nesprávně. Pro zajištění lepší kvality vzorku by měla být příprava a separace produktu leukaferézy provedena bezprostředně po leukaferéze. Udržujte produkt leukaferézy při koncentraci leukocytů nižší než $0{,}2\times10^9$ na mL. V případě potřeby nařeďte produkt leukaferézy autologní plazmou. Při zahájení postupu značení a separace by produkt leukaferézy neměl být starší než 24 hodin. Pokud se má produkt leukaferézy uchovávat, např. přes noc, je třeba jej skladovat při kontrolované teplotě místnosti (+19 °C až +25 °C [+66 °F až +77 °F]).

8.3 Přístroj CliniMACS Plus Instrument a hadičkové soupravy CliniMACS

8.3.1 Chybová hlášení

V přístroji nebo v programu můžou nastat různé poruchy. Ty jsou označovány jako chyby a zobrazují se na obrazovce. Jedná se o interní chyby, které obsluha nemůže opravit. Poznamenejte si číslo chyby a kontaktujte technickou podporu společnosti Miltenyi Biotec Technical Support.



Obrazovka 8.1: Chybové hlášení č. 1

Jedno z možných chybových hlášení je znázorněno na obrázku vedle (Obrazovka 8.1).

Kromě chybových hlášení jsou poruchy, které může opravit obsluha, označeny jako „Varování“ (viz bod 8.4.1).

8.3.2 Vložení a plnění soupravy hadiček

- Ventil se neotevře, když operátor dostane pokyn k vložení hadičky do konkrétního ventilu

  Ventily jsou navrženy tak, aby po vložení hadičky správně fungovaly. Ručním stisknutím ventil otevřete. Během sekvence procvičování s ventilem ventil pečlivě sledujte. Pokud se ventil během sekvence cvičení s ventilem nestlačí, viz bod "Ventil se během sekvence cvičení s ventilem nestlačí".

- Ventil se během sekvence cvičení s ventilem nestlačí

  Ujistěte se, že je hadička správně vložena. Zkontrolujte, zda byly ventily důkladně vyčištěny. Každý ventil, který byl kontaminován kapalinou, musí být vyměněn. Kontaktujte technickou podporu Miltenyi Biotec Technical Support.

- Během plnění ze sady hadiček vytéká pufr

  Souprava hadiček je vadná. Vypněte přístroj CliniMACS Plus Instrument a restartujte plnění s novou nainstalovanou sadou hadiček a dostatečným množstvím nového pufru.

- Po naplnění se v sadě hadiček vyskytuje přebytečný vzduch

  Vak na pufr není správně propíchnutý. Použijte novou sadu hadiček a dostatečné množství nového pufru a restartujte separaci CliniMACS Plus. Ujistěte se, že přepážka vaku na pufr je řádně propíchnutá.

- Neočekávaný objem pufru ve vacích po naplnění. Po naplnění by kapalina měla být pouze ve vaku Priming Waste Bag a vaku Buffer Waste Bag.

  Souprava hadiček není správně namontována. Kapalina může unikat za ventily, pokud sada hadiček není správně nainstalována nebo ventily nefungují správně. Vyjměte sadu hadiček a nahraďte ji novou. Znovu spusťte proces plnění s dostatečným množstvím nového pufru. Pokud sada hadiček není správně vložena, může dojít ke špatnému provedení separace CliniMACS Plus.

- Motor čerpadla se zastaví během plnění

  Hadičky čerpadla nebyly správně zasunuty. Stisknutím **STOP** zastavíte plnění a znovu napájení „VYPNĚTE“ a poté „ZAPNĚTE“. Během instalačního postupu sevřete hadičku pufru uzavíracími kleštěmi, opravte polohu hadičky pumpy a odstraňte uzavírací kleště, než znovu spustíte sekvenci plnění.

8.4 Automatická separace buněk

8.4.1 Varování

Na rozdíl od chybových zpráv (viz bod 8.3.1) se na obrazovce zobrazí varování, když vnitřní kontrolní systém přístroje CliniMACS Plus Instrument rozpozná poruchu, kterou může opravit obsluha. Obvykle se objeví varování v kombinaci se zvukem („pípnutí“). Pokud se během separace CliniMACS Plus objeví varování, pokračujte v separaci buněk podle pokynů na obrazovce. Obecně řečeno, varování se objeví v případě, že se stiskne **STOP**, když se otevřou dvířka čerpadla, když se čerpadlo zastaví nebo když senzor kapaliny detekuje chybu.

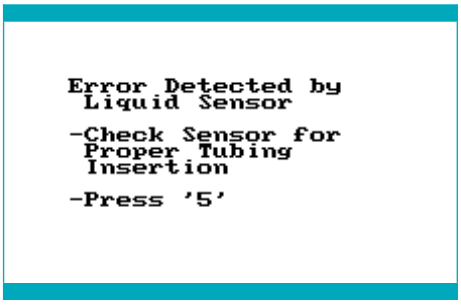
Protože během různých separačních programů mohou nastat různé druhy neočekávaných událostí, je následující část rozdělena podle toho.

8.4.2 Neočekávané události: Všechny separační programy

- Chyba detekované senzorem kapaliny

  Varování č. 1 se objeví během počáteční fáze procesu plnění buněk, pokud senzor kapaliny není schopen detekovat kapalinu v hadičce. Protože je předřazený systémový filtr propláchnut pufrem před naplněním buňkami, musí být v tomto okamžiku v hadičce přítomna kapalina.

