Miltenyi Biotec

CliniMACS® Plus (Applicazioni)

Manuale d'uso



I componenti del Sistema CliniMACS, inclusi reagenti, set di tubi, strumenti e PBS/EDTA Buffer sono stati progettati, fabbricati e testati nell'ambito di un sistema di qualità certificato ISO 13485. Nell'UE i componenti del Sistema CliniMACS sono disponibili come dispositivi medici con marchio CE per il rispettivo uso previsto, salvo diversamente indicato. Negli Stati Uniti il Sistema CliniMACS CD34 Reagent, comprendente CliniMACS Plus Instrument, CliniMACS CD34 Reagent, CliniMACS Tubing Set TS e CliniMACS Tubing Set LS, e CliniMACS PBS/EDTA Buffer, è stato approvato dalla FDA come strumento per uso umanitario (*Humanitarian Use Instrument*, HUD), autorizzato dalla legge federale degli Stati Uniti per l'uso nel trattamento di pazienti con leucemia mieloide acuta (AML) in prima remissione completa. L'efficacia dello strumento per questa indicazione non è stata dimostrata. Altri prodotti della linea CliniMACS sono disponibili per l'uso solo a seguito dell'approvazione di una richiesta IND (*Investigational New Drug*) o IDE (*Investigational Device Exemption*) o di un'approvazione della FDA. In Australia i seguenti componenti del Sistema CliniMACS Plus sono inclusi nel Registro australiano dei beni terapeutici (Australian Register of Therapeutic Goods, ARTG) e sono pertanto approvati per la fornitura: CliniMACS Plus Instrument, CliniMACS CD34 Reagent, CliniMACS Tubing Set, CliniMACS Tubing Set LS, CliniMACS Depletion Tubing Set e CliniMACS PBS/EDTA Buffer. In Australia è consentito l'uso esclusivamente dei prodotti inclusi nell'ARTG.

Salvo diversamente specificato, i prodotti e i servizi di Miltenyi Biotec sono destinati esclusivamente all'uso a scopo di ricerca, e non a scopo terapeutico o diagnostico.

Copyright © 2023 Miltenyi Biotec e/o sue consociate. Tutti i diritti riservati.

È vietato riprodurre, archiviare in un sistema di recupero, trasmettere, pubblicare o distribuire la presente pubblicazione in ogni sua parte, in qualsiasi forma o con qualsiasi mezzo, elettronicamente, meccanicamente, mediante fotocopie, microfilm, registrazioni o altro, senza il previo consenso scritto di Miltenyi Biotec; fatto salvo quanto precede, i proprietari del Sistema CliniMACS Plus possono comunque effettuare copie unicamente per scopi di formazione del personale sull'uso e la manutenzione dell'unità all'interno della loro azienda od organizzazione.

CliniMACS, MACS, MACSmix, il logo Miltenyi Biotec e MiniMACS sono marchi registrati o marchi d'impresa di Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG e/o delle sue consociate in vari Paesi del mondo. Tutti gli altri marchi citati in questo documento sono di proprietà dei rispettivi proprietari e sono utilizzati solo a scopo identificativo.

CliniMACS® Plus (Applicazioni)

Manuale d'uso

Versione del software 2.4x

Edizione: 2023-02
210-003-242/01

MD CE 0123

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

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

www.miltenyibiotec.com

Informazioni essenziali

Questo manuale d'uso fornisce informazioni per l'utilizzo del CliniMACS Plus (Applicazioni). Istruzioni, avvertenze, precauzioni e altre informazioni importanti per l'uso del CliniMACS Plus Instrument sono disponibili nel rispettivo manuale d'uso.

⚠ AVVERTENZA

Il sistema CliniMACS Plus deve essere usato esclusivamente da operatori che abbiano ricevuto un'apposita formazione. Prima della messa in servizio del sistema, leggere attentamente e accertarsi di aver compreso le informazioni sulla sicurezza, le avvertenze, le precauzioni e le istruzioni per il corretto funzionamento del CliniMACS Plus Instrument fornite nelle istruzioni per l'uso del sistema CliniMACS Plus (incluse, a titolo esemplificativo, le informazioni sulla sicurezza contenute nel manuale d'uso del CliniMACS Plus Instrument e nel capitolo 3 "Avvertenze e precauzioni" a pagina 29 nel presente manuale) e in tutte le raccomandazioni relative alla sicurezza pubblicate da Miltenyi Biotec). Prestare particolare attenzione a tutte le avvertenze presenti sullo strumento o fornite con materiali di consumo, accessori, dotazioni e materiali aggiuntivi. Durante l'uso dello strumento, l'operatore deve sempre rispettare e verificare che vengano rispettate tutte le informazioni sulla sicurezza, le avvertenze, le precauzioni e le istruzioni. La mancata osservanza delle informazioni sulla sicurezza, delle avvertenze, delle precauzioni e delle istruzioni contenute nelle istruzioni per l'uso potrebbe causare malfunzionamenti dello strumento, danni materiali, perdita di cellule bersaglio, lesioni personali e/o morte.

Indice

1	**Introduzione**	**11**
1.1	Informazioni generali	11
1.2	Marcatura delle cellule con reagenti CliniMACS	12
1.3	Separazione cellulare magnetica con gradiente alto	13
1.4	Strategie di separazione	14
1.4.1	Strategia di arricchimento	15
1.4.2	Strategia di deplezione	16
2	**Glossario**	**19**
2.1	Legenda grafica	19
2.2	Glossario dei simboli	19
2.3	Glossario dei termini	20
3	**Avvertenze e precauzioni**	**29**
3.1	In associazione al processo	29
3.2	Reagenti CliniMACS e coniugati con biotina	30
3.3	Manipolazione di materiale a rischio biologico	31
3.4	Preparazione cellulare iniziale	32
4	**Il sistema CliniMACS Plus**	**33**
4.1	CliniMACS Plus Instrument	33
4.2	Reagenti CliniMACS e coniugati con biotina	33
4.3	Set di tubi CliniMACS	33
4.4	CliniMACS PBS/EDTA Buffer	33
4.5	Accessori CliniMACS	34
4.6	Materiali aggiuntivi necessari	34
4.7	Apparecchiature necessarie	35
5	**Panoramica delle applicazioni**	**37**
5.1	Quattro FASI per le cellule bersaglio	37
5.2	Tabella riassuntiva	39

6	**Panoramica delle FASI 1-4 nelle specifiche applicazioni**	**43**
6.1	Arricchimento di cellule CD34 positive	43
6.1.1	FASE 1: Preparazione delle cellule e marcatura magnetica	43
6.1.2	FASE 2: Scelta del programma di separazione	45
6.1.3	FASE 3: Installazione del set di tubi CliniMACS	46
6.1.4	FASE 4: Separazione CliniMACS Plus	46
6.2	Arricchimento di cellule CD14 positive	46
6.2.1	FASE 1: Preparazione delle cellule e marcatura magnetica	46
6.2.2	FASE 2: Scelta del programma di separazione	49
6.2.3	FASE 3: Installazione del set di tubi CliniMACS	49
6.2.4	FASE 4: Separazione CliniMACS Plus	49
6.3	Arricchimento/deplezione con il CliniMACS Anti-Biotin Reagent	50
6.3.1	FASE 1: Preparazione delle cellule e marcatura magnetica	50
6.3.2	FASE 2: Scelta del programma di separazione	54
6.3.3	FASE 3: Installazione del set di tubi CliniMACS	54
6.3.4	FASE 4: Separazione CliniMACS Plus	54
6.4	Arricchimento di cellule CD56 positive	55
6.4.1	FASE 1: Preparazione delle cellule e marcatura magnetica	55
6.4.2	FASE 2: Scelta del programma di separazione	58
6.4.3	FASE 3: Installazione del set di tubi CliniMACS	58
6.4.4	FASE 4: Separazione CliniMACS Plus	58
6.5	Deplezione di cellule CD3 positive	59
6.5.1	FASE 1: Preparazione delle cellule e marcatura magnetica	59
6.5.2	FASE 2: Scelta del programma di separazione	63
6.5.3	FASE 3: Installazione del set di tubi CliniMACS	63
6.5.4	FASE 4: Separazione CliniMACS Plus	63
6.6	Deplezione di cellule CD19 positive	64
6.6.1	FASE 1: Preparazione delle cellule e marcatura magnetica	64
6.6.2	FASE 2: Scelta del programma di separazione	66
6.6.3	FASE 3: Installazione del set di tubi CliniMACS	66
6.6.4	FASE 4: Separazione CliniMACS Plus	66

6.7	Deplezione di cellule CD3 positive e CD19 positive	67
6.7.1	FASE 1: Preparazione delle cellule e marcatura magnetica	67
6.7.2	FASE 2: Scelta del programma di separazione	70
6.7.3	FASE 3: Installazione del set di tubi CliniMACS	70
6.7.4	FASE 4: Separazione CliniMACS Plus	70
6.8	Arricchimento/deplezione di cellule CD8 positive	71
6.8.1	FASE 1: Preparazione delle cellule e marcatura magnetica	71
6.8.2	FASE 2: Scelta del programma di separazione	74
6.8.3	FASE 3: Installazione del set di tubi CliniMACS	74
6.8.4	FASE 4: Separazione CliniMACS Plus	75
6.9	Arricchimento/deplezione di cellule CD25 positive	75
6.9.1	FASE 1: Preparazione delle cellule e marcatura magnetica	75
6.9.2	FASE 2: Scelta del programma di separazione	80
6.9.3	FASE 3: Installazione del set di tubi CliniMACS	80
6.9.4	FASE 4: Separazione CliniMACS Plus	80
6.10	Arricchimento/deplezione di cellule CD4 positive	81
6.10.1	FASE 1: Preparazione delle cellule e marcatura magnetica	81
6.10.2	FASE 2: Scelta del programma di separazione	85
6.10.3	FASE 3: Installazione del set di tubi CliniMACS	85
6.10.4	FASE 4: Separazione CliniMACS Plus	85
6.11	Deplezione di cellule CD4 positive e CD18 positive	86
6.11.1	FASE 1: Preparazione delle cellule e marcatura magnetica	86
6.11.2	FASE 2: Scelta del programma di separazione	89
6.11.3	FASE 3: Installazione del set di tubi CliniMACS	89
6.11.4	FASE 4: Separazione CliniMACS Plus	90
6.12	Arricchimento di cellule CD1c (BDCA-1) positive – Parte 1: Deplezione di cellule CD19 positive e marcatura di cellule CD1c (BDCA-1) positive	90
6.12.1	FASE 1: Preparazione delle cellule e marcatura magnetica	90
6.12.2	FASE 2: Scelta del programma di separazione	92
6.12.3	FASE 3: Installazione del set di tubi CliniMACS	93
6.12.4	FASE 4: Separazione CliniMACS Plus	93

6.13 Arricchimento di cellule CD1c (BDCA-1) positive – Parte 2: Flexible Labeling System 93
6.13.1 FASE 1: Preparazione delle cellule e marcatura magnetica 93
6.13.2 FASE 2: Scelta del programma di separazione 95
6.13.3 FASE 3: Installazione del set di tubi CliniMACS 95
6.13.4 FASE 4: Separazione CliniMACS Plus 95
6.14 Arricchimento di cellule CD304 (BDCA-4) positive 96
6.14.1 FASE 1: Preparazione delle cellule e marcatura magnetica 96
6.14.2 FASE 2: Scelta del programma di separazione 98
6.14.3 FASE 3: Installazione del set di tubi CliniMACS 98
6.14.4 FASE 4: Separazione CliniMACS Plus 99
6.15 Deplezione di cellule TCRα/β positive 99
6.15.1 FASE 1: Preparazione delle cellule e marcatura magnetica 99
6.15.2 FASE 2: Scelta del programma di separazione 102
6.15.3 FASE 3: Installazione del set di tubi CliniMACS 102
6.15.4 FASE 4: Separazione CliniMACS Plus 102
6.16 Deplezione di cellule CD45RA positive 103
6.16.1 FASE 1: Preparazione delle cellule e marcatura magnetica 103
6.16.2 FASE 2: Scelta del programma di separazione 105
6.16.3 FASE 3: Installazione del set di tubi CliniMACS 106
6.16.4 FASE 4: Separazione CliniMACS Plus 106
6.17 Arricchimento di cellule umane secernenti IFN-gamma con il CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma) 107
6.17.1 FASE 1: Preparazione delle cellule e marcatura magnetica 107
6.17.2 FASE 2: Scelta del programma di separazione 121
6.17.3 FASE 3: Installazione del set di tubi CliniMACS 121
6.17.4 FASE 4: Separazione sul CliniMACS Plus 121

7 Spiegazione dettagliata delle FASI 1–4 123

7.1 FASE 1: Preparazione delle cellule e marcatura magnetica 123
7.1.1 Primo intervento necessario 123
7.1.2 Marcatura magnetica delle cellule 124
7.2 FASE 2: Scelta del programma di separazione 136
7.2.1 Avviare il CliniMACS Plus Instrument 136

7.2.2 CD34 SELECTION 1/2 136
7.2.3 ENRICHMENT 1.1 138
7.2.4 ENRICHMENT 3.2 143
7.2.5 DEPLETION 2.1 145
7.2.6 DEPLETION 3.1 151
7.3 FASE 3: Installazione del set di tubi CliniMACS 157
7.3.1 CliniMACS Tubing Set e CliniMACS Tubing Set LS 157
7.3.2 Installazione alternativa del set di tubi CliniMACS 171
7.3.3 CliniMACS Depletion Tubing Set 176
7.4 FASE 4: Separazione sul CliniMACS Plus 190
7.4.1 CD34 SELECTION 1/2 190
7.4.2 ENRICHMENT 1.1 194
7.4.3 ENRICHMENT 3.2 198
7.4.4 DEPLETION 2.1 203
7.4.5 DEPLETION 3.1 208

8 Risoluzione degli errori 213

8.1 Miltenyi Biotec Technical Support 213
8.2 Preparazione del prodotto di leucaferesi 213
8.3 CliniMACS Plus Instrument e set di tubi CliniMACS 214
8.3.1 Messaggi di errore 214
8.3.2 Caricamento e priming del set di tubi 214
8.4 Separazione automatica delle cellule 215
8.4.1 Messaggi di avviso 215
8.4.2 Eventi imprevisti: tutti i programmi di separazione 216
8.4.3 Eventi imprevisti: solo programmi di arricchimento 218
8.4.4 Eventi imprevisti: CD34 SELECTION 1/2 219
8.4.5 Eventi imprevisti: ENRICHMENT 1.1 220
8.4.6 Eventi imprevisti: ENRICHMENT 3.2 221
8.4.7 Programma di emergenza (da usare solo con i programmi di arricchimento) 222
8.4.8 Eventi imprevisti: DEPLETION 2.1 223
8.4.9 Eventi imprevisti: DEPLETION 3.1 224
8.5 Performance di separazione cellulare 226
8.5.1 Eventi imprevisti: solo programmi di arricchimento 226

8.5.2 Eventi imprevisti: CD34 SELECTION 1/2, ENRICHMENT 1.1 228
8.5.3 Eventi imprevisti: CD34 SELECTION 1/2 229
8.5.4 Eventi imprevisti: ENRICHMENT 1.1 229
8.5.5 Eventi imprevisti: DEPLETION 2.1 e DEPLETION 3.1 229

9 Note legali 231
9.1 Garanzia limitata 231
9.2 Marchi registrati 232

1 Introduzione

1.1 Informazioni generali

Il sistema CliniMACS Plus comprende un set di strumenti che rendono disponibili procedure di separazione cellulare standard di alta qualità per applicazioni terapeutiche.

Il sistema CliniMACS Plus si basa sulla tecnologia di separazione cellulare magnetica (tecnologia MACS®) sviluppata da Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG. Miltenyi Biotec ha messo a disposizione questi prodotti per applicazioni cliniche conformi ai requisiti delle norme regolatorie europee.

I reagenti CliniMACS e i coniugati con biotina sono destinati esclusivamente all'uso *in vitro* e non sono destinati all'uso terapeutico o all'infusione diretta nei pazienti.

I reagenti CliniMACS combinati con il sistema CliniMACS Plus si usano per la separazione di cellule umane.

In qualità di fabbricante del sistema CliniMACS Plus, Miltenyi Biotec non fornisce alcuna raccomandazione riguardo all'uso di cellule separate per scopi terapeutici né avanza alcuna pretesa in merito a un beneficio clinico.

La produzione e l'uso di cellule bersaglio nell'uomo sono soggetti alle normative nazionali e ai regolamenti applicabili – ad esempio, per l'UE si applica la direttiva 2004/23/CE (tessuti e cellule umani) o la direttiva 2002/98/CE (sangue umano e suoi componenti). Pertanto qualsiasi applicazione clinica delle cellule bersaglio rientra esclusivamente nella responsabilità dell'utilizzatore del sistema CliniMACS Plus.

GARANZIA LIMITATA
Qualora il sistema CliniMACS Plus venga usato in modo diverso da come esplicitamente descritto nel presente manuale, tutte le garanzie sono da intendersi nulle e inefficaci.

IMPORTANTE
Prima di utilizzare il sistema CliniMACS Plus o qualsiasi suo componente al di fuori dello Spazio Economico Europeo, è necessario verificare che il sistema o il componente in questione abbia ottenuto l'approvazione regolatoria nel Paese interessato.

1.2 Marcatura delle cellule con reagenti CliniMACS

Il MACS Magnetic Cell Sorting è un un potente strumento collaudato per la separazione di molti tipi di cellule nei laboratori di ricerca e nelle applicazioni cliniche. Le miscele cellulari vengono separate in un campo magnetico usando una marcatura immunomagnetica specifica per il tipo di cellula in questione, ad es. cellule progenitrici ematopoietiche umane CD34-positive da popolazioni eterogenee di cellule ematiche.

Con il sistema CliniMACS Plus le cellule possono essere sottoposte a marcatura magnetica in tre differenti modi:

- Direttamente in una procedura di marcatura a singola fase mediante anticorpi antigene-specifici coniugati con biglie di ferro destrano superparamagnetiche (cfr. Figura 1.1).
- Indirettamente in una procedura di marcatura a due fasi chiamata Flexible Labeling System. In una prima fase le cellule vengono marcate con anticorpi antigene-specifici coniugati con biotina. In una seconda fase, questi anticorpi vengono marcati con anticorpi biotina-specifici coniugati con biglie di ferro destrano superparamagnetiche (cfr. Figura 1.2).
- Indirettamente in una procedura di marcatura a due fasi chiamata CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma). In primo luogo, le cellule vengono ristimolate *in vitro* per secernere citochina (ad es. IFN-gamma). In una prima fase di marcatura, le cellule ristimolate vengono marcate con una molecola ibrida composta da un anticorpo leucociti-specifico e un anticorpo citochina-specifico, il CliniMACS IFN-gamma Catchmatrix Reagent. Le cellule vengono quindi incubate per permettere la secrezione di citochina, che viene "catturata" dalla matrice di raccolta sulla superficie cellulare. Successivamente, in una seconda fase di marcatura, le cellule

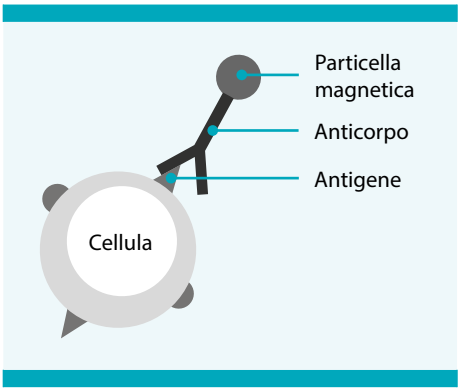


Figura 1.1: Marcatura magnetica delle cellule

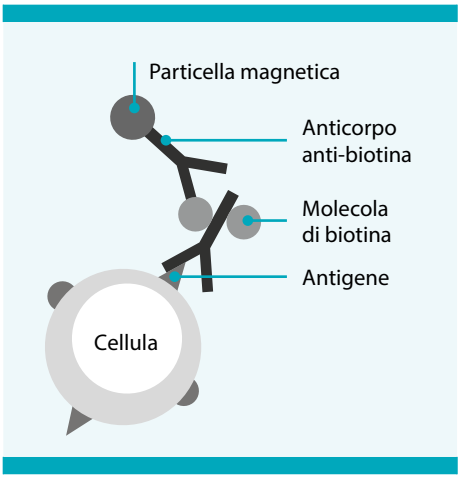


Figura 1.2: Flexible Labeling System

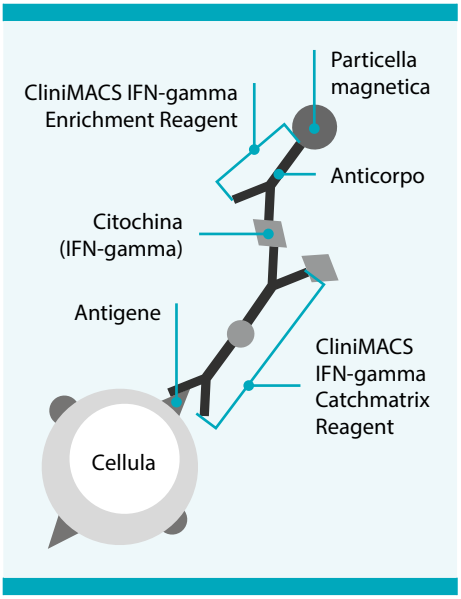


Figura 1.3: CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma)

secernenti citochina vengono marcate con anticorpi citochina-specifici coniugati con biglie superparamagnetiche di ferro destrano (CliniMACS IFN-gamma Enrichment Reagent), (cfr. Figura 1.3).

1.3 Separazione cellulare magnetica con gradiente alto

La sospensione di cellule marcate magneticamente viene caricata nel CliniMACS Plus Instrument preparato con un set di tubi. L'unità di separazione cellulare magnetica con gradiente alto è composta da un potente magnete permanente, sviluppato allo scopo, e da una colonna di separazione con una matrice ferromagnetica.

Il campo ad alto gradiente permette di generare potenti forze magnetiche potenti ed una rapida demagnetizzazione. Quando piccole strutture ferromagnetiche, come la matrice della colonna, vengono posizionate all'interno del campo magnetico, disturbano l'omogeneità del campo, il che genera gradienti magnetici alti. Nelle immediate vicinanze, le strutture ferromagnetiche generano forze magnetiche 10.000 volte maggiori rispetto alle geometrie convenzionali. Il campo ad alto gradiente attrae le cellule marcate nella matrice e le trattiene efficacemente. Dopo aver rimosso la colonna dal magnete, la rapida demagnetizzazione della matrice della colonna permette il rilascio delle cellule trattenute.

1.4 Strategie di separazione

Il sistema CliniMACS Plus offre all'utilizzatore una varietà di programmi di separazione che possono essere generalmente suddivisi in strategie di arricchimento (CD34 SELECTION 1 e 2, ENRICHMENT 1.1 ed ENRICHMENT 3.2) e in strategie di deplezione (DEPLETION 2.1 e DEPLETION 3.1).

Arricchimento di cellule marcate magneticamente

Quando si sceglie una strategia di arricchimento, le cellule marcate magneticamente (marcatura primaria con un reagente CliniMACS) vengono trattenute nella colonna di separazione e le cellule non marcate passano. Le cellule marcate (cellule bersaglio) vengono raccolte nella Cell Collection Bag e le cellule non marcate (cellule non-bersaglio) vengono raccolte nella Negative Fraction Bag (cfr. Figura 1.4).

Deplezione di cellule marcate magneticamente

La tecnologia MACS è molto efficiente anche per la deplezione di popolazioni cellulari specifiche. Le cellule indesiderate vengono marcate specificamente con particelle superparamagnetiche e separate dalle cellule bersaglio al passaggio attraverso la colonna ad alto gradiente magnetico. A differenza della strategia di arricchimento, le cellule non marcate (cellule bersaglio) vengono raccolte nella Cell Collection Bag e le cellule marcate (cellule non-bersaglio) vengono raccolte rispettivamente nella Negative Fraction Bag (cfr. Figura 1.5) o nella Non-Target Cell Bag (cfr. Figura 1.6 e Figura 1.7).

1.4.1 Strategia di arricchimento

Arricchimento di cellule con CliniMACS Tubing Set o CliniMACS Tubing Set LS

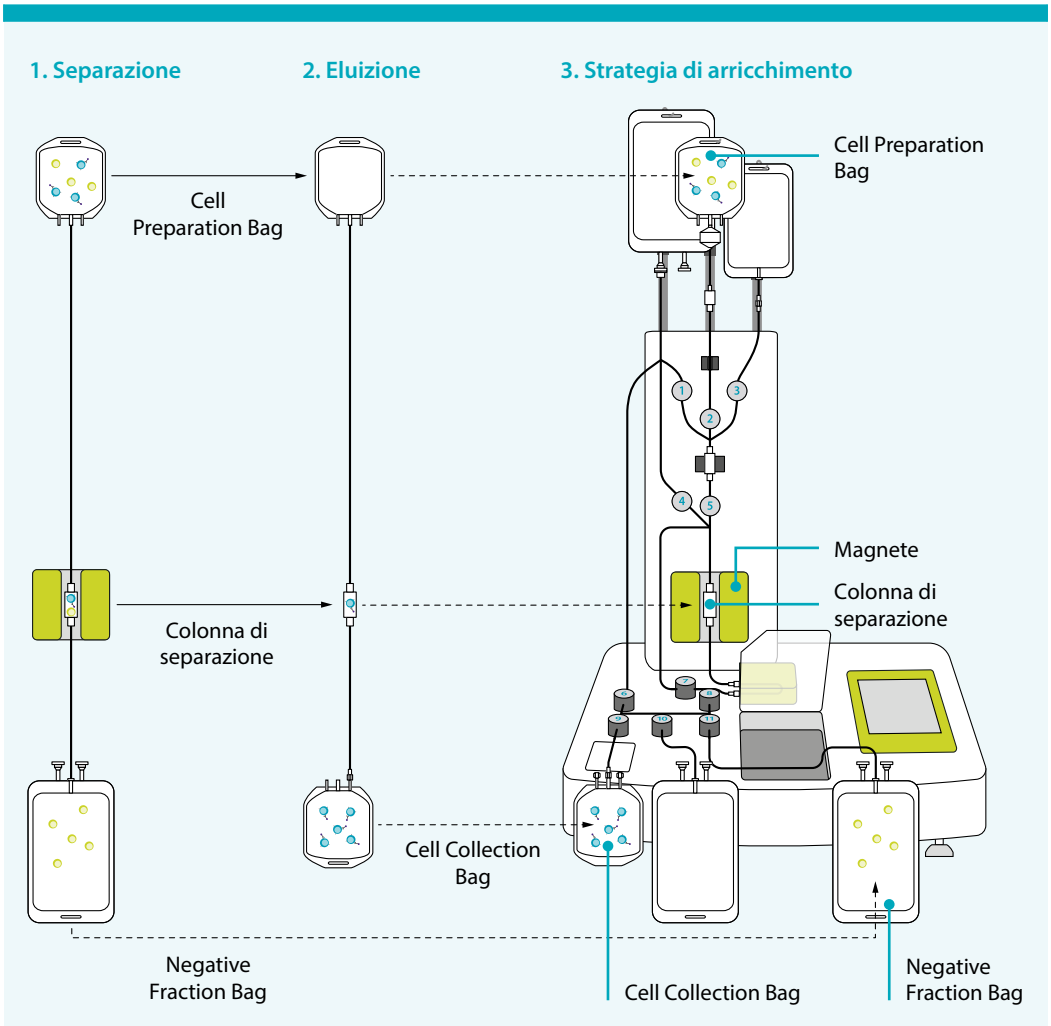


Figura 1.4: Strategia dei programmi di arricchimento con CliniMACS Tubing Set o CliniMACS Tubing Set LS

1. Il magnete è nella posizione "ON". Le cellule marcate magneticamente vengono trattenute nella colonna di separazione, mentre le altre cellule non marcate (cellule non-bersaglio) passano attraverso la colonna e vengono raccolte nella Negative Fraction Bag.
2. Il magnete è nella posizione "OFF". Le cellule marcate magneticamente (cellule bersaglio) vengono rilasciate dalla colonna di separazione e raccolte nella Cell Collection Bag.
3. Il programma di arricchimento trattiene le cellule marcate magneticamente nella colonna di separazione, mentre le cellule non marcate (cellule non-bersaglio) passano attraverso la colonna e vengono raccolte nella Negative Fraction Bag. Quando il magnete viene spostato nella posizione "OFF", le cellule marcate magneticamente (cellule bersaglio) vengono rilasciate dalla colonna e raccolte nella Cell Collection Bag. **Nota:** la frazione di cellule bersaglio viene sempre raccolta nella Cell Collection Bag.

1.4.2 Strategia di deplezione

Deplezione di cellule con CliniMACS Tubing Set LS: DEPLETION 2.1

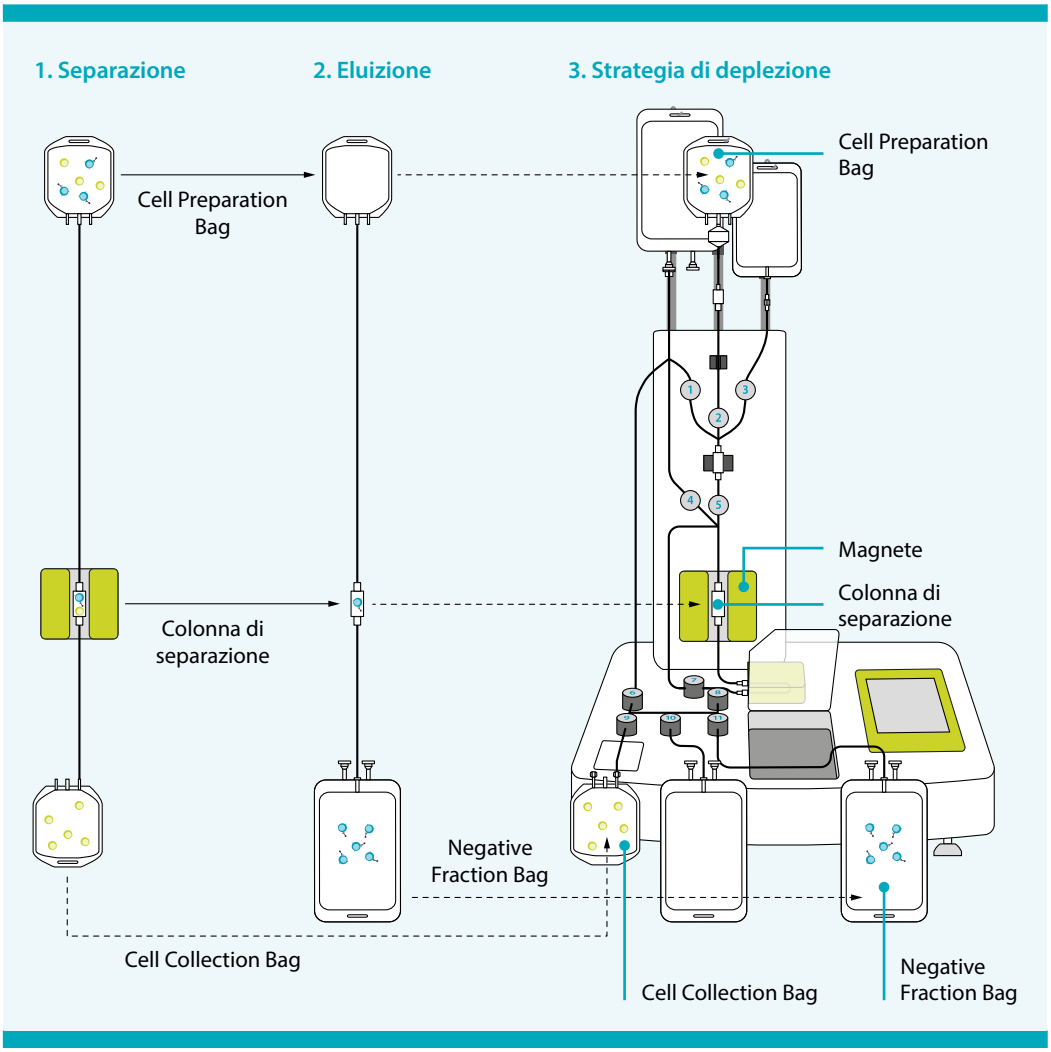


Figura 1.5: Strategia del programma di deplezione DEPLETION 2.1 con il CliniMACS Tubing Set LS

1. Il magnete è nella posizione "ON". Le cellule marcate magneticamente vengono trattenute nella colonna di separazione, mentre le altre cellule non marcate (cellule bersaglio) passano attraverso la colonna e vengono raccolte nella Cell Collection Bag.
2. Il magnete è nella posizione "OFF". Le cellule marcate magneticamente (cellule non-bersaglio) vengono rilasciate dalla colonna di separazione e raccolte nella Negative Fraction Bag.
3. Il programma di deplezione (DEPLETION 2.1) trattiene le cellule marcate magneticamente nella colonna di separazione, mentre le cellule non marcate (cellule bersaglio) passano attraverso la colonna e vengono raccolte nella Cell Collection Bag. Quando il magnete viene spostato nella posizione "OFF", le cellule marcate magneticamente (cellule non-bersaglio) vengono rilasciate dalla colonna e raccolte nella Negative Fraction Bag. **Nota:** la frazione di cellule bersaglio viene sempre raccolta nella Cell Collection Bag.

Deplezione di cellule con CliniMACS Depletion Tubing Set: DEPLETION 3.1 (Parte 1: Staged Cell Loading [Bulk Loading Stage])

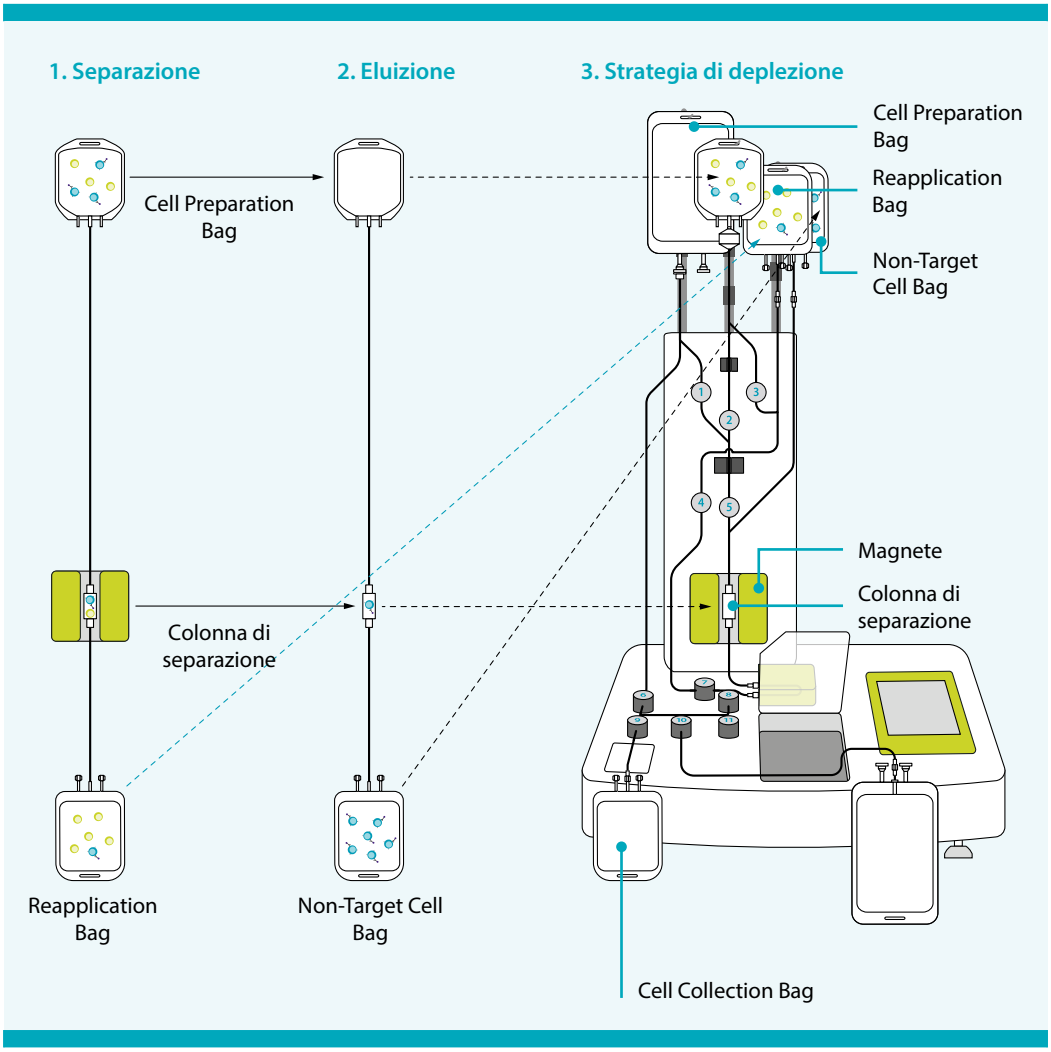


Figura 1.6: Strategia del programma di deplezione DEPLETION 3.1 con il CliniMACS Depletion Tubing Set (Parte 1)

1. Staged Cell Loading (Bulk Loading Stage): il magnete è nella posizione "ON". Le cellule marcate magneticamente vengono trattenute nella colonna di separazione, mentre le altre cellule non marcate (cellule bersaglio) passano attraverso la colonna e vengono raccolte nella Reapplication Bag.
2. Il magnete è nella posizione "OFF". Le cellule marcate magneticamente (cellule non-bersaglio) vengono rilasciate dalla colonna di separazione e raccolte nella Non-Target Cell Bag.
3. Il programma di deplezione (DEPLETION 3.1) trattiene le cellule marcate magneticamente nella colonna di separazione, mentre le cellule non marcate (cellule bersaglio) passano attraverso la colonna e vengono raccolte nella Reapplication Bag per essere ricaricate nella colonna di separazione in una seconda deplezione sensibile (cfr. Figura 1.7). Quando il magnete viene spostato nella posizione "OFF", le cellule marcate magneticamente (cellule non-bersaglio) vengono rilasciate dalla colonna e raccolte nella Non-Target Cell Bag.

Deplezione di cellule con CliniMACS Depletion Tubing Set: DEPLETION 3.1 (Parte 2: Sensitive Sample Loading [Sensitive Loading Stage])

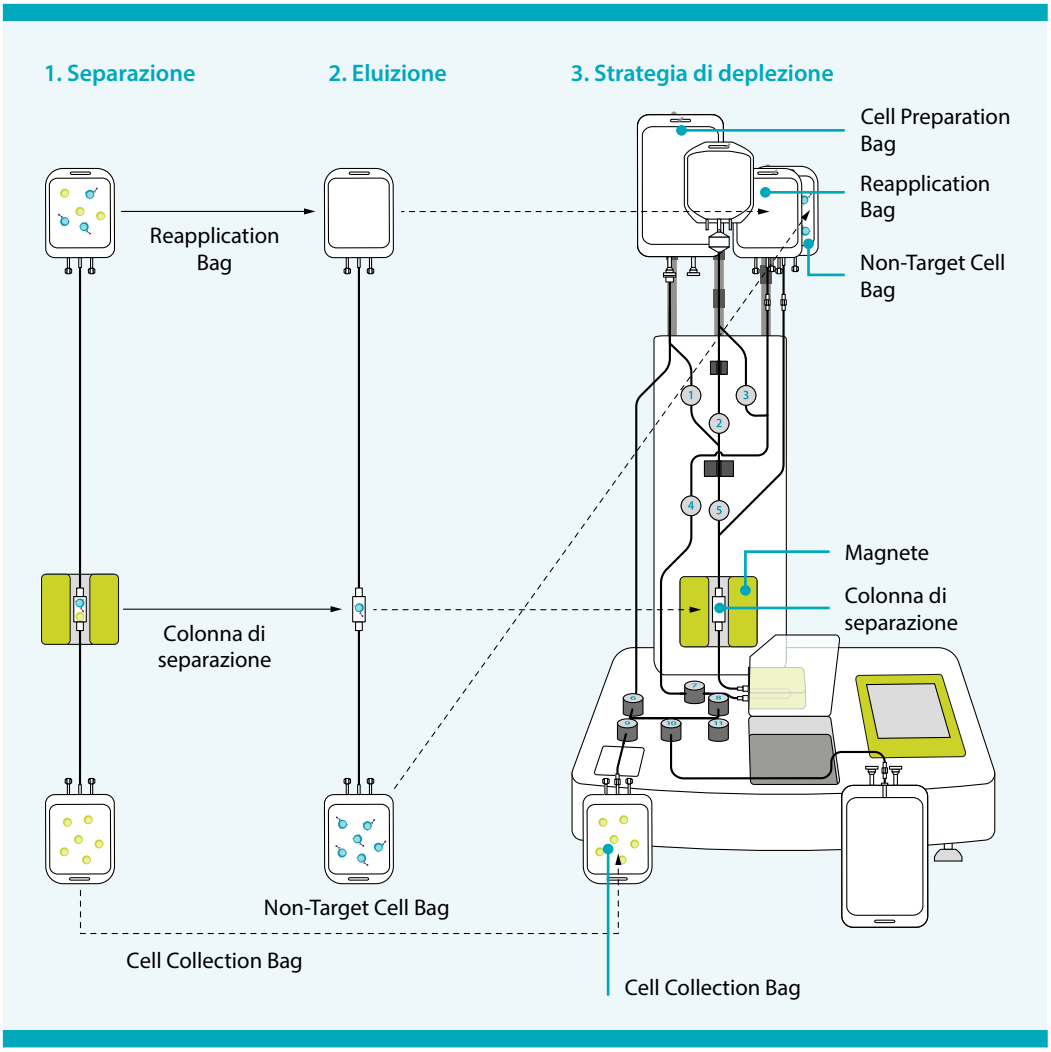


Figura 1.7: Strategia del programma di deplezione DEPLETION 3.1 con il CliniMACS Depletion Tubing Set (Parte 2)

4. Sensitive Sample Loading (Sensitive Loading Stage): il magnete è nella posizione "ON". Dalla Reapplication Bag le cellule vengono ricaricate nella colonna di separazione. Le poche cellule marcate magneticamente rimanenti vengono trattenute nella colonna di separazione, mentre le altre cellule non marcate (cellule bersaglio) passano attraverso la colonna e vengono raccolte nella Cell Collection Bag.
5. Il magnete è nella posizione "OFF". Le cellule marcate magneticamente (cellule non-bersaglio) vengono rilasciate dalla colonna di separazione e raccolte nella Non-Target Cell Bag.
6. Al termine della separazione, le cellule marcate (cellule non-bersaglio) si trovano nella Non-Target Cell Bag e le cellule non marcate (cellule bersaglio) si trovano nella Cell Collection Bag. **Nota:** la frazione di cellule bersaglio viene sempre raccolta nella Cell Collection Bag.