  Zkontrolujte následující body:



Obrázek 8.1: Varování č. 1

1. Byla hadička zasunuta správně? Do senzoru kapaliny? Pokud ne, proveďte to.
2. Je hadička naplněna pufrem? Pokud ne, viz bod 3.
3. Pokud hadička nebude naplněna pufrem, zkontrolujte, zda hadičky nejsou zkroucené a nebrání průtoku pufru směrem nahoru do předřazeného systémového filtru a vaku Cell Preparation Bag. Upravte polohu hadičkové sady. V případě potřeby zvyšte nebo snižte držáky na vak pomocí svorek držáku na vak. Upravte polohu hadičky ve ventilech. Chcete-li změnit polohu hadičky, otevřete ventil ručním stisknutím tlačítka. Ujistěte se, že hadička není zalomená, zkroucená nebo napjatá.
4. Byla správně propíchnut vak Cell Preparation Bag? Ujistěte se, že hrot předřazeného systémového filtru pronikl přes přepážku portu vaku Cell Preparation Bag.
5. Pokud sada hadiček nebyla zcela naplněna pufrem: Pronikl hrot pufru sady hadiček do vaku na pufr? Oprava viz "Po naplnění se v sadě hadiček vyskytuje přebytečný vzduch" v bodě 8.3.2.

Po nápravném opatření pokračujte v probíhající separaci a stiskněte **5**. Pokud se varování č. 1 objeví znovu poté, co byla vyloučena každá z výše uvedených možných příčin, může být vadný senzor kapaliny. Kontaktujte technickou podporu Miltenyi Biotec Technical Support.

Buňky se přesunou do nesprávné části sady hadiček. Kapalina uniká okolo ventilu(ů)

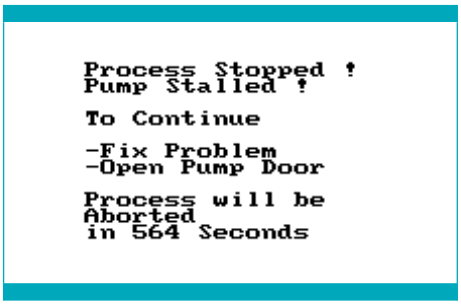
- Souprava hadiček nebyla správně zasunuta. Pokud běh přístroje pokračuje dále, stiskněte **STOP** a sevřete vedení hadiček pojistnými kleštěmi. Nastavte hadičku tak, že nejprve stisknete příslušný ventil. Odstraňte uzavírací kleště a stiskněte **RUN** pro obnovení separace. Pokud do 600 sekund nestisknete tlačítko **RUN**, separace buněk bude přerušena.
- Ventil nepracuje řádně. Stiskněte **STOP**. Sevřete vedení hadiček uzavíracími kleštěmi. Ventil ručně několikrát stlačte, aby se zaseknutý ventil uvolnil. Odstraňte uzavírací kleště a stiskněte **RUN** pro pokračování. Pokud do 600 sekund nestisknete tlačítko **RUN**, separace buněk bude přerušena. Pokud uživatel nemůže ventil uvolnit, kontaktujte technickou podporu Miltenyi Biotec Technical Support.
- Použit chybný program softwaru. Zkontrolujte název aktuálně použitého softwaru na displeji. Přerušte běh stisknutím tlačítka **STOP** a okamžitě kontaktujte technickou podporu Miltenyi Biotec Technical Support.

Magnet se nepohybuje

Pohon magnetu nefunguje. Došlo k poruše pohonu magnetu. Zobrazí se chybová zpráva (viz bod 8.3.1). Poznamenejte si číslo chybové zprávy a kontaktujte technickou podporu společnosti Miltenyi Biotec Technical Support.

Motor čerpadla se zastaví během separace buněk

Hadičky čerpadla nebyly správně zasunuty, proto mohlo dojít k tomu, že se čerpadlo nedokáže otáčet. V tomto případě se objeví v okně obrazovky varování č. 2. Obsluha pak má 600 sekund na opravu polohy hadičky čerpadla.



Obrazovka 8.2: Varování č. 2

1. Opatrně z čerpadla vyjměte hadičku čerpadla.
2. Ujistěte se, že hadička čerpadla nebyla poškozena nesprávným vložením. Pokud hadičky pumpy netěsní, upněte hadičky nad a pod separační kolonou, abyste zachovali buňky zadržené na koloně a kontaktujte technickou podporu Miltenyi Biotec Technical Support.
3. Pokud hadička čerpadla nebyla poškozena, lze ji znovu vložit do tělesa čerpadla.
4. Stiskněte **RUN** pro restart separace do 600 sekund, jinak bude separace přerušena.

Pokud je hadička čerpadla plochá a zborcená, svědčí to o ucpané koloně. V tomto případě kontaktujte Miltenyi Biotec Technical Support.

Vkládání vzorků se nezastaví, ačkoliv je prázdný vak Cell Preparation Bag a předřazený systémový filtr.

Senzor kapaliny nefunguje správně, např. protože je povrch hadičky v kapalinovém senzoru mokrý. Stisknutím **STOP** přerušíte separaci. Vyjměte hadičky ze senzoru kapaliny. Osušte hadičku a kontaktní plochu papírovým ručníkem nebo absorpčním materiálem. Vyměňte hadičku ve snímači kapaliny a stiskněte **RUN**. Nepřerušujte sekvenci na více než 600 sekund, jinak bude separace buněk ukončena.

Pokud není možné aktivovat senzor kapaliny tímto způsobem, stiskněte **STOP**, poté **2** a potvrďte pomocí **ENT** pro přeskočení načítání vzorku a pokračování separace.

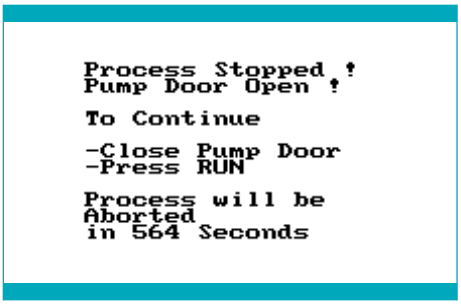
8.4.3 Neočekávané události: Pouze program obohacení

Běh je přerušen před dokončením programu buněčné separace

- Dvířka čerpadla jsou otevřená: Kvůli bezpečnosti se probíhající separace během chodu přístroje automaticky zastaví, jakmile se otevřou dvířka čerpadla. V okně obrazovky se objeví varování č. 5.