2 Glossario

2.1 Legenda grafica

Di seguito sono raffigurati i riquadri utilizzati in questo manuale d'uso per informare l'utilizzatore in merito ai potenziali rischi qualora non vengano osservate le avvertenze e le precauzioni specificate. Il livello di pericolo classifica il pericolo come descritto di seguito. Il livello, il tipo e la fonte di pericolo, nonché le potenziali conseguenze, i divieti e le misure sono indicati come segue. Le icone riportate a sinistra specificano il rischio.

⚠ AVVERTENZA

Indica una situazione di pericolo che, se non evitata, potrebbe causare lesioni gravi o morte

⚠ ATTENZIONE

Indica una situazione di pericolo che, se non evitata, potrebbe causare lesioni lievi o moderate

AVVISO

Indica informazioni considerate importanti, ma non riguardanti pericoli (ad es. messaggi relativi a danni materiali)

IMPORTANTE

Segnala all'utilizzatore importanti pratiche o informazioni non connesse a lesioni personali né a danni materiali

2.2 Glossario dei simboli

Per una panoramica dei simboli utilizzati per il sistema CliniMACS Plus, consultare il manuale d'uso del CliniMACS Plus Instrument. Il glossario dei simboli riporta i pittogrammi usati nei manuali d'uso e sull'etichettatura dei prodotti CliniMACS.

2.3 Glossario dei termini

Aferesi	Metodo di raccolta del sangue con cui si preleva sangue intero, si seleziona e trattiene un componente desiderato e si restituiscono al donatore i componenti rimanenti
Agitatore orbitale	Dispositivo impiegato per mescolare la preparazione cellulare durante la reazione con i reagenti CliniMACS
Albumina sierica umana	Quando utilizzata con il sistema CliniMACS Plus, è necessario aggiungere HSA di grado farmaceutico, approvata nel Paese dell'utilizzatore, quale complemento alla soluzione tampone.
Anticorpi monoclonali	Singolo tipo di anticorpo diretto contro un epitopo specifico (antigene, determinante antigenico) e prodotto da un singolo clone di cellule B o da una singola linea cellulare di ibridoma formata dalla fusione di una cellula linfocitaria con una cellula mielomatosa. Alcune cellule mielomatose sintetizzano naturalmente singoli anticorpi.
Anticorpo anti-biotina	L'anticorpo riconosce le cellule che sono state precedentemente marcate con un anticorpo o un ligando idoneo e biotinilato.
Anticorpo magnetico	Anticorpo marcato superparamagneticamente
Antigene CD14	L'antigene CD14 è una glicoproteina della membrana cellulare di 53-55 kD espressa sui monociti. L'antigene CD14 è noto come recettore per il complesso LPS e la proteina legante LPS (LBP).
Antigene CD19	L'antigene CD19 è una molecola di trasduzione del segnale essenziale che regola lo sviluppo, l'attivazione e la differenziazione dei linfociti B. In quanto marcatore del lignaggio delle cellule B, il CD19 è espresso dallo stadio precoce delle cellule pro-B fino al loro stadio di linfoblasti, ma l'espressione è sottoregolata alla maturazione delle cellule B in plasmacellule. L'antigene CD19 è inoltre espresso sulla maggior parte delle cellule B maligne e su un sottogruppo di cellule dendritiche follicolari.

Antigene CD1c (BDCA-1)	Il CD1c fa parte di un cluster di geni CD1 che si ritiene sia collegato all'MHC. I geni CD1 sono raggruppati all'interno di una regione di 170 000 bp del cromosoma umano 1q23.1. Le proteine lì codificate (CD1a-e) sono espresse con eterodimeri composti dalla catena pesante del CD1 non covalentemente accoppiata con microglobulina ß2. Il CD1c è coinvolto nella presentazione dell'antigene dei glicolipidi microbici o degli antigeni lipopeptidici ai linfociti T. Nel sangue umano periferico, il CD1c (BDCA-1) è espresso sulle cellule dendritiche mieloidi di tipo 1 (MDC1) e su una sottopopolazione di linfociti B, i quali possono essere riscontrati nei linfonodi, nelle zone mantellari e nei centri germinali, nella zona marginale della milza e nel sangue periferico umano fetale e adulto.
Antigene CD25	L'antigene CD25, la catena alfa del recettore dell'interleuchina-2 a bassa affinità (IL-2Rα), è espresso sulle cellule T e B attivate, sulle cellule NK e sui monociti, nonché sulle cellule T regolatorie CD4 positive. L'antigene CD25 presenta tre regioni epitopiche A, B e C. L'anticorpo del CliniMACS CD25 Reagent riconosce l'epitopo A della molecola CD25.
Antigene CD3	L'antigene CD3 è presente sulle cellule T umane mature, sui timociti e su una sottopopolazione di cellule NK. È associato al recettore delle cellule T (TCR) ed è responsabile della trasduzione del segnale del TCR stesso. L'antigene CD3 è un complesso di cinque catene invariabili: γ, δ, ε, ζ e η. L'anticorpo CD3 riconosce tutte le cellule T, ad es. reagisce con il 70-80% dei linfociti del sangue periferico umano e con il 65-85% dei timociti. L'epitopo riconosciuto dall'anticorpo si trova sulla catena ε del complesso CD3.
Antigene CD304 (BDCA-4)	L'antigene CD304 (BDCA-4) è una glicoproteina di 130-140 kDa presente sulla superficie cellulare ed è espresso nel sangue fresco e nel midollo osseo esclusivamente sulle cellule dendritiche plasmacitoidi.
Antigene CD34	L'antigene CD34 è una proteina di membrana integrale di tipo 1 di 115 kDa altamente glicosilata con funzione non nota, che è espressa sull'1-4% delle cellule normali del midollo osseo e su meno dello 0,2% dei leucociti normali del sangue periferico, su sottopopolazioni di cellule stromali del midollo osseo e sull'endotelio dei piccoli vasi di vari tessuti.
Antigene CD4	L'antigene CD4 è espresso sulla maggior parte dei timociti e all'incirca su due terzi delle cellule T del sangue periferico; è espresso anche su monociti e macrofagi. Il CD4 è una molecola accessoria nel riconoscimento degli antigeni estranei in associazione con l'MHC di classe II. Inoltre il CD4 è un recettore per l'HIV-1.

Antigene CD45RA	L'antigene CD45RA è espresso sulle cellule T naive CD4 e CD8 positive, oltre che su sottopopolazioni di cellule B, cellule NK e monociti. Si tratta di un'isoforma del comune antigene leucocitario CD45, una proteina transmembrana tirosina fosfatasi.
Antigene CD56	L'antigene CD56 fa parte della famiglia NCAM (Neural Cell Adhesion Molecule-family), espressa all'interno del sistema ematopoietico su cellule NK e NKT.
Antigene CD8	L'antigene CD8 è un dimero legato al disolfuro ed esiste sotto forma di omodimero CD8 α o di eterodimero CD8 α/β. Il CD8 è fortemente espresso sulle cellule T CD8-positive e sui timociti nonché su una sottopopolazione di cellule NK e sulle cellule T CD8-positive γ/δ. Il CD8 agisce da co-recettore con i recettori delle cellule T ristrette MHC di classe I nel riconoscimento dell'antigene.
Antigene TCRα/β	Il TCRα/β è l'eterodimero recettoriale delle cellule T composto da due catene glicoproteiche transmembrana, le catene α e β. Entrambe le catene appartengono alla superfamiglia Ig e comprendono una regione costante e una regione variabile polimorfa. La regione variabile del TCRα/β è coinvolta nel riconoscimento dei peptidi antigenici presentati dal complesso MHC delle cellule presentanti l'antigene. L'antigene TCRα/β è espresso sulla maggior parte delle cellule T del sangue periferico.
Appendi-sacca	Supporto sul CliniMACS Plus Instrument per montare la Cell Preparation Bag, la Non-Target Cell Bag, la Priming Waste Bag, la Reapplication Bag e la sacca di tampone
BDCA	Antigene delle cellule dendritiche del sangue (Blood Dendritic Cell Antigen)
Buffer Waste Bag	Sacca degli scarti per raccogliere il tampone durante la separazione cellulare con il CliniMACS Plus Instrument
Buffer di selezione	Cfr. CliniMACS PBS/EDTA Buffer.
Cell Collection Bag	Sacca in cui le cellule bersaglio purificate vengono raccolte dopo la separazione
Cell Preparation Bag	Sacca in cui viene trasferita la preparazione cellulare e in cui vengono eseguite la marcatura magnetica e il lavaggio delle cellule
Cellule progenitrici ematopoietiche	Cellule progenitrici dei lignaggi linfoidi, mieloidi ed eritroidi

CliniMACS Anti-Biotin Reagent	Reagente per la marcatura magnetica delle cellule marcate primariamente con anticorpi biotinilati o ligandi
CliniMACS CD14 Reagent	Reagente per la marcatura magnetica delle cellule che esprimono l'antigene CD14
CliniMACS CD19 Reagent	Reagente per la marcatura magnetica delle cellule che esprimono l'antigene CD19
CliniMACS CD1c Biotin (BDCA-1)	Anticorpo biotinilato per la marcatura di cellule umane che esprimono l'antigene CD1c (BDCA-1) prima della marcatura magnetica con il CliniMACS Anti-Biotin Reagent
CliniMACS CD25 Reagent	Reagente per la marcatura magnetica delle cellule che esprimono l'antigene CD25
CliniMACS CD3 Reagent	Reagente per la marcatura magnetica delle cellule che esprimono l'antigene CD3
CliniMACS CD304 (BDCA-4) Reagent	Reagente per la marcatura magnetica delle cellule che esprimono l'antigene CD304 (BDCA-4)
CliniMACS CD34 Reagent	Reagente per la marcatura magnetica delle cellule che esprimono l'antigene CD34
CliniMACS CD4 Reagent	Reagente per la marcatura magnetica delle cellule che esprimono l'antigene CD4
CliniMACS CD45RA Reagent	Reagente per la marcatura magnetica delle cellule che esprimono l'antigene CD45RA
CliniMACS CD56 Reagent	Reagente per la marcatura magnetica delle cellule che esprimono l'antigene CD56
CliniMACS CD8 Reagent	Reagente per la marcatura magnetica delle cellule che esprimono l'antigene CD8
CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma)	Combinazione dei reagenti CliniMACS IFN-gamma Catchmatrix Reagent e CliniMACS IFN-gamma Enrichment Reagent. Il CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma) permette l'arricchimento delle cellule secernenti IFN-gamma dopo la ristimolazione *in vitro*.
CliniMACS Depletion Tubing Set	Set di tubi, connettori, colonne e sacche per il processamento della sospensione di cellule marcate magneticamente e in cui ha luogo la separazione cellulare magnetica; tali prodotti sono stati ideati appositamente per le esigenze specifiche della deplezione

CliniMACS IFN-gamma Enrichment Reagent	Componente del CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma) per la marcatura magnetica dell'IFN-gamma legato al CliniMACS IFN-gamma Catchmatrix Reagent sulle cellule secernenti IFN-gamma
CliniMACS IFN-gamma di Catchmatrix Reagent	Componente del CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma) per la marcatura superficiale dei leucociti con anticorpi IFN-gamma-specifici
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	Soluzione tampone usata per la preparazione e la separazione cellulare con il sistema CliniMACS Plus: PBS (tampone fosfato salino), con aggiunta di 1 mM di EDTA, pH 7,2. Prima dell'uso, al CliniMACS PBS/EDTA Buffer va aggiunta HSA di grado farmaceutico fino a una concentrazione finale dello 0,5% (peso/volume, cioè 5 g di HSA per litro di soluzione tampone).
CliniMACS Plus Instrument	Strumento per la separazione cellulare magnetica basato sulla tecnologia MACS
CliniMACS TCRα/β-Biotin	Anticorpo biotinilato per la marcatura di cellule umane che esprimono l'antigene TCRα/β prima della marcatura magnetica con CliniMACS Anti-Biotin Reagent
CliniMACS Tubing Set, CliniMACS Tubing Set LS	Set di tubi, connettori, colonne e sacche per il processamento della sospensione delle cellule marcate magneticamente e in cui ha luogo la separazione cellulare magnetica
Colonna di selezione	Cfr. Colonna di separazione.
Colonna di separazione	Colonna in cui le cellule marcate magneticamente vengono separate quando sono esposte al campo magnetico
Connettore Luer	Collegamento a vite, parte del set di tubi
MDC	Cellule dendritiche mieloidi
EDTA	Acido etilen-diamino-tetra-acetico
Estrattore di plasma	Dispositivo utilizzato per estrarre liquido dalla Cell Preparation Bag dopo il lavaggio delle cellule
Filtro di pre-sistema	Dispositivo filtrante di 40 µm tra la Cell Preparation Bag e la pre-colonna utilizzato per catturare grumi e detriti cellulari
Forasacche	Porta di iniezione, ad es. per la rimozione dei campioni o l'aggiunta di reagenti CliniMACS alla Cell Preparation Bag
Guarnizione anulare	Parte di un set di tubi che consente al tubo della pompa di rimanere nella sua posizione corretta

HSA	Albumina sierica umana
IgG	Immunoglobulina G
Interruttore di sicurezza della pompa	Sensore che impedisce il funzionamento della pompa quando la porta della pompa è aperta
Leucaferesi	Aferesi per la raccolta di leucociti
Luer/Spike Interconnector	Set di trasferimento con pin perforante (perforatore) e adattatore per siringa (Luer femmina) per plasma o fluidi
Marcatura	Reazione delle cellule con un reagente per marcatura magnetica, ad es. CliniMACS CD34 Reagent per le cellule CD34 positive
Negative Fraction Bag	Sacca del CliniMACS Tubing Set e del CliniMACS Tubing Set LS che contiene la frazione di cellule non-bersaglio
Non-Target Cell Bag	Sacca del CliniMACS Depletion Tubing Set che contiene la frazione di cellule non-bersaglio
PBMC	Cellula mononucleata del sangue periferico (Peripheral Blood Mononuclear Cell)
Plasma Waste Bag	Sacca degli scarti per la raccolta del plasma in eccesso prima della marcatura
Pompa peristaltica	Pompa per tubi utilizzata nel CliniMACS Plus Instrument per controllare la velocità di flusso nel set di tubi
Pre-colonna	Prima colonna nel CliniMACS Tubing Set e nel CliniMACS Tubing Set LS, serve da filtro per catturare cellule che presentano interazioni aspecifiche con la matrice delle colonne
Prelavaggio	Passaggio precedente la separazione cellulare in cui il tampone viene fatto fluire attraverso il set di tubi
Prodotto cellulare iniziale	Preparazione contenente cellule che viene impiegata come materiale di partenza per il processo separazione CliniMACS Plus, ad es. raccolta per leucaferesi, PBMC o midollo osseo
Priming Waste Bag	Sacca in cui viene raccolto il tampone dalla fase di prelavaggio
Procedura in-bag	Processamento e trasferimento in condizioni sterili delle cellule nell'ambiente chiuso delle sacche di trasferimento

Programma di separazione	Programma software progettato per l'arricchimento o la deplezione di sottogruppi di cellule marcate magneticamente da una popolazione cellulare mista. La scelta viene effettuata da un menu di programmi di separazione a seconda della separazione che si intende effettuare
Raccordo a T	Raccordo a forma di T su un set di tubi dove si incontrano tre tubi
Reagente di separazione	Reagente per la marcatura magnetica delle cellule, ad es. CliniMACS CD34 Reagent
Reapplication Bag	Sacca del CliniMACS Depletion Tubing Set in cui le cellule non marcate vengono raccolte provvisoriamente durante la separazione. Le cellule non marcate provenienti dalla Reapplication Bag vengono applicate due volte alla colonna di separazione allo scopo di garantire un'elevata purezza delle cellule bersaglio.
Sacca di trasferimento	Sacca con un tubo e un perforatore sull'estremità
Scomparto per le sacche	Scomparto per il CliniMACS Plus Instrument in cui vengono collocate la Negative Fraction Bag e la Buffer Waste Bag
Sensore per i liquidi	Componente del CliniMACS Plus Instrument per la rilevazione dei liquidi nei tubi
Set di trasferimento di plasma	Set di trasferimento con due perforatori per plasma o fluidi
Supporto della colonna di selezione	Cfr. Supporto della colonna di separazione.
Supporto della colonna di separazione	Guide sagomate nel contenitore del magnete che mantengono la colonna di separazione in posizione
Supporto della pre-colonna	Supporto montato sul CliniMACS Plus Instrument che mantiene la pre-colonna in posizione
Termosaldatrice	Dispositivo riscaldante impiegato per la saldatura sterile dei tubi in PVC
WBC	White Blood Cells
White blood cells	Globuli bianchi
Wash Waste Bag	Sacca di raccolta in cui il sovranatante del lavaggio viene raccolto mediante separazione dalla sospensione cellulare sedimentata dopo le fasi di centrifugazione durante la preparazione del campione

rpm	Giri al minuto (Revolutions Per Minute)
×g	Multipli dell'accelerazione gravitazionale del globo terrestre

3 Avvertenze e precauzioni

In questo capitolo vengono illustrati i potenziali rischi associati al funzionamento del sistema CliniMACS Plus. È necessario attenersi sempre alle istruzioni di sicurezza locali per l'area di lavoro, alle direttive e alle norme di buona pratica di fabbricazione, salute, sicurezza e prevenzione degli incidenti. Per le istruzioni per l'uso, ad esempio le avvertenze e le precauzioni relative alla manipolazione di materiali a rischio biologico e della preparazione cellulare iniziale nonché dei componenti del sistema CliniMACS Plus, fare riferimento alle sezioni pertinenti delle istruzioni per l'uso dei rispettivi componenti. Le istruzioni dettagliate per l'uso del CliniMACS Plus Instrument sono riportate nel manuale d'uso del CliniMACS Plus Instrument.

Qualsiasi incidente grave verificatosi in relazione al presente prodotto deve essere segnalato a Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG – tramite le informazioni di contatto fornite – e all'autorità competente dello Stato membro nel quale è residente l'utilizzatore del presente prodotto.

3.1 In associazione al processo

⚠ AVVERTENZA

Rischio di interruzione del processo o di danni allo strumento. Rischio di interruzione del processo o di danni allo strumento se le procedure vengono svolte da operatori non formati. Tutte le procedure di processamento devono essere eseguite esclusivamente da operatori formati. La formazione degli operatori sarà svolta da un rappresentante qualificato di Miltenyi Biotec.

⚠ ATTENZIONE

Rischio di riduzione delle prestazioni del processo. Temperature più basse o più alte rispetto alla temperatura ambiente possono determinare una minore vitalità, purezza e resa delle cellule bersaglio. Eseguire la preparazione del campione e la separazione cellulare a temperatura ambiente (intervallo +19 °C e +25 °C [+66 °F e +77 °F]).

⚠ ATTENZIONE

La sicurezza dell'apparecchiatura potrebbe essere compromessa. L'uso di apparecchiature in maniera difforme dalle istruzioni del fabbricante potrebbe compromettere la sicurezza dell'apparecchiatura. Leggere attentamente e accertarsi di aver compreso le informazioni sulla sicurezza, le avvertenze, le precauzioni e le istruzioni per il corretto funzionamento del sistema CliniMACS Plus riportate nelle istruzioni per l'uso di CliniMACS Plus e in tutte le raccomandazioni relative alla sicurezza rilasciate da Miltenyi Biotec.

- La produzione e l'uso di cellule bersaglio nell'uomo sono soggetti alle normative nazionali e ai regolamenti applicabili – ad esempio, per l'UE si applica la direttiva 2004/23/CE (tessuti e cellule umani) o la direttiva 2002/98/CE (sangue umano e suoi componenti). Pertanto qualsiasi applicazione clinica delle cellule bersaglio rientra esclusivamente nella responsabilità dell'utilizzatore del sistema CliniMACS Plus.

- Tutti i materiali che sono entrati in contatto con liquidi corporei devono essere trattati come materiali infetti. Osservare le disposizioni per la manipolazione di detti materiali.
- Tutti i tubi, i raccordi, le valvole, la pre-colonna e la colonna di separazione devono essere controllati accuratamente per verificare l'assenza di perdite durante la fase di prelavaggio.
- Tutte le sacche, comprese quelle utilizzate per la preparazione dei campioni, devono essere conservate fino al completamento dell'analisi finale delle cellule raccolte e alla conferma dell'avvenuta separazione delle cellule bersaglio.

3.2 Reagenti CliniMACS e coniugati con biotina

- Quando la frazione di cellule bersaglio viene infusa o iniettata nei pazienti, questi possono ricevere tracce di anticorpi murini e ferro destrano.
- Le biglie di ferro destrano e/o gli anticorpi murini possono causare reazioni allergiche o anafilattiche nei pazienti. Devono essere disponibili attrezzature e farmaci per la terapia intensiva.
- La separazione cellulare con i reagenti CliniMACS e i coniugati con biotina deve essere effettuata esclusivamente da operatori con specifica formazione.
- Gli operatori che utilizzano i reagenti CliniMACS e i coniugati con biotina devono avere esperienza nella separazione delle cellule provenienti dal midollo osseo o dal sangue periferico.
- Le cellule non-bersaglio non sono destinate all'uso terapeutico e non possono essere reinfuse nei pazienti.
- I reagenti CliniMACS e i coniugati con biotina sono destinati esclusivamente all'uso *in vitro* e non sono destinati all'uso terapeutico o all'infusione diretta nei pazienti.
- I reagenti CliniMACS e i coniugati con biotina non sono raccomandati per l'utilizzo in pazienti con sensibilità nota o sospetta alle immunoglobuline murine o al ferro destrano.
- I pazienti potrebbero sviluppare anticorpi umani antimurini (HAMA).
- Non usare dopo la scadenza stampata sull'etichetta del prodotto.
- Da non usare se la confezione è danneggiata. Usare il reagente solo se il flaconcino risulta intatto e sigillato.

3.3 Manipolazione di materiale a rischio biologico

⚠ AVVERTENZA

Rischio di lesioni gravi o morte. A seconda del materiale biologico utilizzato, il contatto può causare gravi lesioni personali o morte. Indossare sempre i dispositivi di protezione individuale conformemente alle avvertenze e alle precauzioni, soprattutto qualora venga o sia stato utilizzato materiale a rischio biologico.

- Per evitare la contaminazione della preparazione cellulare iniziale, tutte le fasi di preparazione devono essere eseguite in condizioni sterili e utilizzando tecniche asettiche (ad es., nella cappa a flusso laminare).
- L'operatore che esegue la separazione cellulare deve essere addestrato all'uso corretto dell'apparecchiatura e alla manipolazione dei prodotti ematici e dell'aspirato di midollo osseo.
- L'operatore che esegue la separazione cellulare deve indossare indumenti idonei (ad es., camice, guanti e occhiali o maschere) quando lavora con campioni di pazienti e maneggia materiale potenzialmente a rischio biologico.
- Tutti i prodotti ematici devono essere trattati come potenziale rischio biologico. Il prodotto di leucaferesi, gli emoderivati, l'aspirato di midollo osseo, le cellule raccolte, il tampone utilizzato, il set di tubi utilizzato e gli altri materiali entrati a contatto con questi liquidi devono essere trattati come materiale a rischio biologico secondo i requisiti ospedalieri o istituzionali standard.
- Il CliniMACS Plus Instrument deve essere considerato un potenziale rischio biologico dopo ogni ciclo di separazione e deve essere pulito con un detergente biocida acquoso (ad es. Bacillol® plus o Meliseptol®, consultare anche la sezione "Pulizia e manutenzione" nel manuale d'uso del CliniMACS Plus Instrument) secondo i requisiti ospedalieri o istituzionali standard.
- I materiali monouso devono essere trattati come materiali a rischio biologico secondo gli standard ospedalieri o istituzionali.

3.4 Preparazione cellulare iniziale

IMPORTANTE

La marcatura e la separazione cellulare devono iniziare il prima possibile dopo la raccolta della preparazione cellulare iniziale. Quando si inizia la procedura di marcatura e separazione, la preparazione non deve avere più di 24 ore.

- La preparazione cellulare iniziale (ad es., prodotto di leucaferesi) deve essere raccolta secondo le procedure ospedaliere o istituzionali standard in sacche di raccolta standard.
- Il contenitore contenente la preparazione cellulare iniziale deve essere etichettato con i dati identificativi del paziente, l'ora, la data e il luogo di raccolta secondo le procedure specificate per l'uso con il protocollo clinico.
- Per il trasporto, la preparazione cellulare iniziale deve essere riposta in contenitori isolati e conservata a temperatura ambiente controllata (intervallo +19 °C e +25 °C [+66 °F e +77 °F]) secondo le procedure standard di raccolta del sangue ospedaliere o istituzionali approvate per l'uso con il protocollo clinico. Non refrigerare. Durante il trasporto la concentrazione cellulare non deve superare $0{,}2\times10^9$ cellule per mL.
- Evitare di mescolare intensamente il materiale della preparazione cellulare iniziale.
- Se la preparazione cellulare iniziale deve essere conservata, ad es. per una notte, va mantenuta a temperatura ambiente controllata (intervallo +19 °C e +25 °C [+66 °F e +77 °F]). Durante la conservazione, la concentrazione di leucociti non deve mai superare $0{,}2\times10^9$ cellule per mL.
- Le cellule devono essere conservate in plasma autologo. Se la concentrazione cellulare è superiore a $0{,}2\times10^9$ cellule per mL, diluire la preparazione cellulare iniziale con plasma autologo.

4 Il sistema CliniMACS Plus

Il sistema CliniMACS Plus, che comprende i componenti CliniMACS Plus Instrument, reagenti CliniMACS, CliniMACS Tubing Set, CliniMACS PBS/EDTA Buffer e altri accessori che devono essere usati in combinazione, è destinato alla separazione *in vitro* di specifiche cellule umane per applicazioni cliniche.

IMPORTANTE
Per le istruzioni per l'uso, ad es. avvertenze e precauzioni, riguardanti i componenti del sistema CliniMACS Plus, consultare le istruzioni per l'uso accluse al rispettivo componente.

4.1 CliniMACS Plus Instrument

Il CliniMACS Plus Instrument è un dispositivo elettromeccanico che incorpora un magnete permanente, una pompa peristaltica, valvole a pinza, componenti elettronici e software.

4.2 Reagenti CliniMACS e coniugati con biotina

I reagenti CliniMACS sono soluzioni colloidali, non viscose, di colore scuro che contengono i coniugati di anticorpi cellula-specifici in soluzione tampone. I reagenti sono costituiti dall'anticorpo accoppiato chimicamente a particelle superparamagnetiche.

I coniugati con biotina CliniMACS sono soluzioni limpide e incolori contenenti anticorpi uniti alla biotina tramite legame covalente in un tampone. Gli anticorpi sono altamente specifici, rendendo possibile la marcatura *in vitro* di cellule bersaglio rare.

4.3 Set di tubi CliniMACS

I set di tubi CliniMACS sono monouso, sterili, progettati per l'impiego in combinazione con il CliniMACS Plus Instrument per l'arricchimento o la deplezione *in vitro* di cellule umane da popolazioni eterogenee di cellule ematologiche.

4.4 CliniMACS PBS/EDTA Buffer

Il CliniMACS PBS/EDTA Buffer è un fluido per il lavaggio e il trasporto strumentale ai fini della separazione *in vitro* di cellule umane.

4.5 Accessori CliniMACS

- **set di trasferimento di plasma:**
  set di trasferimento con due perforatori per plasma o fluidi, Transfer Set Coupler/Coupler (REF 200-073-902) o equivalente
- **Luer/Spike Interconnector:**
  set di trasferimento con perforatore e adattatore per siringa (Luer femmina) per plasma o fluidi, Luer/Spike Interconnector (REF 200-073-903) o equivalente

4.6 Materiali aggiuntivi necessari

Oltre ai prodotti CliniMACS, potrebbero essere necessari materiali aggiuntivi per una separazione CliniMACS Plus:

- **sacche di trasferimento, idonee per la centrifugazione:**
  sacca di trasferimento da 150 mL, Terumo o equivalente
  sacca di trasferimento da 600 mL, Terumo o equivalente
  sacca di trasferimento da 1000 mL, Terumo o equivalente
- **sacche per colture cellulari, permeabili ai gas:**
  MACS GMP Cell Differentiation Bag – 100 mL, o equivalente
- **forasacche:**
  forasacche, Terumo o equivalente
- **filtro pre-sistema:**
  filtro per la trasfusione di sangue, Haemonetics® o equivalente
- **siringhe e aghi:**
  siringhe adeguate (5 mL, 10 mL, 20 mL, 50 mL) e aghi ipodermici da 20 gauge
- **pinzette per clampaggio**
- **provette per campioni**
- **albumina sierica umana (HSA):**
  utilizzare esclusivamente HSA di qualità farmaceutica, disponibile come prodotto approvato nel Paese dell'utilizzatore.
- **immunoglobulina G di grado clinico:**
  utilizzare esclusivamente IgG di grado farmaceutico, disponibili come farmaco autorizzato nel Paese dell'utilizzatore, ad es. per la Germania: Gamunex® 10% o equivalente.
- **terreno di coltura cellulare:**
  ad es. RPMI 1640 o equivalente
- **materiali applicazione-specifici:**
  singolo anticorpo o ligando cellula-specifico biotinilato; siero AB o, in alternativa, siero autologo

4.7 Apparecchiature necessarie

- **gruppo di continuità:**
  UPS consigliato: APC Smart-UPS 1500 VA USB & Serial 230 V, prodotto da APC (American Power Conversion) o equivalente
- **cappa a flusso laminare**
- **connettore sterile per tubi:**
  Terumo Sterile Connection Device (TSCD®) o equivalente
- **agitatore orbitale:**
  agitatori a piattaforma, Heidolph Instruments o equivalente
- **centrifuga:**
  centrifuga, Sorvall o equivalente, e cestelli per la centrifugazione con cappucci per il contenimento degli aerosol
- **estrattore di plasma:**
  stand per la separazione del plasma, apparecchiatura Terumo o equivalente
- **bilancia da banco:**
  bilancia da laboratorio, Mettler Toledo o equivalente, con capacità di 1 kg; risoluzione fino a 0,1 g
- **termosaldatrice per tubi:**
  termosaldatrice manuale Hematron III, Baxter o equivalente
- **spremitubi:**
  spremitubi, Baxter o equivalente
- **contenitore per materiali biologici pericolosi di scarto**

Materiale aggiuntivo necessario per il CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma):

- piastra di coltura 24 pozzetti Corning™ Costar™, piastra di coltura 24 pozzetti Sigma Aldrich o equivalente
- MiniMACS™ Separation Unit, Miltenyi Biotec, (REF 130-042-102)
- MS Columns, Miltenyi Biotec, (REF 130-042-201)
- Filtro di pre-separazione, Miltenyi Biotec, (REF 130-041-407)
- MACSmix™ Tube Rotator, Miltenyi Biotec, (REF 130-090-753)

5 Panoramica delle applicazioni

5.1 Quattro FASI per le cellule bersaglio

Nel seguente capitolo viene presentata una panoramica della separazione CliniMACS Plus. La separazione CliniMACS Plus si svolge in quattro FASI. Nella prima fase le cellule vengono preparate e marcate magneticamente. Nella seconda fase si sceglie un programma di separazione adeguato. Nella terza fase il set di tubi viene installato sul CliniMACS Plus Instrument e nella quarta fase le cellule vengono separate automaticamente.

Può essere necessaria la registrazione dei dati di processo relativi all'applicazione. Per le schede di supporto, contattare il Miltenyi Biotec Technical Support.

Il manuale d'uso del CliniMACS Plus (Applicazioni) comprende diverse opzioni per ciascuna fase (differenti reagenti, set di tubi e programmi). Prima di avviare un'applicazione, scegliere i capitoli specifici dell'applicazione stessa (capitolo 6) e la spiegazione dettagliata delle FASI 1-4 (capitolo 7) in base alla tabella riassuntiva che inizia alla pagina successiva. La tabella riassuntiva contiene informazioni sulle sezioni applicabili del manuale d'uso. La tabella riassuntiva si basa sul tipo e sul numero di reagenti, sul numero di cellule, sul tipo di set di tubi e sul relativo programma di separazione necessario per la separazione.

FASE 1: Preparazione delle cellule e marcatura magnetica

La FASE 1 descrive l'approntamento della preparazione cellulare e la marcatura magnetica di cellule specifiche che esprimono il rispettivo antigene. Seguire le istruzioni nella rispettiva sezione. Continuare con la FASE 2.

FASE 2: Scelta del programma di separazione

La FASE 2 descrive la selezione di un programma di separazione del CliniMACS Plus Instrument. A seconda del tipo di cellula e del numero di cellule da separare, è necessario selezionare programmi diversi. Per determinare il programma applicabile, consultare la tabella riassuntiva alla pagina successiva. Leggere la sezione relativa al programma di separazione selezionato. Seguire le istruzioni fornite nella sezione corrispondente. Continuare con la FASE 3.

FASE 3: Installazione del set di tubi CliniMACS

La FASE 3 descrive l'installazione del set di tubi sul CliniMACS Plus Instrument. Seguire le istruzioni nella rispettiva sezione. Continuare con la FASE 4.

FASE 4: Separazione CliniMACS Plus

La FASE 4 descrive la separazione CliniMACS Plus automatica. Il CliniMACS Plus Instrument esegue la procedura di separazione cellulare automatica (scelta nella FASE 2). Seguire le istruzioni nella rispettiva sezione.

IMPORTANTE

La tabella riassuntiva alle pagine seguenti riassume le informazioni sulle applicazioni tipiche dei reagenti CliniMACS. Quando si deve separare un numero diverso di cellule bersaglio, fare riferimento alle istruzioni fornite nella panoramica per le specifiche applicazioni, dove sono riportate le informazioni sulla capacità massima di ciascuna. Seguire le istruzioni delle sezioni specifiche delle applicazioni e le spiegazioni dettagliate delle FASI 1-4. Cfr. Tabella riassuntiva.

5.2 Tabella riassuntiva

Capacità dell'applicazione	Flaconcino/i di reagente	Set di tubi	Programma di separazione	Sezione specifica dell'applicazione	Spiegazione dettagliata per sezione delle FASI 1-4			
					FASE 1	FASE 2	FASE 3	FASE 4
Anti-Biotin (REF 173-01) – Arricchimento								
≤40×10^9 cellule in totale	1× Anti-Biotin Reagent	1× CliniMACS Tubing Set (REF 161-01)	ENRICHMENT 1.1	6.3	7.1	7.2.3	7.3.1	7.4.2
Anti-Biotin (REF 173-01) – Deplezione (applicazione su scala normale)								
≤40×10^9 cellule in totale	1× Anti-Biotin Reagent	1× CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01)	DEPLETION 2.1	6.3	7.1	7.2.5	7.3.1	7.4.4
Anti-Biotin (REF 173-01) – Deplezione (applicazione su scala larga)								
>40–80×10^9 cellule in totale	2× Anti-Biotin Reagent	1× CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01)	DEPLETION 2.1	6.3	7.1	7.2.5	7.3.1	7.4.4
CCS (REF 279-01) – Arricchimento								
Cellule secernenti IFN su un totale di ≤1×10^9 cellule	1 kit (2 flaconcini di reagente)	1× CliniMACS Tubing Set (REF 161-01)	ENRICHMENT 3.2	6.17	7.1	7.2.4	7.3.1	7.4.3
CD1c (BDCA-1)-Biotin (REF 277-01) – Deplezione - Parte 1 di 2								
≤5×10^9 cellule CD19 positive su ≤40×10^9 cellule totali (WBC)	1× CD19 Reagent e 1× CD1c (BDCA-1)-Biotin	1× CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01)	DEPLETION 2.1	6.12	7.1	7.2.5	7.3.1	7.4.4
CD1c (BDCA-1)-Biotin (REF 277-01) – Arricchimento - Parte 2 di 2								
≤0,2×10^9 cellule CD1c (BDCA-1) positive su ≤40×10^9 cellule totali (WBC)	1× Anti-Biotin Reagent	1× CliniMACS Tubing Set (REF 161-01)	ENRICHMENT 3.2	6.13	7.1	7.2.4	7.3.1	7.4.3
CD3 (REF 273-01) – Deplezione (applicazione su scala normale)								
≤15×10^9 cellule CD3 positive su ≤40×10^9 cellule totali	1× CD3 Reagent	1× CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01)	DEPLETION 2.1	6.5	7.1	7.2.5	7.3.1	7.4.4
CD3 (REF 273-01) – Deplezione (applicazione su larga scala)								
>15–20×10^9 cellule CD3 positive su >40–80×10^9 cellule totali	2× CD3 Reagent	1× CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01)	DEPLETION 2.1	6.5	7.1	7.2.5	7.3.1	7.4.4
CD3 (REF 273-01) – Deplezione (applicazione su scala normale)								
≤15×10^9 cellule CD3 positive su ≤40×10^9 cellule totali	1× CD3 Reagent	1× CliniMACS Depletion Tubing Set (REF 261-01)	DEPLETION 3.1	6.5	7.1	7.2.6	7.3.3	7.4.5

Capacità dell'applicazione	Flaconcino/i di reagente	Set di tubi	Programma di separazione	Sezione specifica dell'applicazione	Spiegazione dettagliata per sezione delle FASI 1-4			
					FASE 1	FASE 2	FASE 3	FASE 4
CD3 (REF 273-01) – Deplezione (applicazione su larga scala)								
>15–30×10^9 cellule CD3 positive su >40-80×10^9 cellule totali	2× CD3 Reagent	1× CliniMACS Depletion Tubing Set (REF 261-01)	DEPLETION 3.1	6.5	7.1	7.2.6	7.3.3	7.4.5
CD4 (REF 276-01) – Arricchimento								
≤5×10^9 cellule CD4 positive su ≤40×10^9 cellule totali	1× CD4 Reagent	1× CliniMACS Tubing Set (REF 161-01)	ENRICHMENT 1.1	6.10	7.1	7.2.3	7.3.1	7.4.2
CD4 (REF 276-01) – Deplezione								
≤12×10^9 cellule CD4 positive su ≤40×10^9 cellule totali	1× CD4 Reagent	1× CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01)	DEPLETION 2.1	6.10	7.1	7.2.5	7.3.1	7.4.4
CD8 (REF 275-01) – Arricchimento								
≤4×10^9 cellule CD8 positive su ≤40×10^9 cellule totali	1× CD8 Reagent	1× CliniMACS Tubing Set (REF 161-01)	ENRICHMENT 1.1	6.8	7.1	7.2.3	7.3.1	7.4.2
CD8 (REF 275-01) – Deplezione								
≤4×10^9 cellule CD8 positive su ≤40×10^9 cellule totali	1× CD8 Reagent	1× CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01)	DEPLETION 2.1	6.8	7.1	7.2.5	7.3.1	7.4.4
Combinazione CD4/CD8 (REF 276-01/REF 275-01) – Deplezione								
≤12×10^9 cellule CD4 positive e ≤4×10^9 cellule CD8 positive su ≤40×10^9 cellule totali	1× CD4 Reagent e 1× CD8 Reagent	1× CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01)	DEPLETION 2.1	6.11	7.1	7.2.5	7.3.1	7.4.4
CD14 (REF 272-01) – Arricchimento								
≤4×10^9 cellule CD14 positive su ≤20×10^9 cellule totali	1× CD14 Reagent	1× CliniMACS Tubing Set (REF 161-01)	ENRICHMENT 1.1	6.2	7.1	7.2.3	7.3.1	7.4.2
CD19 (REF 179-01) – Deplezione								
≤5×10^9 cellule CD19 positive su ≤40×10^9 cellule totali	1× CD19 Reagent	1× CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01)	DEPLETION 2.1	6.6	7.1	7.2.5	7.3.1	7.4.4

Capacità dell'applicazione	Flaconcino/i di reagente	Set di tubi	Programma di separazione	Sezione specifica dell'applicazione	Spiegazione dettagliata per sezione delle FASI 1-4			
					FASE 1	FASE 2	FASE 3	FASE 4
Combinazione CD3/CD19 (REF 273-01/REF 179-01) – Deplezione								
≤15×10^9 cellule CD3 positive e ≤5×10^9 cellule CD19 positive su ≤40×10^9 cellule totali	1× CD3 Reagent e 1× CD19 Reagent	1× CliniMACS Depletion Tubing Set (REF 261-01)	DEPLETION 3.1	6.7	7.1	7.2.6	7.3.3	7.4.5
CD25 (REF 274-01) – Arricchimento								
≤0,6×10^9 cellule CD25 positive su ≤40×10^9 cellule totali (WBC)	1× CD25 Reagent	1× CliniMACS Tubing Set (REF 161-01)	ENRICHMENT 3.2	6.9	7.1	7.2.4	7.3.1	7.4.3
CD25 (REF 274-01) – Arricchimento								
≤0,6×10^9 cellule CD25 positive ad alta espressione di ≤40×10^9 cellule totali (WBC)	1× CD25 Reagent	1× CliniMACS Tubing Set (REF 161-01)	ENRICHMENT 3.2	6.9	7.1	7.2.4	7.3.1	7.4.3
CD25 (REF 274-01) – Deplezione (applicazione su scala normale)								
≤6×10^9 cellule CD25 positive su ≤40×10^9 cellule totali (WBC)	1× CD25 Reagent	1× CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01)	DEPLETION 2.1	6.9	7.1	7.2.5	7.3.1	7.4.4
CD25 (REF 274-01) – Deplezione (applicazione su larga scala)								
>6-12×10^9 cellule CD25 positive su >40-80×10^9 cellule totali (WBC)	2× CD25 Reagent	1× CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01)	DEPLETION 2.1	6,9	7.1	7.2.5	7.3.1	7.4.4
CD34 (REF 171-01) – Arricchimento (applicazione su scala normale)								
≤0,6×10^9 cellule CD34 positive su ≤60×10^9 cellule totali	1× CD34 Reagent	1× CliniMACS Tubing Set (REF 161-01)	CD34 SELECTION 1	6.1	7.1	7.2.2	7.3.1	7.4.1
CD34 (REF 171-01) – Arricchimento (applicazione su larga scala)								
>0,6–1,2×10^9 cellule CD34 positive su >60–120×10^9 cellule totali	2× CD34 Reagent	1× CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01)	CD34 SELECTION 2	6.1	7.1	7.2.2	7.3.1	7.4.1
CD45RA (REF 701-46) – Deplezione								
≤20×10^9 cellule CD45RA positive su ≤50×10^9 cellule totali	1× CD45RA Reagent	1× CliniMACS Depletion Tubing Set (REF 261-01)	DEPLETION 3.1	6.16	7.1	7.2.6	7.3.3	7.4.5

Capacità dell'applicazione	Flaconcino/i di reagente	Set di tubi	Programma di separazione	Sezione specifica dell'applicazione	Spiegazione dettagliata per sezione delle FASI 1-4			
					FASE 1	FASE 2	FASE 3	FASE 4
CD56 (REF 271-01) – Arricchimento								
≤5×10^9 cellule CD56 positive su ≤40×10^9 cellule totali	1× CD56 Reagent	1× CliniMACS Tubing Set (REF 161-01)	ENRICHMENT 1.1	6.4	7.1	7.2.3	7.3.1	7.4.2
CD304 (BDCA-4) (REF 278-01) – Arricchimento								
≤0,2×10^9 cellule CD304 (BDCA-4) positive su ≤40×10^9 cellule totali	1× CD304 (BDCA-4) Reagent	1× CliniMACS Tubing Set (REF 161-01)	ENRICHMENT 3.2	6.14	7.1	7.2.4	7.3.1	7.4.3
TCRα/β-Biotin (REF 701-48/REF 173-01) – Deplezione								
≤24×10^9 cellule TCRα/β positive su ≤60×10^9 cellule totali	1× TCRα/β-Biotin e 2× Anti-Biotin Reagent	1× CliniMACS Depletion Tubing Set (REF 261-01)	DEPLETION 3.1	6.15	7.1	7.2.6	7.3.3	7.4.5

Tabella 5.1: Panoramica delle applicazioni disponibili con rispettivi set di tubi e programmi di separazione

6 Panoramica delle FASI 1-4 nelle specifiche applicazioni

6.1 Arricchimento di cellule CD34 positive

Il CliniMACS Plus CD34 System, comprendente il CliniMACS Plus Instrument, il CliniMACS CD34 Reagent, il CliniMACS Tubing Set o il CliniMACS Tubing Set LS nonché il CliniMACS PBS/EDTA Buffer, è destinato all'arricchimento *in vitro* di cellule progenitrici ematopoietiche umane CD34 positive da popolazioni eterogenee di cellule ematiche.