  Uzavřete dvířka čerpadla a stiskněte **RUN**.

  Pokud, jako v tomto případě, nestisknete **RUN** do 600 sekund, separace bude přerušena a separace buněk nebude dokončena. Získejte co nejvíce vzorku ze sady hadiček spuštěním NOUZOVÉHO PROGRAMU.



Obrazovka 8.3: Varování č. 5

- Výpadek napájení: Výpadek napájení má za následek ukončení separace CliniMACS Plus. Po obnovení napájení nebude separace buněk dokončena. Získejte co nejvíce vzorku ze sady hadiček spuštěním NOUZOVÉHO PROGRAMU.

8.4.4 Neočekávané události: CD34 SELECTION 1/2

Naplnění se zastavilo před nanesením kompletního vzorku na kolony

Předřazený systémový filtr je ucpaný kvůli velkému množství buněčných zbytků nebo kvůli neúplnému naplnění filtru. V důsledku pokračujícího čerpání se vytvořilo vakuum, které vedlo k vytváření vzduchových bublin aktivujících snímač kapaliny. Proto se v separačním procesu pokračovalo s promýváním kolony předtím, než mohl být naplněn veškerý vzorek. Jakmile se sekvence vkládání zastaví, není možné restartovat zavádění vzorku.

Nechte přístroj CliniMACS Plus Instrument dokončit separační program. Nepřerušujte aktuální běh, mohlo by dojít ke zbytečné ztrátě buněk. Po dokončení separačního postupu přefiltrujte zbývající vzorek 200 µm vřazeným krevním filtrem a přeneste vzorek do nového přenosového vaku. Ihned proveďte druhou separaci s novou sadou hadiček a dostatečným množstvím nového pufru.

Hadičky pumpy se zhroutily a/nebo se v hadičkách pod předřazenou kolonou během plnění buněk objevilo nadměrné množství vzduchu

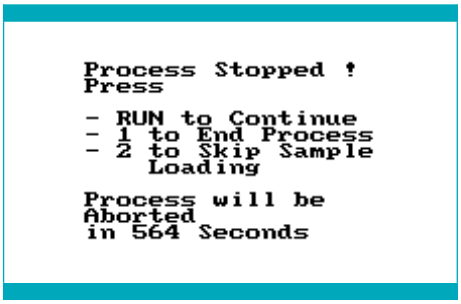
Předřazená kolona je ucpaná kvůli velkému množství odpadní buněčné hmoty ve vaku Cell Preparation Bag. Je nutné ručně přeskočit naplnění zbývajícího vzorku a pokračovat v separaci s buňkami, které již byly naplněny do systému.

1. Stisknutím **STOP** přerušíte plnění buňkami. Objeví varování č. 3.
2. Stisknutím **2** přeskočíte proces plnění buňkami.

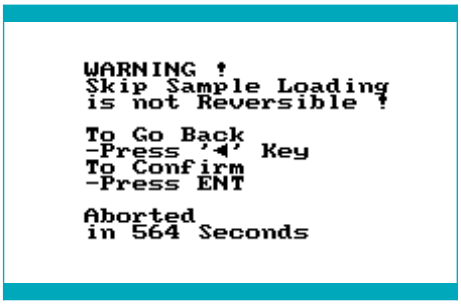
   Varování č. 4 se objeví a dá operátorovi příležitost potvrdit nebo změnit rozhodnutí, protože přeskočení vkládání vzorku není vratné.
3. Stiskněte **ENT** a separační program zastaví nanášení vzorku a bude pokračovat v promývání kolony.

Upněte hadičku pod předřazeným systémovým filtrem, abyste zabránili úniku buněk z vaku Cell Preparation Bag do sady hadiček. Po dokončení separačního postupu přefiltrujte zbývající vzorek 200 µm vřazeným krevním filtrem a přeneste vzorek do nového přenosového vaku.

Ihned proveďte druhou separaci s novou sadou hadiček a dostatečným množstvím nového pufru.



Obrazovka 8.4: Varování č. 3



Obrazovka 8.5: Varování č. 4

8.4.5 Neočekávané události: ENRICHMENT 1.1

- Naplnění se zastavilo před nanesením kompletního vzorku na kolony

Předřazený systémový filtr je ucpaný kvůli velkému množství buněčných zbytků nebo kvůli neúplnému vyplnění filtru. V důsledku pokračujícího čerpání se vytvořilo vakuum, které vedlo k vytváření vzduchových bublin. Ty aktivovaly senzor kapaliny a proces separace pokračoval přímo v konečné fázi nanášení vzorku. Po dokončení separace může část vzorku zůstat ve vaku Cell Preparation Bag.

Nechte přístroj CliniMACS Plus Instrument dokončit separační program. Nepřerušujte aktuální běh, mohlo by dojít ke zbytečné ztrátě buněk.

Určete celkový počet buněk, procento cílových buněk a zbývající objem vkládání vzorku ve vaku Cell Preparation Bag a zadejte skutečné parametry vzorku během nastavování přístroje (KROK 2). Po dokončení separačního postupu přefiltrujte zbývající vzorek 200 µm vřazeným krevním filtrem a přeneste vzorek do nového přenosového vaku. Ihned proveďte druhou separaci s novou sadou hadiček a dostatečným množstvím nového pufru.

- Byly zadány nesprávné hodnoty parametrů vzorku

  Zadaný objem vzorku byl nižší než skutečný objem v připojeném vaku Cell Preparation Bag. Jakmile se sekvence vkládání zastaví, není možné restartovat vkládání vzorku.

  Nechte přístroj CliniMACS Plus Instrument dokončit separační program. Nepřerušujte aktuální běh, mohlo by dojít ke zbytečné ztrátě buněk.

  Určete celkový počet buněk, procento cílových buněk a zbývající objem vkládání vzorku ve vaku Cell Preparation Bag a zadejte skutečné parametry vzorku během nastavování přístroje (KROK 2). Zpracujete zbývající vzorek s novou sadou hadiček, novým předřazeným systémovým filtrem a dostatečným množstvím nového pufru.