6.1.1 FASE 1: Preparazione delle cellule e marcatura magnetica

Primo intervento necessario

Capacità dell'applicazione

- Applicazione su scala normale: fino a $0{,}6\times10^9$ cellule CD34 positive da un totale di fino a 60×10^9 cellule (WBC)
- Applicazione su larga scala: più di $0{,}6\times10^9$ e fino a $1{,}2\times10^9$ cellule CD34 positive da un totale di fino a 120×10^9 cellule (WBC)

⚠ ATTENZIONE

Rischio di prestazioni di separazione insufficienti delle cellule marcate. Se si superano le specifiche dell'applicazione, vi è il rischio di una marcatura specifica insufficiente. Utilizzare la quantità necessaria di cellule e reagente come descritto per la rispettiva applicazione.

Materiali CliniMACS necessari

Materiale	Numero di catalogo	Quantità	Programma di separazione
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1	–
CliniMACS CD34 Reagent	171-01	• 1 flaconcino (scala normale) • 2 flaconcini (larga scala)	–
CliniMACS Tubing Set	161-01	1 set di tubi	CD34 SELECTION 1
CliniMACS Tubing Set LS	162-01	1 set di tubi	CD34 SELECTION 2
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	Sacche da 3×1000 mL[1]	–

1 Prima dell'uso, aggiungere HSA al CliniMACS PBS/EDTA Buffer fino a una concentrazione finale dello 0,5% (p/v).

Tabella 6.1: Materiali CliniMACS necessari per l'arricchimento di cellule CD34 positive

Materiali aggiuntivi necessari

- **Cell Preparation Bag:**
  una sacca di trasferimento da 600 mL idonea per la centrifugazione nonché un forasacche e due set di trasferimento di plasma, da utilizzare durante la procedura di preparazione delle cellule
- **Plasma Waste Bag (1) e Wash Waste Bag (2):**
  tre sacche di trasferimento da 600 mL idonee per la centrifugazione
- **Cell Collection Bag:**
  una sacca di trasferimento da 150 mL in combinazione con un Luer/Spike Interconnector per collegare la Cell Collection Bag al set di tubi
- un filtro di pre-sistema
- pinzette per clampaggio
- siringhe idonee (di diverse dimensioni) e aghi ipodermici da 20 gauge
- albumina sierica umana (HSA) da aggiungere al CliniMACS PBS/EDTA Buffer fino a una concentrazione finale dello 0,5% (p/v)
- provette per campioni

▶ Preparazione delle sacche

Determinare il peso della Cell Collection Bag e della Cell Preparation Bag vuote come descritto nella sezione 7.1.1 a pagina 123.

Marcatura magnetica delle cellule

Fare riferimento alla sezione 7.1 “FASE 1: Preparazione delle cellule e marcatura magnetica” a pagina 123 per una descrizione dettagliata delle seguenti fasi.

▶ Analisi della preparazione cellulare iniziale

▶ Trasferimento della preparazione cellulare iniziale nella Cell Preparation Bag

Se il peso della preparazione cellulare iniziale è superiore a 200 g, ma il numero di cellule è inferiore a 120×10^9 cellule totali e $1{,}2\times10^9$ cellule CD34 positive, centrifugare il campione per ridurre il volume a 200 g al massimo e quindi procedere con i seguenti passaggi.

▶ Diluizione della preparazione cellulare iniziale

Aggiungere il tampone: Peso del tampone da aggiungere = Peso della preparazione cellulare iniziale × 2

▶ Centrifugazione

Centrifugare a 200×g, senza freno, per 15 minuti, a temperatura ambiente (RT: intervallo +19 °C e +25 °C [+66 °F e +77 °F]).

▶ Aggiustamento del volume: volume di marcatura 95 g (±5 g) (applicazione su scala normale) o 190 g (±5 g) (applicazione su larga scala)

1. Rimuovere il sovranatante per regolare il campione utilizzando la seguente equazione: Peso del sovranatante da rimuovere = Peso della preparazione cellulare diluita – Volume di marcatura
2. Risospendere il pellet cellulare.

▶ Incubazione con il CliniMACS CD34 Reagent

1. Aggiungere 1 o 2 flaconcini di CliniMACS CD34 Reagent (cfr. Tabella 6.1). Mescolare delicatamente il contenuto.
2. Incubare su un rotatore orbitale (25 rpm) per 30 minuti a temperatura ambiente.

▶ Rimozione del reagente in eccesso

1. Riempire la Cell Preparation Bag con tampone.
2. Centrifugare (200×g, senza freno, per 15 minuti, a temperatura ambiente).
3. Rimuovere quanto più sovranatante possibile. **Nota:** rimuovere almeno 500 g di sovranatante. Se il sovranatante rimosso è inferiore a questi valori, si consiglia di eseguire un totale di tre fasi di lavaggio (anziché solo due). In caso contrario, la rimozione del reagente non legato potrebbe essere insufficiente.
4. Risospendere il pellet cellulare.
5. Riempire la Cell Preparation Bag con tampone.
6. Centrifugare (200×g, senza freno, per 15 minuti, a temperatura ambiente).
7. Rimuovere quanto più sovranatante possibile.
8. Risospendere il pellet cellulare.
9. Regolare il volume di caricamento del campione a 150 g (applicazione su scala normale) o a 275 g (applicazione su larga scala).

Nota: prelevare un campione dopo la rimozione del reagente in eccesso per un'analisi successiva (facoltativo).

6.1.2 FASE 2: Scelta del programma di separazione

▶ Collegare il CliniMACS Plus Instrument

▶ Scelta del programma di separazione CD34 SELECTION 1/2

(Con 1 flaconcino: CD34 SELECTION 1, o con 2 flaconcini: CD34 SELECTION 2)

Cfr. sezione 7.2.2 a pagina 136.

6.1.3 FASE 3: Installazione del set di tubi CliniMACS

- **CliniMACS Tubing Set e CliniMACS Tubing Set LS**

Cfr. sezione 7.3.1 a pagina 157.

6.1.4 FASE 4: Separazione CliniMACS Plus

- **Procedura di separazione**
- **Scollegare le sacche e registrare il codice del processo**
- **Scollagare il set di tubi e spegnere**
- **Analisi delle cellule**

Cfr. sezione 7.4.1 a pagina 190.

6.2 Arricchimento di cellule CD14 positive

Il CliniMACS Plus CD14 System, comprendente il CliniMACS Plus Instrument, il CliniMACS CD14 Reagent, il CliniMACS Tubing Set e il CliniMACS PBS/EDTA Buffer, è destinato all'arricchimento *in vitro* di cellule umane CD14 positive da popolazioni eterogenee di cellule ematiche.

6.2.1 FASE 1: Preparazione delle cellule e marcatura magnetica

Primo intervento necessario

Capacità dell'applicazione

Fino a 4×10^9 cellule CD14 positive da un totale di fino a 20×10^9 cellule (WBC)

⚠ ATTENZIONE

Rischio di prestazioni di separazione insufficienti delle cellule marcate. Se si superano le specifiche dell'applicazione, vi è il rischio di una marcatura specifica insufficiente. Utilizzare la quantità necessaria di cellule e reagente come descritto per la rispettiva applicazione.

Materiali CliniMACS necessari

Materiale	Numero di catalogo	Quantità
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS CD14 Reagent	272-01	1 flaconcino
CliniMACS Tubing Set	161-01	1 set di tubi
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	Sacche da 3×1000 mL[1]

1 Cfr. Tabella 6.3 e Tabella 6.4. Prima dell'uso, aggiungere HSA al CliniMACS PBS/EDTA Buffer fino a una concentrazione finale dello 0,5% (p/v).

Tabella 6.2: Materiali CliniMACS necessari per l'arricchimento di cellule CD14 positive

Materiali aggiuntivi necessari

- **Cell Preparation Bag:**
  una sacca di trasferimento da 600 mL idonea per la centrifugazione nonché un forasacche e un set di trasferimento di plasma, da utilizzare durante la procedura di preparazione delle cellule
- **Plasma Waste Bag e Wash Waste Bag:**
  due sacche di trasferimento da 600 mL idonee per la centrifugazione
- **Cell Collection Bag:**
  una sacca di trasferimento da 150 mL o da 600 mL in combinazione con un Luer/Spike Interconnector per collegare la Cell Collection Bag al set di tubi (cfr. Tabella 6.4)
- **Se è necessario sostituire la Negative Fraction Bag e la Buffer Waste Bag:**
  due sacche di trasferimento da 1000 mL in combinazione con due Luer/Spike Interconnector per collegare le sacche al set di tubi (cfr. Tabella 6.4)
- **Se per la separazione è necessario più di un litro di tampone:**
  un set di trasferimento di plasma per collegare le sacche di tampone (cfr. Tabella 6.4)
- un filtro di pre-sistema
- pinzette per clampaggio
- siringhe idonee (di diverse dimensioni) e aghi ipodermici da 20 gauge

Panoramica dei materiali necessari

Preparazione cellulare	
Totale cellule (WBC)	$\leq 20\times10^9$
Cellule marcate	$\leq 4\times10^9$
Numero di flaconcini di reagente	1–2
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 mL
Set di trasferimento di plasma	1

Tabella 6.3: Materiale necessario per la preparazione di cellule CD14 positive

Separazione		
Cellule marcate	2×10^9	$\leq2–4\times10^9$
Negative Fraction Bag	–	Sostituire le sacche originali del set di tubi con sacche di trasferimento da 1000 mL
Buffer Waste Bag	–	
Priming Waste Bag	–	–
Cell Collection Bag	150 mL	600 mL
Luer/Spike Interconnector	1	3
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 mL	2000 mL
Set di trasferimento di plasma	–	1

Tabella 6.4: Materiali necessari per l'arricchimento di cellule CD14 positive

▶ Preparazione delle sacche

Determinare il peso della Cell Collection Bag e della Cell Preparation Bag vuote come descritto nella sezione 7.1.1 a pagina 123.

Marcatura magnetica delle cellule

Fare riferimento alla sezione 7.1 "FASE 1: Preparazione delle cellule e marcatura magnetica" a pagina 123 per una descrizione dettagliata delle seguenti fasi.

▶ Analisi della preparazione cellulare iniziale

▶ Trasferimento della preparazione cellulare iniziale nella Cell Preparation Bag

▶ Diluizione della preparazione cellulare iniziale

Aggiungere il tampone: Peso del tampone da aggiungere = 600 g – Peso della preparazione cellulare iniziale

▶ Centrifugazione

Centrifugare a 300×g, senza freno, per 15 minuti, a temperatura ambiente (RT: intervallo +19 °C e +25 °C [+66 °F e +77 °F]).

▶ Aggiustamento del volume: volume di marcatura 50 g (±5 g)

1. Rimuovere il sovranatante per regolare il campione utilizzando la seguente equazione: Peso del sovranatante da rimuovere = Peso della preparazione cellulare diluita – Volume di marcatura
2. Risospendere il pellet cellulare.

▶ Incubazione con il CliniMACS CD14 Reagent

1. Aggiungere 1 flaconcino di CliniMACS CD14 Reagent. Mescolare il contenuto.

2. Incubare su un rotatore orbitale (25 rpm) per 15 minuti a temperatura ambiente.

▶ **Rimozione del reagente in eccesso**

1. Riempire la Cell Preparation Bag con tampone.
2. Centrifugare (300×g, senza freno, per 15 minuti, a temperatura ambiente).
3. Rimuovere quanto più sovranatante possibile. **Nota:** rimuovere almeno 500 g di sovranatante. Se il sovranatante rimosso è inferiore a 500 g, si consiglia di eseguire un totale di due fasi di lavaggio (anziché solo una). In caso contrario, la rimozione del reagente non legato potrebbe essere insufficiente.
4. Risospendere il pellet cellulare.
5. Regolare il volume di caricamento del campione a 100 g.

Nota: prelevare un campione dopo la rimozione del reagente in eccesso per un'analisi successiva (facoltativo).

6.2.2 FASE 2: Scelta del programma di separazione

▶ **Avviare il CliniMACS Plus Instrument**

▶ **Scelta del programma di separazione ENRICHMENT 1.1**

▶ **Inserimento dei parametri del campione**

Cfr. sezione 7.2.3 a pagina 138.

6.2.3 FASE 3: Installazione del set di tubi CliniMACS

▶ **CliniMACS Tubing Set e CliniMACS Tubing Set LS**

Cfr. sezione 7.3.1 a pagina 157.

6.2.4 FASE 4: Separazione CliniMACS Plus

▶ **Procedura di separazione**

▶ **Scollegare le sacche e registrare il codice del processo**

▶ **Scollagare il set di tubi e spegnere**

▶ **Analisi delle cellule**

Cfr. sezione 7.4.2 a pagina 194.

6.3 Arricchimento/deplezione con il CliniMACS Anti-Biotin Reagent

Il CliniMACS Plus Anti-Biotin System, comprendente il CliniMACS Plus Instrument, il CliniMACS Anti-Biotin Reagent, il CliniMACS Tubing Set o il CliniMACS Tubing Set LS nonché il CliniMACS PBS/EDTA Buffer, è destinato all'arricchimento o alla deplezione *in vitro* di cellule umane precedentemente marcate con anticorpi biotinilati.

6.3.1 FASE 1: Preparazione delle cellule e marcatura magnetica

Primo intervento necessario

Capacità dell'applicazione

- **Arricchimento:** fino a un totale di 40×10^9 cellule (WBC)
- **Deplezione:**
  Applicazione su scala normale: fino a un totale di 40×10^9 cellule (WBC)
  Applicazione su larga scala: più di 40 e fino a un totale di 80×10^9 cellule (WBC)

⚠ ATTENZIONE

Rischio di prestazioni di separazione insufficienti delle cellule marcate. Se si superano le specifiche dell'applicazione, vi è il rischio di una marcatura specifica insufficiente. Utilizzare la quantità necessaria di cellule e reagente come descritto per la rispettiva applicazione.

Materiali CliniMACS necessari

Materiale	Numero di catalogo	Quantità	Programma di separazione
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1	–
CliniMACS Anti-Biotin Reagent	173-01	• 1 flaconcino (scala normale) • 2 flaconcini (larga scala)	–
CliniMACS Tubing Set	161-01	1 set di tubi	ENRICHMENT 1.1
CliniMACS Tubing Set LS	162-01	1 set di tubi	DEPLETION 2.1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	• 3× sacche da 1000 mL[1] (scala normale) • 4× sacche da 1000 mL[1] (larga scala)	–

1 La quantità di tampone varia a seconda del programma di separazione selezionato e del numero di cellule marcate (cfr. Tabella 6.6 – Tabella 6.9). Prima dell'uso, aggiungere HSA al CliniMACS PBS/EDTA Buffer fino a una concentrazione finale dello 0,5% (p/v).

Tabella 6.5: Materiali CliniMACS necessari per l'arricchimento/la deplezione con il CliniMACS Anti-Biotin Reagent

Materiali aggiuntivi necessari

- **Cell Preparation Bag:**
  una sacca di trasferimento da 600 mL idonea per la centrifugazione nonché un forasacche e due set di trasferimento di plasma, da utilizzare durante la procedura di preparazione delle cellule
- **Plasma Waste Bag e Wash Waste Bag:**
  due sacche di trasferimento da 600 mL idonee per la centrifugazione
- **Cell Collection Bag:**
  una sacca di trasferimento da 600 mL o da 1000 mL in combinazione con un Luer/Spike Interconnector per collegare la Cell Collection Bag al set di tubi (cfr. Tabella 6.7 e Tabella 6.9)
- **Se è necessario sostituire la Negative Fraction Bag, la Buffer Waste Bag e/o la Priming Waste Bag:**
  due o tre sacche di trasferimento da 1000 mL in combinazione con due Luer/Spike Interconnector per collegare le sacche al set di tubi (cfr. Tabella 6.7 e Tabella 6.9). Sostituire la Priming Waste Bag servendosi del connettore sterile per tubi.
- **Se per la separazione è necessario più di un litro di tampone:**
  uno o due set di trasferimento di plasma per collegare le sacche di tampone (cfr. Tabella 6.7 e Tabella 6.9)
- un filtro di pre-sistema
- pinzette per clampaggio
- siringhe idonee (di diverse dimensioni) e aghi ipodermici da 20 gauge
- albumina sierica umana (HSA) da aggiungere al CliniMACS PBS/EDTA Buffer fino a una concentrazione finale dello 0,5% (p/v)
- provette per campioni
- singolo anticorpo cellula-specifico biotinilato o ligando

Panoramica dei materiali

Preparazione delle cellule (ENRICHMENT 1.1)	
Totale cellule (WBC)	≤40×10^9
Numero di flaconcini di reagente	1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	2000 mL
Set di trasferimento di plasma	2

Tabella 6.6: Materiali necessari per la preparazione delle cellule (ENRICHMENT 1.1)

Separazione (ENRICHMENT 1.1)		
Cellule marcate	≤2×10^9	>2–5×10^9
Negative Fraction Bag	–	Sostituire le sacche originali del set di tubi con sacche di trasferimento da 1000 mL
Buffer Waste Bag	–	
Priming Waste Bag	–	–
Cell Collection Bag	600 mL	600 mL
Luer/Spike Interconnector	1	3
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 mL	2000 mL
Set di trasferimento di plasma	–	1

Tabella 6.7: Materiali necessari per l'arricchimento (ENRICHMENT 1.1)

Preparazione delle cellule (DEPLETION 2.1)		
Totale cellule (WBC)	≤40×10^9	>40–80×10^9
Numero di flaconcini di reagente	1	2
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	2000 mL	2000 mL
Set di trasferimento di plasma	2	2

Tabella 6.8: Materiali necessari per la preparazione delle cellule (DEPLETION 2.1)

Separazione (DEPLETION 2.1)			
Cellule marcate	<5×10^9	5–13×10^9	>13–20×10^9
Negative Fraction Bag	–	Sostituire le sacche originali del set di tubi con sacche di trasferimento da 1000 mL	Sostituire le sacche originali del set di tubi con sacche di trasferimento da 1000 mL
Buffer Waste Bag	–		
Priming Waste Bag	–	–	
Cell Collection Bag	600 mL	1000 mL	1000 mL
Luer/Spike Interconnector	1	3	4
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 mL	2000 mL	3000 mL
Set di trasferimento di plasma	–	1	2

Tabella 6.9: Materiali necessari per la deplezione (DEPLETION 2.1)

▶ Preparazione delle sacche

Determinare il peso della Cell Collection Bag e della Cell Preparation Bag vuote come descritto nella sezione 7.1.1 a pagina 123.

Marcatura magnetica delle cellule

Fare riferimento alla sezione 7.1 "FASE 1: Preparazione delle cellule e marcatura magnetica" a pagina 123 per una descrizione dettagliata delle seguenti fasi.

▶ Analisi della preparazione cellulare iniziale

▶ Trasferimento della preparazione cellulare iniziale nella Cell Preparation Bag

Diluizione della preparazione cellulare iniziale

Aggiungere il tampone: Peso del tampone da aggiungere = Peso della preparazione cellulare iniziale × 2

Centrifugazione

1. Centrifugare a 300×g, senza freno, per 15 minuti, a temperatura ambiente (RT: intervallo +19 °C e +25 °C [+66 °F e +77 °F]).
2. Rimuovere il sovranatante per regolare il volume per la marcatura dell'anticorpo primario come raccomandato dal fabbricante dell'anticorpo primario.
3. Risospendere il pellet cellulare.

Marcatura delle cellule: incubazione con l'anticorpo primario

Seguire le istruzioni per l'uso fornite dal fabbricante dell'anticorpo primario.

Rimozione del coniugato in eccesso (1° lavaggio)

1. Aggiungere il tampone: Peso del tampone da aggiungere = 600 g – Peso della preparazione cellulare
2. Centrifugare a 300×g, senza freno, per 15 minuti, a temperatura ambiente (RT: intervallo +19 °C e +25 °C [+66 °F e +77 °F]).

Aggiustamento del volume: volume di marcatura 95 g (±5 g) (applicazione su scala normale) o 190 g (±5 g) (applicazione su larga scala)

1. Rimuovere il sovranatante per regolare il campione utilizzando la seguente equazione: Peso del sovranatante da rimuovere = Peso della preparazione cellulare diluita – Volume di marcatura
   Nota: rimuovere almeno 500 g di sovranatante. Se il sovranatante rimosso è inferiore a 500 g, si consiglia di eseguire un totale di due fasi di lavaggio (anziché solo una). In caso contrario, la rimozione del reagente non legato potrebbe essere insufficiente.
2. Risospendere il pellet cellulare.

Marcatura magnetica delle cellule: incubazione con il CliniMACS Anti-Biotin Reagent

1. Aggiungere 1 o 2 flaconcini di CliniMACS Anti-Biotin Reagent (cfr. Tabella 6.6 e Tabella 6.8). Mescolare il contenuto.
2. Incubare su un rotatore orbitale (25 rpm) per 30 minuti a temperatura ambiente.

- **Rimozione del reagente in eccesso (2° lavaggio)**

1. Riempire la Cell Preparation Bag con tampone.
2. Centrifugare (300×g, senza freno, per 15 minuti, a temperatura ambiente).
3. Rimuovere quanto più sovranatante possibile. **Nota:** rimuovere almeno 500 g di sovranatante. Se il sovranatante rimosso è inferiore ai valori elencati sopra, si consiglia di eseguire un totale di due fasi di lavaggio (anziché solo una). In caso contrario, la rimozione del reagente non legato potrebbe essere insufficiente.
4. Risospendere il pellet cellulare.
5. Regolare il volume di caricamento del campione a 100 g (applicazione su scala normale) o a 200 g (applicazione su larga scala).

Nota: prelevare un campione dopo la rimozione del reagente in eccesso per un'analisi successiva (facoltativo).

6.3.2 FASE 2: Scelta del programma di separazione

- **Avviare il CliniMACS Plus Instrument**
- **Scelta del programma di separazione ENRICHMENT 1.1 o DEPLETION 2.1**
- **Inserimento dei parametri del campione**

Cfr. sezione 7.2.3 a pagina 138 o 7.2.5 a pagina 145.

6.3.3 FASE 3: Installazione del set di tubi CliniMACS

- **CliniMACS Tubing Set e CliniMACS Tubing Set LS**

Cfr. sezione 7.3.1 a pagina 157.

6.3.4 FASE 4: Separazione CliniMACS Plus

- **Procedura di separazione**
- **Scollegare le sacche e registrare il codice del processo**
- **Scollegare il set di tubi e spegnere**
- **Analisi delle cellule**

Cfr. sezione 7.4.2 a pagina 194 e 7.4.4 a pagina 203.

6.4 Arricchimento di cellule CD56 positive

Il CliniMACS Plus CD56 System, comprendente il CliniMACS Plus Instrument, il CliniMACS CD56 Reagent, il CliniMACS Tubing Set e il CliniMACS PBS/EDTA Buffer, è destinato all'arricchimento *in vitro* di cellule umane CD56 positive da popolazioni eterogenee di cellule ematiche.

6.4.1 FASE 1: Preparazione delle cellule e marcatura magnetica

Primo intervento necessario

Capacità dell'applicazione

Fino a 5×10^9 cellule CD56 positive da un totale di fino a 40×10^9 cellule (WBC)

⚠ ATTENZIONE

Rischio di prestazioni di separazione insufficienti delle cellule marcate. Se si superano le specifiche dell'applicazione, vi è il rischio di una marcatura specifica insufficiente. Utilizzare la quantità necessaria di cellule e reagente come descritto per la rispettiva applicazione.

Materiali CliniMACS necessari

Materiale	Numero di catalogo	Quantità
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS CD56 Reagent	271-01	1 flaconcino
CliniMACS Tubing Set	161-01	1 set di tubi
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	Sacche da 3×1000 mL[1]

1 Cfr. Tabella 6.11 e Tabella 6.12. Prima dell'uso, aggiungere HSA al CliniMACS PBS/EDTA Buffer fino a una concentrazione finale dello 0,5% (p/v).

Tabella 6.10: Materiali CliniMACS necessari per l'arricchimento di cellule CD56 positive

Materiali aggiuntivi necessari

- **Cell Preparation Bag:**
  una sacca di trasferimento da 600 mL idonea per la centrifugazione nonché un forasacche e un set di trasferimento di plasma, da utilizzare durante la procedura di preparazione delle cellule
- **Plasma Waste Bag e Wash Waste Bag:**
  due sacche di trasferimento da 600 mL idonee per la centrifugazione
- **Cell Collection Bag:**
  una sacca di trasferimento da 150 mL o da 600 mL in combinazione con un Luer/Spike Interconnector per collegare la Cell Collection Bag al set di tubi (cfr. Tabella 6.12)

- **Se è necessario sostituire la Negative Fraction Bag e la Buffer Waste Bag:** due sacche di trasferimento da 1000 mL in combinazione con due Luer/Spike Interconnector per collegare le sacche al set di tubi (cfr. Tabella 6.12)
- **Se per la separazione è necessario più di un litro di tampone:** un set di trasferimento di plasma per collegare le sacche di tampone (cfr. Tabella 6.12)
- un filtro di pre-sistema
- pinzette per clampaggio
- siringhe (di diverse dimensioni) e aghi ipodermici da 20 gauge
- albumina sierica umana (HSA) da aggiungere al CliniMACS PBS/EDTA Buffer fino a una concentrazione finale dello 0,5% (p/v)
- provette per campioni

Panoramica dei materiali necessari

Preparazione cellulare	
Totale cellule (WBC)	≤40×10^9
Numero di flaconcini di reagente	1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 mL
Set di trasferimento di plasma	1

Tabella 6.11: Materiali necessari per la preparazione di cellule CD56 positive

Separazione		
Cellule marcate	≤2×10^9	>2–5×10^9
Negative Fraction Bag	–	Sostituire le sacche originali del set di tubi con sacche di trasferimento da 1000 mL
Buffer Waste Bag	–	
Priming Waste Bag	–	–
Cell Collection Bag	150 mL	600 mL
Luer/Spike Interconnector	1	3
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 mL	2000 mL
Set di trasferimento di plasma	–	1

Tabella 6.12: Materiali necessari per l'arricchimento di cellule CD56 positive

▶ Preparazione delle sacche

Determinare il peso della Cell Collection Bag e della Cell Preparation Bag vuote come descritto nella sezione 7.1.1 a pagina 123.

Marcatura magnetica delle cellule

Fare riferimento alla sezione 7.1 "FASE 1: Preparazione delle cellule e marcatura magnetica" a pagina 123 per una descrizione dettagliata delle seguenti fasi.

Analisi della preparazione cellulare iniziale

Trasferimento della preparazione cellulare iniziale nella Cell Preparation Bag

Diluizione della preparazione cellulare iniziale

Aggiungere il tampone: Peso del tampone da aggiungere = 600 g – Peso della preparazione cellulare iniziale

Centrifugazione

Centrifugare a 200×g, senza freno, per 15 minuti, a temperatura ambiente (RT: intervallo +19 °C e +25 °C [+66 °F e +77 °F]).

Aggiustamento del volume: volume di marcatura 95 g (±5 g)

1. Rimuovere completamente il sovranatante avendo cura di non risospendere il pellet cellulare.
2. Risospendere il pellet cellulare con cura dopo aver rimosso il sovranatante.
3. Regolare il peso della Cell Preparation Bag (CPB) aggiungendo tampone in base alla seguente equazione: Peso target della CPB riempita = 95 g + Peso della CPB vuota
4. Risospendere le cellule.

Incubazione con il CliniMACS CD56 Reagent

1. Aggiungere 1 flaconcino di CliniMACS CD56 Reagent. Mescolare il contenuto.
2. Incubare su un rotatore orbitale (25 rpm) per 30 minuti a temperatura ambiente.

Rimozione del reagente in eccesso

1. Riempire la Cell Preparation Bag con tampone.
2. Centrifugare (300×g, senza freno, per 15 minuti, a temperatura ambiente).
3. Rimuovere quanto più sovranatante possibile. **Nota:** rimuovere almeno 500 g di sovranatante. Se il sovranatante rimosso è inferiore a 500 g, si consiglia di eseguire un totale di due fasi di lavaggio (anziché solo una). In caso contrario, la rimozione del reagente non legato potrebbe essere insufficiente.
4. Risospendere il pellet cellulare con cura dopo aver rimosso il sovranatante.
5. Regolare il volume di caricamento del campione a 150 g.

Nota: prelevare un campione dopo la rimozione del reagente in eccesso per un'analisi successiva (facoltativo).

6.4.2 FASE 2: Scelta del programma di separazione

- **Avviare il CliniMACS Plus Instrument**
- **Scelta del programma di separazione ENRICHMENT 1.1**
- **Inserimento dei parametri del campione**

Cfr. sezione 7.2.3 a pagina 138.

6.4.3 FASE 3: Installazione del set di tubi CliniMACS

- **CliniMACS Tubing Set e CliniMACS Tubing Set LS**

Cfr. sezione 7.3.1 a pagina 157.

6.4.4 FASE 4: Separazione CliniMACS Plus

- **Procedura di separazione**
- **Scollegare le sacche e registrare il codice del processo**
- **Scollegare il set di tubi e spegnere**
- **Analisi delle cellule**

Cfr. sezione 7.4.2 a pagina 194.

6.5 Deplezione di cellule CD3 positive

Il CliniMACS Plus CD3 System, comprendente il CliniMACS Plus Instrument, il CliniMACS CD3 Reagent, il CliniMACS Tubing Set LS o il CliniMACS Depletion Tubing Set nonché il CliniMACS PBS/EDTA Buffer, è destinato alla deplezione *in vitro* di cellule umane CD3 positive da popolazioni eterogenee di cellule ematiche.

6.5.1 FASE 1: Preparazione delle cellule e marcatura magnetica

Primo intervento necessario

Capacità dell'applicazione

- Applicazione su scala normale: fino a 15×10^9 cellule CD3 positive da un totale di fino a 40×10^9 cellule (WBC) usando il CliniMACS Tubing Set LS o il CliniMACS Depletion Tubing Set
- Applicazione su larga scala: più di 15×10^9 e fino a 20×10^9 cellule CD3 positive da un totale di più di 40×10^9 e fino a 80×10^9 cellule (WBC) usando il CliniMACS Tubing Set LS o più di 15×10^9 e fino a 30×10^9 cellule CD3 positive da un totale di più di 40×10^9 e fino a 80×10^9 cellule (WBC) usando il CliniMACS Depletion Tubing Set

⚠ ATTENZIONE

Rischio di prestazioni di separazione insufficienti delle cellule marcate. Se si superano le specifiche dell'applicazione, vi è il rischio di una marcatura specifica insufficiente. Utilizzare la quantità necessaria di cellule e reagente come descritto per la rispettiva applicazione.

Materiali CliniMACS necessari

Materiale	Numero di catalogo	Quantità	Programma di separazione
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1	
CliniMACS CD3 Reagent	273-01	• 1 flaconcino (scala normale) • 2 flaconcini (larga scala)	
CliniMACS Tubing Set LS	162-01	1 set di tubi	DEPLETION 2.1
CliniMACS Depletion Tubing Set	261-01	1 set di tubi	DEPLETION 3.1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	Fino a 5 sacche da 1000 mL[1]	

1 Cfr. Tabella 6.14 – Tabella 6.16. Prima dell'uso, aggiungere HSA al CliniMACS PBS/EDTA Buffer fino a una concentrazione finale dello 0,5% (p/v).

2 **Nota:** per un numero elevato di cellule marcate si consiglia di utilizzare un CliniMACS Depletion Tubing Set allo scopo di risparmiare tempo di processamento (ad es. con il CliniMACS Tubing Set LS si processeranno 20×10 cellule marcate nell'arco di cinque ore mentre con il CliniMACS Depletion Tubing Set serviranno due ore).

Tabella 6.13: Materiali CliniMACS necessari per la deplezione di cellule CD3 positive

Materiali aggiuntivi necessari

- **Cell Preparation Bag:**
  una sacca di trasferimento da 600 mL idonea per la centrifugazione nonché un forasacche e due set di trasferimento di plasma, da utilizzare durante la procedura di preparazione delle cellule
- **Plasma Waste Bag e Wash Waste Bag:**
  due sacche di trasferimento da 600 mL idonee per la centrifugazione
- **Cell Collection Bag:**
  una o due sacche di trasferimento da 600 mL in combinazione con un Luer/Spike Interconnector per collegare la Cell Collection Bag al set di tubi

  Se per la separazione sono necessarie due Cell Collection Bag, utilizzare un set di trasferimento di plasma per collegare entrambe le sacche. Una sacca di trasferimento da 600 mL è già collegata al CliniMACS Depletion Tubing Set (cfr. Tabella 6.15 e Tabella 6.16).
- **Se è necessario sostituire la Negative Fraction Bag, la Buffer Waste Bag e/o la Priming Waste Bag:**
  due o tre sacche di trasferimento da 1000 mL in combinazione con due Luer/Spike Interconnector per collegare le sacche al set di tubi (cfr. Tabella 6.15 e Tabella 6.16)

  Sostituire la Priming Waste Bag servendosi del connettore sterile per tubi.
- **Se per la separazione è necessario più di un litro di tampone:**
  uno o due set di trasferimento di plasma per collegare le sacche di tampone (cfr. Tabella 6.15 e Tabella 6.16)
- un filtro di pre-sistema
- pinzette per clampaggio
- siringhe (di diverse dimensioni) e aghi ipodermici da 20 gauge
- albumina sierica umana (HSA) da aggiungere al CliniMACS PBS/EDTA Buffer fino a una concentrazione finale dello 0,5% (p/v)
- immunoglobulina G di grado clinico
- provette per campioni

IMPORTANTE
Dopo l'inserimento dei parametri del campione (FASE 2), il CliniMACS Plus Software calcola i volumi che saranno raccolti nella Reapplication Bag, nella Cell Collection Bag, nella Non-Target Cell Bag e nella Buffer Waste Bag. Se il volume del liquido calcolato supera il volume standard di 500 mL, è necessario sostituire le sacche.

Panoramica dei materiali necessari

Preparazione cellulare		
Totale cellule (WBC)	≤40×10^9	>40–80×10^9
Cellule marcate	≤15×10^9	>15–30×10^9
Numero di flaconcini di reagente	1	2
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	2000 mL	2000 mL
Set di trasferimento di plasma	2	2
Volume di caricamento del campione	150 mL	250–300 mL

Tabella 6.14: Materiali necessari per la preparazione di cellule CD3 positive

Separazione (DEPLETION 2.1)			
Cellule marcate	≤5×10^9	>5–13×10^9	>13–20×10^9
Negative Fraction Bag	–	Sostituire le sacche originali del set di tubi con sacche di trasferimento da 1000 mL	Sostituire le sacche originali del set di tubi con sacche di trasferimento da 1000 mL
Buffer Waste Bag	–		
Priming Waste Bag	–	–	
Cell Collection Bag	600 mL	1–2×600 mL	2×600 mL
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 mL	2000 mL	3000 mL
Luer/Spike Interconnector	1	3	3
Set di trasferimento di plasma	–	1–2	3

Tabella 6.15: Materiali necessari per la deplezione di cellule CD3 positive (DEPLETION 2.1)

Separazione (DEPLETION 3.1)		
Cellule marcate	≤29×10^9	>29–30×10^9
Non-Target Cell Bag	Non è necessaria la sostituzione della sacca	
Buffer Waste Bag		
Reapplication Bag		
Cell Collection Bag	–	1×600 mL (in aggiunta)
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 mL	
Set di trasferimento di plasma	–	1

Tabella 6.16: Materiali necessari per la deplezione di cellule CD3 positive (DEPLETION 3.1)

Nota: i materiali necessari per la separazione possono essere stabiliti anche procedendo come segue: accendere il CliniMACS Plus Instrument, selezionare il programma di separazione da utilizzare (DEPLETION 2.1 per il CliniMACS Tubing Set LS e DEPLETION 3.1 per il CliniMACS Depletion Tubing Set) e inserire i parametri del campione. Il CliniMACS Plus Software calcolerà le dimensioni necessarie delle sacche da collegare al set di tubi e il peso necessario per il tampone.

▶ Preparazione delle sacche

Determinare il peso della Cell Collection Bag e della Cell Preparation Bag vuote come descritto nella sezione 7.1.1 a pagina 123.

Marcatura magnetica delle cellule

Fare riferimento alla sezione 7.1 “FASE 1: Preparazione delle cellule e marcatura magnetica” a pagina 123 per una descrizione dettagliata delle seguenti fasi.

▶ Analisi della preparazione cellulare iniziale

Determinare il numero di tutte le cellule marcate con CD3 (compreso il legame aspecifico con CD3, non soltanto le cellule T reali). Considerare questo numero per applicazioni specifiche e per l’inserimento dei parametri dei campioni (cfr. FASE 2).

▶ Trasferimento della preparazione cellulare iniziale nella Cell Preparation Bag

▶ Diluizione della preparazione cellulare iniziale

Aggiungere il tampone: Peso del tampone da aggiungere = 600 g – Peso della preparazione cellulare iniziale

▶ Centrifugazione

Centrifugare a 200×g, senza freno, per 15 minuti, a temperatura ambiente (RT: intervallo +19 °C e +25 °C [+66 °F e +77 °F]).

▶ Aggiustamento del volume: volume di marcatura 95 g (±5 g) (applicazione su scala normale) o 190 g (±5 g) (applicazione su larga scala)

1. Rimuovere completamente il sovranatante avendo cura di non risospendere il pellet cellulare.
2. Risospendere il pellet cellulare con cura dopo aver rimosso il sovranatante.
3. Regolare il peso della Cell Preparation Bag (CPB) aggiungendo tampone in base alla seguente equazione (considerare il peso IgG): Peso target della CPB riempita = Volume di marcatura – Peso IgG + Peso della CPB vuota
4. Risospendere il pellet cellulare.

▶ Incubazione con immunoglobulina di grado clinico

1. Aggiungere IgG (1,5 mg/mL).
2. Incubare su un rotatore orbitale (25 rpm) per 5 minuti a temperatura ambiente.

▶ Incubazione con il CliniMACS CD3 Reagent

1. Aggiungere 1 o 2 flaconcini di CliniMACS CD3 Reagent (cfr. Tabella 6.14). Mescolare il contenuto.
2. Incubare su un rotatore orbitale (25 rpm) per 30 minuti a temperatura ambiente.

▶ **Rimozione del reagente in eccesso**

1. Riempire la Cell Preparation Bag con tampone.
2. Centrifugare (300×g, senza freno, per 15 minuti, a temperatura ambiente).
3. Rimuovere quanto più sovranatante possibile. **Nota:** rimuovere almeno 500 g di sovranatante. Se il sovranatante rimosso è inferiore a 500 g, si consiglia di eseguire un totale di due fasi di lavaggio (anziché solo una). In caso contrario, la rimozione del reagente non legato potrebbe essere insufficiente.
4. Risospendere il pellet cellulare.
5. Regolare il volume di caricamento del campione a 150 g (applicazione su scala normale) o a 250–300 g (applicazione su larga scala).

6.5.2 FASE 2: Scelta del programma di separazione

▶ **Avviare il CliniMACS Plus Instrument**

▶ **Scelta del programma di separazione DEPLETION 2.1 o DEPLETION 3.1**
(durante l'utilizzo del CliniMACS Tubing Set LS o del CliniMACS Depletion Tubing Set)

▶ **Inserimento dei parametri del campione**
(in base all'analisi della preparazione cellulare iniziale (cfr. FASE 1))

Cfr. sezione 7.2.5 a pagina 145 o 7.2.6 a pagina 151.

6.5.3 FASE 3: Installazione del set di tubi CliniMACS

▶ **CliniMACS Tubing Set e CliniMACS Tubing Set LS**
oppure
▶ **CliniMACS Depletion Tubing Set**

Cfr. sezione 7.3.1 a pagina 157 o 7.3.3 a pagina 176.