- Motor čerpadla se zastaví během eluce cílových buněk do vaku Cell Collection Bag

  Uzavírací kleště vedle vaku Cell Collection Bag nejsou otevřeny během eluční sekvence. Proto je dráha do vaku Cell Collection Bag ucpaná.

  Stiskněte **STOP** a otevřete uzavírací kleště vedle vaku Cell Preparation Bag. Otevřete dvířka čerpadla a zkontrolujte, zda je hadička čerpadla správně vložena. Zavřete dvířka čerpadla a stiskněte **RUN** pro restartování eluční sekvence do 600 sekund.

8.4.6 Neočekávané události: ENRICHMENT 3.2

- Naplnění se zastavilo před nanesením kompletního vzorku na kolony

  Předřazený systémový filtr je ucpaný kvůli velkému množství buněčných zbytků nebo kvůli neúplnému naplnění filtru. V důsledku pokračujícího čerpání se vytvořilo vakuum, které vedlo k vytváření vzduchových bublin. Ty aktivovaly senzor kapaliny a proces separace pokračoval s promýváním kolony předtím, než byl naplněn veškerý vzorek. Jakmile se sekvence vkládání zastaví, není možné restartovat zavádění vzorku.

  Nechte přístroj CliniMACS Plus Instrument dokončit separační program. Nepřerušujte aktuální běh, mohlo by dojít ke zbytečné ztrátě buněk.

  Po dokončení separačního postupu přefiltrujte zbývající vzorek 200 µm vřazeným krevním filtrem a přeneste vzorek do nového přenosového vaku. Ihned proveďte druhou separaci s novou sadou hadiček a dostatečným množstvím nového pufru.

- Motor čerpadla se zastaví během eluce cílových buněk do vaku Cell Collection Bag

  Uzavírací kleště vedle vaku Cell Collection Bag nejsou otevřeny během eluční sekvence. Proto je dráha do vaku Cell Collection Bag ucpaná.

  Stiskněte **STOP** a otevřete uzavírací kleště vedle vaku Cell Preparation Bag. Otevřete dvířka čerpadla a zkontrolujte, zda je hadička čerpadla správně vložena. Zavřete dvířka čerpadla a stiskněte **RUN** pro restartování eluční sekvence do 600 sekund.

8.4.7 Nouzový program (pro použití pouze z programy obohacování)

Pokud je z jakéhokoli důvodu běh nevratně ukončen dříve, než jsou cílové buňky eluovány ze separační kolony, lze spustit nouzový program k eluci buněk ze separační kolony. Tento program byl navržen pouze pro použití se všemi obohacovacími programy společně se sadou hadiček CliniMACS Tubing Set (REF 161-01) nebo sadou hadiček CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01).

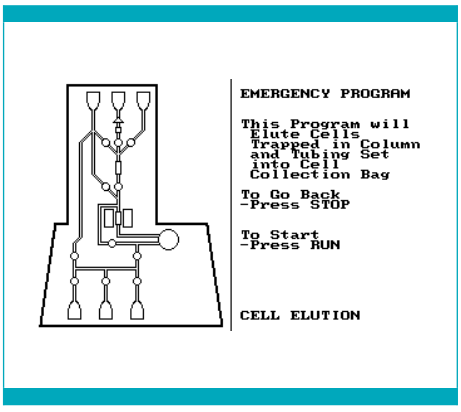
Nouzový program se nesmí používat s žádnými programy deplece.

Poznámka: Nouzový program eluuje přibližně 75 mL tekutiny. Ujistěte se, že je jeden vak Cell Collection Bag již připojen k soupravě hadiček.

1. Pro potvrzení, že separační kolona není zmagnetizovaná, vypněte přístroj, počkejte 5 sekund a poté přístroj znovu zapněte. Magnet bude vytažen z magnetické separační jednotky (viz bod „Popis“ v uživatelské příručce k přístroji CliniMACS Plus Instrument). Zkontrolujte to přiložením malého magnetizovatelného předmětu k magnetické separační jednotce. Pokud byl magnete vytažen nebo přetrvává-li výpadek napájení, kontaktujte technickou podporu Miltenyi Biotec Technical Support.
2. Počkejte, dokud se v okně nezobrazí hlavní obrazovka (viz bod „Instalace“ v uživatelské příručce k přístroji CliniMACS Plus Instrument).

   K vyvolání nouzového programu klepněte na **4**. Okno označuje Obrazovka 8.6.
3. Chcete-li pokračovat v eluci zachycených buněk, stiskněte **RUN**.

   Poznámka: Chcete-li opustit nouzový program bez zahájení eluce zachycených buněk, stiskněte **STOP**.



Obrazovka 8.6: Nouzový program

4. Přeneste eluované buňky shromážděné v vaku Cell Collection Bag do nového 600 mL přenosového vaku. Nakonec spojte zbývající buňky ve vaku Cell Preparation Bag s buňkami eluovanými nouzovým programem. Spusťte nový separační postup s novou sadou hadiček a dostatečným množstvím nového pufru.

8.4.8 Neočekávané události: DEPLETION 2.1

■ Cílové buňky se nedostanou do vaku Cell Collection Bag

Pumpa nemůže načíst produkt ze vaku Cell Preparation Bag, protože svorka vedle vaku Cell Collection Bag není během sekvence vkládání buněk otevřena. Stiskněte **STOP** a otevřete svorku vedle vaku Cell Preparation Bag. V procesu deplece pokračujte stisknutím **RUN**.

Nechte přístroj CliniMACS Plus Instrument dokončit separační program. Nepřerušujte aktuální běh, mohlo by dojít ke zbytečné ztrátě buněk. Pokud po dokončení procesu deplece zůstane část produktu ve vaku Cell Preparation Bag, zpracujte zbývající buňky pomocí nové sady hadiček, nového předřazeného systémového filtru a dostatečného množství nového pufru.