6.5.4 FASE 4: Separazione CliniMACS Plus

▶ **Procedura di separazione**

▶ **Scollegare le sacche e registrare il codice del processo**

▶ **Scollegare il set di tubi e spegnere**

▶ **Analisi delle cellule**

Cfr. sezione 7.4.4 a pagina 203 e 7.4.5 a pagina 208.

6.6 Deplezione di cellule CD19 positive

Il CliniMACS Plus CD19 System, comprendente il CliniMACS Plus Instrument, il CliniMACS CD19 Reagent, il CliniMACS Tubing Set LS e il CliniMACS PBS/EDTA Buffer, è destinato alla deplezione *in vitro* di cellule umane CD19 positive da popolazioni eterogenee di cellule ematiche.

6.6.1 FASE 1: Preparazione delle cellule e marcatura magnetica

Primo intervento necessario

Capacità dell'applicazione

Fino a 5×10^9 cellule CD19 positive da un totale di fino a 40×10^9 cellule (WBC)

⚠ ATTENZIONE

Rischio di prestazioni di separazione insufficienti delle cellule marcate. Se si superano le specifiche dell'applicazione, vi è il rischio di una marcatura specifica insufficiente. Utilizzare la quantità necessaria di cellule e reagente come descritto per la rispettiva applicazione.

Materiali CliniMACS necessari

Materiale	Numero di catalogo	Quantità
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS CD19 Reagent	179-01	1 flaconcino
CliniMACS Tubing Set LS	162-01	1 set di tubi
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	Sacche da 2×1000 mL[1]

1 Prima dell'uso, aggiungere HSA al CliniMACS PBS/EDTA Buffer fino a una concentrazione finale dello 0,5% (p/v).

Tabella 6.17: Materiali CliniMACS necessari per la deplezione di cellule CD19 positive

Materiali aggiuntivi necessari

- **Cell Preparation Bag:**
  una sacca di trasferimento da 600 mL idonea per la centrifugazione nonché un forasacche e due set di trasferimento di plasma, da utilizzare durante la procedura di preparazione delle cellule
- **Plasma Waste Bag e Wash Waste Bag:**
  due sacche di trasferimento da 600 mL idonee per la centrifugazione
- **Cell Collection Bag:**
  una sacca di trasferimento da 600 mL in combinazione con un Luer/Spike Interconnector per collegare la Cell Collection Bag al set di tubi
- un filtro di pre-sistema

- pinzette per clampaggio
- siringhe (di diverse dimensioni) e aghi ipodermici da 20 gauge
- albumina sierica umana (HSA) da aggiungere al CliniMACS PBS/EDTA Buffer fino a una concentrazione finale dello 0,5% (p/v)
- provette per campioni

▶ Preparazione delle sacche

Determinare il peso della Cell Collection Bag e della Cell Preparation Bag vuote come descritto nella sezione 7.1.1 a pagina 123.

Marcatura magnetica delle cellule

Fare riferimento alla sezione 7.1 "FASE 1: Preparazione delle cellule e marcatura magnetica" a pagina 123 per una descrizione dettagliata delle seguenti fasi.

▶ Analisi della preparazione cellulare iniziale

▶ Trasferimento della preparazione cellulare iniziale nella Cell Preparation Bag

▶ Diluizione della preparazione cellulare iniziale

Aggiungere il tampone: Peso del tampone da aggiungere = 600 g – Peso della preparazione cellulare iniziale

▶ Centrifugazione

Centrifugare a 200×g, senza freno, per 15 minuti, a temperatura ambiente (RT: intervallo +19 °C e +25 °C [+66 °F e +77 °F]).

▶ Aggiustamento del volume: volume di marcatura 95 g (±5 g)

1. Rimuovere completamente il sovranatante avendo cura di non risospendere il pellet cellulare.
2. Risospendere il pellet cellulare con cura dopo aver rimosso il sovranatante.
3. Regolare il peso della Cell Preparation Bag (CPB) aggiungendo tampone in base alla seguente equazione: Peso target della CPB riempita = 95 g + Peso della CPB vuota
4. Risospendere il pellet cellulare.

▶ Incubazione con il CliniMACS CD19 Reagent

1. Aggiungere 1 flaconcino di CliniMACS CD19 Reagent. Mescolare delicatamente il contenuto.
2. Incubare su un rotatore orbitale (25 rpm) per 30 minuti a temperatura ambiente.

▶ **Rimozione del reagente in eccesso**

1. Riempire la Cell Preparation Bag con tampone.
2. Centrifugare (300×g, senza freno, per 15 minuti, a temperatura ambiente).
3. Rimuovere quanto più sovranatante possibile. **Nota:** rimuovere almeno 500 g di sovranatante. Se il sovranatante rimosso è inferiore a 500 g, si consiglia di eseguire un totale di due fasi di lavaggio (anziché solo una). In caso contrario, la rimozione del reagente non legato potrebbe essere insufficiente.
4. Risospendere il pellet cellulare.
5. Regolare il volume di caricamento del campione a 100 g.

6.6.2 FASE 2: Scelta del programma di separazione

▶ **Avviare il CliniMACS Plus Instrument**

▶ **Scelta del programma di separazione DEPLETION 2.1**

▶ **Inserimento dei parametri del campione**

Cfr. sezione 7.2.5 a pagina 145.

6.6.3 FASE 3: Installazione del set di tubi CliniMACS

▶ **CliniMACS Tubing Set e CliniMACS Tubing Set LS**

Cfr. sezione 7.3.1 a pagina 157.

6.6.4 FASE 4: Separazione CliniMACS Plus

▶ **Procedura di separazione**

▶ **Scollegare le sacche e registrare il codice del processo**

▶ **Scollegare il set di tubi e spegnere**

▶ **Analisi delle cellule**

Cfr. sezione 7.4.4 a pagina 203.

6.7 Deplezione di cellule CD3 positive e CD19 positive

Il CliniMACS Plus CD3/CD19 System, comprendente il CliniMACS Plus Instrument, il CliniMACS CD3 Reagent, il CliniMACS CD19 Reagent, il CliniMACS Depletion Tubing Set e il CliniMACS PBS/EDTA Buffer, è destinato alla deplezione simultanea *in vitro* di cellule umane CD3 positive e CD19 positive da popolazioni eterogenee di cellule ematiche.

6.7.1 FASE 1: Preparazione delle cellule e marcatura magnetica

Primo intervento necessario

Capacità dell'applicazione

Fino a 15×10^9 cellule CD3 positive e fino a 5×10^9 cellule CD19 positive da un totale di fino a 40×10^9 cellule (WBC)

⚠ ATTENZIONE

Rischio di prestazioni di separazione insufficienti delle cellule marcate. Se si superano le specifiche dell'applicazione, vi è il rischio di una marcatura specifica insufficiente. Utilizzare la quantità necessaria di cellule e reagente come descritto per la rispettiva applicazione.

Materiali CliniMACS necessari

Materiale	Numero di catalogo	Quantità
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS CD3 Reagent	273-01	1 flaconcino
CliniMACS CD19 Reagent	179-01	1 flaconcino
CliniMACS Depletion Tubing Set	261-01	1 set di tubi
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	Sacche da 4×1000 mL[1]

1 Prima dell'uso, aggiungere HSA al CliniMACS PBS/EDTA Buffer fino a una concentrazione finale dello 0,5% (p/v).

Tabella 6.18: Materiali CliniMACS necessari per la deplezione di cellule CD3 positive e CD19 positive

Materiali aggiuntivi necessari

- **Cell Preparation Bag:**
  una sacca di trasferimento da 600 mL idonea per la centrifugazione nonché un forasacche e due set di trasferimento di plasma, da utilizzare durante la procedura di preparazione delle cellule
- **Plasma Waste Bag e Wash Waste Bag:**
  due sacche di trasferimento da 600 mL idonee per la centrifugazione
- **Cell Collection Bag:**
  una o due sacche di trasferimento da 600 mL in combinazione con un Luer/Spike Interconnector per collegare la Cell Collection Bag al set di tubi
- un filtro di pre-sistema
- pinzette per clampaggio
- siringhe (di diverse dimensioni) e aghi ipodermici da 20 gauge
- albumina sierica umana (HSA) da aggiungere al CliniMACS PBS/EDTA Buffer fino a una concentrazione finale dello 0,5% (p/v)
- immunoglobulina G di grado clinico
- provette per campioni

IMPORTANTE
Dopo l'inserimento dei parametri del campione (FASE 2), il CliniMACS Plus Software calcola i volumi che saranno raccolti nella Reapplication Bag, nella Cell Collection Bag, nella Non-Target Cell Bag e nella Buffer Waste Bag. Se il volume del liquido calcolato supera il volume standard di 500 mL, è necessario sostituire le sacche.

▶ Preparazione delle sacche

Determinare il peso della Cell Collection Bag e della Cell Preparation Bag vuote come descritto nella sezione 7.1.1 a pagina 123.

Marcatura magnetica delle cellule

Fare riferimento alla sezione 7.1 "FASE 1: Preparazione delle cellule e marcatura magnetica" a pagina 123 per una descrizione dettagliata delle seguenti fasi.

▶ Analisi della preparazione cellulare iniziale

Determinare il numero di tutte le cellule marcate con CD3 e CD19 (compreso il legame aspecifico con CD3 e CD19, non soltanto le cellule T e B reali). Considerare questo numero per applicazioni specifiche e per l'inserimento dei parametri dei campioni (cfr. FASE 2).

▶ Trasferimento della preparazione cellulare iniziale nella Cell Preparation Bag

Diluizione della preparazione cellulare iniziale

Aggiungere il tampone: Peso del tampone da aggiungere = 600 g – Peso della preparazione cellulare iniziale

Centrifugazione

Centrifugare a 200×g, senza freno, per 15 minuti, a temperatura ambiente (RT: intervallo +19 °C e +25 °C [+66 °F e +77 °F]).

Aggiustamento del volume: volume di marcatura 87,5°g (±5°g)

1. Rimuovere completamente il sovranatante avendo cura di non risospendere il pellet cellulare.
2. Risospendere il pellet cellulare con cura dopo aver rimosso il sovranatante.
3. Regolare il peso della Cell Preparation Bag (CPB) aggiungendo tampone in base alla seguente equazione (considerare il peso IgG): Peso target della CPB riempita = 87,5 g – Peso IgG + Peso della CPB vuota
4. Risospendere il pellet cellulare.

Incubazione con immunoglobulina di grado clinico

1. Aggiungere IgG (1,5 mg/mL).
2. Incubare su un rotatore orbitale (25 rpm) per 5 minuti a temperatura ambiente.

Incubazione con il CliniMACS CD3 Reagent e il CliniMACS CD19 Reagent

1. Aggiungere 1 flaconcino di CliniMACS CD3 Reagent e 1 flaconcino di CliniMACS CD19 Reagent. Mescolare delicatamente il contenuto.
2. Incubare su un rotatore orbitale (25 rpm) per 30 minuti a temperatura ambiente.

Rimozione del reagente in eccesso

1. Riempire la Cell Preparation Bag con tampone.
2. Centrifugare (300×g, senza freno, per 15 minuti, a temperatura ambiente).
3. Rimuovere quanto più sovranatante possibile. **Nota:** rimuovere almeno 500 g di sovranatante. Se il sovranatante rimosso è inferiore a 500 g, si consiglia di eseguire un totale di due fasi di lavaggio (anziché solo una). In caso contrario, la rimozione del reagente non legato potrebbe essere insufficiente.
4. Risospendere il pellet cellulare.
5. Regolare il volume di caricamento del campione a 150 g.

6.7.2 FASE 2: Scelta del programma di separazione

- **Avviare il CliniMACS Plus Instrument**
- **Scelta del programma di separazione DEPLETION 3.1**
- **Inserimento dei parametri del campione**
  (in base all'analisi della preparazione cellulare iniziale (cfr. FASE 1))

Cfr. sezione 7.2.6 a pagina 151.

6.7.3 FASE 3: Installazione del set di tubi CliniMACS

- **CliniMACS Depletion Tubing Set**

Cfr. sezione 7.3.3 a pagina 176.

6.7.4 FASE 4: Separazione CliniMACS Plus

- **Procedura di separazione**
- **Scollegare le sacche e registrare il codice del processo**
- **Scollegare il set di tubi e spegnere**
- **Analisi delle cellule**

Cfr. sezione 7.4.5 a pagina 208.

6.8 Arricchimento/deplezione di cellule CD8 positive

Il CliniMACS Plus CD8 System, comprendente il CliniMACS Plus Instrument, il CliniMACS CD8 Reagent, il CliniMACS Tubing Set o il CliniMACS Tubing Set LS e il CliniMACS PBS/EDTA Buffer, è destinato all'arricchimento o alla deplezione *in vitro* di cellule umane CD8 positive da popolazioni eterogenee di cellule ematiche.

6.8.1 FASE 1: Preparazione delle cellule e marcatura magnetica

Primo intervento necessario

Capacità dell'applicazione

- **Arricchimento:** fino a 4×10^9 cellule marcate da un totale di fino a 40×10^9 cellule (WBC) usando il CliniMACS Tubing Set
- **Deplezione:** fino a 4×10^9 cellule marcate da un totale di fino a 40×10^9 cellule (WBC) usando il CliniMACS Tubing Set LS

⚠ ATTENZIONE

Rischio di prestazioni di separazione insufficienti delle cellule marcate. Se si superano le specifiche dell'applicazione, vi è il rischio di una marcatura specifica insufficiente. Utilizzare la quantità necessaria di cellule e reagente come descritto per la rispettiva applicazione.

Materiali CliniMACS necessari

Materiale	Numero di catalogo	Quantità	Programma di separazione
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1	–
CliniMACS CD8 Reagent	275-01	1 flaconcino	–
CliniMACS Tubing Set	161-01	1 set di tubi	ENRICHMENT 1.1
CliniMACS Tubing Set LS	162-01	1 set di tubi	DEPLETION 2.1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	Fino a 3 sacche da 1000 mL[1]	–

1 Cfr. Tabella 6.20 – Tabella 6.22. Prima dell'uso, aggiungere HSA al CliniMACS PBS/EDTA Buffer fino a una concentrazione finale dello 0,5% (p/v).

Tabella 6.19: Materiali CliniMACS necessari per l'arricchimento/la deplezione di cellule CD8 positive

Materiali aggiuntivi necessari

- **Cell Preparation Bag:**
  una sacca di trasferimento da 600 mL idonea per la centrifugazione nonché un forasacche e due set di trasferimento di plasma, da utilizzare durante la procedura di preparazione delle cellule
- **Plasma Waste Bag e Wash Waste Bag:**
  due sacche di trasferimento da 600 mL idonee per la centrifugazione

- **Cell Collection Bag:**
  una sacca di trasferimento da 600 mL in combinazione con un Luer/Spike Interconnector per collegare la Cell Collection Bag al set di tubi (cfr. Tabella 6.21 e Tabella 6.22)
- **Se è necessario sostituire la Negative Fraction Bag e la Buffer Waste Bag:**
  due sacche di trasferimento da 1000 mL in combinazione con due Luer/Spike Interconnector per collegare le sacche al set di tubi (cfr. Tabella 6.21 e Tabella 6.22)
- **Se per la separazione è necessario più di un litro di tampone:**
  un set di trasferimento di plasma per collegare le sacche di tampone (cfr. Tabella 6.21 e Tabella 6.22)
- un filtro di pre-sistema
- pinzette per clampaggio
- siringhe (di diverse dimensioni) e aghi ipodermici da 20 gauge
- albumina sierica umana (HSA) da aggiungere al CliniMACS PBS/EDTA Buffer fino a una concentrazione finale dello 0,5% (p/v)
- provette per campioni

IMPORTANTE

Dopo l'inserimento dei parametri del campione (FASE 2), il CliniMACS Plus Software calcola i volumi che saranno raccolti nella Priming Waste Bag, nella Cell Collection Bag, nella Negative Fraction Bag e nella Buffer Waste Bag. Se il volume del liquido calcolato supera il volume standard di 500 mL, è necessario sostituire le sacche in base alla seguente panoramica dei materiali necessari.

Panoramica dei materiali necessari

Preparazione cellulare	
Totale cellule	$\leq 40\times10^9$
Cellule marcate	$\leq 4\times10^9$
Numero di flaconcini di reagente	1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 mL
Set di trasferimento di plasma	1
Volume di caricamento del campione	100 mL

Tabella 6.20: Materiali necessari per la preparazione di cellule CD8 positive

Separazione (ENRICHMENT 1.1)		
Cellule marcate	$<2\times10^9$	$2–4\times10^9$
Negative Fraction Bag	–	Sostituire le sacche originali del set di tubi con sacche di trasferimento da 1000 mL
Buffer Waste Bag	–	
Priming Waste Bag	–	–
Cell Collection Bag	600 mL	600 mL
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 mL	2000 mL
Luer/Spike Interconnector	1	3
Set di trasferimento di plasma	–	1

Tabella 6.21: Materiali necessari per l'arricchimento di cellule CD8 positive

Separazione (DEPLETION 2.1)	
Cellule marcate	$\leq4\times10^9$
Negative Fraction Bag	Non è necessaria la sostituzione della sacca
Buffer Waste Bag	
Priming Waste Bag	
Cell Collection Bag	600 mL
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 mL
Luer/Spike Interconnector	1

Tabella 6.22: Materiali necessari per la deplezione di cellule CD8 positive

▶ Preparazione delle sacche

Determinare il peso della Cell Collection Bag e della Cell Preparation Bag vuote come descritto nella sezione 7.1.1 a pagina 123.

Marcatura magnetica delle cellule

Fare riferimento alla sezione 7.1 "FASE 1: Preparazione delle cellule e marcatura magnetica" a pagina 123 per una descrizione dettagliata delle seguenti fasi.

▶ Analisi della preparazione cellulare iniziale

▶ Trasferimento della preparazione cellulare iniziale nella Cell Preparation Bag

▶ Diluizione della preparazione cellulare iniziale

Aggiungere il tampone: Peso del tampone da aggiungere = Peso della preparazione cellulare iniziale × 2

▶ Centrifugazione

Centrifugare a 300×g, senza freno, per 15 minuti, a temperatura ambiente (RT: intervallo +19 °C e +25 °C [+66 °F e +77 °F]).

- **Aggiustamento del volume: volume di marcatura 95 g (±5 g)**

1. Rimuovere completamente il sovranatante avendo cura di non risospendere il pellet cellulare.
2. Risospendere il pellet cellulare con cura dopo aver rimosso il sovranatante.
3. Regolare il peso della Cell Preparation Bag (CPB) aggiungendo tampone. Calcolare il peso target della CPB riempita con la preparazione cellulare diluita usando l'equazione: Peso target della CPB riempita = 95 g – Peso della CPB vuota
4. Risospendere il pellet cellulare.

- **Incubazione con il CliniMACS CD8 Reagent**

1. Aggiungere 1 flaconcino di CliniMACS CD8 Reagent. Mescolare delicatamente il contenuto.
2. Incubare su un rotatore orbitale (25 rpm) per 30 minuti a temperatura ambiente.

- **Rimozione del reagente in eccesso**

1. Riempire la Cell Preparation Bag con tampone.
2. Centrifugare (300×g, senza freno, per 15 minuti, a temperatura ambiente).
3. Rimuovere quanto più sovranatante possibile. **Nota:** rimuovere almeno 500 g di sovranatante. Se il sovranatante rimosso è inferiore a 500 g, si consiglia di eseguire un totale di due fasi di lavaggio (anziché solo una). In caso contrario, la rimozione del reagente non legato potrebbe essere insufficiente.
4. Risospendere il pellet cellulare.
5. Regolare il volume di caricamento del campione a 100 g.

6.8.2 FASE 2: Scelta del programma di separazione

- **Avviare il CliniMACS Plus Instrument**
- **Scelta del programma di separazione ENRICHMENT 1.1 o DEPLETION 2.1**
- **Inserimento dei parametri del campione**

Cfr. sezione 7.2.3 a pagina 138 o 7.2.5 a pagina 145.

6.8.3 FASE 3: Installazione del set di tubi CliniMACS

- **CliniMACS Tubing Set e CliniMACS Tubing Set LS**

Cfr. sezione 7.3.1 a pagina 157.

6.8.4 FASE 4: Separazione CliniMACS Plus

- **Procedura di separazione**
- **Scollegare le sacche e registrare il codice del processo**
- **Scollegare il set di tubi e spegnere**
- **Analisi delle cellule**

Cfr. sezione 7.4.2 a pagina 194 o 7.4.4 a pagina 203.

6.9 Arricchimento/deplezione di cellule CD25 positive

Il CliniMACS Plus CD25 System, comprendente il CliniMACS Plus Instrument, il CliniMACS CD25 Reagent, il CliniMACS Tubing Set o il CliniMACS Tubing Set LS e il CliniMACS PBS/EDTA Buffer, è destinato all'arricchimento o alla deplezione *in vitro* di cellule umane CD25 positive – preferibilmente cellule ad alta espressione di CD25 – da popolazioni eterogenee di cellule ematiche.

6.9.1 FASE 1: Preparazione delle cellule e marcatura magnetica

Primo intervento necessario

Capacità dell'applicazione

- **Arricchimento:** cellule CD25 positive o cellule ad alta espressione di CD25: fino a $0{,}6\times10^9$ cellule marcate da un totale di fino a 40×10^9 cellule (WBC) usando il CliniMACS Tubing Set
- **Deplezione:**
  Applicazione su scala normale: fino a 6×10^9 cellule CD25 positive da un totale di fino a 40×10^9 cellule (WBC) usando il CliniMACS Tubing Set LS
  Applicazione su larga scala: più di 6×10^9 e fino a 12×10^9 cellule CD25 positive da un totale di più di 40×10^9 e fino a 80×10^9 cellule (WBC) usando il CliniMACS Tubing Set LS

⚠ ATTENZIONE

Rischio di prestazioni di separazione insufficienti delle cellule marcate. Se si superano le specifiche dell'applicazione, vi è il rischio di una marcatura specifica insufficiente. Utilizzare la quantità necessaria di cellule e reagente come descritto per la rispettiva applicazione.

Materiali CliniMACS necessari

Materiale	Numero di catalogo	Quantità	Programma di separazione
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1	–
CliniMACS CD25 Reagent	274-01	• 1 flaconcino (scala normale) • 2 flaconcini (larga scala)	–
CliniMACS Tubing Set	161-01	1 set di tubi	ENRICHMENT 3.2
CliniMACS Tubing Set LS	162-01	1 set di tubi	DEPLETION 2.1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	Fino a 4 sacche da 1000 mL[1]	–

1 Cfr. Tabella 6.24 – Tabella 6.27. Prima dell'uso, aggiungere HSA al CliniMACS PBS/EDTA Buffer fino a una concentrazione finale dello 0,5% (p/v).

Tabella 6.23: Materiali CliniMACS necessari per l'arricchimento/la deplezione di cellule CD25 positive

Materiali aggiuntivi necessari

- **Cell Preparation Bag:**
  una sacca di trasferimento da 600 mL idonea per la centrifugazione, un forasacche e uno o due set di trasferimento di plasma, da utilizzare durante la procedura di preparazione delle cellule
- **Plasma Waste Bag e Wash Waste Bag:**
  due sacche di trasferimento da 600 mL (o due da 1000 L) idonee per la centrifugazione
- **Cell Collection Bag:**
  una sacca di trasferimento da 150 mL o una o due da 600 mL in combinazione con un Luer/Spike Interconnector per collegare la Cell Collection Bag al set di tubi

  Se per la separazione sono necessarie due Cell Collection Bag, utilizzare un set di trasferimento di plasma per collegare entrambe le sacche (cfr. Tabella 6.25 e Tabella 6.27).
- **Se è necessario sostituire la Negative Fraction Bag e la Buffer Waste Bag:**
  due sacche di trasferimento da 1000 mL in combinazione con due Luer/Spike Interconnector per collegare le sacche al set di tubi (cfr. TabellaTabella 6.25 e Tabella 6.27)
- **Se per la separazione è necessario più di un litro di tampone:**
  un set di trasferimento di plasma per collegare le sacche di tampone (cfr. Tabella 6.25 e Tabella 6.27)
- un filtro di pre-sistema
- pinzette per clampaggio
- siringhe (di diverse dimensioni) e aghi ipodermici da 20 gauge

- albumina sierica umana (HSA) da aggiungere al CliniMACS PBS/EDTA Buffer fino a una concentrazione finale dello 0,5% (p/v)
- provette per campioni

IMPORTANTE

Dopo l'inserimento dei parametri del campione (FASE 2), il CliniMACS Plus Software calcola i volumi che saranno raccolti nella Priming Waste Bag, nella Cell Collection Bag, nella Negative Fraction Bag e nella Buffer Waste Bag. Se il volume del liquido calcolato supera il volume standard di 500 mL, è necessario sostituire le sacche in base alla seguente panoramica dei materiali necessari.

Panoramica dei materiali necessari

Preparazione delle cellule (ENRICHMENT 3.2)		
Applicazione	**Arricchimento di cellule CD25 positive**	**Arricchimento di cellule ad alta espressione di CD25**
Totale cellule (WBC)	≤40×10^9	≤40×10^9
Cellule marcate	≤0,6×10^9	≤0,6×10^9
Numero di flaconcini di reagente	1	1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000–2000 mL	2000 mL
Set di trasferimento di plasma	1–2	2
Volume di marcatura	190 mL	380 mL
Temperatura di marcatura	Temperatura ambiente	Da +4 °C a +8 °C (da +39 °F a +46 °F)

Tabella 6.24: Materiali necessari per la preparazione di cellule CD25 positive/ad alta espressione di CD25 (ENRICHMENT 3.2)

Separazione (ENRICHMENT 3.2)		
Applicazione	**Arricchimento di cellule CD25 positive**	**Arricchimento di cellule ad alta espressione di CD25**
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 mL	1000 mL
Negative Fraction Bag	Non è necessaria la sostituzione della sacca	
Buffer Waste Bag		
Priming Waste Bag		
Cell Collection Bag	150 mL	150 mL
Luer/Spike Interconnector	1	1

Tabella 6.25: Materiali necessari per l'arricchimento di cellule CD25 positive/ad alta espressione di CD25 (ENRICHMENT 3.2)

Preparazione delle cellule (DEPLETION 2.1)		
Totale cellule (WBC)	≤40×10^9	>40–80×10^9
Cellule marcate	≤6×10^9	>6–12×10^9
Numero di flaconcini di reagente	1	2
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000–2000 mL	1000–2000 mL
Set di trasferimento di plasma	1–2	1–2
Volume di marcatura	95 mL	190 mL
Temperatura di marcatura	Temperatura ambiente	Temperatura ambiente

Tabella 6.26: Materiali necessari per la preparazione di cellule CD25 positive (DEPLETION 2.1)

Separazione (DEPLETION 2.1)		
Totale cellule (WBC)	≤40×10^9	>40–80×10^9
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 mL per <5×10^9 cellule marcate	2000 mL per 5–12×10^9 cellule marcate
Negative Fraction Bag	–	Sostituire le sacche originali del set di tubi con sacche di trasferimento da 1000 mL
Buffer Waste Bag	–	
Priming Waste Bag	–	–
Cell Collection Bag	600 mL	2×600 mL
Luer/Spike Interconnector	1	3
Set di trasferimento di plasma	–	2

Tabella 6.27: Materiali necessari per la deplezione di cellule CD25 positive (DEPLETION 2.1)

▶ Preparazione delle sacche

Determinare il peso della Cell Collection Bag e della Cell Preparation Bag vuote come descritto nella sezione 7.1.1 a pagina 123.

Marcatura magnetica delle cellule

Fare riferimento alla sezione 7.1 “FASE 1: Preparazione delle cellule e marcatura magnetica” a pagina 123 per una descrizione dettagliata delle seguenti fasi.

IMPORTANTE

- *Conservare il tampone per la preparazione delle cellule per l’arricchimento o la deplezione di cellule CD25 positive a temperatura compresa tra +19 °C e +25 °C (tra +66 °F e +77 °F).*
- *La marcatura magnetica durante la preparazione delle cellule per l’arricchimento di cellule ad alta espressione di CD25 deve essere effettuata con tampone freddo (tra +4 °C e +8 °C [tra +39 °F e +46 °F]). Temperature più basse o più alte possono determinare una minore purezza e resa delle cellule bersaglio.*

▶ Analisi della preparazione cellulare iniziale

Trasferimento della preparazione cellulare iniziale nella Cell Preparation Bag

Diluizione della preparazione cellulare iniziale

Aggiungere il tampone: Peso del tampone da aggiungere = Peso della preparazione cellulare iniziale × 2

Centrifugazione

Centrifugare a 300×g, senza freno, per 15 minuti, a temperatura ambiente (RT: intervallo +19 °C e +25 °C [+66 °F e +77 °F]).

Aggiustamento del volume: volume di marcatura per

arricchimento di cellule CD25 positive: 190 g (±5 g)
arricchimento di cellule ad alta espressione di CD25: 380 g (±5 g)[1]
deplezione di cellule CD25 positive (applicazione su scala normale): 95 g
deplezione di cellule CD25 positive (applicazione su larga scala): 190 g

1. Rimuovere completamente il sovranatante avendo cura di non risospendere il pellet cellulare.
2. Risospendere il pellet cellulare con cura dopo aver rimosso il sovranatante.
3. Regolare il peso della Cell Preparation Bag (CPB) aggiungendo tampone in base alla seguente equazione: Peso target della CPB riempita = Volume di marcatura + Peso della CPB vuota
4. Risospendere il pellet cellulare.

Incubazione con il CliniMACS CD25 Reagent

1. Aggiungere 1 o 2 flaconcini di CliniMACS CD25 Reagent (cfr. Tabella 6.24 e Tabella 6.26). Mescolare delicatamente il contenuto.
2. Incubare su un rotatore orbitale (25 rpm):
   a) arricchimento o deplezione di cellule CD25 positive: 30 minuti a RT
   b) arricchimento di cellule ad alta espressione di CD25: 15 minuti tra +4 °C e +8 °C (+39 °F e +46 °F)

Rimozione del reagente in eccesso

1. Riempire la Cell Preparation Bag con tampone.
2. Centrifugare (300×g, senza freno, per 15 minuti, a temperatura ambiente).
3. Rimuovere quanto più sovranatante possibile. **Nota:** rimuovere almeno 500 g di sovranatante. Se il sovranatante rimosso è inferiore a 500 g, si consiglia di eseguire un totale di due fasi di lavaggio (anziché solo una). In caso contrario, la rimozione del reagente non legato potrebbe essere insufficiente.
4. Risospendere il pellet cellulare.

1 La marcatura magnetica per l'arricchimento di cellule ad alta espressione di CD25 deve essere effettuata con tampone freddo (tra +4 °C e +8 °C [tra +39 °F e +46 °F]).

5. Regolare il volume di caricamento del campione a 100 g (applicazione su scala normale) o a 200 g (applicazione su larga scala).

6.9.2 FASE 2: Scelta del programma di separazione

- **Avviare il CliniMACS Plus Instrument**
- **Scelta del programma di separazione ENRICHMENT 3.2 o DEPLETION 2.1**
- **Inserimento dei parametri del campione**
  (non per ENRICHMENT 3.2)

Cfr. sezione 7.2.4 a pagina 143 o 7.2.5 a pagina 145.

6.9.3 FASE 3: Installazione del set di tubi CliniMACS

- **CliniMACS Tubing Set e CliniMACS Tubing Set LS**

Cfr. sezione 7.3.1 a pagina 157.

6.9.4 FASE 4: Separazione CliniMACS Plus

- **Procedura di separazione**
- **Scollegare le sacche e registrare il codice del processo**
- **Scollegare il set di tubi e spegnere**
- **Analisi delle cellule**

Cfr. sezione 7.4.3 a pagina 198 o 7.4.4 a pagina 203.

6.10 Arricchimento/deplezione di cellule CD4 positive

Il CliniMACS Plus CD4 System, comprendente il CliniMACS Plus Instrument, il CliniMACS CD4 Reagent, il CliniMACS Tubing Set o il CliniMACS Tubing Set LS e il CliniMACS PBS/EDTA Buffer, è destinato all'arricchimento o alla deplezione *in vitro* di cellule umane CD4 positive da popolazioni eterogenee di cellule ematiche.

6.10.1 FASE 1: Preparazione delle cellule e marcatura magnetica

Primo intervento necessario

Capacità dell'applicazione

- **Arricchimento:** fino a 5×10^9 cellule marcate da un totale di fino a 40×10^9 cellule (WBC) usando il CliniMACS Tubing Set
- **Deplezione:** fino a 12×10^9 cellule marcate da un totale di fino a 40×10^9 cellule (WBC) usando il CliniMACS Tubing Set LS

Nota: se il numero di cellule calcolate supera la capacità di applicazione, dividere il campione e continuare con ciascun campione separatamente utilizzando un nuovo set di tubi per ogni ciclo del CliniMACS Plus Instrument.

⚠ ATTENZIONE

Rischio di prestazioni di separazione insufficienti delle cellule marcate. Se si superano le specifiche dell'applicazione, vi è il rischio di una marcatura specifica insufficiente. Utilizzare la quantità necessaria di cellule e reagente come descritto per la rispettiva applicazione.

Materiali CliniMACS necessari

Materiale	Numero di catalogo	Quantità	Programma di separazione
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1	–
CliniMACS CD4 Reagent	276-01	1 flaconcino	–
CliniMACS Tubing Set	161-01	1 set di tubi	ENRICHMENT 1.1
CliniMACS Tubing Set LS	162-01	1 set di tubi	DEPLETION 2.1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	Fino a 4 sacche da 1000 mL[1]	–

1 Cfr. Tabella 6.29 – Tabella 6.32. Prima dell'uso, aggiungere HSA al CliniMACS PBS/EDTA Buffer fino a una concentrazione finale dello 0,5% (p/v).

Tabella 6.28: Materiali CliniMACS necessari per l'arricchimento/la deplezione di cellule CD4 positive

Materiali aggiuntivi necessari

- **Cell Preparation Bag:**
  una sacca di trasferimento da 600 mL idonea per la centrifugazione nonché un forasacche e due set di trasferimento di plasma, da utilizzare durante la procedura di preparazione delle cellule
- **Plasma Waste Bag e Wash Waste Bag:**
  due sacche di trasferimento da 600 mL (o due da 1000 L) idonee per la centrifugazione
- **Cell Collection Bag:**
  una sacca di trasferimento da 150 mL o una o due da 600 mL in combinazione con un Luer/Spike Interconnector per collegare la Cell Collection Bag al set di tubi

  Se per la separazione sono necessarie due Cell Collection Bag, utilizzare un set di trasferimento di plasma per collegare entrambe le sacche (cfr. Tabella 6.30 e Tabella 6.32).
- **Se è necessario sostituire la Negative Fraction Bag, la Buffer Waste Bag e/o la Priming Waste Bag:**
  fino a tre sacche di trasferimento da 1000 mL in combinazione con due Luer/Spike Interconnector per collegare le sacche al set di tubi (cfr. Tabella 6.30 e Tabella 6.32)

  Sostituire la Priming Waste Bag servendosi del connettore sterile per tubi.
- **Se per la separazione è necessario più di un litro di tampone:**
  uno o due set di trasferimento di plasma per collegare le sacche di tampone (cfr. Tabella 6.30 e Tabella 6.32)
- un filtro di pre-sistema
- pinzette per clampaggio
- siringhe (di diverse dimensioni) e aghi ipodermici da 20 gauge
- albumina sierica umana (HSA) da aggiungere al CliniMACS PBS/EDTA Buffer fino a una concentrazione finale dello 0,5% (p/v)
- provette per campioni

IMPORTANTE

Dopo l'inserimento dei parametri del campione (FASE 2), il CliniMACS Plus Software calcola i volumi che saranno raccolti nella Priming Waste Bag, nella Cell Collection Bag, nella Negative Fraction Bag e nella Buffer Waste Bag. Se il volume del liquido calcolato supera il volume standard di 500 mL, è necessario sostituire le sacche in base alla seguente panoramica dei materiali necessari.

Panoramica dei materiali necessari

Preparazione delle cellule (ENRICHMENT 1.1)	
Totale cellule (WBC)	≤40×10^9
Cellule marcate	≤5×10^9
Numero di flaconcini di reagente	1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 mL
Set di trasferimento di plasma	1

Tabella 6.29: Materiali necessari per la preparazione di cellule CD4 positive (ENRICHMENT 1.1)

Separazione (ENRICHMENT 1.1)		
Cellule marcate	≤2×10^9	>2–5×10^9
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 mL	2000 mL
Negative Fraction Bag	–	Sostituire le sacche originali del set di tubi con sacche di trasferimento da 1000 mL
Buffer Waste Bag	–	
Priming Waste Bag	–	–
Cell Collection Bag	150 mL	600 mL
Luer/Spike Interconnector	1	3
Set di trasferimento di plasma	–	1

Tabella 6.30: Materiali necessari per l'arricchimento di cellule CD4 positive (ENRICHMENT 1.1)

Preparazione delle cellule (DEPLETION 2.1)	
Totale cellule (WBC)	≤40×10^9
Cellule marcate	≤12×10^9
Numero di flaconcini di reagente	1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 mL
Set di trasferimento di plasma	1

Tabella 6.31: Materiali necessari per la preparazione di cellule CD4 positive (DEPLETION 2.1)

Separazione (DEPLETION 2.1)		
Cellule marcate	<5×10^9	5–12×10^9
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 mL	2000 mL
Negative Fraction Bag	–	Sostituire le sacche originali del set di tubi con sacche di trasferimento da 1000 mL
Buffer Waste Bag	–	
Priming Waste Bag	–	–
Cell Collection Bag	1×600 mL	1–2×600 mL
Luer/Spike Interconnector	1	3
Set di trasferimento di plasma	–	1–2

Tabella 6.32: Materiali necessari per la deplezione di cellule CD4 positive (DEPLETION 2.1)

▶ Preparazione delle sacche

Determinare il peso della Cell Collection Bag e della Cell Preparation Bag vuote come descritto nella sezione 7.1.1 a pagina 123.

Marcatura magnetica delle cellule

Fare riferimento alla sezione 7.1 "FASE 1: Preparazione delle cellule e marcatura magnetica" a pagina 123 per una descrizione dettagliata delle seguenti fasi.

▶ Analisi della preparazione cellulare iniziale

▶ Trasferimento della preparazione cellulare iniziale nella Cell Preparation Bag

▶ Diluizione della preparazione cellulare iniziale

Aggiungere il tampone: Peso del tampone da aggiungere = Peso della preparazione cellulare iniziale × 2

▶ Centrifugazione

Centrifugare a 300×g, senza freno, per 15 minuti, a temperatura ambiente (RT: intervallo +19 °C e +25 °C [+66 °F e +77 °F]).

▶ Aggiustamento del volume: volume di marcatura 95 g (±5 g)

1. Rimuovere il sovranatante per regolare il campione utilizzando la seguente equazione: Peso del sovranatante da rimuovere = Peso della preparazione cellulare diluita – 95 g
2. Risospendere il pellet cellulare.

▶ Incubazione con il CliniMACS CD4 Reagent

1. Aggiungere 1 flaconcino di CliniMACS CD4 Reagent. Mescolare delicatamente il contenuto.
2. Incubare su un rotatore orbitale (25 rpm) per 30 minuti a temperatura ambiente.

▶ Rimozione del reagente in eccesso

1. Riempire la Cell Preparation Bag con tampone.
2. Centrifugare (300×g, senza freno, per 15 minuti, a temperatura ambiente).
3. Rimuovere quanto più sovranatante possibile. **Nota:** rimuovere almeno 500 g di sovranatante. Se il sovranatante rimosso è inferiore a 500 g, si consiglia di eseguire un totale di due fasi di lavaggio (anziché solo una). In caso contrario, la rimozione del reagente non legato potrebbe essere insufficiente.

4. Risospendere il pellet cellulare.
5. Regolare il volume di caricamento del campione a 100 g.

6.10.2 FASE 2: Scelta del programma di separazione

- **Avviare il CliniMACS Plus Instrument**
- **Scelta del programma di separazione ENRICHMENT 1.1 o DEPLETION 2.1**
- **Inserimento dei parametri del campione**

Cfr. sezione 7.2.3 a pagina 138 e 7.2.5 a pagina 145.

6.10.3 FASE 3: Installazione del set di tubi CliniMACS

- **CliniMACS Tubing Set e CliniMACS Tubing Set LS**

Cfr. sezione 7.3.1 a pagina 157.

6.10.4 FASE 4: Separazione CliniMACS Plus

- **Procedura di separazione**
- **Scollegare le sacche e registrare il codice del processo**
- **Scollegare il set di tubi e spegnere**
- **Analisi delle cellule**

Cfr. sezione 7.4.2 a pagina 194 o 7.4.4 a pagina 203.

6.11 Deplezione di cellule CD4 positive e CD18 positive

Il CliniMACS Plus CD4/CD8 System, comprendente il CliniMACS Plus Instrument, il CliniMACS CD4 Reagent, il CliniMACS CD8 Reagent, il CliniMACS Tubing Set LS e il CliniMACS PBS/EDTA Buffer, è destinato alla deplezione simultanea *in vitro* di cellule umane CD4 positive e CD8 positive da popolazioni eterogenee di cellule ematiche.

6.11.1 FASE 1: Preparazione delle cellule e marcatura magnetica

Primo intervento necessario

Capacità dell'applicazione

Fino a 12×10^9 cellule CD4 positive e fino a 4×10^9 cellule CD8 positive da un totale di fino a 40×10^9 cellule (WBC)

Nota: se il numero di cellule calcolate supera la capacità di applicazione, dividere il campione e continuare con ciascun campione separatamente utilizzando un nuovo set di tubi per ogni ciclo del CliniMACS Plus Instrument.

⚠ ATTENZIONE

Rischio di prestazioni di separazione insufficienti delle cellule marcate. Se si superano le specifiche dell'applicazione, vi è il rischio di una marcatura specifica insufficiente. Utilizzare la quantità necessaria di cellule e reagente come descritto per la rispettiva applicazione.

Materiali CliniMACS necessari

Materiale	Numero di catalogo	Quantità
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS CD4 Reagent	276-01	1 flaconcino
CliniMACS CD8 Reagent	275-01	1 flaconcino
CliniMACS Tubing Set LS	162-01	1 set di tubi
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	Fino a 4 sacche da 1000 mL[1]

1 Cfr. Tabella 6.34 e Tabella 6.35. Prima dell'uso, aggiungere HSA al CliniMACS PBS/EDTA Buffer fino a una concentrazione finale dello 0,5% (p/v).