Určete celkový počet buněk, procento značených buněk a objem naplnění vzorkem a zadejte skutečné parametry vzorku během nastavování přístroje (KROK 2).

■ Naplnění se zastavilo před nanesením kompletního vzorku na kolony

Vzduchové bubliny ze vzorku a/nebo předřazeného systémového filtru aktivovaly senzor kapaliny předtím, než byl vložen veškerý vzorek. Přerušte aktuální běh a zkontrolujte celkový počet buněk a účinnost deplece buněk ve vaku Cell Collection Bag. V případě potřeby zpracujete zbývající vzorek s novou sadou hadiček, novým předřazeným systémovým filtrem a dostatečným množstvím nového pufru.

Určete celkový počet buněk, procento značených buněk a objem naplnění vzorkem a zadejte skutečné parametry vzorku během nastavování přístroje (KROK 2).

8.4.9 Neočekávané události: DEPLETION 3.1

■ Vkládání se zastavilo během Staged Cell Loading před vložením kompletního vzorku na kolony

- Předřazený systémový filtr zasunut nesprávným směrem. Funkce kapénkové komory proto není k dispozici a vzduchové bubliny mohou procházet senzorem kapaliny přímo a způsobit ukončení plnění vzorkem před nanesením úplného vzorku. Přístroj pokračuje v procesu deplece přímým zahájením dalšího kroku. Jakmile se sekvence vkládání zastaví, není možné restartovat vkládání vzorku.

- Předřazený systémový filtr je ucpaný kvůli velkému množství buněčných zbytků nebo kvůli neúplnému vyplnění filtru. V důsledku pokračujícího čerpání se vytvořilo vakuum, které vedlo k vytváření vzduchových bublin. Ty aktivovaly senzor kapaliny a proces separace pokračoval přímo v konečné fázi nanášení vzorku. Po dokončení separace může část vzorku zůstat ve vaku Cell Preparation Bag.

Přerušte aktuální běh a spojte obsah vaku Reapplication Bag a vaku Cell Preparation Bag. Zpracujete zbývající buňky s novou sadou hadiček, novým předřazeným systémovým filtrem a dostatečným množstvím nového pufru.

Vkládání zastaveno během Sensitive Sample Loading [Sensitive Loading Stage])

Vak Reapplication Bag visí níže než vak Cell Preparation Bag. Během citlivého kroku vkládání se vak Cell Preparation Bag vyprázdní, než se zcela vloží objem vaku Reapplication Bag. Je proto možné, že vzduchová bublina aktivuje senzor kapaliny před úplným vložením vzorku z vaku Reapplication Bag po dokončení procesu deplece. Jakmile se sekvence vkládání zastaví, není možné restartovat vkládání vzorku.

Nechte přístroj CliniMACS Plus Instrument dokončit separační program. Nepřerušujte aktuální běh, mohlo by dojít ke zbytečné ztrátě buněk. Zpracujete zbývající vzorek s novou sadou hadiček, předřazeným systémovým filtrem a dostatečným množstvím nového pufru.

Určete celkový počet buněk, procento značených buněk a objem naplnění vzorkem a zadejte skutečné parametry vzorku během nastavování přístroje (KROK 2). Zvažte povinnou potřebu tří velkých držáků na vak pro program DEPLETION 3.1 a příslušné výšky vaků najdete v návodu k instalaci (viz bod 7.3.3).

Cílové buňky (neoznačené buňky) nedosáhnou vaku Reapplication Bag během Staged Cell Loading Bulk (Loading Stage)

Do ventilu č. 3 je vložena špatná hadička (pravá větev hadičky vaku Reapplication Bag místo levé větve (tvarovka Y) hadičky). Stiskněte **STOP** a odstraňte nesprávnou hadičku z ventilu č. 3. Ručně vložte správnou hadičku (levá větev hadičky vaku Reapplication Bag) do ventilu č. 3, jak je popsáno v návodu k instalaci. Stisknutím **RUN** pokračujte v proceduře deplece do 600 sekund.

Nechte přístroj CliniMACS Plus Instrument dokončit separační program. Nepřerušujte aktuální běh, mohlo by dojít ke zbytečné ztrátě buněk. Zkontrolujte účinnost deplece cílové frakce ve vaku Cell Collection Bag. Pokud účinnost deplece není dostatečná, opakujte postup vyčerpání s novou sadou hadiček, novým předřazeným systémovým filtrem a dostatečným množstvím nového pufru.

Určete celkový počet buněk, procento značených buněk a objem naplnění vzorkem a zadejte skutečné hodnoty parametrů vzorku během nastavování přístroje (KROK 2) a spusťte novou depleci.

■ Buňky proudí do pufrovacího vaku během kroků gravimetrického proplachování

Vak na pufr visí příliš nízko (nižší než vak Cell Preparation Bag). Stiskněte **STOP** a nastavte závěs vaku na pufr do správné polohy. Ujistěte se, že jsou nainstalovány držáky na vak pro program DEPLETION 3.1 a příslušné výšky vaků najdete v návodu k instalaci (viz bod 7.3.3).

- Pokud buňky nedosáhly vaku s pufrem, stačí ručně otevřít ventily č. 1 a 2, aby se umožnilo krátké zpětné propláchnutí buněk do vaku Cell Preparation Bag. Poté, co je hadička vaku s pufrem opět čistá, uzavřete ventily č. 1 a 2 a stisknutím **RUN** pokračujte v proceduře deplece do 600 sekund.
- Pokud buňky již dosáhly vaku na pufr, vyměňte vak na pufr, ručně otevřete ventily č. 1 a 2 pro krátké propláchnutí hadičky vaku s pufrem a stisknutím **RUN** pokračujte v proceduře deplece do 600 sekund. V případě potřeby zpracujte zbývající vzorek ve vaku s pufrem (pokud objem překročí 300 mL, přeneste vzorek nejprve do centrifugovatelného vaku pro snížení objemu) pomocí nové sady hadiček, nového filtru před systémem a dostatečného množství nového pufru.