Tabella 6.33: Materiali CliniMACS necessari per la deplezione di cellule CD4 positive e CD8 positive

Materiali aggiuntivi necessari

- **Cell Preparation Bag:**
  una sacca di trasferimento da 600 mL idonea per la centrifugazione nonché un forasacche e due set di trasferimento di plasma, da utilizzare durante la procedura di preparazione delle cellule
- **Plasma Waste Bag e Wash Waste Bag:**
  due sacche di trasferimento da 600 mL (o due da 1000 L) idonee per la centrifugazione
- **Cell Collection Bag:**
  una o due sacche di trasferimento da 600 mL in combinazione con un Luer/Spike Interconnector per collegare la Cell Collection Bag al set di tubi

  Se per la separazione sono necessarie due Cell Collection Bag, utilizzare un set di trasferimento di plasma per collegare entrambe le sacche (cfr. Tabella 6.35).
- **Se è necessario sostituire la Negative Fraction Bag, la Buffer Waste Bag e/o la Priming Waste Bag:**
  fino a tre sacche di trasferimento da 1000 mL in combinazione con due Luer/Spike Interconnector per collegare le sacche al set di tubi (cfr. Tabella 6.35)

  Sostituire la Priming Waste Bag servendosi del connettore sterile per tubi.
- **Se per la separazione è necessario più di un litro di tampone:**
  uno o due set di trasferimento di plasma per collegare le sacche di tampone (cfr. Tabella 6.35)
- un filtro di pre-sistema
- pinzette per clampaggio
- siringhe (di diverse dimensioni) e aghi ipodermici da 20 gauge
- albumina sierica umana (HSA) da aggiungere al CliniMACS PBS/EDTA Buffer fino a una concentrazione finale dello 0,5% (p/v)
- provette per campioni

IMPORTANTE

Dopo l'inserimento dei parametri del campione (FASE 2), il CliniMACS Plus Software calcola i volumi che saranno raccolti nella Priming Waste Bag, nella Cell Collection Bag, nella Negative Fraction Bag e nella Buffer Waste Bag. Se il volume del liquido calcolato supera il volume standard di 500 mL, è necessario sostituire le sacche in base alla seguente panoramica dei materiali necessari.

Panoramica dei materiali necessari

Preparazione cellulare	
Totale cellule (WBC)	≤40×10^9
Cellule marcate	≤12×10^9 cellule CD4 positive e ≤4×10^9 cellule CD8 positive
Numero di flaconcini di reagente	1 flaconcino di CliniMACS CD4 Reagent e 1 flaconcino di CliniMACS CD8 Reagent
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 mL
Set di trasferimento di plasma	1

Tabella 6.34: Materiali necessari per la preparazione di cellule CD4 positive e CD8 positive

Separazione			
Cellule marcate	<5×10^9	5–13×10^9	>13–16×10^9
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 mL	2000 mL	3000 mL
Negative Fraction Bag	–	Sostituire le sacche originali del set di tubi con sacche di trasferimento da 1000 mL	Sostituire le sacche originali del set di tubi con sacche di trasferimento da 1000 mL
Buffer Waste Bag	–		
Priming Waste Bag	–	–	
Cell Collection Bag	1× 600 mL	1–2× 600 mL	2× 600 mL
Luer/Spike Interconnector	1	3	3
Set di trasferimento di plasma	–	1–2	3

Tabella 6.35: Materiali necessari per la deplezione di cellule CD4 positive e CD8 positive

▶ Preparazione delle sacche

Determinare il peso della Cell Collection Bag e della Cell Preparation Bag vuote come descritto nella sezione 7.1.1 a pagina 123.

Marcatura magnetica delle cellule

Fare riferimento alla sezione 7.1 “FASE 1: Preparazione delle cellule e marcatura magnetica” a pagina 123 per una descrizione dettagliata delle seguenti fasi.

▶ Analisi della preparazione cellulare iniziale

▶ Trasferimento della preparazione cellulare iniziale nella Cell Preparation Bag

▶ Diluizione della preparazione cellulare iniziale

Aggiungere il tampone: Peso del tampone da aggiungere = Peso della preparazione cellulare iniziale × 2

▶ Centrifugazione

Centrifugare a 300×g, senza freno, per 15 minuti, a temperatura ambiente (RT: tra +19 °C e +25 °C (tra +66 °F e +77 °F)

- **Aggiustamento del volume: volume di marcatura 88 g (±5 g)**

  1. Rimuovere il sovranatante per regolare il campione utilizzando la seguente equazione: Peso del sovranatante da rimuovere = Peso della preparazione cellulare diluita – Volume di marcatura
  2. Risospendere il pellet cellulare.

- **Incubazione con il CliniMACS CD4 Reagent e il CliniMACS CD8 Reagent**

  1. Aggiungere 1 flaconcino di CliniMACS CD4 Reagent e 1 flaconcino di CliniMACS CD8 Reagent. Mescolare delicatamente il contenuto.
  2. Incubare su un rotatore orbitale (25 rpm) per 30 minuti a temperatura ambiente.

- **Rimozione del reagente in eccesso**

  1. Riempire la Cell Preparation Bag con tampone.
  2. Centrifugare (300×g, senza freno, per 15 minuti, a temperatura ambiente).
  3. Rimuovere quanto più sovranatante possibile. **Nota:** rimuovere almeno 500 g di sovranatante. Se il sovranatante rimosso è inferiore a 500 g, si consiglia di eseguire un totale di due fasi di lavaggio (anziché solo una). In caso contrario, la rimozione del reagente non legato potrebbe essere insufficiente.
  4. Risospendere il pellet cellulare.
  5. Regolare il volume di caricamento del campione a 100 g.

6.11.2 FASE 2: Scelta del programma di separazione

- **Avviare il CliniMACS Plus Instrument**
- **Scelta del programma di separazione DEPLETION 2.1**
- **Inserimento dei parametri del campione**

Cfr. sezione 7.2.5 a pagina 145.

6.11.3 FASE 3: Installazione del set di tubi CliniMACS

- **CliniMACS Tubing Set e CliniMACS Tubing Set LS**

Cfr. sezione 7.3.1 a pagina 157.

6.11.4 FASE 4: Separazione CliniMACS Plus

- **Procedura di separazione**
- **Scollegare le sacche e registrare il codice del processo**
- **Scollegare il set di tubi e spegnere**
- **Analisi delle cellule**

Cfr. sezione 7.4.4 a pagina 203.

6.12 Arricchimento di cellule CD1c (BDCA-1) positive – Parte 1: Deplezione di cellule CD19 positive e marcatura di cellule CD1c (BDCA-1) positive

Il CliniMACS Plus CD1c (BDCA-1)-Biotin System, comprendente il CliniMACS Plus Instrument, il CliniMACS CD1c (BDCA-1)-Biotin, il CliniMACS CD19 Reagent, il CliniMACS Anti-Biotin Reagent, il CliniMACS Tubing Set LS, il CliniMACS Tubing Set e il CliniMACS PBS/EDTA Buffer, è destinato all'arricchimento *in vitro* di cellule umane CD1c (BDCA-1) positive da popolazioni eterogenee di cellule ematiche dopo la deplezione delle cellule CD19 positive.

6.12.1 FASE 1: Preparazione delle cellule e marcatura magnetica

Primo intervento necessario

Capacità dell'applicazione

Deplezione di un numero fino a 5×10^9 di cellule CD19 positive e marcatura di un numero fino a $0{,}2\times10^9$ cellule CD1c (BDCA-1) positive da un totale di fino a 40×10^9 cellule (WBC)

⚠ ATTENZIONE

Rischio di prestazioni di separazione insufficienti delle cellule marcate. Se si superano le specifiche dell'applicazione, vi è il rischio di una marcatura specifica insufficiente. Utilizzare la quantità necessaria di cellule e reagente come descritto per la rispettiva applicazione.

Materiali CliniMACS necessari

Materiale	Numero di catalogo	Quantità
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS CD1c (BDCA-1)-Biotin	277-01	1 flaconcino
CliniMACS CD19 Reagent	179-01	1 flaconcino
CliniMACS Tubing Set LS	162-01	1 set di tubi
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	Sacche da 2×1000 mL[1]

1 Prima dell'uso, aggiungere HSA al tampone fino a una concentrazione finale dello 0,5% (p/v).

Tabella 6.36: Materiali CliniMACS necessari per l'arricchimento di cellule CD1c (BDCA-1) positive (Parte 1)

Materiali aggiuntivi necessari (per Parte 1 e Parte 2)

- **Cell Preparation Bag:**
  due sacche di trasferimento da 600 mL idonee per la centrifugazione nonché due forasacche e tre set di trasferimento di plasma, da utilizzare durante le procedure di preparazione delle cellule
- **Plasma Waste Bag e Wash Waste Bag:**
  cinque sacche di trasferimento da 600 mL idonee per la centrifugazione
- **Cell Collection Bag (Parte 1):**
  una sacca di trasferimento da 600 mL idonea per la centrifugazione in combinazione con un Luer/Spike Interconnector per collegare la Cell Collection Bag al set di tubi
- **Cell Collection Bag (Parte 2):**
  una sacca di trasferimento da 150 mL idonea per la centrifugazione in combinazione con un Luer/Spike Interconnector per collegare la sacca di trasferimento al set di tubi
- due filtri pre-sistema
- pinzette per clampaggio
- siringhe (di diverse dimensioni) e aghi ipodermici da 20 gauge
- albumina sierica umana (HSA) da aggiungere al CliniMACS PBS/EDTA Buffer fino a una concentrazione finale dello 0,5% (p/v)
- provette per campioni

Marcatura magnetica delle cellule (Parte 1)

Fare riferimento alla sezione 7.1 "FASE 1: Preparazione delle cellule e marcatura magnetica" a pagina 123 per una descrizione dettagliata delle seguenti fasi.

▶ Analisi della preparazione cellulare iniziale

▶ Trasferimento della preparazione cellulare iniziale nella Cell Preparation Bag

▶ Diluizione della preparazione cellulare iniziale

Aggiungere il tampone: Peso del tampone da aggiungere = Peso della preparazione cellulare iniziale × 2

▶ Centrifugazione

Centrifugare a 200×g, senza freno, per 15 minuti, a temperatura ambiente (RT: intervallo +19 °C e +25 °C [+66 °F e +77 °F]).

▶ Aggiustamento del volume: volume di marcatura 90 g (±5 g)

1. Risospendere il pellet cellulare con cura dopo aver rimosso il sovranatante.
2. Regolare il peso della Cell Preparation Bag Parte 1 (CPB) aggiungendo tampone in base alla seguente equazione: Peso target della CPB Parte 1 riempita = 90 g + Peso della CPB vuota
3. Risospendere il pellet cellulare.

▶ Incubazione con il CliniMACS CD19 Reagent e il CliniMACS CD1c (BDCA-1)-Biotin

1. Aggiungere 1 flaconcino di CliniMACS CD19 Reagent e 1 flaconcino di CliniMACS CD1c (BDCA-1)-Biotin. Mescolare delicatamente il contenuto.
2. Incubare su un rotatore orbitale (25 rpm) per 30 minuti a temperatura ambiente.

▶ Rimozione del reagente in eccesso

1. Riempire la Cell Preparation Bag Parte 1 con tampone.
2. Centrifugare (300×g, senza freno, per 15 minuti, a temperatura ambiente).
3. Rimuovere quanto più sovranatante possibile. **Nota:** rimuovere almeno 500 g di sovranatante. Se il sovranatante rimosso è inferiore a 500 g, si consiglia di eseguire un totale di due fasi di lavaggio (anziché solo una). In caso contrario, la rimozione del reagente non legato potrebbe essere insufficiente.
4. Risospendere il pellet cellulare.
5. Regolare il volume di caricamento del campione a 100 g.

6.12.2 FASE 2: Scelta del programma di separazione

▶ Avviare il CliniMACS Plus Instrument

▶ Scelta del programma di separazione DEPLETION 2.1

▶ Inserimento dei parametri del campione

Cfr. sezione 7.2.5 a pagina 145.

6.12.3 FASE 3: Installazione del set di tubi CliniMACS

- **CliniMACS Tubing Set e CliniMACS Tubing Set LS**

Cfr. sezione 7.3.1 a pagina 157.

6.12.4 FASE 4: Separazione CliniMACS Plus

- **Procedura di separazione**
- **Scollegare le sacche e registrare il codice del processo**
- **Scollegare il set di tubi e spegnere**
- **Analisi delle cellule**

Cfr. sezione 7.4.4 a pagina 203.

6.13 Arricchimento di cellule CD1c (BDCA-1) positive – Parte 2: Flexible Labeling System

Il CliniMACS Plus CD1c (BDCA-1)-Biotin System, comprendente il CliniMACS Plus Instrument, il CliniMACS CD1c (BDCA-1)-Biotin, il CliniMACS CD19 Reagent, il CliniMACS Anti-Biotin Reagent, il CliniMACS Tubing Set LS, il CliniMACS Tubing Set e il CliniMACS PBS/EDTA Buffer, è destinato all'arricchimento *in vitro* di cellule umane CD1c (BDCA-1) positive da popolazioni eterogenee di cellule ematiche dopo la deplezione delle cellule CD19 positive.

6.13.1 FASE 1: Preparazione delle cellule e marcatura magnetica

Primo intervento necessario

Capacità dell'applicazione

Fino a $0{,}2\times10^9$ cellule CD1c (BDCA-1) positive da un totale di fino a 40×10^9 cellule (WBC)

⚠ ATTENZIONE

Rischio di prestazioni di separazione insufficienti delle cellule marcate. Se si superano le specifiche dell'applicazione, vi è il rischio di una marcatura specifica insufficiente. Utilizzare la quantità necessaria di cellule e reagente come descritto per la rispettiva applicazione.

Materiali CliniMACS necessari

Materiale	Numero di catalogo	Quantità
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS Anti-Biotin Reagent	173-01	1 flaconcino
CliniMACS Tubing Set	161-01	1 set di tubi
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	Sacche da 3×1000 mL[1]

1 Prima dell'uso, aggiungere HSA al tampone fino a una concentrazione finale dello 0,5% (p/v).

Tabella 6.37: Materiali CliniMACS necessari per l'arricchimento di cellule CD1c (BDCA-1) positive (Parte 2)

Materiali aggiuntivi necessari

Per i materiali aggiuntivi necessari fare riferimento alla parte 1.

▶ Preparazione delle sacche

Determinare il peso della Cell Collection Bag e della Cell Preparation Bag vuote come descritto nella sezione 7.1.1 a pagina 123.

Marcatura magnetica di cellule (preparazione cellulare depletata di CD19 (Parte 2))

Fare riferimento alla sezione 7.1 "FASE 1: Preparazione delle cellule e marcatura magnetica" a pagina 123 per una descrizione dettagliata delle seguenti fasi.

▶ Trasferimento della preparazione cellulare iniziale depletata di CD19 nella Cell Preparation Bag Parte 2

▶ Diluizione della preparazione cellulare iniziale depletata di CD19

Aggiungere il tampone: peso del tampone da aggiungere = 600 g – Peso della preparazione cellulare iniziale depletata di CD19

▶ Centrifugazione

Centrifugare a 300×g, senza freno, per 15 minuti, a temperatura ambiente (RT: intervallo +19 °C e +25 °C [+66 °F e +77 °F]).

▶ Aggiustamento del volume: volume di marcatura 95 g (±5 g)

1. Rimuovere il sovranatante per regolare il campione utilizzando la seguente equazione: Peso del sovranatante da rimuovere = Peso della preparazione cellulare diluita – Volume di marcatura
2. Risospendere il pellet cellulare.

▶ Incubazione con il CliniMACS Anti-Biotin Reagent

1. Aggiungere 1 flaconcino di CliniMACS Anti-Biotin Reagent. Mescolare delicatamente il contenuto

2. Incubare su un rotatore orbitale (25 rpm) per 30 minuti a temperatura ambiente.

▶ **Rimozione del reagente in eccesso**

1. Riempire la Cell Preparation Bag Parte 2 con tampone.
2. Centrifugare (300×g, senza freno, per 15 minuti, a temperatura ambiente).
3. Rimuovere quanto più sovranatante possibile.
4. Risospendere il pellet cellulare.
5. Riempire la Cell Preparation Bag Parte 2 con tampone.
6. Centrifugare (300×g, senza freno, per 15 minuti, a temperatura ambiente).
7. Rimuovere quanto più sovranatante possibile.
8. Risospendere il pellet cellulare.
9. Regolare il volume di caricamento del campione a 100 g.

6.13.2 FASE 2: Scelta del programma di separazione

▶ **Avviare il CliniMACS Plus Instrument**

▶ **Scelta del programma di separazione ENRICHMENT 3.2**

Cfr. sezione 7.2.4 a pagina 143.

6.13.3 FASE 3: Installazione del set di tubi CliniMACS

▶ **CliniMACS Tubing Set e CliniMACS Tubing Set LS**

Cfr. sezione 7.3.1 a pagina 157.

6.13.4 FASE 4: Separazione CliniMACS Plus

▶ **Procedura di separazione**

▶ **Scollegare le sacche e registrare il codice del processo**

▶ **Scollegare il set di tubi e spegnere**

▶ **Analisi delle cellule**

Cfr. sezione 7.4.3 a pagina 198.

6.14 Arricchimento di cellule CD304 (BDCA-4) positive

Il CliniMACS Plus CD304 (BDCA-4) System, comprendente il CliniMACS Plus Instrument, il CliniMACS CD304 (BDCA-4) Reagent, il CliniMACS Tubing Set e il CliniMACS PBS/EDTA Buffer, è destinato all'arricchimento *in vitro* di cellule umane CD304 (BDCA-4) positive da popolazioni eterogenee di cellule ematiche.

6.14.1 FASE 1: Preparazione delle cellule e marcatura magnetica

Primo intervento necessario

Capacità dell'applicazione

Fino a $0{,}2\times10^9$ cellule CD304 (BDCA-4) positive da un totale di fino a 40×10^9 cellule (WBC)

⚠ ATTENZIONE

Rischio di prestazioni di separazione insufficienti delle cellule marcate. Se si superano le specifiche dell'applicazione, vi è il rischio di una marcatura specifica insufficiente. Utilizzare la quantità necessaria di cellule e reagente come descritto per la rispettiva applicazione.

Materiali CliniMACS necessari

Materiale	Numero di catalogo	Quantità
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS CD304 (BDCA-4) Reagent	278-01	1 flaconcino
CliniMACS Tubing Set	161-01	1 set di tubi
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	Sacche da 4×1000 mL[1]

1 Prima dell'uso, aggiungere HSA al CliniMACS PBS/EDTA Buffer fino a una concentrazione finale dello 0,5% (p/v).

Tabella 6.38: Materiali CliniMACS necessari per l'arricchimento di cellule CD304 (BDCA-4) positive

Materiali aggiuntivi necessari

- **Cell Preparation Bag:**
  una sacca di trasferimento da 600 mL idonea per la centrifugazione nonché un forasacche e tre set di trasferimento di plasma, da utilizzare durante le procedure di preparazione delle cellule
- **Plasma Waste Bag e Wash Waste Bag:**
  cinque sacche di trasferimento da 600 mL idonee per la centrifugazione

- **Cell Collection Bag:**
  una sacca di trasferimento da 150 mL in combinazione con un Luer/Spike Interconnector per collegare la Cell Collection Bag al set di tubi
- un filtro di pre-sistema
- pinzette per clampaggio
- siringhe (di diverse dimensioni) e aghi ipodermici da 20 gauge
- albumina sierica umana (HSA) da aggiungere al CliniMACS PBS/EDTA Buffer fino a una concentrazione finale dello 0,5% (p/v)
- provette per campioni

▶ Preparazione delle sacche

Determinare il peso della Cell Collection Bag e della Cell Preparation Bag vuote come descritto nella sezione 7.1.1 a pagina 123.

Marcatura magnetica delle cellule

Fare riferimento alla sezione 7.1 "FASE 1: Preparazione delle cellule e marcatura magnetica" a pagina 123 per una descrizione dettagliata delle seguenti fasi.

▶ Analisi della preparazione cellulare iniziale

▶ Trasferimento della preparazione cellulare iniziale nella Cell Preparation Bag

▶ Diluizione della preparazione cellulare iniziale depletata

Aggiungere il tampone: Peso del tampone da aggiungere = 600 g – Peso della preparazione cellulare iniziale

▶ Centrifugazione

Centrifugare a 200×g, senza freno, per 15 minuti, a temperatura ambiente (RT: intervallo +19 °C e +25 °C [+66 °F e +77 °F]).

▶ Ripetere due volte le fasi "Diluizione della preparazione cellulare iniziale" e "Centrifugazione"

1. Riempire una sacca di trasferimento fino a 600 g.
2. Centrifugare a 300×g, senza freno, per 15 minuti, a temperatura ambiente (RT: intervallo +19 °C e +25 °C [+66 °F e +77 °F]).
3. Rimuovere il sovranatante.

- **Aggiustamento del volume: volume di marcatura 95 g (±5 g)**

  1. Rimuovere completamente il sovranatante avendo cura di non risospendere il pellet cellulare.
  2. Risospendere il pellet cellulare con cura dopo aver rimosso il sovranatante.
  3. Regolare il peso della Cell Preparation Bag (CPB) aggiungendo tampone in base alla seguente equazione: Peso target della CPB riempita = 95 g + Peso della CPB vuota.
  4. Risospendere il pellet cellulare.

- **Incubazione con il CliniMACS CD304 (BDCA-4) Reagent**

  1. Aggiungere 1 flaconcino di CliniMACS CD304 (BDCA-4) Reagent. Mescolare delicatamente il contenuto
  2. Incubare su un rotatore orbitale (25 rpm) per 30 minuti a temperatura ambiente.

- **Rimozione del reagente in eccesso**

  1. Riempire la Cell Preparation Bag con tampone.
  2. Centrifugare (300×g, senza freno, per 15 minuti, a temperatura ambiente).
  3. Rimuovere quanto più sovranatante possibile.
  4. Risospendere il pellet cellulare.
  5. Regolare il volume di caricamento del campione a 100 g.

6.14.2 FASE 2: Scelta del programma di separazione

- **Avviare il CliniMACS Plus Instrument**

- **Scelta del programma di separazione ENRICHMENT 3.2**

Cfr. sezione 7.2.4 a pagina 143.

6.14.3 FASE 3: Installazione del set di tubi CliniMACS

- **CliniMACS Tubing Set e CliniMACS Tubing Set LS**

Cfr. sezione 7.3.1 a pagina 157.

6.14.4 FASE 4: Separazione CliniMACS Plus

- **Procedura di separazione**
- **Scollegare le sacche e registrare il codice del processo**
- **Scollegare il set di tubi e spegnere**
- **Analisi delle cellule**

Cfr. sezione 7.4.3 a pagina 198.

6.15 Deplezione di cellule TCRα/β positive

Il CliniMACS Plus TCRα/β-Biotin System, comprendente il CliniMACS Plus Instrument, il CliniMACS TCRα/β-Biotin, il CliniMACS Anti-Biotin Reagent, il CliniMACS Depletion Tubing Set e il CliniMACS PBS/EDTA Buffer, è destinato alla deplezione *in vitro* di cellule umane TCRα/β positive da popolazioni eterogenee di cellule ematiche.

6.15.1 FASE 1: Preparazione delle cellule e marcatura magnetica

Primo intervento necessario

Capacità dell'applicazione

Fino a 24×10^9 cellule TCRα/β positive da un totale di fino a 60×10^9 cellule (WBC)

⚠ ATTENZIONE

Rischio di prestazioni di separazione insufficienti delle cellule marcate. Se si superano le specifiche dell'applicazione, vi è il rischio di una marcatura specifica insufficiente. Utilizzare la quantità necessaria di cellule e reagente come descritto per la rispettiva applicazione.

Materiali CliniMACS necessari

Materiale	Numero di catalogo	Quantità
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS TCRα/β-Biotin	701-48	1 flaconcino
CliniMACS Anti-Biotin Reagent	173-01	2 flaconcini
CliniMACS Depletion Tubing Set	261-01	1 set di tubi
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	Fino a 4 sacche da 1000 mL[1]

1 Prima dell'uso, aggiungere HSA al CliniMACS PBS/EDTA Buffer fino a una concentrazione finale dello 0,5% (p/v).

Tabella 6.39: Materiali CliniMACS necessari per la deplezione di cellule TCRα/β positive

Materiali aggiuntivi necessari

- **Cell Preparation Bag:**
  una sacca di trasferimento da 600 mL idonea per la centrifugazione nonché un forasacche e due set di trasferimento di plasma, da utilizzare durante la procedura di preparazione delle cellule
- **Plasma Waste Bag e Wash Waste Bag:**
  quattro sacche di trasferimento da 600 mL (o da 1000 mL) idonee per la centrifugazione
- **Cell Collection Bag:**
  una Cell Collection Bag da 600 mL è già assemblata nel CliniMACS Depletion Tubing Set.
- un filtro di pre-sistema
- pinzette per clampaggio
- siringhe (di diverse dimensioni) e aghi ipodermici da 20 gauge
- albumina sierica umana (HSA) da aggiungere al CliniMACS PBS/EDTA Buffer fino a una concentrazione finale dello 0,5% (p/v)
- provette per campioni

▶ Preparazione delle sacche

Determinare il peso della Cell Collection Bag e della Cell Preparation Bag vuote come descritto nella sezione 7.1.1 a pagina 123.

Marcatura magnetica delle cellule

Fare riferimento alla sezione 7.1 “FASE 1: Preparazione delle cellule e marcatura magnetica” a pagina 123 per una descrizione dettagliata delle seguenti fasi.

▶ Analisi della preparazione cellulare iniziale

Determinare la percentuale/il numero totale di tutte le cellule marcate con TCRα/β (incluso il legame aspecifico con TCRα/β, non solo le cellule realmente TCRα/β positive). Considerare questo numero per applicazioni specifiche e per l’inserimento dei parametri dei campioni (cfr. FASE 2).

▶ Trasferimento della preparazione cellulare iniziale nella Cell Preparation Bag

▶ Diluizione della preparazione cellulare iniziale

Aggiungere il tampone: Peso del tampone da aggiungere = Peso della preparazione cellulare iniziale × 2

Centrifugazione

1. Centrifugare a 200×g, senza freno, per 15 minuti, a temperatura ambiente (RT: intervallo +19 °C e +25 °C [+66 °F e +77 °F]).
2. Rimuovere il sovranatante.

Aggiustamento del volume: volume di marcatura 95 g (±5 g)

1. Rimuovere completamente il sovranatante avendo cura di non risospendere il pellet cellulare.
2. Risospendere il pellet cellulare con cura dopo aver rimosso il sovranatante.
3. Regolare il peso della Cell Preparation Bag (CPB) aggiungendo tampone in base alla seguente equazione: Peso target della CPB riempita = 95 g + Peso della CPB vuota
4. Risospendere il pellet cellulare.

Marcatura delle cellule: incubazione con il CliniMACS TCRα/β-Biotin

1. Aggiungere 1 flaconcino di CliniMACS TCRα/β-Biotin. Mescolare delicatamente il contenuto.
2. Incubare su un rotatore orbitale (25 rpm) per 30 minuti a temperatura ambiente.

Rimozione del coniugato in eccesso: ripetere questo passo

1. Riempire la Cell Preparation Bag con tampone.
2. Centrifugare (300×g, senza freno, per 15 minuti, a temperatura ambiente).
3. Rimuovere quanto più sovranatante possibile.
4. Risospendere il pellet cellulare e portare il volume a 190 g dopo il secondo lavaggio.

Marcatura magnetica delle cellule: incubazione con il CliniMACS Anti-Biotin Reagent

1. Aggiungere 2 flaconcini di CliniMACS Anti-Biotin Reagent. Mescolare delicatamente il contenuto.
2. Incubare su un rotatore orbitale (25 rpm) per 30 minuti a temperatura ambiente.

- **Rimozione del reagente in eccesso**

1. Riempire la Cell Preparation Bag con tampone.
2. Centrifugare (300×g, senza freno, per 15 minuti, a temperatura ambiente).
3. Rimuovere quanto più sovranatante possibile. **Nota:** rimuovere almeno 500 g di sovranatante. Se il sovranatante rimosso è inferiore a 500 g, si consiglia di eseguire un totale di due fasi di lavaggio (anziché solo una). In caso contrario, la rimozione del reagente non legato potrebbe essere insufficiente.
4. Risospendere il pellet cellulare.
5. Regolare il volume di caricamento del campione a 150 g. Si consiglia una concentrazione massima di WBC di $0{,}4\times10^9$ WBC/mL.

6.15.2 FASE 2: Scelta del programma di separazione

- **Avviare il CliniMACS Plus Instrument**
- **Scelta del programma di separazione DEPLETION 3.1**
- **Inserimento dei parametri del campione**

Cfr. sezione 7.2.6 a pagina 151.

6.15.3 FASE 3: Installazione del set di tubi CliniMACS

- **CliniMACS Depletion Tubing Set**

Cfr. sezione 7.3.3 a pagina 176.

6.15.4 FASE 4: Separazione CliniMACS Plus

- **Procedura di separazione**
- **Scollegare le sacche e registrare il codice del processo**
- **Scollegare il set di tubi e spegnere**
- **Analisi delle cellule**

Cfr. sezione 7.4.5 a pagina 208.

6.16 Deplezione di cellule CD45RA positive

Il CliniMACS Plus CD45RA System, comprendente il CliniMACS Plus Instrument, il CliniMACS CD45RA Reagent, il CliniMACS Depletion Tubing Set e il CliniMACS PBS/EDTA Buffer, è destinato alla deplezione *in vitro* di cellule umane CD45RA positive da popolazioni eterogenee di cellule ematiche.

6.16.1 FASE 1: Preparazione delle cellule e marcatura magnetica

Primo intervento necessario

Capacità dell'applicazione

Fino a 20×10^9 cellule CD45RA positive da un totale di fino a 50×10^9 cellule (WBC)

⚠ ATTENZIONE

Rischio di prestazioni di separazione insufficienti delle cellule marcate. Se si superano le specifiche dell'applicazione, vi è il rischio di una marcatura specifica insufficiente. Utilizzare la quantità necessaria di cellule e reagente come descritto per la rispettiva applicazione.

Materiali CliniMACS necessari

Materiale	Numero di catalogo	Quantità
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS CD45RA Reagent	701-46	1 flaconcino
CliniMACS Depletion Tubing Set	261-01	1 set di tubi
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	Sacche da 3×1000 mL[1]

1 Prima dell'uso, aggiungere HSA al CliniMACS PBS/EDTA Buffer fino a una concentrazione finale dello 0,5% (p/v).

Tabella 6.40: Materiali CliniMACS necessari per la deplezione di cellule CD45RA positive

Materiali aggiuntivi necessari

- **Cell Preparation Bag:**
  una sacca di trasferimento da 600 mL idonea per la centrifugazione nonché un forasacche e due set di trasferimento di plasma, da utilizzare durante la procedura di preparazione delle cellule
- **Plasma Waste Bag e Wash Waste Bag:**
  due sacche di trasferimento da 600 mL idonee per la centrifugazione
- **Cell Collection Bag:**
  una Cell Collection Bag da 600 mL è già assemblata nel CliniMACS Depletion Tubing Set.
- un filtro di pre-sistema

- pinzette per clampaggio
- siringhe (di diverse dimensioni) e aghi ipodermici da 20 gauge
- albumina sierica umana (HSA) da aggiungere al CliniMACS PBS/EDTA Buffer fino a una concentrazione finale dello 0,5% (p/v)
- provette per campioni

IMPORTANTE

Una fonte cellulare iniziale alternativa può essere costituita dalla frazione cellulare non-bersaglio ottenuta con la separazione CliniMACS Plus CD34. L'uso del CliniMACS CD45RA Reagent è consigliato esclusivamente per preparazioni cellulari iniziali contenenti una percentuale di cellule CD45RA positive nel range della norma (fino all'80%). Percentuali superiori sono state osservate in alcuni donatori in cui il CD45RA è espresso da quasi tutte le PBMC a causa di una rara mutazione nel gene CD45. In tali casi l'efficacia della deplezione e/o della guarigione può essere inadeguata.

▶ Preparazione delle sacche

Determinare il peso della Cell Collection Bag e della Cell Preparation Bag vuote come descritto nella sezione 7.1.1 a pagina 123.

Marcatura magnetica delle cellule

Fare riferimento alla sezione 7.1 "FASE 1: Preparazione delle cellule e marcatura magnetica" a pagina 123 per una descrizione dettagliata delle seguenti fasi.

▶ Analisi della preparazione cellulare iniziale

Determinare la percentuale/il numero totale di tutte le cellule marcate con CD45RA (compresi i legami aspecifici con CD45RA, non soltanto le cellule realmente CD45RA positive). Considerare questo numero per applicazioni specifiche e per l'inserimento dei parametri dei campioni (cfr. FASE 2).

▶ Trasferimento della preparazione cellulare iniziale nella Cell Preparation Bag

▶ Diluizione della preparazione cellulare iniziale depletata

Aggiungere il tampone: Peso del tampone da aggiungere = Peso della preparazione cellulare iniziale × 2

▶ Centrifugazione

Centrifugare a 200×g, senza freno, per 15 minuti, a temperatura ambiente (RT: intervallo +19 °C e +25 °C [+66 °F e +77 °F]).

Se la frazione di cellule non-bersaglio di una separazione CliniMACS CD34 viene utilizzata come fonte alternativa per la preparazione cellulare iniziale, la fase di diluizione può essere saltata. Continuare con la fase di centrifugazione e centrifugare le cellule a 300×g (senza freno) per 15 minuti a RT.

▶ Aggiustamento del volume: volume di marcatura 95 g (±5 g)

1. Rimuovere completamente il sovranatante avendo cura di non risospendere il pellet cellulare.
2. Risospendere il pellet cellulare con cura dopo aver rimosso il sovranatante.
3. Regolare il peso della Cell Preparation Bag (CPB) aggiungendo tampone in base alla seguente equazione: Peso target della CPB riempita = 95 g + Peso della CPB vuota
4. Risospendere il pellet cellulare.

▶ Incubazione con il CliniMACS CD45RA Reagent

1. Aggiungere 1 flaconcino di CliniMACS CD45RA Reagent. Mescolare delicatamente il contenuto.
2. Incubare su un rotatore orbitale (25 rpm) per 30 minuti a temperatura ambiente.

▶ Rimozione del reagente in eccesso

1. Riempire la Cell Preparation Bag con tampone.
2. Centrifugare (300×g, senza freno, per 15 minuti, a temperatura ambiente).
3. Rimuovere quanto più sovranatante possibile. **Nota:** rimuovere almeno 500 g di sovranatante. Se il sovranatante rimosso è inferiore a 500 g, si consiglia di eseguire un totale di due fasi di lavaggio (anziché solo una). In caso contrario, la rimozione del reagente non legato potrebbe essere insufficiente.
4. Risospendere il pellet cellulare.
5. Regolare il volume di caricamento del campione. Calcolare il peso di tampone necessario per portare il peso della sospensione cellulare a circa 125 g. La concentrazione cellulare non deve superare $0{,}4\times10^9$ WBC/mL: Peso del tampone da aggiungere (g) = 125 g – Peso della preparazione cellulare dopo il lavaggio (g)

6.16.2 FASE 2: Scelta del programma di separazione

▶ Avviare il CliniMACS Plus Instrument

▶ Scelta del programma di separazione DEPLETION 3.1

▶ Inserimento dei parametri del campione

Cfr. sezione 7.2.6 a pagina 151.

6.16.3 FASE 3: Installazione del set di tubi CliniMACS

- **CliniMACS Depletion Tubing Set**

Cfr. sezione 7.3.3 a pagina 176.

6.16.4 FASE 4: Separazione CliniMACS Plus

- **Procedura di separazione**
- **Scollegare le sacche e registrare il codice del processo**
- **Scollegare il set di tubi e spegnere**
- **Analisi delle cellule**

Cfr. sezione 7.4.5 a pagina 208.

6.17 Arricchimento di cellule umane secernenti IFN-gamma con il CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma)

Il CliniMACS Plus CCS (IFN-gamma) System, comprendente il CliniMACS Plus Instrument, il CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma), il CliniMACS Tubing Set e il CliniMACS PBS/EDTA Buffer, è destinato all'arricchimento *in vitro* di cellule umane secernenti IFN-gamma da popolazioni eterogenee di cellule ematiche.

6.17.1 FASE 1: Preparazione delle cellule e marcatura magnetica

Primo intervento necessario

Capacità dell'applicazione

Cellule secernenti IFN-gamma da un totale di fino a 1×10^9 cellule (WBC)

⚠ ATTENZIONE

Rischio di prestazioni di separazione insufficienti delle cellule marcate. Se si superano le specifiche dell'applicazione, vi è il rischio di una marcatura specifica insufficiente. Utilizzare la quantità necessaria di cellule e reagente come descritto per la rispettiva applicazione.

Materiali CliniMACS necessari

Materiale	Numero di catalogo	Quantità
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma)	279-01	1 set
CliniMACS Tubing Set	161-01	1 set di tubi
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	Sacche da 3×1000 mL[1]

1 Prima dell'uso, aggiungere HSA al CliniMACS PBS/EDTA Buffer fino a una concentrazione finale dello 0,5% (p/v).

Tabella 6.41: Materiali CliniMACS necessari per l'arricchimento di cellule umane secernenti IFN-gamma

IMPORTANTE

Conservare il tampone per la preparazione delle cellule a temperature compresa tra +2 °C e +8 °C (tra +36 °F e +46 °F). Temperature ambiente più basse o più alte possono determinare una minore purezza e resa delle cellule bersaglio.

Materiali aggiuntivi necessari

- **Cell Preparation Bag:**
  due sacche di trasferimento da 600 mL idonee per la centrifugazione nonché due forasacche e due set di trasferimento di plasma, da utilizzare durante la procedura di preparazione delle cellule
- **Plasma Waste Bag e Wash Waste Bag:**
  nove sacche di trasferimento da 600 mL idonee per la centrifugazione
- **Medium bag:**
  otto sacche di trasferimento da 600 mL idonee per la centrifugazione
- **Cell Collection Bag (Parte 2):**
  una sacca di trasferimento da 150 mL idonea per la centrifugazione in combinazione con un Luer/Spike Interconnector per collegare la sacca di trasferimento al set di tubi
- una sacca per la coltura cellulare da 100 mL permeabile ai gas
- un filtro di pre-sistema
- pinzette per clampaggio
- siringhe (di diverse dimensioni) e aghi ipodermici da 20 gauge
- albumina sierica umana (HSA) da aggiungere al CliniMACS PBS/EDTA Buffer fino a una concentrazione finale dello 0,5% (p/v)
- provette per campioni
- 120 mL di siero AB o, in alternativa, siero autologo, per l'integrazione dei terreni di coltura
- 1000 mL di terreno di coltura cellulare (RPMI 1640), +4 °C (+39 °F)
- 1.100 mL di terreno di coltura cellulare (RPMI 1640), +37 °C (+99 °F) integrato con il 10% (v/v) di siero AB o, in alternativa, siero autologo
- 500 mL di terreno di coltura cellulare (RPMI 1640), +4 °C (+39 °F) integrato con il 2% (v/v) di siero AB o, in alternativa, siero autologo

▶ Apparecchiature necessarie

Informazioni sulle apparecchiature necessarie per una separazione CliniMACS Plus sono riportate nella sezione 4.7.

Apparecchiatura aggiuntiva necessaria per un'applicazione con l'utilizzo del CliniMACS Plus CCS (IFN-gamma) System:

- piastra di coltura con 24 pozzetti
- MiniMACS Separation Unit
- MS Columns
- filtro pre-separazione (solo per MS Columns)
- MACSmix Tube Rotator

▶ Preparazione delle sacche

Determinare il peso della Cell Collection Bag e della Cell Preparation Bag vuote come descritto nella sezione 7.1.1 a pagina 123.

Nota: pre-raffreddare la centrifuga a +4 °C (+39 °F). Dopo la fase di secrezione, è necessaria una terza Cell Preparation Bag per riunire le sospensioni cellulari. Pertanto, apporre a una delle quattro sacche di trasferimento da 600 mL (preparate con 125 mL di terreno di coltura (RPMI) integrato con il 10% di siero AB) l'etichetta **Preparazione cellulare N. 3 (Separazione)**.

Preparazione cellulare iniziale

Le seguenti sezioni descrivono la procedura in-bag raccomandata per la preparazione della preparazione cellulare iniziale utilizzando il connettore per tubi sterile.

- L'operatore deve avere pratica con l'operazione e l'uso del connettore per tubi sterile.
- Prima di iniziare la procedura di marcatura e separazione cellulare, assicurarsi che tutte le apparecchiature e i materiali di consumo necessari siano disponibili.

Trasferimento della preparazione cellulare iniziale nella Cell Preparation Bag N. 1

1. Registrare la data e l'ora di inizio prima di iniziare a predisporre la preparazione cellulare iniziale.
2. Determinare il volume della preparazione cellulare iniziale stimando 1 mL di prodotto originale equivalente a 1 g (1 g ≙ 1 mL).
3. Tenendo la sacca contenente la preparazione cellulare iniziale con entrambe le mani, mescolare accuratamente il contenuto con un delicato movimento rotatorio.
4. Utilizzando il connettore per tubi sterile, collegare la Cell Preparation Bag N. 1 alla sacca contenente la preparazione cellulare iniziale.
5. Aprire la pinzetta per clampaggio per trasferire il peso appropriato della preparazione cellulare iniziale (contenente un massimo di 1×109 cellule, secondo la frequenza di leucociti determinata in precedenza) nella Cell Preparation Bag N. 1. Effettuare un controllo visivo (monitorando la scala) per verificare che sia stato trasferito il peso appropriato. Chiudere la pinzetta per clampaggio sulla Cell Preparation Bag.

6. Saldare il tubo e separare le sacche lasciando almeno 15 cm di tubo sulla Cell Preparation Bag N. 1 per ulteriori collegamenti (cfr. Figura 6.1). Con la termosaldatrice, realizzare tre saldature adiacenti nel tubo. Accertarsi di aver effettuato correttamente le saldature. Tagliare la saldatura centrale. Conservare la sacca che conteneva la preparazione cellulare iniziale fino al completamento della separazione e dell'analisi finale di tutte le cellule.