■ Motor čerpadla se zastaví během eluce cílových buněk do vaku Non-Target Cell Bag

- Po testu neporušenosti nebyly odstraněny uzavírací kleště. Stiskněte STOP a uzavírací kleště odstraňte. Otevřete dvířka čerpadla a zkontrolujte, zda je hadička čerpadla vložena správně. Zavřete dvířka čerpadla a stiskněte **RUN** pro restartování eluční sekvence do 600 sekund.
- Do ventilu č. 3 je vložena špatná hadička (hadička vaku Non-Target Cell Bag místo levé větve (tvarovka Y) hadičky vaku Reapplication Bag). Stiskněte **STOP** a odstraňte hadičku vaku Non-Target Cell Bag z ventilu č. 3. Ručně vložte správnou hadičku (levá větev hadičky vaku Reapplication Bag) do ventilu č. 3, jak je popsáno v návodu k instalaci. Stiskněte **RUN** pro restartování eluční sekvence do 600 sekund.

8.5 Účinnost separace buněk

8.5.1 Neočekávané události: Pouze program obohacení

■ Výtěžek cílových buněk je nízký

- Cílové buňky byly špatně označeny reagencií:
  - Doba použitelnosti reagencie vypršela. Zkontrolujte datum použitelnosti. Nepoužívejte reagencii po datu použitelnosti.
  - Reagencie nebyla řádně uskladněna. Zkontrolujte teplotu skladováni. Reagencii, která byla nevhodně skladována, nepoužívejte (viz návod k použití reagencie).

  - Nebyl dodržen doporučený postup značení. Viz bod přípravy vzorku a postupu separace v uživatelské příručce.
- Během kroků přípravy došlo ke ztrátě buněk.
  - Buňky byly odstraněny se supernatantem do vaku Plasma Waste Bag a vaků Wash Waste Bag v důsledku neúplné sedimentace nebo příliš brzké resuspenze buněk, např. když byl vak vyjmut z centrifugy. Porovnejte obsah leukocytů v neznačeném buněčném produktu a ve značeném buněčném produktu. Zkontrolujte správné nastavení centrifugace. Určete počty buněk ze všech odpadních vaků.
  - Pufr neobsahoval HSA. Doplňte pufr HSA na konečnou koncentraci 0,5 % (hm./obj.), (viz bod „Potřebné materiály CliniMACS“ příslušné aplikace).
  - Nastavení centrifugace bylo suboptimální. Zkontrolujte nastavení centrifugace.
  - Nevyváženost odstředivky nebo použití brzdy nebo nesymetrické zatížení odstředivky.
- Analýza byla nesprávná.
  - Došlo k chybě při odběru vzorku. Zkontrolujte buněčnou suspenzi, zda neobsahuje shluky nebo usazené buňky. Potvrďte, že byly odebrány reprezentativní vzorky a opakujte analýzu.
  - Došlo k chybě při barvení. Zkontrolujte reagencie pro cytometrii. Opakujte barvení.
  - Nesprávné nastavení průtokového cytometru. Zkontrolujte nastavení přístroje.

■ Čistota cílových buněk je nízká.

- Buněčný produkt byl skladován nevhodně. Příprava a separace produktu leukaferézy by měla být provedena bezprostředně po leukaferéze. Udržujte buněčný produkt při koncentraci leukocytů nižší než $0{,}2\times10^9$ na mL. V případě potřeby nařeďte buněčný produkt autologní plazmou. Při zahájení postupu označování a separace by buněčný produkt neměl být starší než 24 hodin. Pokud se má buněčný produkt uchovávat, např. přes noc, je třeba jej skladovat při kontrolované teplotě místnosti (+19 °C až +25 °C [+66 °F až +77 °F]).
- Nebyl dodržen protokol magnetického značení (např. nesprávné objemy během magnetického značení). Postupujte podle pokynů pro magnetické označení (viz KROK 1 v bodě příslušné aplikace). Pro účely odstraňování problémů určete podskupiny leukocytů (B buňky, T buňky, monocyty, granulocyty i krevní destičky), které kontaminují frakci cílových buněk, a požádejte o radu technickou podporu Miltenyi Biotec Technical Support.
- Vysoký počet granulocytů kontaminoval výchozí produkt (suboptimální nastavení aferézy). Umírající granulocyty se pak nespecificky navážou na reagencii CliniMACS, což může vést ke snížení čistoty cílových buněk.

- Došlo k vadné funkci ventilu. Eluovaná frakce cílových buněk byla kontaminována částí necílové frakce nebo odpadní frakce pufru. Zkontrolujte umístění hadiček ve ventilech, abyste zajistili správné fungování. Posuďte obsah cílových buněk ve frakci necílových buněk a odpadu pufru. Je-li to nutné, spojte cílovou a necílovou buněčnou frakci, zredukujte na vhodný objem a opakujte separaci s novou sadou hadiček a dostatečným množstvím nového pufru.

■ Nespecifická retence mrtvých buněk z buněčného produktu nebo vysoké nespecifické ztráty buněk během postupu

- Pufr neobsahuje HSA. Doplňte pufr HSA na konečnou koncentraci 0,5 % (hm./obj.), (viz bod „Potřebné materiály CliniMACS“ příslušné aplikace).
- Buněčný produkt mohl být skladován nevhodně. Příprava a separace produktu leukaferézy by měla být provedena bezprostředně po leukaferéze. Udržujte buněčný produkt při koncentraci leukocytů nižší než $0{,}2\times10^9$ na mL. V případě potřeby nařeďte leukaferézu autologní plazmou. Při zahájení postupu označování a separace by buněčný produkt neměl být starší než 24 hodin. Pokud se má buněčný produkt uchovávat, např. přes noc, je třeba jej skladovat při kontrolované teplotě místnosti (+19 °C až +25 °C [+66 °F až +77 °F]).
- Neúplné vložení vzorku kvůli ucpání separační kolony, předřazeného systémového filtru nebo předřazené kolony. Zkontrolujte celkový počet buněk a účinnost vyčerpání zbývajících buněk.

8.5.2 Neočekávané události: CD34 SELECTION 1/2 a ENRICHMENT 1.1

■ Čistota cílových buněk je nízká

Eluce ze separační kolony byla neúplná.

- Došlo k přerušení separačního programu. Zkontrolujte, zda na obrazovce není chybová zpráva. Pokračujte podle bodu "Běh je přerušen před dokončením programu buněčné separace" (viz bod 8.4.3 na straně 210).
- Došlo k selhání čerpadla nebo selhání ventilu. Obnovte buňky ze sady hadiček podle nouzového programu popsaného v bodě 8.4.7. Zkontrolujte objemy všech frakcí. Vyhodnoťte obsah cílových buněk ve vaku Buffer Waste Bag a vaku Negative Fraction Bag.
- Hadičky vedoucí k vaku Cell Collection Bag jsou ucpané. Zkontrolujte sadu hadiček, zda nejsou uzavřené svorkami, nemají ucpané úseky nebo zalomení.
- Byla překročena kapacita reagencie a/nebo sady hadiček. Viz limit kapacity příslušné aplikace.
- Hadička nebyla správně zasunuta. Zkontrolujte všechny ventily, zda jsou správně zasunuty hadičky.

8.5.3 Neočekávané události: CD34 SELECTION 1/2

■ Čistota cílových buněk je nízká

Byly zadrženy necílové buňky.

- Mobilizace cílových buněk byla slabá. Objevil se velmi nízký počet cílových buněk. Proto nízký počet kontaminujících necílových buněk (např. granulocytů, monocytů, krevních destiček) může vést ke snížení čistoty.
- Během magnetického značení bylo přítomno nedostatečné množství plazmy nebo imunoglobulinů. Postupujte podle pokynů pro magnetické označení (viz KROK 1 v příslušné aplikaci).

  Pokud nelze zaručit konečnou koncentraci asi 30% autologní plazmy ve vzorku během magnetického značení, přidejte do vzorku imunoglobulin. Konečná koncentrace 1,5 mg/mL se doporučuje pro účinné blokování nespecifické vazby reagencií během magnetického značení.

8.5.4 Neočekávané události: ENRICHMENT 1.1

■ Výtěžek cílových buněk je nízký

Vstup nesprávného parametru vzorku. Křížová kontrola vstupu parametrů s výsledky analýzy.

8.5.5 Neočekávané události: DEPLETION 2.1 a DEPLETION 3.1

■ Účinnost deplece je nízká

Pokud je účinnost deplece nedostatečná, zpracujte zbývající vzorek pomocí nové soupravy hadiček a dostatečného množství nového pufru. Mělo by se zvážit nové označení buněk, které mají být vystaveny depleci. Určete počet buněk a procento buněk určených k depleci a zadejte skutečné parametry vzorku během nastavování přístroje (KROK 2). Pokud se objeví viditelné shluky, může být užitečné filtrovat buňky před novým cyklem. Vezměte v úvahu, že buňky mohou být ztraceny v důsledku shlukování a dodatečné filtrace.

- Byla překročena kapacita reagencie a/nebo sady hadiček. Viz limit kapacity příslušné aplikace.
- Nesprávné určení buněk, které mají být značeny reagencií.
- Vstup nesprávného parametru vzorku. Křížová kontrola vstupu parametrů s výsledky analýzy.

- Snížená životaschopnost buněk. Mrtvé buňky se mohou nespecificky vázat na separační kolonu, čímž se snižuje značící kapacita kolony, což může mít za následek nižší účinnost deplece. Zajistěte lepší kvalitu buněčného produktu a zpracujte produkt co nejčerstvější. Skladované produkty, které jsou starší než 24 hodin, by se neměly používat. Pokud bude skladování nezbytné, buněčný produkt musí být uchováván při pokojové teplotě (+19 °C až +25 °C [+66 °F až +77 °F]). Koncentrace buněk by neměla překročit 0,2 x 10^9/mL. V případě potřeby nařeďte buněčný produkt autologní plazmou pro dosažení optimální koncentrace buněk.

9 Právní oznámení

9.1 Omezená záruka

S výjimkou případů uvedených ve zvláštním prohlášení o záruce, které může být přiloženo k tomuto produktu, nebo pokud není písemně dohodnuto jinak řádně zplnomocněným zástupcem společnosti Miltenyi Biotec, vztahuje se záruka společnosti Miltenyi Biotec na jakýkoliv výrobek zakoupený přímo od společnosti Miltenyi Biotec s výhradou podmínek prodeje, za nichž vám jej poskytla příslušná prodejní organizace Miltenyi Biotec. Platné podmínky prodeje se mohou lišit v závislosti na zemi a regionu. Tyto podmínky jsou k dispozici na vyžádání nebo na www.miltenyibiotec.com. Nic v tomto dokumentu by nemělo být vykládáno tak, že by představovalo další záruku.

Pro výrobky zakoupené od prodejců či distributorů jiných výrobců (např. zakoupených od autorizovaného místního poskytovatele servisu Miltenyi Biotec) mohou platit jiné podmínky.

Informace o záruce dodané s produktem najdete na dodacím listu, faktuře, stvrzence nebo jiné prodejní dokumentaci. Některé součásti kombinace výrobku, kterou jste zakoupili, mohou mít kratší záruční dobu, než je doba uvedená na balicím listu, faktuře, stvrzence nebo jiné prodejní dokumentaci (např. zboží s omezenou trvanlivostí nebo zastarávající zboží).

Záruka společnosti Miltenyi Biotec na tento výrobek pokrývá pouze problémy s výrobkem způsobené vadami materiálu nebo zpracováním při běžném používání. Nepokrývá problémy výrobku způsobené jakoukoliv příčinou, zejména problémy výrobku způsobené používáním výrobku jiným způsobem, než je konkrétně předepsáno v této příručce, například: nevhodné nebo nesprávné použití, nesprávná montáž či instalace obsluhou nebo třetí stranou, přiměřené opotřebení, nedbalá či nesprávná obsluha, manipulace, skladování, servis či údržba, nedodržování návodu k obsluze, neoprávněná úprava tohoto výrobku nebo jakékoliv jeho části, případně použití nevhodných spotřebních materiálů, doplňků nebo pracovních materiálů.