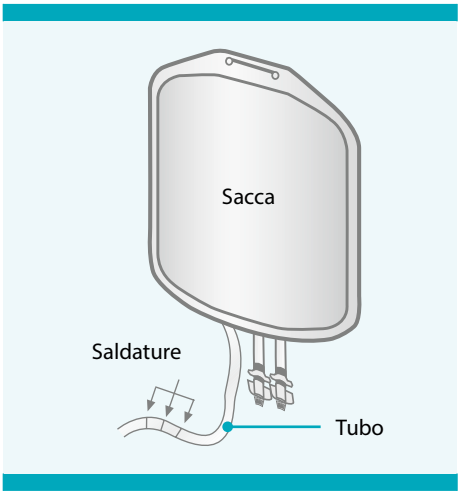


Figura 6.1: Saldatura di una sacca

7. Tarare la bilancia. Stendere la Cell Preparation Bag N. 1 sulla bilancia lasciando il tubo sul tavolo. Registrare il peso della Cell Preparation Bag N. 1 riempita.

8. Determinare il peso della preparazione cellulare iniziale sottraendo il peso della Cell Preparation Bag N. 1 vuota dal peso della Cell Preparation Bag N. 1 riempita con la preparazione cellulare iniziale. Registrare il peso calcolato.

Peso della preparazione cellulare iniziale (g)	=	Peso della Cell Preparation Bag N. 1 riempita (g)	–	Peso della Cell Preparation Bag N. 1 vuota (g)

Diluizione della preparazione cellulare iniziale

La preparazione cellulare iniziale deve essere diluita con terreno di coltura. Diluire la preparazione con terreno di coltura freddo (tra +2 °C e +8 °C [tra +36 °F e +46 °F]) fino a un volume totale di 500 mL. Calcolare il peso del terreno di coltura da aggiungere con la seguente equazione e registrarlo.

Peso del terreno di coltura da aggiungere (g)	=	500 g	–	Peso della preparazione cellulare iniziale diluita (g)

1. Prendere una delle sacche di terreno di coltura e collegarla alla Cell Preparation Bag N. 1 utilizzando il connettore per tubi sterile.

2. Mettere la Cell Preparation Bag N. 1 sulla bilancia e tarare la bilancia. Appendere la Medium Bag a un appendi-sacca.

3. Aprire la pinzetta per clampaggio sulla Cell Preparation Bag N. 1. Monitorando visivamente la scala graduata sulla bilancia, trasferire il peso calcolato del terreno di coltura alla Cell Preparation Bag N. 1.

4. Una volta trasferito il peso appropriato del terreno di coltura, chiudere la pinzetta per clampaggio sulla Cell Preparation Bag N. 1 per arrestare il flusso del liquido.

5. Con la termosaldatrice, saldare il tubo lasciando almeno 15 cm di tubo nella Cell Preparation Bag N. 1 per ulteriori collegamenti. Scollegare la Medium Bag.
6. Tenendo la Cell Preparation Bag N. 1 con entrambe le mani, mescolare accuratamente il contenuto con un delicato movimento rotatorio. Evitare di mescolare intensamente le cellule.
7. Tarare la bilancia e pesare la Cell Preparation Bag N. 1 riempita. Registrare il peso.
8. Determinare il peso della preparazione cellulare iniziale diluita sottraendo il peso della Cell Preparation Bag N. 1 vuota dal peso della Cell Preparation Bag N. 1 riempita. Registrare il peso calcolato.

Peso della preparazione cellulare iniziale diluita (g)	=	Peso della Cell Preparation Bag N. 1 riempita (g)	–	Peso della Cell Preparation Bag N. 1 vuota (g)

⚠ AVVERTENZA

Rischio di contaminazione. Se le sacche non sono idonee alla preparazione delle cellule o non sono posizionate correttamente nel cestello della centrifuga, vi è il rischio di contaminazione a causa di danni alla sacca. Utilizzare sacche idonee, piegare verso il basso eventuali parti mobili delle sacche o dei tubi avendo cura di non compromettere l'integrità delle sacche, quindi posizionare le sacche saldamente nel cestello della centrifuga.

⚠ ATTENZIONE

Rischio di prestazioni di separazione cellulare inferiori. Se le sacche non sono posizionate correttamente nel cestello della centrifuga, vi è il rischio di una perdita di cellule durante la rimozione del sovranatante. Piegare verso il basso eventuali parti mobili delle sacche o dei tubi e posizionare le sacche saldamente nel cestello della centrifuga.

Centrifugazione

1. Utilizzando il connettore per tubi sterile, collegare la Plasma Waste Bag N. 1 vuota alla Cell Preparation Bag N. 1.
2. Piegare verso il basso eventuali parti mobili della Cell Preparation Bag N. 1 o del tubo. Posizionare le due sacche saldamente nel cestello della centrifuga.
3. Bilanciare il cestello carico con un cestello adeguatamente pesato. È essenziale che la centrifuga sia ben bilanciata.
4. Centrifugare le cellule a 200×g (senza freno) per 10 minuti a temperatura ambiente (tra +19 °C e +25 °C [tra +66 °F e +77 °F]).
5. Togliere le sacche dalla centrifuga avendo cura di non muovere il pellet cellulare. Caricare la Cell Preparation Bag N. 1 sull'estrattore di plasma.

6. Aprire la pinzetta per clampaggio sulla Cell Preparation Bag N. 1. Rimuovere completamente il sovranatante avendo cura di non risospendere il pellet cellulare durante la rimozione. Una volta rimosso il sovranatante, chiudere la pinzetta per clampaggio sulla Cell Preparation Bag N. 1 per arrestare il flusso del liquido.
7. Con la termosaldatrice, saldare il tubo lasciando almeno 15 cm di tubo nella Cell Preparation Bag N. 1 per ulteriori collegamenti. Scollegare la Plasma Waste Bag N. 1.
8. Ripetere la diluizione e la centrifugazione utilizzando la seconda sacca di terreno di coltura preparata con terreno freddo e la Plasma Waste Bag N. 2.
9. Conservare tutte le Plasma Waste Bag fino al completamento della separazione e dell'analisi finale di tutte le cellule.

Aggiustamento del volume

1. Per la ristimolazione *in vitro* delle cellule, il volume del campione cellulare deve essere regolato a 100 mL. Una volta rimosso il sovranatante, risospendere il pellet con attenzione.
2. Aggiustare il peso della Cell Preparation Bag N. 1 aggiungendo terreno di coltura. Calcolare il peso del terreno di coltura da aggiungere con la seguente equazione:

Peso della Cell Preparation Bag N. 1 riempita dopo l'aggiustamento del volume (g)	=	100 g	+	Peso della Cell Preparation Bag N. 1 vuota (g)

3. Utilizzando il connettore per tubi sterile, collegare la Cell Preparation Bag N. 1 alla Medium Bag preparata al 10% (contenente 600 mL di terreno di coltura preriscaldato integrato con il 10% di siero AB). Appendere la Medium Bag al 10% a un appendi-sacca.
4. Tarare la bilancia. Mettere la Cell Preparation Bag N. 1 con il pellet cellulare sulla bilancia.
5. Aprire la pinzetta per clampaggio sulla Cell Preparation Bag N. 1. Riempire la Cell Preparation Bag N. 1 con il terreno di coltura fino al raggiungimento del "Peso della Cell Preparation Bag N. 1 riempita dopo l'aggiustamento del volume" calcolato. Chiudere la pinzetta per clampaggio sulla Cell Preparation Bag N. 1 per arrestare il flusso del liquido.
6. Con la termosaldatrice, saldare il tubo lasciando almeno 15 cm di tubo nella Cell Preparation Bag per ulteriori collegamenti. Scollegare la Medium Bag al 10%.
7. Utilizzando il connettore per tubi sterile, collegare la Cell Preparation Bag N. 1 alla sacca contenente 100 mL di coltura permeabile ai gas. Aprire la pinzetta per clampaggio sulla Cell Preparation Bag N. 1 e trasferire completamente il contenuto.

⚠ ATTENZIONE

Rischio di prestazioni inferiori. Se le sacche non sono idonee alla preparazione delle cellule, vi è il rischio di contaminazione a causa di danni alla sacca. Utilizzare sacche di coltura permeabili ai gas idonee per la preparazione delle cellule.

Marcatura delle cellule

Un CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma), composto da due flaconcini (7,5 mL ciascuno), è pronto per l'uso e sufficiente per un'applicazione come descritto di seguito. I reagenti non sono destinati alla somministrazione parenterale.

Campione target e campione di controllo

Il protocollo descrive la procedura di marcatura del "campione target" e del "campione di controllo". Entrambi i campioni vengono processati in parallelo e il campione di controllo viene trattato esattamente come il campione target, ma senza l'aggiunta di antigene. Pertanto l'analisi del campione di controllo fornisce informazioni sulla secrezione spontanea di citochina.

Ristimolazione *in vitro*

IMPORTANTE

- *Come misura della secrezione spontanea di citochina occorre includere un piccolo campione di controllo negativo (campione di controllo), trattato esattamente come il campione target stimolato dall'antigene ma senza aggiunta di antigene.*
- *Per la ristimolazione in vitro, la densità cellulare ottimale è di 0,5–1×10^9 cellule/cm^2 e 1×10^9 cellule/mL.*

1. Utilizzando una siringa sterile (1 mL) con un ago da 20 gauge, prelevare una piccola aliquota (ad es. 1 mL = ca. 1×10^9 cellule) delle cellule da utilizzare come **campione di controllo (non stimolato)**.
2. Coltivare l'aliquota in condizioni ottimali in un pozzetto di una piastra di coltura da 24 pozzetti.
3. Con una siringa, iniettare l'antigene nelle cellule della sacca di coltura cellulare permeabile ai gas **(campione target)** alla concentrazione prestabilita attraverso una delle porte.
4. Incubare entrambi i campioni a +37 °C (+99 °F) e 5–7,5% CO^2 per un tempo appropriato. Quando si utilizzano proteine o lisati cellulari come antigeni, il tempo di incubazione è compreso tra 4 e 16 ore. Per i peptidi il tempo di incubazione è di 3–6 ore. Poiché il tempo di stimolazione ottimale è influenzato dalle caratteristiche specifiche dell'antigene, per ottenere i risultati migliori Miltenyi Biotec raccomanda di eseguire procedure di validazione dedicate.

Marcare con il CliniMACS IFN-gamma Catchmatrix Reagent

Registrare il numero di lotto e la data di scadenza del CliniMACS IFN-gamma Catchmatrix Reagent.

Campione target

IMPORTANTE

Per la fase di secrezione, il recipiente scelto deve essere di dimensioni sufficienti per consentire l'aggiunta di almeno 1 volume di tampone freddo al termine della fase di secrezione. La densità cellulare non deve superare 1×10^6 cellule/mL. Pertanto, per la secrezione devono essere incubate 1×10^9 cellule in un totale di 1000 mL di terreno di coltura caldo.

1. Utilizzare il connettore per tubi sterile per collegare la sacca di coltura alla Cell Preparation Bag N. 2 (secrezione) e trasferire le cellule. Assicurarsi che il trasferimento delle cellule nella Cell Preparation Bag N. 2 sia completo. Chiudere la pinzetta per clampaggio sulla Cell Preparation Bag N. 2 per arrestare il flusso del liquido.
2. Con la termosaldatrice, saldare il tubo lasciando almeno 15 cm di tubo nella Cell Preparation Bag N. 2 per ulteriori collegamenti. Scollegare la sacca del terreno di coltura vuota.
3. Utilizzare il connettore per tubi sterile per collegare la Medium Bag preparata al 2% (contenente 500 mL di terreno di coltura freddo (tra +2 e +8 °C [tra +36 °F e +46 °F]) integrato con il 2% di siero AB) alla Cell Preparation Bag N. 2.
4. Aprire la pinzetta per clampaggio sulla Cell Preparation Bag N. 2. Riempire la Cell Preparation Bag N. 2 fino a 600 mL. Una volta trasferito il peso appropriato del terreno di coltura, chiudere la pinzetta per clampaggio sulla Cell Preparation Bag N. 2 per arrestare il flusso del liquido.
5. Con la termosaldatrice, saldare il tubo lasciando almeno 15 cm di tubo nella Cell Preparation Bag N. 2 per ulteriori collegamenti. Scollegare la Medium Bag al 2%.
6. Con la termosaldatrice, collegare la Wash Waste Bag N. 1 vuota alla Cell Preparation Bag N. 2.
7. Piegare verso il basso eventuali parti mobili della sacca o del tubo. Posizionare le due sacche saldamente nel cestello della centrifuga.
8. Bilanciare il cestello carico con un cestello di peso adeguato. È essenziale che la centrifuga sia ben bilanciata.
9. Centrifugare le cellule a 300×g (senza freno) per 10 minuti a una temperatura tra +4 °C e +8 °C (+39 °F e +46 °F).
10. Caricare la Cell Preparation Bag N. 2 sull'estrattore di plasma. Aprire la pinzetta per clampaggio sulla Cell Preparation Bag N. 2. Rimuovere completamente il sovranatante avendo cura di non muovere il pellet cellulare. Chiudere la pinzetta per clampaggio sulla Cell Preparation Bag N. 2 per arrestare il flusso del liquido.
11. Con la termosaldatrice, saldare il tubo lasciando almeno 15 cm di tubo nella Cell Preparation Bag N. 2 per ulteriori collegamenti. Scollegare la Wash Waste Bag N. 1.
12. Risospendere il pellet cellulare nel volume residuo dopo aver rimosso il sovranatante.
13. Collegare un forasacche alla Cell Preparation Bag N. 2 e disinfettare il setto. Utilizzare una siringa e un ago sterili idonei per prelevare 7,425 mL dal flaconcino del CliniMACS IFN-gamma Catchmatrix Reagent. Per prelevare il contenuto di un flaconcino di reagente è sufficiente una siringa da 10 mL. La siringa dovrebbe avere un ago da 20 gauge.
14. Tenendo la Cell Preparation Bag N. 2 con entrambe le mani, mescolare accuratamente il contenuto con un delicato movimento rotatorio.

15. Utilizzando la porta di iniezione del forasacche, iniettare l'intero volume del reagente nella Cell Preparation Bag N. 2. Fare attenzione a non forare la sacca.
16. Risospendere le cellule e incubarle per 5 minuti su ghiaccio. Registrare l'ora di incubazione.

Campione di controllo (non stimolato)

1. Trasferire le cellule in una provetta richiudibile da 15 mL.
2. Aggiungere terreno di coltura freddo (tra +2 °C e +8 °C [tra +36 °F e +46 °F]) integrato con il 2% di siero AB fino a 15 mL.
3. Centrifugare le cellule a 300×g (senza freno) per 10 minuti a una temperatura tra +4 °C e +8 °C (+39 °F e +46 °F) e rimuovere con attenzione e completamente il sovranatante.
4. Risospendere il pellet cellulare in 100 µL di terreno di coltura freddo (tra +2 °C e +8 °C [tra +36 °F e +46 °F]) integrato con il 2% di siero AB.
5. Aggiungere i restanti 75 µL del CliniMACS IFN-gamma Catchmatrix Reagent e incubare la sospensione per 5 minuti su ghiaccio.

Fase di secrezione

Campione target

1. Prendere le quattro sacche di trasferimento pre-riempite (compresa la Cell Preparation Bag N. 3 etichettata) contenenti 125 mL di terreno di coltura caldo (+37 °C [+99 °F]) integrato con il 10% di siero AB.
2. Utilizzando il connettore per tubi sterile, collegare la Cell Preparation Bag N. 2 alla Medium Bag preparata al 10% (contenente terreno di coltura preriscaldato (+37 °C [+99 °F]) integrato con il 10% di siero AB).
3. Aggiungere 500 mL di terreno di coltura preriscaldato al campione di cellule nella Cell Preparation Bag N. 2. Iniziare immediatamente a misurare il tempo di incubazione di 45 minuti.
4. Distribuire 125 mL della sospensione cellulare ottenuta in ciascuna delle quattro sacche di trasferimento collegandole in serie alla Cell Preparation Bag N. 2 mediante il connettore per tubi sterile. Monitorando visivamente la scala graduata sulla bilancia, trasferire il peso appropriato di sospensione cellulare. Questa procedura consente di ottenere un totale di 250 g di sospensione cellulare in ciascuna delle quattro sacche di trasferimento. Dopo il trasferimento, saldare i tubi con la termosaldatrice per scollegare le sacche di trasferimento.
5. Incubare le cellule a +37 °C (+99 °F) per i restanti 45 minuti con rotazione lenta continua (max 50 rpm) fino alla fine del tempo di incubazione. Registrare l'ora di incubazione.
6. Prendere un set di trasferimento di plasma e assicurarsi che il morsetto sia nella posizione di chiusura. Inserire il perforatore del set di trasferimento di plasma in una porta della sacca di tampone.

7. Dopo 45 minuti, collegare la sacca di tampone alla Cell Preparation Bag N. 3 utilizzando il connettore per tubi sterile. Aggiungere tampone freddo (tra +2 °C e +8 °C [tra +36 °F e +46 °F]) a ciascuna delle quattro sacche di trasferimento (almeno un volume, cioè 250 mL ciascuna) collegandole in serie alla sacca di tampone. Lasciare raffreddare le cellule ponendo le sacche su ghiaccio per 10 minuti.
8. Utilizzando il connettore per tubi sterile, collegare una Wash Waste Bag (Wash Waste Bag N. 2–5) a ciascuna delle quattro sacche di trasferimento.
9. Centrifugare le cellule a 300×g (senza freno) per 10 minuti a +4 °C (+39 °F). Con l'estrattore di plasma, rimuovere completamente il sovranatante da tutte le sacche.
10. Saldare i tubi di ciascuna sacca con la termosaldatrice. Scollegare le Wash Waste Bag.
11. Prendere un set di trasferimento di plasma e assicurarsi che il morsetto sia nella posizione di chiusura. Inserire il perforatore del set di trasferimento di plasma in una porta di una sacca di tampone.
12. Utilizzando il connettore per tubi sterile, collegare la sacca di tampone alla Cell Preparation Bag N. 3.
13. Far scorrere il morsetto sul set di trasferimento di plasma fino alla posizione di apertura e riempire la Cell Preparation Bag N. 3 con 200 mL di tampone.
14. Una volta trasferito il peso appropriato di tampone, far scorrere il morsetto sul set di trasferimento di plasma fino alla posizione di chiusura per arrestare il flusso di liquido.
15. Con la termosaldatrice, saldare il tubo lasciando almeno 15 cm di tubo sulla Cell Preparation Bag N. 3. Scollegare la sacca di tampone.
16. Utilizzando il connettore per tubi sterili, collegare una delle altre tre sacche di trasferimento contenenti le cellule alla Cell Preparation Bag N. 3 e riunire le due sospensioni.

    IMPORTANTE
    I campioni divisi devono essere riuniti nella Cell Preparation Bag N. 3 prima della centrifugazione.
17. Ripetere questa procedura fino a quando le sospensioni cellulari di tutte le quattro sacche di trasferimento non saranno riunite nella Cell Preparation Bag N. 3.
18. Una volta riunite le cellule, collegare la sacca di tampone alla Cell Preparation Bag N. 3 utilizzando il connettore per tubi sterile.
19. Far scorrere il morsetto del set di trasferimento di plasma fino alla posizione di apertura. Riempire la Cell Preparation Bag con tampone fino a 500 mL.
20. Una volta trasferito il peso appropriato di tampone, far scorrere il morsetto sul set di trasferimento di plasma fino alla posizione di chiusura per arrestare il flusso di liquido. Chiudere la pinzetta per clampaggio sulla Cell Preparation Bag N. 3.

21. Con la termosaldatrice, saldare il tubo lasciando almeno 15 cm di tubo sulla Cell Preparation Bag N. 3 per ulteriori collegamenti. Scollegare la sacca di tampone.
22. Utilizzando il connettore per tubi sterile, collegare la Wash Waste Bag N. 6 vuota alla Cell Preparation Bag N. 3.
23. Piegare verso il basso eventuali parti mobili della Cell Preparation Bag N. 3 o del tubo. Posizionare le due sacche saldamente nel cestello della centrifuga.
24. Bilanciare il cestello carico con un cestello di peso adeguato. È essenziale che la centrifuga sia ben bilanciata.
25. Centrifugare le cellule a 300×g (senza freno) per 10 minuti a +4 °C (+39 °F).

Campione di controllo (non stimolato)

1. Aggiungere terreno di coltura caldo (+37 °C [+99 °F]) addizionato con il 10% di siero AB per diluire il campione fino a un massimo di 1×10^6 cellule/mL, cioè per 1×10^9 cellule si deve utilizzare un volume totale di 10 mL.
2. Incubare le cellule in una provetta chiusa per 45 minuti a +37 °C (+99 °F) con rotazione continua lenta utilizzando il MACSmix Tube Rotator (max 50 rpm).
3. Dopo 45 minuti, riempire la provetta con tampone freddo (+4 °C [+39 °F]) e mettere la provetta in ghiaccio per 5–10 minuti.
4. Centrifugare le cellule a 300×g (senza freno) per 10 minuti ad una temperatura tra +4 °C e +8 °C (+39 °F e +46 °F).

Marcatura magnetica delle cellule con il CliniMACS IFN-gamma Enrichment Reagent

Registrare il numero di lotto e la data di scadenza del CliniMACS IFN-gamma Enrichment Reagent.

Campione target

1. Dopo la fase di centrifugazione, rimuovere con attenzione il sovranatante utilizzando l'estrattore di plasma come descritto sopra e risospendere nel volume residuo. Dopo la rimozione, chiudere la pinzetta per clampaggio sulla Cell Preparation Bag N. 3.
2. Con la termosaldatrice, saldare il tubo lasciando almeno 15 cm di tubo nella Cell Preparation Bag N. 3 per ulteriori collegamenti. Scollegare la Wash Waste Bag N. 6.
3. Collegare un forasacche alla Cell Preparation Bag N. 3 e disinfettare il setto. Utilizzare una siringa e un ago sterili idonei per prelevare 7,425 mL dal flaconcino del CliniMACS IFN-gamma Catchmatrix Reagent. Per prelevare il contenuto di un flaconcino di reagente è sufficiente una siringa da 10 mL. La siringa dovrebbe avere un ago da 20 gauge.

4. Utilizzando la porta di iniezione del forasacche, iniettare il reagente nella Cell Preparation Bag N. 3. Fare attenzione a non forare la sacca. Iniziare immediatamente a contare il tempo di incubazione di 15 minuti. Registrare l'ora di inizio dell'incubazione.
5. Tenendo la Cell Preparation Bag con entrambe le mani, mescolare accuratamente il contenuto con un delicato movimento rotatorio.
6. Incubare le cellule per 15 minuti in ghiaccio. Registrare l'ora di fine incubazione.
7. Utilizzando il connettore per tubi sterile, collegare la sacca di tampone alla Cell Preparation Bag N. 3.
8. Aprire la pinzetta per clampaggio sulla Cell Preparation Bag N. 3. Far scorrere il morsetto del set di trasferimento di plasma fino alla posizione di apertura. Riempire la Cell Preparation Bag N. 3 fino a 500 mL di tampone freddo (tra +2 °C e +8 °C [tra +36 °F e +46 °F]).
9. Una volta trasferito il peso appropriato di tampone, far scorrere la pinzetta per clampaggio sul set di trasferimento di plasma fino alla posizione di chiusura. Chiudere la pinzetta per clampaggio sulla Cell Preparation Bag N. 3. Saldare il tubo con la termosaldatrice tra i due pinzette per clampaggio. Scollegare la sacca di tampone.
10. Utilizzando il connettore per tubi sterile, collegare la Wash Waste Bag N. 7 vuota alla Cell Preparation Bag N. 3.
11. Piegare verso il basso eventuali parti mobili della sacca o del tubo. Posizionare le due sacche saldamente nel cestello della centrifuga.
12. Bilanciare il cestello carico con un cestello di peso adeguato. È essenziale che la centrifuga sia ben bilanciata.
13. Centrifugare a 300×g (senza freno) per 10 minuti a +4 °C (+39 °F).
14. Rimuovere con attenzione il sovranatante come descritto sopra e risospendere le cellule in 100 mL di tampone freddo (tra +2 °C e +8 °C [tra +36 °F e +46 °F]).
15. Disinfettare il setto del forasacche. Inserire un ago con una siringa idonea nel forasacche della Cell Preparation Bag e prelevare un volume di 0,5 mL di prodotto marcato facendo attenzione a non forare la sacca. Trasferire il campione in una provetta. Etichettare la provetta come CAMPIONE TARGET ORIGINALE (includendo i dati identificativi del paziente).

    IMPORTANTE
    Assicurarsi che le cellule siano mescolate accuratamente prima di prelevare il campione. Per ottenere un campione rappresentativo, utilizzare una siringa con capacità di almeno 5 mL.
16. Conservare il campione di cellule per l'analisi cellulare al freddo (tra +2 °C e +8 °C [tra +36 °F e +46 °F]).

Campione di controllo (non stimolato)

1. Dopo la centrifugazione rimuovere con attenzione il sovranatante.

2. Risospendere le cellule in 100 µL di tampone freddo (tra +2 °C e +8 °C [tra +36 °F e +46 °F]).
3. Aggiungere 75 µL del CliniMACS IFN-gamma Enrichment Reagent rimanente.
4. Incubare le cellule per 15 minuti in ghiaccio.
5. Aggiungere tampone freddo (tra +2 °C e +8 °C [tra +36 °F e +46 °F]) fino al riempimento della provetta e centrifugare a 300×g (senza freno) per 10 minuti a +4 °C (+39 °F).
6. Rimuovere con attenzione il sovranatante e risospendere le cellule in 1 mL di tampone freddo (tra +2 °C e +8 °C [tra +36 °F e +46 °F]).
7. Prima della separazione, rimuovere una piccola quantità di campione (ca. 100 µL) della sospensione cellulare e trasferirla in una provetta, con l'etichetta Frazione del CAMPIONE DI CONTROLLO ORIGINALE. Conservare al freddo fino all'analisi.

Separazione magnetica

Campione target

La separazione magnetica del campione target viene eseguita con Il CliniMACS Plus Instrument. Dopo la procedura di separazione, processare il campione di controllo come descritto di seguito.

Campione di controllo (non stimolato)

1. Preparare due MS Columns sciacquandole con 500 µL di tampone freddo (tra +2 °C e +8 °C [tra +36 °F e +46 °F]) ed eliminare l'eluato.
2. Posizionare la prima colonna nel campo magnetico del MiniMACS Separator.
3. Passare le cellule attraverso un filtro di pre-separazione per rimuovere eventuali aggregati.
4. Introdurre la sospensione cellulare nella colonna.
5. Raccogliere l'eluato totale (contenente la frazione cellulare non marcata). Lavare la colonna aggiungendo 500 µL di tampone freddo alla colonna stessa. Eseguire un totale di tre fasi di lavaggio inserendo in successione 500 µL di tampone nella colonna ogni volta che il serbatoio della colonna rimane vuoto.
6. Rimuovere la colonna dal separatore, posizionare la seconda colonna nel separatore e mettere la prima colonna sopra la seconda.
7. Pipettare 1 mL di tampone freddo nella prima colonna. Sciacquare immediatamente la frazione con le cellule marcate magneticamente applicando saldamente lo stantuffo, fornito con la colonna, direttamente sulla seconda colonna.
8. Raccogliere le cellule non marcate che passano attraverso la colonna e lavare la colonna con 500 µL di tampone freddo. Eseguire un totale di tre fasi di lavaggio inserendo in successione 500 µL di tampone nella colonna ogni volta che il serbatoio della colonna rimane vuoto.

9. Rimuovere la seconda colonna dal separatore e posizionarla su un apposito tubo di raccolta con l'etichetta "frazione positiva".
10. Pipettare 0,5 mL di tampone freddo nella colonna. Sciacquare immediatamente la frazione con le cellule marcate magneticamente applicando saldamente lo stantuffo fornito con la colonna.
11. Mantenere la frazione di cellule bersaglio al freddo fino all'analisi.

6.17.2 FASE 2: Scelta del programma di separazione

- **Scelta del programma di separazione ENRICHMENT 3.2**

Cfr. sezione 7.2.4 a pagina 143.

6.17.3 FASE 3: Installazione del set di tubi CliniMACS

- **CliniMACS Tubing Set e CliniMACS Tubing Set LS**

Cfr. sezione 7.3.1 a pagina 157.

6.17.4 FASE 4: Separazione sul CliniMACS Plus

- **Procedura di separazione**
- **Scollegare le sacche e registrare il codice del processo**
- **Scollegare il set di tubi e spegnere**
- **Analisi delle cellule**

Cfr. sezione 7.4.3 a pagina 198.

7 Spiegazione dettagliata delle FASI 1–4

7.1 FASE 1: Preparazione delle cellule e marcatura magnetica

Questo capitolo fornisce le spiegazioni dettagliate delle procedure necessarie per la separazione cellulare utilizzando il CliniMACS Plus System.

7.1.1 Primo intervento necessario

Per i materiali necessari per una particolare applicazione, fare riferimento alla sezione specifica per l'applicazione (cfr. sezione 5.2 a pagina 39).

Preparazione del CliniMACS PBS/EDTA Buffer

Aggiungere il CliniMACS PBS/EDTA Buffer con HSA fino a una concentrazione finale dello 0,5% (p/v).

Preparazione delle sacche

Fare riferimento alla sezione specifica dell'applicazione per le sacche necessarie:

- **Cell Preparation Bag:** inserire un forasacche (o equivalente) nella porta esterna della Cell Preparation Bag. Posizionare una pinzetta per clampaggio sul tubo vicino alla sacca e chiuderla. Pesare la Cell Preparation Bag vuota con la pinzetta per clampaggio posizionata vicino alla sacca e il tubo pendente sul tavolo accanto alla bilancia. Registrare il peso.

  IMPORTANTE
  Poiché la lunghezza del tubo può variare durante la procedura di preparazione, occorre cautela quando si determina il peso della Cell Preparation Bag. Per una lettura accurata, verificare che le pinzette per clampaggio siano sempre posizionate accanto alla sacca e in orizzontale sulla bilancia e che il resto del tubo appoggi in orizzontale sul tavolo accanto alla bilancia.

- **Cell Collection Bag:**

  - CliniMACS Tubing Set/CliniMACS Tubing Set LS: inserire un Luer/Spike Interconnector (o equivalente) nella porta esterna della Cell Preparation Bag. Posizionare una pinzetta per clampaggio sul tubo vicino alla sacca e chiuderla. Pesare la Cell Preparation Bag vuota con la pinzetta per clampaggio accanto alla sacca e il tubo pendente sul tavolo accanto alla bilancia. Registrare il peso.

  - CliniMACS Depletion Tubing Set: una Cell Collection Bag è già collegata al set di tubi. Inserire un Luer/Spike Interconnector (o equivalente) nella porta esterna della Cell Preparation Bag. Posizionare una pinzetta per clampaggio

sul tubo vicino alla sacca e chiuderla. Pesare la Cell Preparation Bag vuota con la pinzetta per clampaggio accanto alla sacca e il tubo pendente sul tavolo accanto alla bilancia. Registrare il peso.

7.1.2 Marcatura magnetica delle cellule

Le seguenti sezioni descrivono la procedura in-bag raccomandata per l'allestimento della preparazione cellulare utilizzando il connettore per tubi sterile.

- L'operatore deve avere pratica con l'operazione e l'uso del connettore per tubi sterile.
- Prima di iniziare la procedura di marcatura e separazione cellulare, assicurarsi che tutte le apparecchiature e i materiali di consumo necessari siano disponibili.

IMPORTANTE

- *Ogni manipolazione delle sacche deve essere eseguita in ambiente sterile (ad esempio, cappa a flusso laminare) utilizzando tecniche asettiche. Il collegamento dei tubi utilizzando il connettore per tubi sterile può essere eseguito all'esterno della cappa a flusso laminare.*
- *Eseguire la preparazione del campione e la separazione cellulare alle condizioni di temperatura definite nella sezione specifica dell'applicazione. Temperature ambiente più basse o più alte possono determinare una minore purezza e resa delle cellule bersaglio.*

In breve, la marcatura magnetica della preparazione cellulare viene eseguita mediante i seguenti passaggi:

1. analisi della preparazione cellulare iniziale
2. trasferimento della preparazione cellulare iniziale nella Cell Preparation Bag
3. diluizione della preparazione cellulare iniziale
4. centrifugazione
5. solo per il CliniMACS Plus Anti-Biotin System e il CliniMACS Plus TCRα/β-Biotin System: marcatura delle cellule (incubazione con l'anticorpo primario/CliniMACS TCRα/β-Biotin) e rimozione del coniugato in eccesso (1° lavaggio)
6. aggiustamento del volume
7. solo per CliniMACS Plus CD3 e CD3/CD19 System: incubazione con immunoglobuline di grado clinico
8. marcatura magnetica delle cellule (incubazione con CliniMACS Reagent)
9. rimozione del reagente in eccesso
10. aggiustamento del volume per la separazione cellulare

Analisi della preparazione cellulare iniziale

Prima di iniziare la preparazione cellulare iniziale, determinare i seguenti parametri:

- numero totale di leucociti
- percentuale di cellule da marcare
- numero totale di leucociti da marcare
- vitalità

Assicurarsi che l'attività rientri nelle specifiche dell'applicazione.

Ricontrollare i parametri dopo la procedura di marcatura. Ciò è necessario per i programmi di caricamento a stadi (ENRICHMENT 1.1/DEPLETION 2.1/ DEPLETION 3.1), poiché i tre parametri seguenti del campione devono essere inseriti nel software durante la configurazione del CliniMACS Plus Instrument prima di caricare il set di tubi sullo strumento:

- concentrazione di leucociti per mL
- percentuale di cellule da marcare
- volume finale del campione cellulare (volume di caricamento del campione)

Potrebbero essere necessari altri test, a seconda dell'uso previsto delle cellule (ad es. numero di cellule T, fenotipo). Registrare tutti i dati.

Trasferimento della preparazione cellulare iniziale nella Cell Preparation Bag

1. Registrare la data e l'ora di inizio prima di iniziare a predisporre la preparazione cellulare iniziale.
2. Determinare il volume della preparazione cellulare iniziale stimando 1 mL di preparazione cellulare iniziale originale equivalente a 1 g (1 g $\triangleq$ 1 mL).
3. Tenendo la sacca della preparazione cellulare iniziale con entrambe le mani, mescolare accuratamente il contenuto con un delicato movimento rotatorio.
4. Utilizzando il connettore per tubi sterile, collegare la Cell Preparation Bag alla sacca contenente la preparazione cellulare iniziale originale.
5. Aprire la pinzetta per clampaggio per trasferire la preparazione cellulare iniziale nella Cell Preparation Bag. Utilizzare uno spremitubi per rimuovere l'eventuale sangue residuo dai tubi. Chiudere la pinzetta per clampaggio sui tubi quanto più possibile accanto alla sacca.

6. Saldare i tubi e separare le sacche lasciando almeno 15 cm di tubo sulla Cell Preparation Bag per ulteriori collegamenti (cfr. Figura 7.1). Con la termosaldatrice, realizzare tre saldature adiacenti nel tubo. Accertarsi di aver effettuato correttamente le saldature. Tagliare la saldatura centrale. Conservare la sacca che conteneva leucaferesi/preparazione cellulare iniziale fino al completamento della separazione e dell'analisi finale di tutte le cellule.

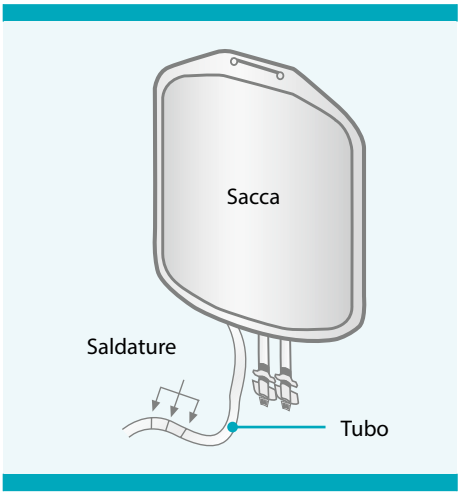


Figura 7.1: Saldatura di una sacca.

7. Per prelevare un campione, disinfettare il setto del forasacche. Mescolare il contenuto della sacca. Inserire un ago con una siringa idonea nel forasacche della Cell Preparation Bag e prelevare un volume di 0,5 mL. Trasferire il campione in una provetta. Etichettare il tubo come LEUCAFERESI/PREPARAZIONE CELLULARE INIZIALE (includendo i dati identificativi del paziente) e conservare per l'analisi cellulare.

   IMPORTANTE
   Assicurarsi che la preparazione cellulare iniziale sia mescolata accuratamente prima di prelevare il campione. Per ottenere un campione rappresentativo, utilizzare una siringa con capacità di almeno 5 mL.

8. Tarare la bilancia. Appoggiare la Cell Preparation Bag riempita sulla bilancia in posizione orizzontale lasciando il tubo sul tavolo. Registrare il peso.

9. Determinare il peso della preparazione cellulare iniziale sottraendo il peso della Cell Preparation Bag vuota dal peso della Cell Preparation Bag riempita con la preparazione cellulare iniziale. Registrare il peso calcolato.

Peso della preparazione cellulare iniziale (g)	=	Peso della Cell Preparation Bag riempita (g)	–	Peso della Cell Preparation Bag vuota (g)

Diluizione della preparazione cellulare iniziale

Per il rapporto di diluizione fare riferimento alla sezione specifica dell'applicazione.

La preparazione cellulare iniziale deve essere diluita con il CliniMACS PBS/EDTA Buffer (addizionato con HSA fino a una concentrazione finale dello 0,5% (p/v)) prima della marcatura magnetica. Calcolare il peso del tampone da aggiungere con una delle seguenti equazioni (1 o 2) a seconda dell'applicazione e registrarlo.

(1) Peso del tampone da aggiungere (g)	=	600 g	–	Peso della preparazione cellulare iniziale (g)
(2) Peso del tampone da aggiungere (g)	=	Peso della preparazione cellulare iniziale (g)	×	2

1. Prendere un set di trasferimento di plasma e accertarsi che il morsetto sia nella posizione di chiusura. Inserire il perforatore del set di trasferimento di plasma in una porta della sacca di tampone.
2. Utilizzando il connettore per tubi sterile, collegare la sacca di tampone alla Cell Preparation Bag. Appendere la sacca di tampone a un appendi-sacca.
3. Mettere la Cell Preparation Bag sulla bilancia e tarare la bilancia.
4. Aprire la pinzetta per clampaggio sulla Cell Preparation Bag. Far scorrere il morsetto del set di trasferimento di plasma fino alla posizione di apertura. Monitorando visivamente la scala graduata sulla bilancia, trasferire il peso calcolato del tampone nella Cell Preparation Bag.
5. Una volta trasferito il peso appropriato di tampone, far scorrere il morsetto sul set di trasferimento di plasma fino alla posizione di chiusura per arrestare il flusso di liquido. Chiudere la pinzetta per clampaggio sui tubi quanto più possibile accanto alla sacca.
6. Con la termosaldatrice, saldare il tubo tra il morsetto e la pinzetta clampaggio lasciando almeno 15 cm di tubo nella Cell Preparation Bag per ulteriori collegamenti. Scollegare la sacca di tampone.
7. Tenendo la Cell Preparation Bag con entrambe le mani, mescolare accuratamente il contenuto con un delicato movimento rotatorio. Evitare di mescolare intensamente le cellule.
8. Tarare la bilancia e pesare la Cell Preparation Bag riempita. Registrare il peso.
9. Determinare il peso della preparazione cellulare iniziale diluita sottraendo il peso della Cell Preparation Bag vuota dal peso della Cell Preparation Bag riempita. Registrare il peso calcolato.

Peso della preparazione cellulare iniziale diluita (g)	=	Peso della Cell Preparation Bag riempita (g)	–	Peso della Cell Preparation Bag vuota (g)

Centrifugazione

⚠ AVVERTENZA

Rischio di contaminazione. Se le sacche non sono idonee alla preparazione delle cellule o non sono posizionate correttamente nel cestello della centrifuga, vi è il rischio di contaminazione a causa di danni alla sacca. Utilizzare sacche idonee, piegare verso il basso eventuali parti mobili delle sacche o dei tubi avendo cura di non compromettere l'integrità delle sacche, quindi posizionare le sacche saldamente nel cestello della centrifuga.

⚠ ATTENZIONE

Rischio di prestazioni di separazione cellulare inferiori. Se le sacche non sono posizionate correttamente nel cestello della centrifuga, vi è il rischio di una perdita di cellule durante la rimozione del sovranatante. Piegare verso il basso eventuali parti mobili delle sacche o dei tubi e posizionare le sacche saldamente nel cestello della centrifuga.

1. Utilizzando il connettore per tubi sterile, collegare la Plasma Waste Bag vuota alla Cell Preparation Bag.
2. Piegare verso il basso eventuali parti mobili della Cell Preparation Bag o del tubo. Posizionare le due sacche saldamente nel cestello della centrifuga.
3. Bilanciare il cestello carico con un cestello di peso adeguato. È essenziale che la centrifuga sia ben bilanciata.
4. Centrifugare le cellule alle condizioni definite nella sezione specifica dell'applicazione. Registrare le condizioni di centrifugazione.
5. Togliere le sacche dalla centrifuga avendo cura di non muovere il pellet cellulare. Caricare la Cell Preparation Bag sull'estrattore di plasma e la Waste Bag collegata sulla bilancia da tavolo.

Aggiustamento del volume

Per la marcatura magnetica delle cellule, il peso ottimale della preparazione cellulare varia a seconda dell'applicazione. Fare riferimento al volume di marcatura nella sezione specifica dell'applicazione.

A seconda dell'applicazione, per raggiungere il volume di marcatura può essere necessario rimuovere il sovranatante solo in parte (rimozione mirata del sovranatante) o completamente e aggiungere tampone (rimozione completa del sovranatante). Fare riferimento alla sezione specifica dell'applicazione per l'opzione applicabile e continuare di conseguenza.