Záruka společnosti Miltenyi Biotec se nevztahuje na produkty prodávané TAK, JAK JSOU, nebo SE VŠEMI PORUCHAMI nebo na spotřební materiál. Nic v tomto dokumentu by nemělo být vykládáno tak, že by představovalo další záruku.

Společnost Miltenyi Biotec musí být okamžitě informována, pokud bude na základě takové záruky uplatněna reklamace. Dojde-li během záruční doby k závadě na materiálu nebo z výroby, podnikne Miltenyi Biotec příslušná opatření k obnovení plné použitelnosti přístroje.

Omezení odškodnění. Společnost Miltenyi Biotec nenese odpovědnost za jakékoli náhodné nebo následné škody způsobené porušením jakékoli výslovné nebo předpokládané záruky nebo podmínky tohoto produktu.

Některé země/státy nebo jurisdikce nedovolují výluky či omezení náhodných či následných škod, proto pro vás některá omezení nebo výluky nemusí platit. Toto záruční prohlášení vám dává konkrétní zákonná práva a můžete mít i další práva, která se v jednotlivých státech nebo jurisdikcích liší.

9.2 Ochranné známky

CliniMACS, MACS, MACSmix, logo Miltenyi Biotec a MiniMACS jsou registrované ochranné známky společnosti Miltenyi Biotec a/nebo jejích přidružených společností v různých zemích světa. Všechny ostatní ochranné známky uvedené v tomto dokumentu jsou majetkem příslušných vlastníků a slouží pouze pro identifikační účely.

Miltenyi Biotec

Německo/Rakousko
Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG
Friedrich-Ebert-Straße 68
51429 Bergisch Gladbach
Německo
+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

Austrálie
Miltenyi Biotec
Australia Pty. Ltd.
Unit 11, 2 Eden Park Drive
Macquarie Park NSW 2113
Austrálie
+61 2 8877 7400
+61 2 9889 5044
macsau@miltenyi.com

Benelux
Miltenyi Biotec B.V.
Dellaertweg 9C
2316 WZ Leiden
Nizozemsko
macsnl@miltenyi.com
Zákaznický servis Nizozemsko
0800 4020120
0800 4020100
Zákaznický servis Belgie
0800 94016
0800 99626
Zákaznický servis Lucembursko
800 24971
800 24984

Čína
Miltenyi Biotec Technology &
Trading (Shanghai) Co., Ltd.
Room A401, 4/F
No. 1077, Zhangheng Road
Pudong New Area
201203 Shanghai
P.R. Čína
+86 21 6235 1005-0
+86 21 6235 0953
macscn@miltenyi.com.cn

Francie
Miltenyi Biotec SAS
10 rue Mercoeur
75011 Paris
Francie
+33 1 56 98 16 16
macsfr@miltenyi.com

Hongkong
Miltenyi Biotec Hong Kong Ltd.
Unit 301, Lakeside 1
No. 8 Science Park West Avenue
Hong Kong Science Park
Pak Shek Kok, New Territories
Hongkong
+852 3751 6698
+852 3619 5772
macshk@miltenyi.com.hk

Itálie
Miltenyi Biotec S.r.l.
Via Paolo Nanni Costa, 30
40133 Bologna
Itálie
+39 051 6 460 411
+39 051 6 460 499
macsit@miltenyi.com

Japonsko
Miltenyi Biotec K.K.
NEX-Eitai Building 5F
16-10 Fuyuki, Koto-ku
Tokyo 135-0041
Japonsko
+81 3 5646 8910
+81 3 5646 8911
macsjp@miltenyi.com

Jižní Korea
Miltenyi Biotec Korea Co., Ltd.
Donggeuk 7F
562 Nonhyeon-ro
Gangnam-gu
Soul 06136
Jižní Korea
+82 2 555 1988
+82 2 555 8890
macskr@miltenyi.com

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

Skandinávie a Pobaltí
Miltenyi Biotec Norden AB
Medicon Village
Scheeletorget 1
223 81 Lund
Švédsko
macsse@miltenyi.com
Zákaznický servis Švédsko
0200 111 800
+46 280 72 99
Zákaznický servis Dánsko
80 20 30 10
+46 46 280 72 99
Zákaznický servis
Norsko, Finsko, Island
a pobaltské země
+46 46 280 72 80
+46 46 280 72 99

Španělsko
Miltenyi Biotec S.L.
C/Luis Buñuel 2
Ciudad de la Imagen
28223 Pozuelo de Alarcón (Madrid)
Španělsko
+34 91 512 12 90
+34 91 512 12 91
macses@miltenyi.com

Švýcarsko
Miltenyi Biotec Swiss AG
Gibelinstrasse 27
4500 Solothurn
Švýcarsko
+41 32 623 08 47
+49 2204 85197
macsch@miltenyi.com

Velká Británie
Miltenyi Biotec Ltd.
Almac House, Church Lane
Bisley, Surrey GU24 9DR
Velká Británie
+44 1483 799 800
+44 1483 799 811
macsuk@miltenyi.com

www.miltenyibiotec.com

Společnost Mitenyi Biotec poskytuje výrobky a služby na celém světě. Navštivte web **www.miltenyibiotec.com/local**, kde naleznete nejbližší kontakt na společnost Miltenyi Biotec.

CliniMACS, MACS, MACSmix, logo Miltenyi Biotec a MiniMACS jsou registrovanými obchodními známkami a značkami společnosti Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG a/nebo jejích dceřiných společností v různých zemích světa. Copyright © 2024 Miltenyi Biotec a/nebo její dceřiné společnosti. Všechna práva vyhrazena.

210-003-224/01 | Vydáno: 2024-03