IMPORTANTE

- *Utilizzando l'estrattore di plasma, mantenere un controllo costante della maniglia di rilascio dell'estrattore e assicurarsi che la pinzetta per clampaggio sulla Cell Preparation Bag sia aperta prima di iniziare il trasferimento. Rilasciare lentamente la maniglia dell'estrattore.*
- *Durante la rimozione del sovranatante fare attenzione a non perdere cellule.*

Rimozione mirata del sovranatante

Calcolare il peso del sovranatante da rimuovere per aggiustare il campione al volume di marcatura servendosi della seguente equazione:

Peso del sovranatante da rimuovere (g)	=	Peso della preparazione cellulare dopo il lavaggio (g)	–	Volume di marcatura (g)

Registrare il peso del sovranatante da rimuovere.

1. Mettere la Plasma Waste Bag o la Wash Waste Bag N. 1 vuota sulla bilancia e tarare la bilancia.

2. Aprire la pinzetta per clampaggio sulla Cell Preparation Bag. Monitorando visivamente la scala graduata sulla bilancia, rimuovere il sovranatante servendosi dell'estrattore di plasma. Far fuoriuscire con attenzione il sovranatante in eccesso fino a raggiungere il "peso di sovranatante da rimuovere" calcolato.
3. Una volta rimosso il peso appropriato di sovranatante, chiudere la pinzetta per clampaggio sulla Cell Preparation Bag per arrestare il flusso del liquido. Registrare il peso del sovranatante rimosso.
4. Con la termosaldatrice, saldare il tubo lasciando almeno 15 cm di tubo nella Cell Preparation Bag per ulteriori collegamenti. Scollegare la Plasma Waste Bag o la Wash Waste Bag N. 1.
5. Risospendere con cura le cellule nella Cell Preparation Bag. Evitare di mescolare intensamente le cellule. Accertarsi che tutte le cellule siano sospese.
6. Tarare la bilancia e pesare la Cell Preparation Bag riempita. Registrare il peso.
7. Determinare il peso della preparazione cellulare iniziale dopo l'aggiustamento del volume sottraendo il peso della Cell Preparation Bag vuota dal peso della Cell Preparation Bag riempita. Registrare il peso calcolato.

Peso della preparazione cellulare dopo l'aggiustamento del volume (g)	=	Peso della Cell Preparation Bag riempita (g)	–	Peso della Cell Preparation Bag vuota (g)

8. Conservare tutte le Plasma Waste Bag o Wash Waste Bag fino al completamento della separazione e dell'analisi finali di tutte le cellule.

Completare la rimozione del sovranatante

Rimuovere completamente il sovranatante avendo cura di non risospendere il pellet cellulare durante la rimozione. Una volta rimosso il sovranatante, chiudere la pinzetta per clampaggio sulla Cell Preparation Bag per arrestare il flusso del liquido. Con la termosaldatrice, saldare il tubo lasciando almeno 15 cm di tubo nella Cell Preparation Bag per ulteriori collegamenti. Scollegare la Plasma Waste Bag. Risospendere il pellet con cura.

Regolare il peso della Cell Preparation Bag aggiungendo tampone. Calcolare il peso target della Cell Preparation Bag (CPB) riempita con la preparazione cellulare diluita usando la seguente equazione:

Peso target della CPB riempita con preparazione cellulare lavata (g)	=	Volume di marcatura (g)	+	Peso della CPB vuota (g)

1. Inserire il perforatore di un set di trasferimento di plasma in una porta di una sacca di tampone. Verificare che il morsetto del set di trasferimento di plasma sia nella posizione di chiusura.
2. Utilizzando il connettore per tubi sterile, collegare la sacca di tampone alla Cell Preparation Bag. Appendere la sacca di tampone a un appendi-sacca.

3. Tarare la bilancia. Mettere la Cell Preparation Bag con il pellet cellulare sulla bilancia.
4. Aprire la pinzetta per clampaggio sulla Cell Preparation Bag. Far scorrere il morsetto del set di trasferimento di plasma fino alla posizione di apertura. Riempire la Cell Preparation Bag con tampone fino al raggiungimento del "Peso target della Cell Preparation Bag riempita con preparazione cellulare lavata" calcolato. Far scorrere il morsetto sul set di trasferimento di plasma fino alla posizione di chiusura per arrestare il flusso di liquido. Chiudere la pinzetta per clampaggio sulla Cell Preparation Bag.
5. Con la termosaldatrice, saldare il tubo lasciando almeno 15 cm di tubo nella Cell Preparation Bag per ulteriori collegamenti. Scollegare la sacca di tampone.
6. Risospendere con cura le cellule nella Cell Preparation Bag. Evitare di mescolare intensamente le cellule. Accertarsi che tutte le cellule siano sospese.
7. Tarare la bilancia e pesare la Cell Preparation Bag riempita. Registrare il peso.
8. Determinare il peso della preparazione cellulare iniziale dopo l'aggiustamento del volume sottraendo il peso della Cell Preparation Bag vuota dal peso della Cell Preparation Bag riempita. Registrare il peso calcolato.

Peso della preparazione cellulare dopo l'aggiustamento del volume (g)	=	Peso della Cell Preparation Bag riempita (g)	–	Peso della Cell Preparation Bag vuota (g)

9. Conservare la Plasma Waste Bag fino al completamento della separazione e dell'analisi finali di tutte le cellule.

Marcatura delle cellule (solo per CliniMACS Plus Anti-Biotin System e CliniMACS Plus TCRα/β-Biotin System)

Incubazione con il CliniMACS TCRα/β-Biotin

Il flaconcino di CliniMACS TCRα/β-Biotin è pronto per l'uso e sufficiente per l'applicazione come descritto di seguito. Il coniugato non è destinato alla somministrazione parenterale.

Conservare il coniugato a temperatura compresa tra +2 °C e +8 °C ((+36 °F e +46 °F). NON congelare. Il coniugato deve essere utilizzato freddo, direttamente dal frigorifero. NON scaldarlo prima dell'uso. Il numero di lotto e la data di scadenza del coniugato sono stampati sull'etichetta del flaconcino. NON usare il coniugato dopo la data di scadenza.

1. Registrare il numero di lotto e la data di scadenza del CliniMACS TCRα/β-Biotin.
2. Disinfettare il setto del forasacche. Utilizzare una siringa e un ago sterili idonei per prelevare tutto il volume da un flaconcino (7,5 mL). Una siringa da 10 mL è sufficiente per prelevare il contenuto di un flaconcino. La siringa deve avere un ago da 20 gauge.

3. Utilizzando la porta di iniezione del forasacche, iniettare l'intero volume di coniugato nella Cell Preparation Bag (in via facoltativa è possibile trasferire il contenuto della Cell Preparation Bag in una nuova sacca di trasferimento per un'elevata efficienza di deplezione). Iniziare immediatamente il tempo di incubazione di 30 minuti.
4. Tenendo la Cell Preparation Bag con entrambe le mani, mescolare accuratamente il contenuto con un delicato movimento rotatorio. Registrare l'ora di inizio dell'incubazione.
5. Mettere la Cell Preparation Bag sul rotatore orbitale, impostare una velocità di circa 25 rpm e assicurarsi che la sacca non sia increspata o piegata. Incubare la sacca per un totale di 30 minuti a temperatura ambiente controllata (tra +19 °C e +25 °C [tra +66 °F e +77 °F]). Registrare l'ora di fine incubazione.

Incubazione con l'anticorpo primario (anticorpo biotinilato di un altro fabbricante)

1. Risospendere il pellet e marcare le cellule con l'anticorpo biotinilato primario nel momento e con il titolo raccomandati dal fabbricante dell'anticorpo. Accertarsi che tutte le cellule siano sospese. (L'anticorpo primario deve essere usato al suo titolo ottimale, cioè con un'intensità di colorazione ottimale e senza colorazione di fondo. Seguire le istruzioni per l'uso fornite dal fabbricante dell'anticorpo primario.)
2. Incubare la Cell Preparation Bag in un agitatore orbitale a 25 rpm. Seguire le istruzioni per l'uso fornite dal fabbricante dell'anticorpo primario.

Rimozione del coniugato in eccesso (1° lavaggio) (solo per CliniMACS Plus Anti-Biotin System e CliniMACS Plus TCRα/β-Biotin System)

Diluire la preparazione cellulare con il tampone fino a un peso totale di 600 g. Calcolare il peso del tampone da aggiungere con la seguente equazione e registrarlo.

Peso del tampone da aggiungere (g)	=	600 g	–	Peso della preparazione cellulare marcata (g)

1. Diluire la preparazione cellulare seguendo i passi descritti nella fase "Diluizione della preparazione cellulare iniziale" (fasi 1–8) fino a un peso totale di 600 g.
2. Determinare il peso della preparazione cellulare dopo la rimozione del coniugato in eccesso (1° lavaggio) sottraendo il peso della Cell Preparation Bag vuota dal peso della Cell Preparation Bag riempita. Registrare il peso calcolato.

Peso della preparazione cellulare dopo la rimozione del coniugato in eccesso (1° lavaggio) (g)	=	Peso della Cell Preparation Bag riempita (g)	–	Peso della Cell Preparation Bag vuota (g)

3. Utilizzando il connettore per tubi sterile, collegare la Wash Waste Bag vuota alla Cell Preparation Bag.
4. Piegare verso il basso eventuali parti mobili della Cell Preparation Bag o del tubo. Posizionare le due sacche saldamente nel cestello della centrifuga.
5. Bilanciare il cestello carico con un cestello di peso adeguato. È essenziale che la centrifuga sia ben bilanciata.
6. Centrifugare le cellule alle condizioni definite nella sezione specifica dell'applicazione.
7. Togliere le sacche dalla centrifuga avendo cura di non risospendere il pellet cellulare. Caricare la Cell Preparation Bag sull'estrattore di plasma e la Waste Bag collegata sulla bilancia da tavolo.
8. Per il numero necessario di lavaggi, consultare la specifica dell'applicazione.
9. Per la marcatura magnetica delle cellule con il CliniMACS Anti-Biotin Reagent, aggiustare il peso della sospensione cellulare come descritto nella sezione "Aggiustamento del volume" fino a ca. 190 g.

Incubazione con immunoglobulina di grado clinico (solo per CliniMACS Plus CD3 o CD3/CD19 System)

IMPORTANTE

Attenzione: l'IgG umana non è un componente del sistema CliniMACS. Usare solo IgG umana di grado farmaceutico approvata nel proprio Paese. Leggere con attenzione il foglio illustrativo dell'IgG umana utilizzata, in particolare il paragrafo sulle reazioni di ipersensibilità e sul rischio di infezione per tutti i pazienti legato all'IgG umana. Tutti i rischi correlati a questi materiali devono essere valutati dall'utilizzatore.

Disinfettare il setto del forasacche della Cell Preparation Bag. Utilizzare una siringa sterile e un ago idonei per aggiungere 1,5 mg di IgG umana per mL di preparazione cellulare (ad es. 1,6 mL di Gamunex 10% per 95 mL di preparazione cellulare). Mescolare accuratamente il contenuto. Incubare per 5 minuti a temperatura ambiente controllata con un delicato movimento rotatorio (ad es. 25 rpm sul rotatore orbitale).

Marcatura magnetica delle cellule: incubazione con il CliniMACS Reagent

I flaconcini di CliniMACS Reagent sono pronti per l'uso e sufficienti per l'applicazione come descritto di seguito. I reagenti non sono destinati alla somministrazione parenterale.

Conservare i reagenti a una temperatura compresa tra +2 °C e +8 °C (+36 °F e +46 °F). NON congelare. I reagenti devono essere utilizzati freddi, direttamente dal frigorifero. NON scaldarli prima dell'uso. Il numero di lotto e la data di scadenza dei reagenti sono stampati sull'etichetta del flaconcino. NON USARE i reagenti dopo la data di scadenza.

1. Registrare il numero di lotto e la data di scadenza di ogni CliniMACS Reagent.
2. Disinfettare il setto del forasacche. Utilizzare una siringa e un ago sterili idonei per prelevare tutto il volume da a) un flaconcino o b) due flaconcini di reagente (7,5 mL ciascuno). Una siringa da 10 mL è sufficiente per rimuovere il contenuto di un flaconcino e una siringa da 20 mL è sufficiente per rimuovere il contenuto di due flaconcini di reagente. La siringa dovrebbe avere un ago da 20 gauge.
3. Utilizzando la porta di iniezione del forasacche, iniettare l'intero volume del reagente nella Cell Preparation Bag (in via facoltativa, nelle applicazioni per la deplezione è possibile trasferire il contenuto della Cell Preparation Bag in una nuova sacca di trasferimento per un'elevata efficienza di deplezione). Il tempo di incubazione inizia in questo momento.
4. Tenendo la Cell Preparation Bag con entrambe le mani, mescolare accuratamente il contenuto con un delicato movimento rotatorio.
5. Mettere la Cell Preparation Bag sul rotatore orbitale, impostare una velocità di circa 25 rpm e assicurarsi che la sacca non sia increspata o piegata. Incubare la sacca nelle condizioni e per la durata definite nella sezione specifica dell'applicazione.

Rimozione del reagente in eccesso

Per rimuovere il reagente non legato al termine dell'incubazione, è necessario lavare le cellule. Per il numero necessario di lavaggi, fare riferimento alla sezione specifica dell'applicazione.

1. Inserire il perforatore di un set di trasferimento di plasma in una porta di una sacca di tampone contenente almeno 500 mL di tampone. Verificare che il morsetto del set di trasferimento di plasma sia nella posizione di chiusura.
2. Utilizzando il connettore per tubi sterile, collegare la sacca di tampone alla Cell Preparation Bag. Appendere la sacca di tampone a un appendi-sacca.
3. Mettere la Cell Preparation Bag sulla bilancia e tarare la bilancia.
4. Aprire la pinzetta per clampaggio sulla Cell Preparation Bag. Far scorrere il morsetto del set di trasferimento di plasma fino alla posizione di apertura. Riempire la Cell Preparation Bag con tampone fino a 600 mL. Far scorrere il morsetto sul set di trasferimento di plasma fino alla posizione di chiusura per arrestare il flusso di liquido. Chiudere la pinzetta per clampaggio sulla Cell Preparation Bag. Registrare il peso della Cell Preparation Bag riempita.
5. Saldare i tubi lasciando almeno 15 cm di tubo sulla Cell Preparation Bag per ulteriori collegamenti. Scollegare la sacca di tampone.
6. Tenendo la Cell Preparation Bag con entrambe le mani, mescolare accuratamente il contenuto con un delicato movimento rotatorio.
7. Utilizzando il connettore per tubi sterile, collegare la Wash Waste Bag vuota alla Cell Preparation Bag.

8. Piegare verso il basso eventuali parti mobili delle sacche o del tubo. Trasferire la Cell Preparation Bag e la Wash Waste Bag nel cestello della centrifuga osservando le misure di sicurezza.
9. Centrifugare le cellule nelle condizioni e per la durata definite nella sezione specifica dell'applicazione.
10. Facendo attenzione a non muovere il pellet cellulare, rimuovere le sacche dalla centrifuga.
11. Caricare con cura la Cell Preparation Bag sull'estrattore di plasma.
12. Mettere la Wash Waste Bag sulla bilancia e tarare la bilancia.
13. Aprire la pinzetta per clampaggio sulla Cell Preparation Bag. Utilizzando l'estrattore di plasma, rimuovere la maggior quantità possibile di sovranatante dalla Cell Preparation Bag. Chiudere la pinza sulla Cell Preparation Bag per arrestare il flusso del liquido.
14. Servendosi della termosigillatrice, saldare il tubo lasciando almeno 15 cm di tubo nella Cell Preparation Bag per ulteriori collegamenti. Scollegare la Wash Waste Bag.
15. Conservare la Wash Waste Bag fino al completamento della separazione e dell'analisi finali di tutte le cellule.
16. Risospendere il pellet cellulare nella Cell Preparation Bag. Evitare di mescolare intensamente le cellule. Accertarsi che tutte le cellule siano sospese.
17. Se sono necessari più lavaggi (ad es. per l'arricchimento di cellule CD34 positive), ripetere i passi 1–16.
18. Tarare la bilancia e pesare la Cell Preparation Bag riempita. Registrare il peso.
19. Determinare il peso della preparazione cellulare dopo il lavaggio sottraendo il peso della Cell Preparation Bag vuota dal peso della Cell Preparation Bag riempita. Registrare il peso calcolato.

Peso della preparazione cellulare dopo il lavaggio (g)	=	Peso della Cell Preparation Bag riempita (g)	–	Peso della Cell Preparation Bag vuota (g)

20. Aggiustare il volume di caricamento del campione: calcolare il peso di tampone necessario per portare il peso della sospensione cellulare fino al volume di caricamento del campione appropriato in base all'applicazione servendosi dell'equazione sottostante. Per il caricamento delle cellule marcate e lavate in un set di tubi, si consiglia una concentrazione cellulare massima di $0{,}4\times10^9$ cellule per mL.

Peso del tampone da aggiungere (g)	=	Volume di caricamento del campione (in base all'applicazione)	–	Peso della preparazione cellulare dopo il lavaggio (g)

21. Utilizzando il connettore per tubi sterile, collegare la sacca di tampone alla Cell Preparation Bag. Appendere la sacca di tampone a un appendi-sacca.
22. Mettere la Cell Preparation Bag sulla bilancia e tarare la bilancia.

23. Aprire la pinzetta per clampaggio sulla Cell Preparation Bag. Far scorrere il morsetto del set di trasferimento di plasma fino alla posizione di apertura. Monitorando visivamente la scala graduata sulla bilancia, trasferire il peso calcolato del tampone nella Cell Preparation Bag.
24. Una volta trasferito il peso appropriato di tampone, far scorrere il morsetto sul set di trasferimento di plasma fino alla posizione di chiusura per arrestare il flusso di liquido. Chiudere la pinzetta per clampaggio sulla Cell Preparation Bag.
25. Con la termosaldatrice, saldare i tubi tra i due morsetti. Scollegare la sacca di tampone.
26. Risospendere il pellet cellulare nella Cell Preparation Bag. Evitare di mescolare intensamente le cellule. Accertarsi che tutte le cellule siano sospese.
27. Disinfettare il setto del forasacche. Inserire un ago con una siringa idonea nel forasacche della Cell Preparation Bag e prelevare un volume di 0,5 mL di prodotto marcato. Trasferire il campione in una provetta. Etichettare il tubo come ORIGINALE (includendo i dati identificativi del paziente) e conservare per l'analisi cellulare.
28. Tarare la bilancia e pesare la Cell Preparation Bag riempita. Registrare il peso.
29. Determinare il peso della preparazione cellulare dopo l'aggiunta di tampone (volume di caricamento del campione) sottraendo il peso della Cell Preparation Bag vuota dal peso della Cell Preparation Bag riempita. Registrare il peso calcolato.

Peso della preparazione cellulare dopo l'aggiunta del tampone (g)	=	Peso della Cell Preparation Bag riempita (g)	–	Peso della Cell Preparation Bag vuota (g)

▶ Continuare con la FASE 2.

NON collegare la Cell Preparation Bag al set di tubi finché non appare la rispettiva indicazione nel display dello strumento.

7.2 FASE 2: Scelta del programma di separazione

7.2.1 Avviare il CliniMACS Plus Instrument

Accendere il CliniMACS Plus Instrument utilizzando l'interruttore ON/OFF sul pannello posteriore dello strumento. Registrare l'ora di avvio dello strumento.

La finestra indica la schermata principale della sezione "Installazione" del Manuale d'uso del CliniMACS Plus Instrument.

Per tornare al menu dei programmi, premere **ENT**.

7.2.2 CD34 SELECTION 1/2

IMPORTANTE

- *CD34 SELECTION 1 deve essere utilizzato solo in combinazione con il CliniMACS Tubing Set (REF 161-01), mentre CD34 SELECTION 2 deve essere utilizzato solo in combinazione con il CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01). Controllare attentamente il set di tubi prima dell'installazione.*
- *Nella finestra di visualizzazione appariranno i messaggi a schermo e i diagrammi per guidare l'operatore nelle procedure. Effettuare e controllare ogni passaggio attenendosi alle istruzioni del manuale prima di procedere al passaggio successivo. Per correggere un errore durante l'inserimento dei dati, premere il pulsante "Undo" (cfr. la sezione "Descrizione" nel Manuale d'uso del CliniMACS Plus Instrument).*

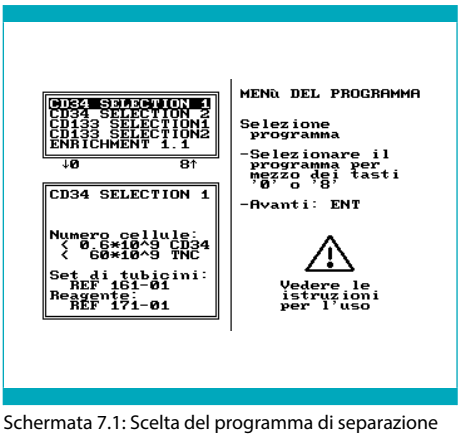
Scelta del programma di separazione CD34 SELECTION 1/2

La finestra indica la Schermata 7.1.

Scegliere CD34 SELECTION 1 o CD34 SELECTION 2 a seconda dell'applicazione.

Per scegliere il programma di separazione, evidenziare il nome del programma con la barra nera. Muovere la barra su e giù usando i pulsanti **0** e **8**.

Per continuare con il programma evidenziato, premere **ENT**.



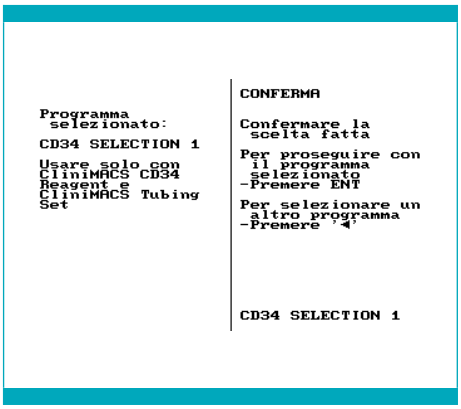
Schermata 7.1: Scelta del programma di separazione

Conferma

La finestra indica la Schermata 7.2.

Per confermare il programma di separazione e continuare, premere ENT.

In caso contrario, premere ◄ per ritornare al passo precedente e modificare la scelta.



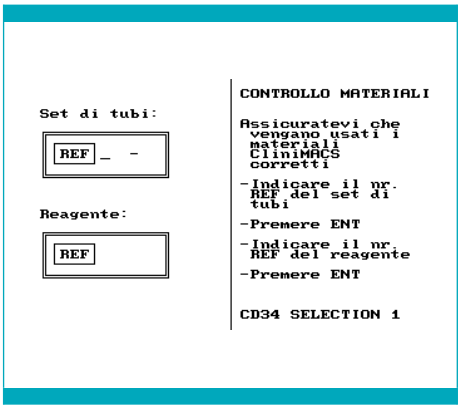
Schermata 7.2: Conferma

Controllo del materiale

La finestra indica la Schermata 7.3.

CD34 SELECTION 1 e CD34 SELECTION 2 sono ottimizzati per l'arricchimento di cellule CD34 positive.

Per verificare che sia disponibile il set di tubi idoneo e che sia stato utilizzato il reagente corretto per la marcatura delle cellule, inserire il rispettivo numero di catalogo (REF) nella casella di ricerca. Il software dello strumento verificherà se i materiali possono essere utilizzati in combinazione con il programma scelto.



Schermata 7.3: Controllo del materiale

1. Inserire il numero di catalogo del set di tubi da usare per la separazione automatica delle cellule. Per confermare e continuare, premere ENT.
2. Inserire il numero di catalogo del reagente usato per la marcatura delle cellule. Per confermare e continuare, premere ENT.

Se è stato inserito il numero di catalogo di un set di tubi o di un reagente non specificato per il programma di separazione scelto, viene visualizzato un messaggio. Premere ENT per confermare e inserire di nuovo il numero di catalogo corretto. Se il numero inserito è ancora sbagliato, il messaggio apparirà una seconda volta. Dopo aver premuto RUN, il programma tornerà automaticamente al menu dei programmi (cfr. Schermata 7.1).

IMPORTANTE

- *CD34 SELECTION 1 deve essere utilizzato solo in combinazione con il CliniMACS Tubing Set (REF 161-01), mentre CD34 SELECTION 2 deve essere utilizzato solo in combinazione con il CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01). Controllare attentamente il set di tubi prima dell'installazione.*
- *Per correggere un errore durante l'inserimento dei dati, premere il pulsante "Undo" (cfr. la sezione "Descrizione" nel Manuale d'uso del CliniMACS Plus Instrument).*

Se il controllo del materiale è andato a buon fine, il programma continua automaticamente con le istruzioni per installare il set di tubi.

▶ **Continuare con la FASE 3.**

7.2.3 ENRICHMENT 1.1

IMPORTANTE

- *Il programma di separazione ENRICHMENT 1.1 deve essere usato solo con il CliniMACS Tubing Set (REF 161-01).*
- *Nella finestra di visualizzazione appariranno i messaggi a schermo e i diagrammi per guidare l'operatore nelle procedure. Effettuare e controllare ogni passaggio attenendosi alle istruzioni del manuale prima di procedere al passaggio successivo. Per correggere un errore durante l'inserimento dei dati, premere il pulsante "Undo" (cfr. la sezione "Descrizione" nel Manuale d'uso del CliniMACS Plus Instrument).*

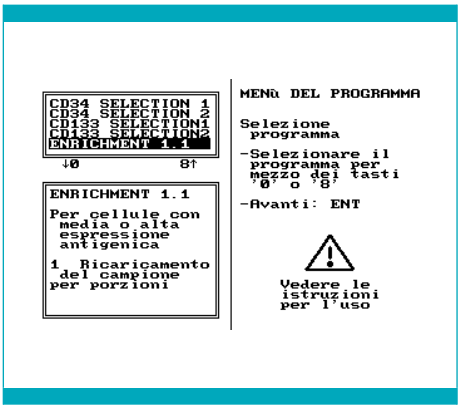
Scelta del programma di separazione ENRICHMENT 1.1

La finestra indica la Schermata 7.4.

Scegliere ENRICHMENT 1.1.

Per scegliere il programma di separazione, evidenziare il nome del programma con la barra nera. Muovere la barra su e giù usando i pulsanti **0** e **8**.

Per continuare con il programma evidenziato, premere **ENT**.



Schermata 7.4: Scelta del programma di separazione

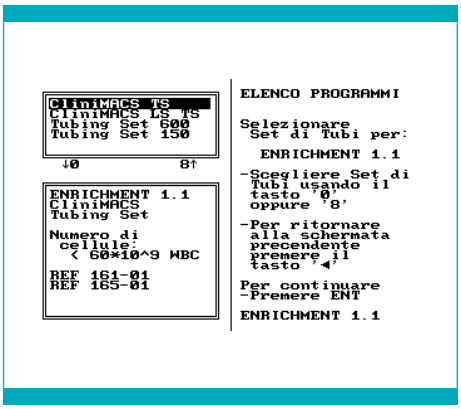
Selezione del set di tubi

La finestra indica la Schermata 7.5.

Verificare di aver scelto il programma corretto. In caso contrario, premere ◄ per ritornare al passo precedente e modificare la scelta.

Selezionare il set di tubi evidenziandolo nella casella in alto a sinistra con la barra nera. Muovere la barra su e giù usando i pulsanti **0** e **8**.

La finestra in basso indica i dati rilevanti come la capacità e il numero di catalogo del set di tubi selezionato.



Schermata 7.5: Selezione del set di tubi

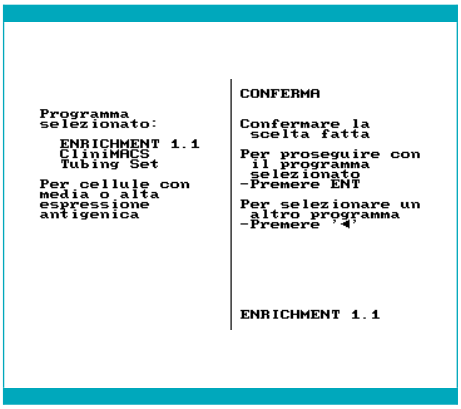
Per confermare la combinazione selezionata di programma di separazione e set di tubi, premere **ENT**.

Conferma

La finestra indica la Schermata 7.6.

Per confermare la combinazione di programma di separazione e set di tubi e continuare, premere **ENT**.

In caso contrario, premere ◄ per ritornare al passo precedente e modificare la scelta.



Schermata 7.6: Conferma

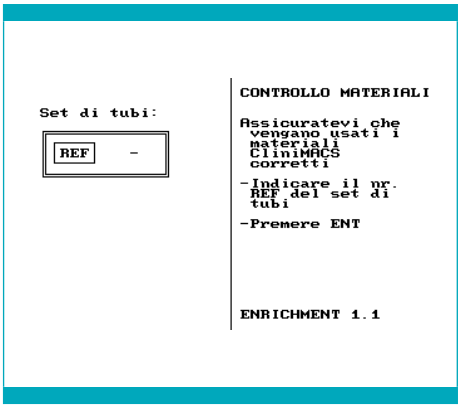
Controllo del materiale

La finestra indica la Schermata 7.7.

La richiesta del numero di catalogo (REF) del set di tubi serve da controllo di sicurezza per garantire che il set di tubi selezionato possa essere utilizzato con il programma scelto.

Inserire il numero di catalogo del set di tubi selezionato e premere **ENT** per procedere.

Se è stato inserito un numero di catalogo non corrispondente, verrà visualizzato un messaggio. Per confermare, premere **ENT** e inserire il numero di catalogo corretto. Se il



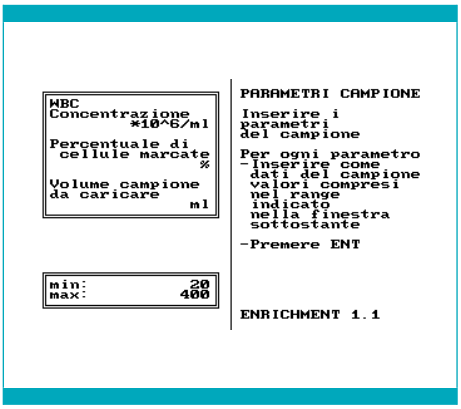
Schermata 7.7: Controllo del materiale

numero inserito è ancora sbagliato, il messaggio apparirà una seconda volta. Dopo aver premuto **RUN**, il programma tornerà automaticamente al menu dei programmi (cfr. Schermata 7.4).

Inserimento dei parametri del campione

Se il controllo del materiale è andato a buon fine, il programma continua automaticamente con la richiesta dei parametri del campione necessari per aggiustare la separazione per ogni singolo campione e fornire all'operatore informazioni importanti sui volumi necessari di tampone e sacca.

La finestra indica la Schermata 7.8.



Schermata 7.8: Inserimento dei parametri del campione

1. Iniziare inserendo la concentrazione di WBC del campione. L'intervallo consentito è indicato nella casella in basso a sinistra. Premere ◀ per correggere un inserimento errato.

   Confermare che il valore inserito corrisponda al valore del campione. In caso contrario, il processamento del campione potrebbe non essere ottimale. Per continuare con il prossimo inserimento, premere **ENT**.

   IMPORTANTE
   Tutti i parametri del campione necessari fanno riferimento alla procedura post marcatura e lavaggio delle cellule del campione. L'intervallo consentito mostrato nel riquadro in basso a sinistra tiene sempre conto dell'inserimento precedente. Dopo ogni inserimento il software calcola e aggiusta l'intervallo accettato della prossima richiesta.

   ⚠ ATTENZIONE

   L'indicazione di parametri errati può comportare un processamento non ottimale del campione e aumentare il rischio di perdita di cellule bersaglio. L'inserimento di valori per la concentrazione di WBC e/o la percentuale di cellule marcate inferiori ai valori effettivi del campione può causare una perdita di cellule dovuta al sovraccarico del sistema. L'inserimento di un volume di campione inferiore può comportare una perdita di cellule dovuta al sovraccarico o addirittura a un processamento incompleto del campione. Se la specifica di uno dei tre parametri è troppo alta, si otterranno un aumento del tempo di processamento e un volume maggiore della frazione cellulare bersaglio. Assicurarsi sempre di inserire i parametri corretti.

2. Inserire la percentuale di cellule marcate. Confermare che il valore inserito corrisponda al valore del campione. In caso contrario, il processamento del campione potrebbe non essere ottimale (cfr. "Importante"). Per continuare con il prossimo inserimento, premere **ENT**.

3. Inserire il volume finale del campione cellulare. Confermare che il valore inserito corrisponda al valore del campione. In caso contrario, il processamento del campione potrebbe non essere ottimale (cfr. “Importante”).

Per continuare, premere **ENT**.

Calcolo

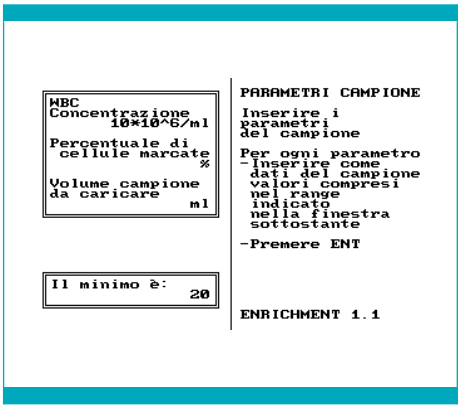
Il CliniMACS Plus Software calcola il numero totale di cellule marcate per controllare che la capacità di separazione sia sufficiente.

Il risultato viene visualizzato su una delle due possibili schermate:

- Il risultato del calcolo viene visualizzato su una schermata simile alla Schermata 7.9. Assicurarsi che il numero calcolato di cellule marcate sia corretto.

  Per continuare, premere **ENT**.

  È possibile correggere i dati. Premere ◄ per tornare alla schermata precedente per la correzione.

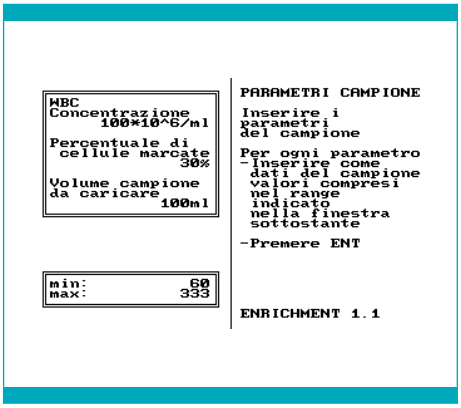


Schermata 7.9: Calcolo

- Se il numero calcolato di cellule marcate supera la capacità di separazione del CliniMACS Plus System, viene visualizzata una schermata simile alla Schermata 7.10. Assicurarsi che siano stati inseriti i parametri corretti del campione e che il numero di cellule calcolato sia corretto. Premere ◄ per tornare alla Schermata 7.8 precedente e correggere i parametri del campione.

  Per evitare di sovraccaricare il sistema, suddividere il campione e determinare il volume di ciascuna porzione. Premere ◄ per tornare alla Schermata 7.8 precedente. Inserire i parametri del campione per la prima aliquota del campione e continuare con la separazione di questa porzione. Al termine della separazione, avviare una seconda separazione con la seconda aliquota usando un nuovo set di tubi.

  Per continuare, premere **ENT**.



Schermata 7.10: Calcolo: Il numero di cellule supera la capacità di separazione

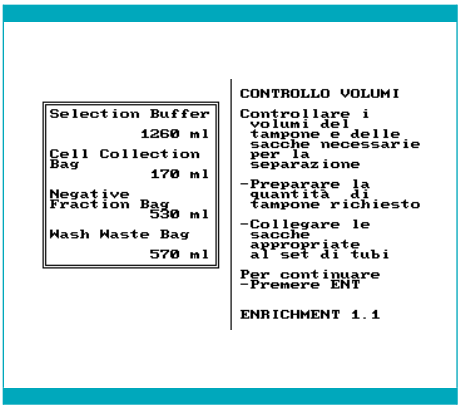
Informazioni sul volume

Dal numero totale di cellule marcate (cfr. "Calcolo") il software calcola il numero di fasi di separazione, la quantità di tampone necessaria per l'intera separazione e i volumi di liquido che verranno raccolti nella Negative Fraction Bag, nella Buffer Waste Bag e nella Cell Collection Bag.

I valori standard sono i seguenti:

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

Se uno dei valori calcolati supera questi valori standard, appare la Schermata 7.11 per informare sulla quantità di liquido che sarà necessaria e verrà accumulata durante il processo di separazione. Se è necessaria una sostituzione, sostituire le sacche fornite con il set di tubi (capacità di ca. 500 mL) con sacche alternative di dimensioni adeguate. Le sacche originariamente collegate al set di tubi sono collegate con connessioni Luer. Le sacche che sostituiscono le sacche originali devono avere un connettore Luer femmina. Le sacche standard possono essere collegate mediante un Luer/Spike Interconnector.



Schermata 7.11: Controllare i volumi

1. Verificare che sia disponibile la quantità di tampone richiesta. Non agganciare sacche contenenti più di tre litri di tampone all'appendi-sacca.

   AVVISO

   Rischio di danni allo strumento. Il sovraccarico degli appendi-sacche può danneggiare lo strumento. La capacità portante di un singolo appendi-sacca è di 3 kg. Non superare i limiti di carico degli appendi-sacche.

2. Aprire il vassoio del set di tubi in condizioni sterili e, se necessario, sostituire le sacche originali con altre più grandi. Assicurarsi che il passaggio del flusso verso queste sacche sia libero.

3. Collegare una Cell Collection Bag di dimensioni sufficienti al connettore Luer libero. Se non specificato nella Schermata 7.11, il volume massimo di eluizione della frazione di cellule bersaglio è 150 mL. Assicurarsi che il passaggio del flusso verso la Cell Collection Bag sia libero.

IMPORTANTE

- *Accertarsi che la quantità di tampone necessaria sia disponibile e che il volume delle sacche indicato nella Schermata 7.11 sia sufficiente. In caso contrario, si comprometteranno le prestazioni di separazione dello strumento.*
- *Qualsiasi modifica dei Set di tubi CliniMACS deve essere eseguita in condizioni sterili, ad es. nella cappa a flusso laminare.*
- *Per ulteriori analisi o per il processamento delle cellule, tenere presente che i volumi elencati nella Schermata 7.11 non sono i volumi esatti ma i volumi che rientrano nei requisiti di sicurezza.*

4. Controllare i Luer Lock sulle colonne. I Luer Locks devono essere chiusi bene.

Per continuare, premere **ENT**.

Il programma continua automaticamente con le istruzioni per installare il set di tubi sullo strumento.

▶ **Continuare con la FASE 3.**

7.2.4 ENRICHMENT 3.2

IMPORTANTE

- *Il programma di separazione ENRICHMENT 3.2 deve essere usato solo con il CliniMACS Tubing Set (REF 161-01).*
- *Nella finestra di visualizzazione appariranno i messaggi a schermo e i diagrammi per guidare l'operatore nelle procedure. Effettuare e controllare ogni passaggio attenendosi alle istruzioni del manuale prima di procedere al passaggio successivo. Per correggere un errore durante l'inserimento dei dati, premere il pulsante "Undo" (cfr. la sezione "Descrizione" nel Manuale d'uso del CliniMACS Plus Instrument).*

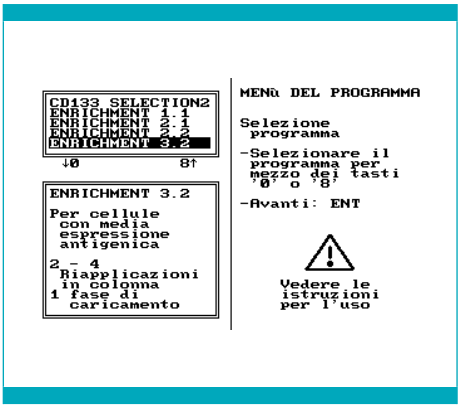
Scelta del programma di separazione ENRICHMENT 3.2

La finestra indica la Schermata 7.12.

Scegliere ENRICHMENT 3.2.

Per scegliere il programma di separazione, evidenziare il nome del programma con la barra nera. Muovere la barra su e giù usando i pulsanti **0** e **8**.

Per continuare con il programma evidenziato, premere **ENT**.



Schermata 7.12: Scelta del programma di separazione

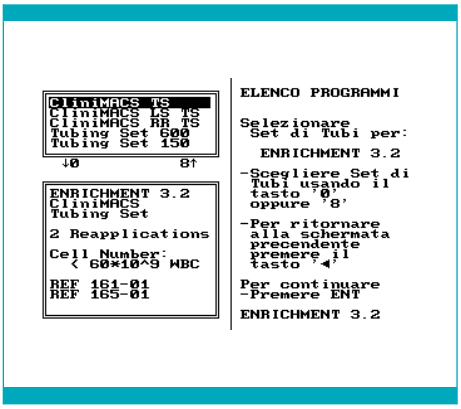
Selezione del set di tubi

La finestra indica la Schermata 7.13.

Verificare di aver scelto il programma corretto. In caso contrario, premere ◄ per tornare al passo precedente e modificare la scelta.

Selezionare il set di tubi evidenziandolo nella casella in alto a sinistra con la barra nera. Muovere la barra su e giù usando i pulsanti **0** e **8**.

La finestra in basso indica i dati rilevanti come la capacità e il numero di catalogo del set di tubi selezionato.



Schermata 7.13: Selezione del set di tubi

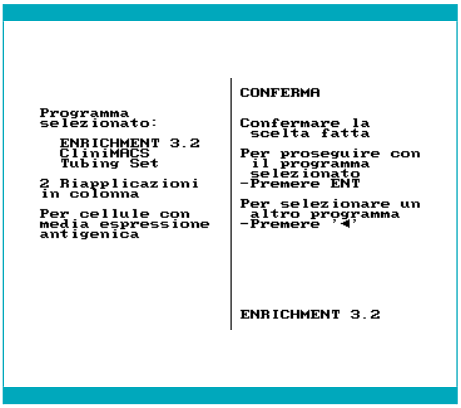
Per confermare la combinazione selezionata di programma di separazione e set di tubi, premere **ENT**.

Conferma

La finestra indica la Schermata 7.14.

Per confermare la combinazione di programma di separazione e set di tubi e continuare, premere **ENT**.

In caso contrario, premere ◄ per ritornare al passo precedente e modificare la scelta.

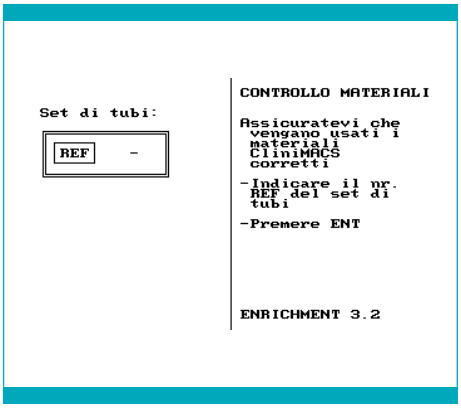


Schermata 7.14: Conferma

Controllo del materiale

La finestra indica la Schermata 7.15.

La richiesta del numero di catalogo (REF) del set di tubi serve da controllo di sicurezza per garantire che il set di tubi selezionato possa essere utilizzato con il programma scelto.



Schermata 7.15: Controllo del materiale

Inserire il numero di catalogo del set di tubi selezionato e premere **ENT** per procedere.

Se è stato inserito un numero di catalogo non corrispondente, verrà visualizzato un messaggio.

Per confermare, premere **ENT** e inserire il numero di catalogo corretto. Se il numero inserito è ancora sbagliato, il messaggio apparirà una seconda volta. Dopo aver premuto **RUN**, il programma tornerà automaticamente al menu dei programmi (cfr. Schermata 7.12).

Se il controllo del materiale è andato a buon fine, il programma continua automaticamente con le istruzioni per installare il set di tubi.

▶ **Continuare con la FASE 3.**

7.2.5 DEPLETION 2.1

IMPORTANTE

- *Il programma di separazione DEPLETION 2.1 deve essere usato solo con il CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01).*
- *Nella finestra di visualizzazione appariranno i messaggi a schermo e i diagrammi per guidare l'operatore nelle procedure. Effettuare e controllare ogni passaggio attenendosi alle istruzioni del manuale prima di procedere al passaggio successivo. Per correggere un errore durante l'inserimento dei dati, premere il pulsante "Undo" (cfr. la sezione "Descrizione" nel Manuale d'uso del CliniMACS Plus Instrument).*

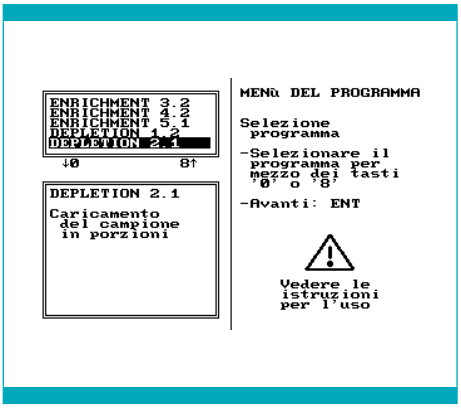
Scelta del programma di separazione DEPLETION 2.1

La finestra indica la Schermata 7.16.

Scegliere DEPLETION 2.1.

Per scegliere il programma di separazione, evidenziare il nome del programma con la barra nera. Muovere la barra su e giù usando i pulsanti **0** e **8**.

Per continuare con il programma evidenziato, premere **ENT**.



Schermata 7.16: Scelta del programma di separazione

Selezione del set di tubi

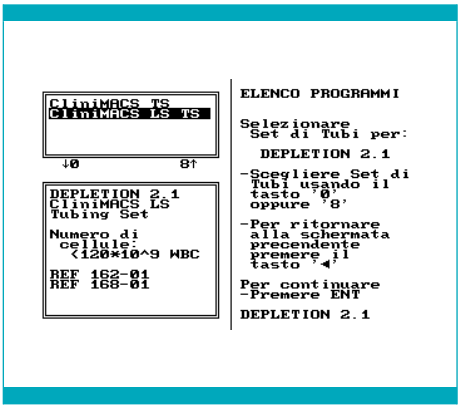
La finestra indica la Schermata 7.17.

Verificare di aver scelto il programma corretto.

In caso contrario, premere ◄ per ritornare al passo precedente e modificare la scelta.

Selezionare il set di tubi evidenziandolo nella casella in alto a sinistra con la barra nera. Muovere la barra su e giù usando i pulsanti **0** e **8**.

La finestra in basso indica i dati rilevanti come la capacità e il numero di catalogo del set di tubi selezionato.



Schermata 7.17: Selezione del set di tubi

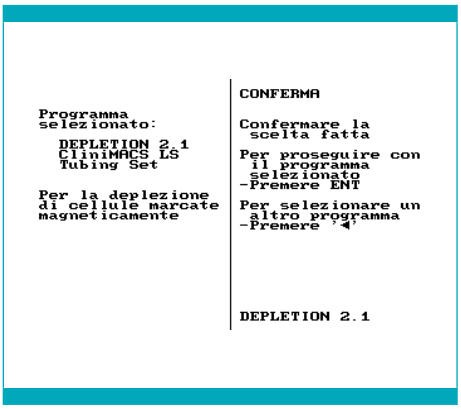
Per confermare la combinazione selezionata di programma di separazione e set di tubi, premere **ENT**.

Conferma

La finestra indica la Schermata 7.18.

Per confermare la combinazione di programma di separazione e set di tubi e continuare, premere **ENT**.

In caso contrario, premere ◄ per ritornare al passo precedente e modificare la scelta.



Schermata 7.18: Conferma

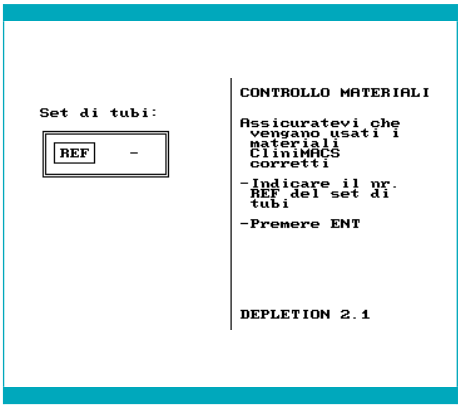
Controllo del materiale

La finestra indica la Schermata 7.19.

La richiesta del numero di catalogo (REF) del set di tubi serve da controllo di sicurezza per garantire che il set di tubi selezionato dall'operatore possa essere utilizzato.

Inserire il numero di catalogo del set di tubi selezionato e premere **ENT** per procedere.

Se è stato inserito un numero di catalogo non corrispondente, verrà visualizzato un messaggio.



Schermata 7.19: Controllo del materiale

Per confermare, premere **ENT** e inserire il numero di catalogo corretto. Se il numero inserito è ancora sbagliato, il messaggio apparirà una seconda volta. Dopo aver premuto **RUN**, il programma tornerà automaticamente al menu dei programmi (cfr. Schermata 7.16).

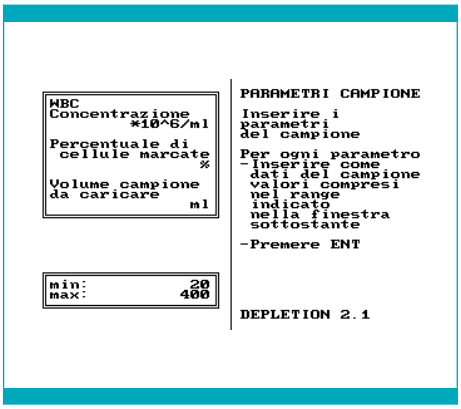
Inserimento dei parametri del campione

Se il controllo del materiale è andato a buon fine, il programma continua automaticamente con la richiesta dei parametri del campione necessari per aggiustare la separazione per ogni singolo campione e fornire all'operatore informazioni importanti sui volumi necessari di tampone e sacca.

La finestra indica la Schermata 7.20.

1. Iniziare inserendo la concentrazione di WBC del campione. L'intervallo consentito è indicato nella casella in basso a sinistra. Premere ◀ per correggere un inserimento errato.

   Confermare che il valore inserito corrisponda al valore del campione. In caso contrario, il processamento del campione potrebbe non essere ottimale.



Schermata 7.20: Inserimento dei parametri del campione

IMPORTANTE

Tutti i parametri del campione necessari fanno riferimento alla procedura post marcatura e lavaggio delle cellule del campione. L'intervallo consentito mostrato nel riquadro in basso a sinistra tiene sempre conto dell'inserimento precedente. Dopo ogni inserimento il software calcola e aggiusta l'intervallo accettato della prossima richiesta.

⚠ ATTENZIONE

L'indicazione di parametri errati può comportare un processamento non ottimale del campione e aumentare il rischio di perdita di cellule bersaglio. L'inserimento di valori per la concentrazione di WBC e/o la percentuale di cellule marcate inferiori ai valori effettivi del campione può causare una perdita di cellule dovuta al sovraccarico del sistema. L'inserimento di un volume di campione inferiore può comportare una perdita di cellule dovuta al sovraccarico o addirittura a un processamento incompleto del campione. Se la specifica di uno dei tre parametri è troppo alta, si otterranno un aumento del tempo di processamento e un volume maggiore della frazione cellulare bersaglio. Assicurarsi sempre di inserire i parametri corretti.

Per continuare con il prossimo inserimento, premere **ENT**.

2. Inserire la percentuale di cellule marcate. Confermare che il valore inserito corrisponda al valore del campione. In caso contrario, il processamento del campione potrebbe non essere ottimale (cfr. "Importante").

   Per continuare con il prossimo inserimento, premere **ENT**.

3. Inserire il volume finale del campione cellulare. Confermare che il valore inserito corrisponda al valore del campione. In caso contrario, il processamento del campione potrebbe non essere ottimale (cfr. "Importante").

Per continuare, premere **ENT**.

Calcolo

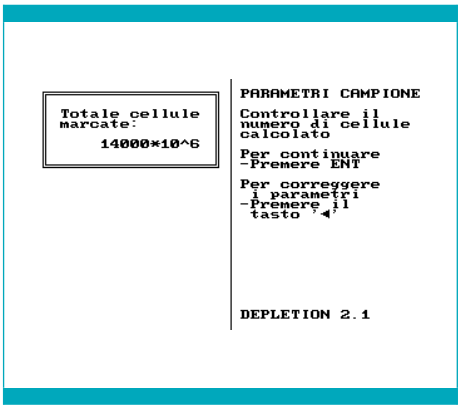
Il CliniMACS Plus Software calcola il numero totale di cellule marcate per controllare che la capacità di separazione sia sufficiente.

Il risultato viene visualizzato su una delle due possibili schermate:

- Il risultato del calcolo viene visualizzato su una schermata simile alla Schermata 7.21. Assicurarsi che il numero calcolato di cellule marcate sia corretto.

  Per continuare, premere **ENT**.

  È possibile correggere i dati. Premere ◄ per tornare alla schermata precedente per la correzione.

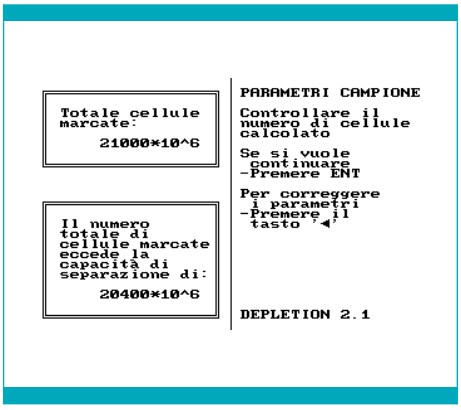


Schermata 7.21: Calcolo

- Se il numero calcolato di cellule marcate supera la capacità di separazione del CliniMACS Plus System, viene visualizzata una schermata simile alla Schermata 7.22. Assicurarsi che siano stati inseriti i parametri corretti del campione e che il numero di cellule calcolato sia corretto. Premere ◄ per tornare alla schermata precedente e correggere i parametri del campione.

  Per evitare di sovraccaricare il sistema, suddividere il campione e determinare il volume di ciascuna porzione. Premere ◄ per tornare alla Schermata 7.20 precedente. Inserire i parametri del campione per la prima aliquota del campione e continuare con la separazione di questa porzione. Al termine della separazione, avviare una seconda separazione con la seconda aliquota usando un nuovo set di tubi.

  Per continuare, premere **ENT**.



Schermata 7.22: Calcolo: Il numero di cellule supera la capacità di separazione

Informazioni sul volume

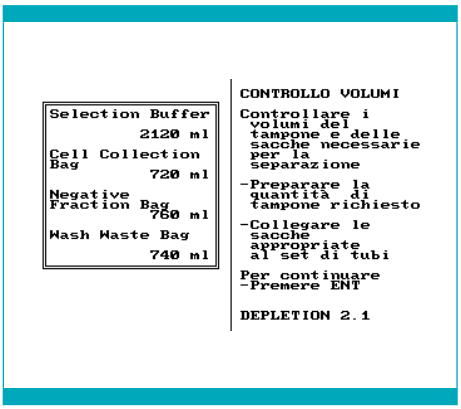
Dal numero totale di cellule marcate (cfr. "Calcolo") il software calcola il numero di fasi di separazione, la quantità di tampone necessaria per l'intera separazione e i volumi di liquido che verranno raccolti nella Negative Fraction Bag, nella Buffer Waste Bag e nella Cell Collection Bag.

I valori standard sono i seguenti:

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

- Cell Collection Bag 150 mL

Se uno dei valori calcolati supera questi valori standard, appare la Schermata 7.23 per informare sulla quantità di liquido che sarà necessaria e verrà accumulata durante il processo di separazione. Se è necessaria una sostituzione, sostituire le sacche fornite con il set di tubi (capacità di ca. 500 mL) con sacche alternative di dimensioni adeguate. Le sacche originariamente collegate al set di tubi sono collegate con connessioni Luer. Le sacche che sostituiscono le sacche originali devono avere un connettore Luer femmina. Le sacche standard possono essere collegate mediante un Luer/Spike Interconnector.



Schermata 7.23: Controllare i volumi

1. Verificare che sia disponibile la quantità di tampone richiesta. Non agganciare sacche contenenti più di tre litri di tampone all'appendi-sacca.

   AVVISO

   Rischio di danni allo strumento. Il sovraccarico degli appendi-sacche può danneggiare lo strumento. La capacità portante di un singolo appendi-sacca è di 3 kg. Non superare i limiti di carico degli appendi-sacche.

2. Aprire il vassoio del set di tubi in condizioni sterili e, se necessario, sostituire le sacche originali con altre più grandi. Assicurarsi che il passaggio del flusso verso queste sacche sia libero.

3. Collegare una Cell Collection Bag di dimensioni sufficienti al connettore Luer libero. Se non specificato nella Schermata 7.23, il volume massimo di eluizione della frazione di cellule bersaglio è 150 mL. Assicurarsi che il passaggio del flusso verso la Cell Collection Bag sia libero.

   IMPORTANTE

   - *Accertarsi che la quantità di tampone necessaria sia disponibile e che il volume delle sacche indicato nella Schermata 7.23 sia sufficiente. In caso contrario, si comprometteranno le prestazioni di separazione dello strumento.*
   - *Qualsiasi modifica dei Set di tubi CliniMACS deve essere eseguita in condizioni sterili, ad esempios sotto una cappa a flusso laminare.*
   - *Per ulteriori analisi o per il processamento delle cellule, tenere presente che i volumi elencati nella Schermata 7.23 non sono i volumi esatti ma i volumi che rientrano nei requisiti di sicurezza.*

4. Controllare i Luer Lock sulle colonne. I Luer Locks devono essere chiusi bene.

Per continuare, premere **ENT**.

Il programma continua automaticamente con le istruzioni per installare il set di tubi sullo strumento.

▶ **Continuare con la FASE 3.**

7.2.6 DEPLETION 3.1

IMPORTANTE

- *Il programma di separazione DEPLETION 3.1 deve essere usato solo con il CliniMACS Depletion Tubing Set (REF 261-01).*
- *Nella finestra di visualizzazione appariranno i messaggi a schermo e i diagrammi per guidare l'operatore nelle procedure. Effettuare e controllare ogni passaggio attenendosi alle istruzioni del manuale prima di procedere al passaggio successivo. Per correggere un errore durante l'inserimento dei dati, premere il pulsante "Undo" (cfr. la sezione "Descrizione" nel Manuale d'uso del CliniMACS Plus Instrument).*

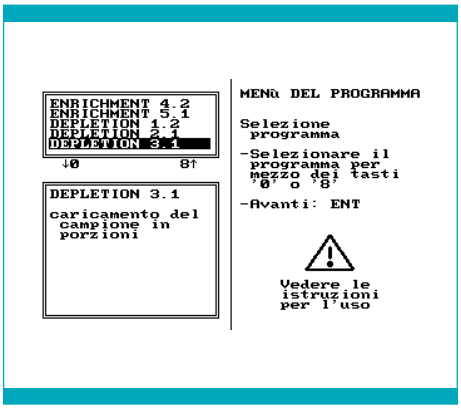
Scelta del programma di separazione DEPLETION 3.1

La finestra indica la Schermata 7.24.

Scegliere DEPLETION 3.1.

Per scegliere il programma di separazione, evidenziare il nome del programma con la barra nera. Muovere la barra su e giù usando i pulsanti **0** e **8**.

Per continuare con il programma evidenziato, premere **ENT**.



Schermata 7.24: Scelta del programma di separazione

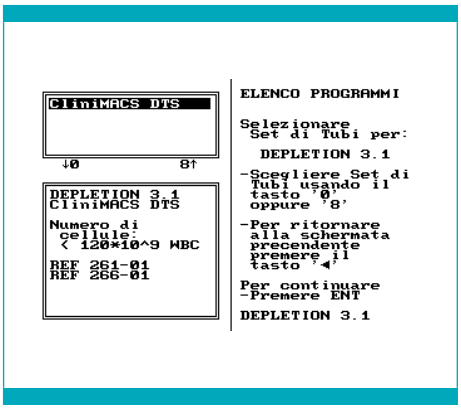
Selezione del set di tubi

La finestra indica la Schermata 7.25.

Verificare di aver scelto il programma corretto. In caso contrario, premere ◀ per ritornare al passo precedente e modificare la scelta.

Selezionare il set di tubi evidenziandolo nella casella in alto a sinistra con la barra nera. Muovere la barra su e giù usando i pulsanti **0** e **8**.

La finestra in basso indica i dati rilevanti come la capacità e il numero di catalogo del set di tubi selezionato.



Schermata 7.25: Selezione del set di tubi

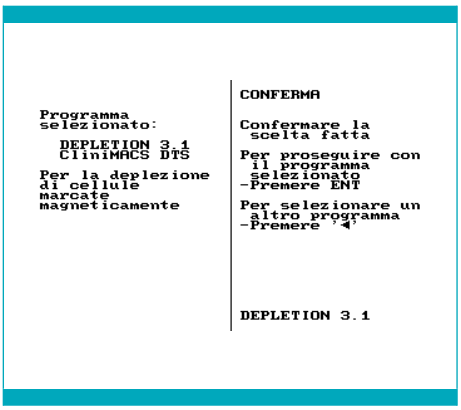
Per confermare la combinazione selezionata di programma di separazione e set di tubi, premere **ENT**.

Conferma

La finestra indica la Schermata 7.26.

Per confermare la combinazione di programma di separazione e set di tubi e continuare, premere **ENT**.

In caso contrario, premere ◄ per ritornare al passo precedente e modificare la scelta.



Schermata 7.26: Conferma

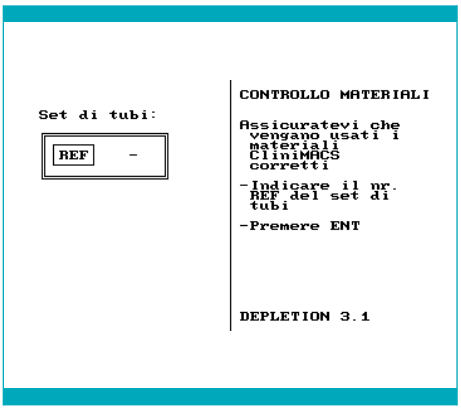
Controllo del materiale

La finestra indica la Schermata 7.27.

La richiesta del numero di catalogo (REF) del set di tubi serve da controllo di sicurezza per garantire che il set di tubi selezionato dall'operatore possa essere utilizzato.

Inserire il numero di catalogo del set di tubi selezionato e premere **ENT** per procedere.

Se è stato inserito un numero di catalogo non corrispondente, verrà visualizzato un messaggio.



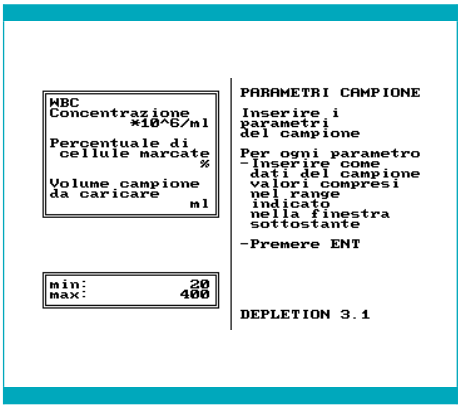
Schermata 7.27: Controllo del materiale

Per confermare, premere **ENT** e inserire il numero di catalogo corretto. Se il numero inserito è ancora sbagliato, il messaggio apparirà una seconda volta. Dopo aver premuto **RUN**, il programma tornerà automaticamente al menu dei programmi (cfr. Schermata 7.25).

Inserimento dei parametri del campione

Se il controllo del materiale è andato a buon fine, il programma continua automaticamente con la richiesta di alcuni parametri del campione necessari per aggiustare la separazione per ogni singolo campione e fornire all'operatore informazioni importanti sui volumi necessari di tampone e sacche.

La finestra indica la Schermata 7.28.



Schermata 7.28: Inserimento dei parametri del campione

1. Iniziare inserendo la concentrazione di WBC del campione. L'intervallo consentito è indicato nella casella in basso a sinistra. Premere ◄ per correggere un inserimento errato.

   Confermare che il valore inserito corrisponda al valore del campione. In caso contrario, il processamento del campione potrebbe non essere ottimale.

   IMPORTANTE
   Tutti i parametri del campione necessari fanno riferimento alla procedura post marcatura e lavaggio delle cellule del campione. L'intervallo consentito mostrato nel riquadro in basso a sinistra tiene sempre conto dell'inserimento precedente. Dopo ogni inserimento il software calcola e aggiusta l'intervallo accettato della prossima richiesta.

   ⚠ ATTENZIONE

   L'indicazione di parametri errati può comportare un processamento non ottimale del campione e aumentare il rischio di perdita di cellule bersaglio. L'inserimento di valori per la concentrazione di WBC e/o la percentuale di cellule marcate inferiori ai valori effettivi del campione può causare una perdita di cellule dovuta al sovraccarico del sistema. L'inserimento di un volume di campione inferiore può comportare una perdita di cellule dovuta al sovraccarico o addirittura a un processamento incompleto del campione. Se la specifica di uno dei tre parametri è troppo alta, si otterranno un aumento del tempo di processamento e un volume maggiore della frazione cellulare bersaglio. Assicurarsi sempre di inserire i parametri corretti.

   Per continuare con il prossimo inserimento, premere **ENT**.

2. Inserire la percentuale di cellule marcate. Confermare che il valore inserito corrisponda al valore del campione. In caso contrario, il processamento del campione potrebbe non essere ottimale (cfr. "Importante").

   Per continuare con il prossimo inserimento, premere **ENT**.

3. Inserire il volume finale del campione cellulare. Confermare che il valore inserito corrisponda al valore del campione. In caso contrario, il processamento del campione potrebbe non essere ottimale (cfr. "Importante").

Per continuare, premere **ENT**.

Calcolo

Il CliniMACS Plus Software calcola il numero totale di cellule marcate per controllare che la capacità di separazione sia sufficiente.

Il risultato viene visualizzato su una delle due possibili schermate:

- Il risultato del calcolo viene visualizzato su una schermata simile alla Schermata 7.29. Assicurarsi che il numero calcolato di cellule marcate sia corretto.

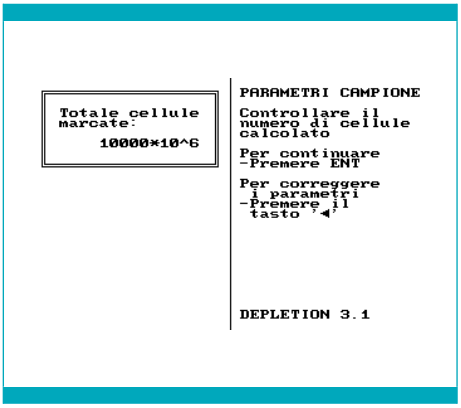
  Per continuare, premere **ENT**.

  È possibile correggere i dati. Premere ◄ per tornare alla schermata precedente per la correzione.

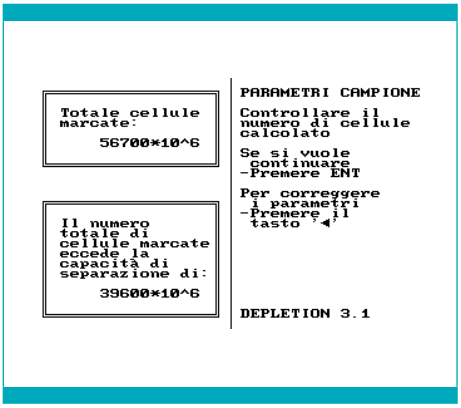
- Se il numero calcolato di cellule marcate supera la capacità di separazione del CliniMACS Plus System, viene visualizzata una schermata simile alla Schermata 7.30. Assicurarsi che siano stati inseriti i parametri corretti del campione e che il numero di cellule calcolato sia corretto. Premere ◄ per tornare alla schermata precedente e correggere i parametri del campione.

  Per evitare di sovraccaricare il sistema, suddividere il campione e determinare il volume di ciascuna porzione. Premere ◄ per tornare alla Schermata 7.28 precedente. Inserire i parametri del campione per la prima aliquota del campione e continuare con la separazione di questa porzione. Al termine della separazione, avviare una seconda separazione con la seconda aliquota usando un nuovo set di tubi.

  Per continuare, premere **ENT**.



Schermata 7.29: Selezione del set di tubi



Schermata 7.30: Calcolo: Il numero di cellule supera la capacità di separazione

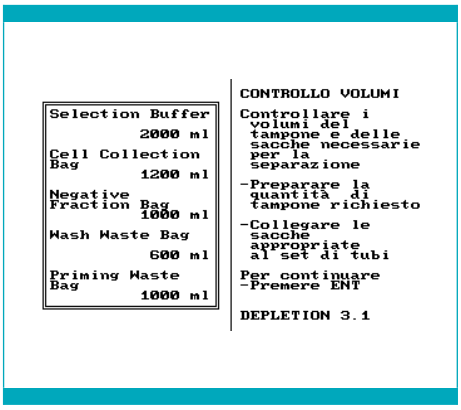
Informazioni sul volume

Dal numero totale di cellule marcate (cfr. sezione “Calcolo”) il software calcola il numero di fasi di separazione, la quantità di tampone necessaria per l’intera deplezione e i volumi di liquido che verranno raccolti nella Cell Collection Bag, nella Non-Target Cell Bag e nella Reapplication Bag.

IMPORTANTE

- *La Negative Fraction Bag corrisponde alla Non-Target Cell Bag.*
- *La Priming Waste Bag corrisponde alla Reapplication Bag.*

Se uno dei valori calcolati supera questi valori standard, verrà visualizzata una schermata simile alla Schermata 7.31 per informare sulla quantità di liquido che sarà necessaria e verrà accumulata durante il processo di separazione. Se è necessaria una sostituzione, sostituire le sacche fornite con il set di tubi con sacche alternative di dimensioni adeguate. Le sacche originariamente collegate al set di tubi sono collegate con connessioni Luer. Le sacche che sostituiscono le sacche originali devono avere un connettore Luer femmina. Le sacche standard possono essere collegate mediante un Luer/Spike Interconnector.



Schermata 7.31: Controllare i volumi

1. Verificare che sia disponibile la quantità di tampone richiesta. Non agganciare sacche contenenti più di tre litri di tampone all’appendi-sacca.

   AVVISO

   Rischio di danni allo strumento. Il sovraccarico degli appendi-sacche può danneggiare lo strumento. La capacità portante di un singolo appendi-sacca è di 3 kg. Non superare i limiti di carico degli appendi-sacche.

2. Aprire il vassoio del set di tubi in condizioni sterili e, se necessario, sostituire le sacche originali con altre più grandi. Assicurarsi che il passaggio del flusso verso queste sacche sia libero.

3. Se è necessaria una sostituzione, sostituire la Cell Collection Bag del set di tubi con una sacca di trasferimento di dimensioni sufficienti. Determinare il peso della Cell Collection Bag vuota e registrarlo. Assicurarsi che il passaggio del flusso verso la Cell Collection Bag sia libero. In alternativa, collegare una sacca di trasferimento aggiuntiva da 600 mL alla prima Cell Collection Bag, ad esempio utilizzando un set di trasferimento di plasma.

IMPORTANTE

- *Accertarsi che la quantità di tampone necessaria sia disponibile e che il volume delle sacche indicato nella Schermata 7.31 sia sufficiente. In caso contrario, si comprometteranno le prestazioni di separazione dello strumento.*
- *Qualsiasi modifica dei Set di tubi CliniMACS deve essere eseguita in condizioni sterili, ad es. nella cappa a flusso laminare.*
- *Per ulteriori analisi o per il processamento delle cellule, tenere presente che i volumi elencati nella Schermata 7.31 non sono i volumi esatti ma i volumi che rientrano nei requisiti di sicurezza.*

4. Controllare i Luer Lock sulle colonne. I Luer Locks devono essere chiusi bene.

Per continuare, premere **ENT**.

Il programma continua automaticamente con le istruzioni per installare il set di tubi sullo strumento.

▶ **Continuare con la FASE 3.**

7.3 FASE 3: Installazione del set di tubi CliniMACS

7.3.1 CliniMACS Tubing Set e CliniMACS Tubing Set LS

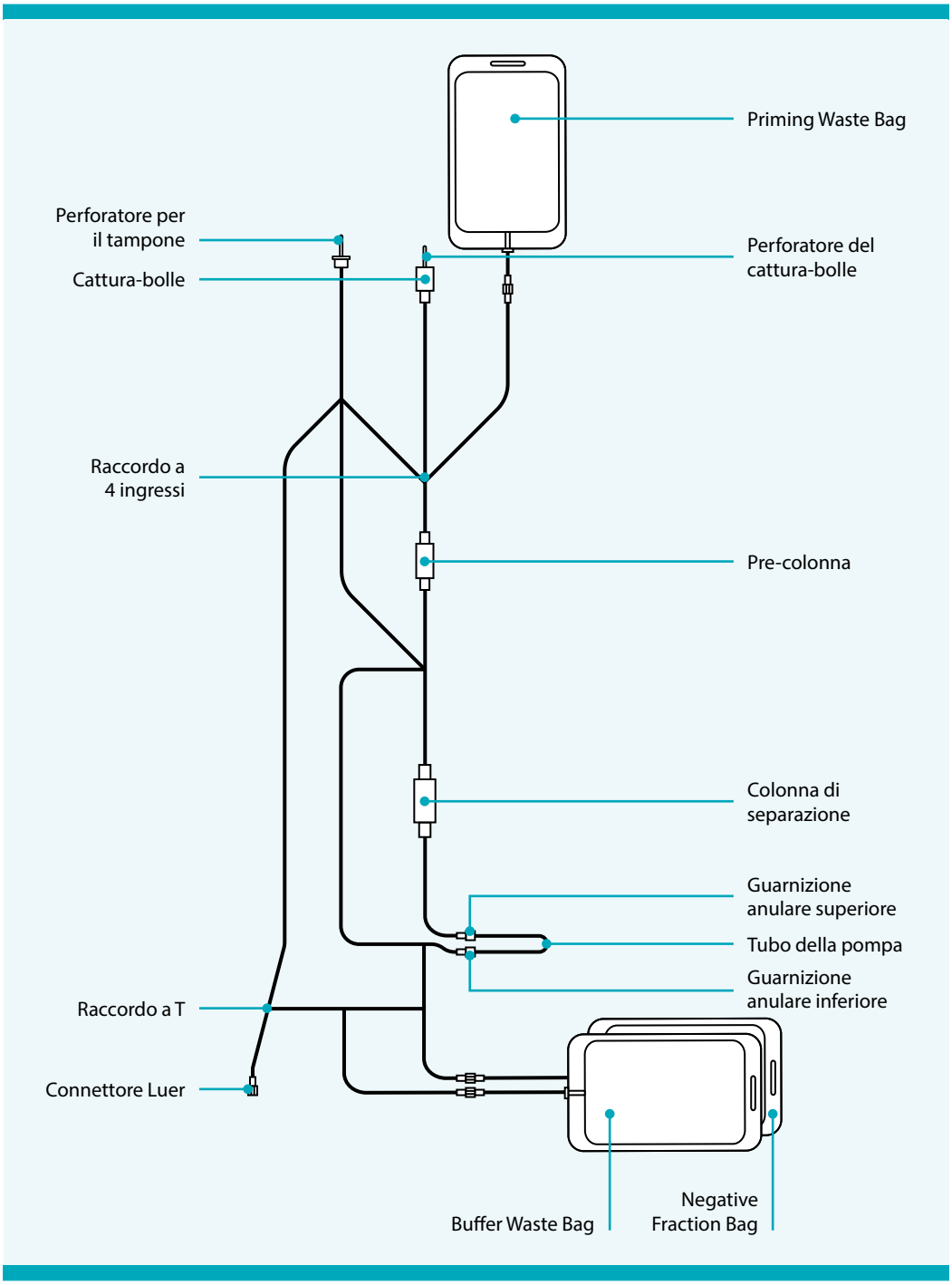
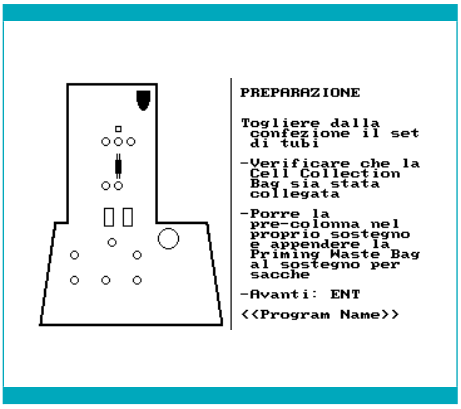


Figura 7.2: Struttura generale di un CliniMACS Tubing Set (ad es. CliniMACS Tubing Set)

Preparazione dell'installazione del set di tubi

La finestra indica la Schermata 7.32.



Schermata 7.32: Disimballare il set di tubi

Le istruzioni sono visualizzate sulla destra e il diagramma corrispondente alle istruzioni è sul lato sinistro dello schermo. Gli elementi lampeggianti sullo schermo indicano le aree di attenzione.

Il Set di tubi CliniMACS e il Set di tubi CliniMACS LS sono forniti in confezioni sterilizzate, sigillate. Ogni set di tubi contiene tubi e colonne preassemblati per una separazione cellulare (cfr. Figura 7.2). Se la confezione è intatta, il percorso del fluido è sterile.

⚠ AVVERTENZA

Rischio di contaminazione. Se la confezione è danneggiata, il set di tubi potrebbe non essere più sterile e perciò non deve essere usato. Controllare attentamente la confezione per la presenza di danni, fori o strappi. Usare il set di tubi solo se la confezione risulta intatta e sigillata.

Nota: il CliniMACS Plus Instrument mostra il nome del programma scelto, ad esempio CD34 SELECTION 1, nella riga inferiore dello schermo dello strumento. In qualsiasi fase dell'installazione del set di tubi, è possibile premere il pulsante "Undo" (cfr. la sezione "Descrizione" nel Manuale d'uso del CliniMACS Plus Instrument) per tornare al passo precedente.

1. Registrare il numero di lotto e la data di scadenza del set di tubi.

   Disimballare il set di tubi sterili in condizioni di sterilità (ad es., cappa a flusso laminare). Rimuovere il morsetto a pinza utilizzato per l'imballaggio del CliniMACS Tubing Set LS prima dell'uso del set di tubi. Il morsetto è dotato dell'etichetta "Rimuovere prima di assemblare il CliniMACS Plus Instrument".

2. Controllare i Luer Lock con le sacche. I Luer Locks devono essere chiusi bene.

Collegare la Cell Collection Bag

1. Prendere nota del peso della Cell Collection Bag vuota.
2. In ambiente asettico, rimuovere i tappi e collegare la Cell Collection Bag sterile con Luer/Spike Interconnector al set di tubi prima di caricare il set di tubi sul CliniMACS Plus Instrument. Assicurarsi che il tubo originale della Cell Collection Bag sia chiuso o sigillato.

   Se per una separazione è necessaria più di una Cell Collection Bag, collegare le sacche utilizzando un set di trasferimento di plasma. Assicurarsi che tutte le connessioni siano ben chiuse.
3. Assicurarsi che il passaggio del flusso verso la Cell Collection Bag sia libero.
4. Procedere con l'installazione del set di tubi seguendo la procedura descritta di seguito o l'"Installazione alternativa per i set di tubi CliniMACS".

Collegare la Priming Waste Bag e inserire la pre-colonna

La finestra indica la Schermata 7.32.

1. Agganciare la Priming Waste Bag all'appendi-sacca destro dello strumento (cfr. Figura 7.3).
2. Regolare l'altezza dell'appendi-sacca. Alzare o abbassare l'appendi-sacca per adattare l'altezza alle dimensioni della Priming Waste Bag. Accertarsi che la posizione sia sufficientemente alta per evitare che i tubi si pieghino eccessivamente limitando il flusso e sufficientemente bassa per evitare che i tubi o i collegamenti siano troppo tesi.
3. Mettere la pre-colonna nel supporto (cfr. Figura 7.3).

Per proseguire, premere **ENT**.

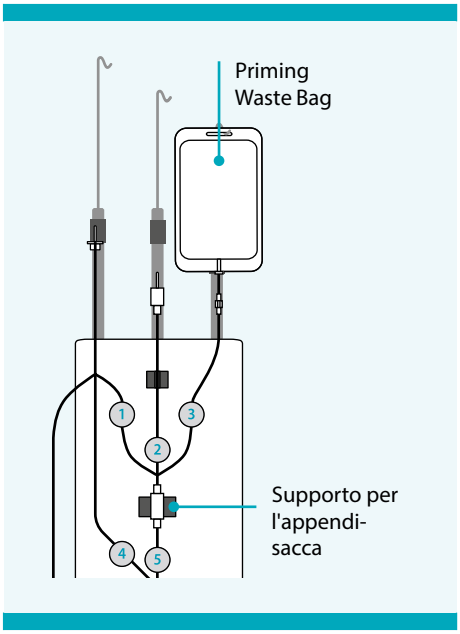


Figura 7.3: Collegare la Priming Waste Bag all'appendi-sacca

Inserire la colonna di separazione e caricare la valvola n. 5

La finestra indica la Schermata 7.33.

Le valvole visualizzate in nero sullo schermo si apriranno automaticamente per facilitare l'inserimento dei tubi.

1. Inserire la colonna di separazione nel suo supporto (cfr. Figura 7.4).

   ⚠ AVVERTENZA

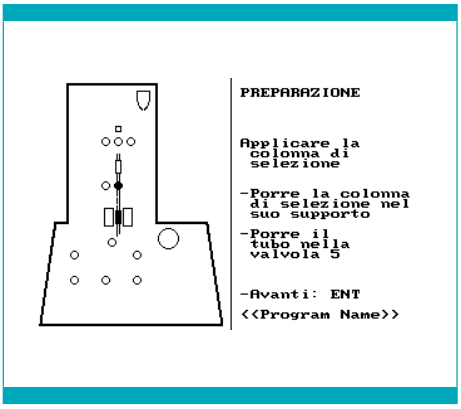
   Rischio di lesioni. Se la colonna di separazione viene inserita o rimossa mentre l'unità magnetica è accesa, sussiste il rischio di lesioni personali. Inserire o rimuovere la colonna di separazione solo quando l'unità magnetica è spenta.

2. Inserire il tubo nella valvola n. 5.

IMPORTANTE

- *Durante ogni fase, controllare che tutti i tubi e gli attacchi non presentino attorcigliamenti o piegature eccessive che potrebbero limitare il flusso del liquido attraverso i tubi. Controllare tutte le valvole per verificare che il tubo si inserisca perfettamente.*
- *Inserire il set di tubi solo in valvole aperte (quando il pulsante è spinto verso l'interno). Il tubo non si adatta correttamente se viene inserito in una valvola chiusa.*
- *Se il tubo deve essere regolato dopo la chiusura di una valvola, non tirare il tubo senza aver premuto il pulsante della valvola per aprirla (cfr. Figura 7.5).*

Per proseguire, premere **ENT**.



Schermata 7.33: Inserire la colonna di separazione e caricare la valvola n. 5

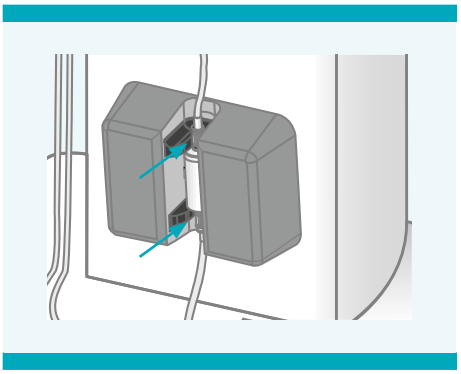


Figura 7.4: Colonna di separazione nel supporto della colonna di separazione

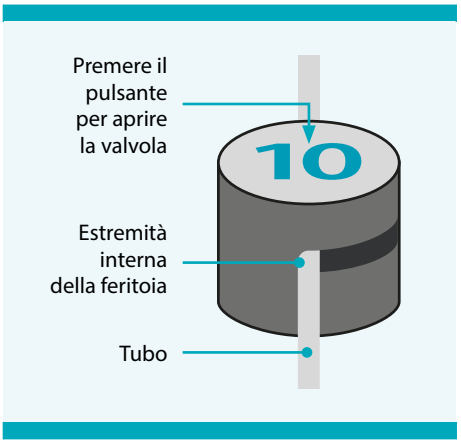


Figura 7.5: Tubi correttamente inseriti

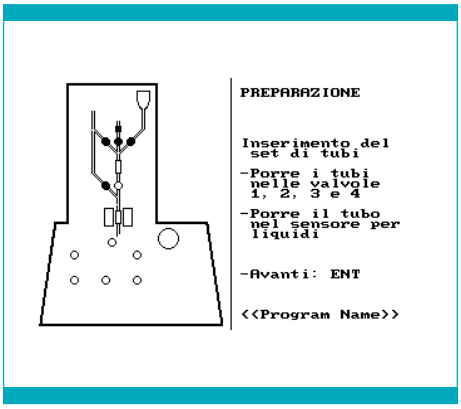
Caricare le valvole n. 1, 2, 3 e 4

La finestra indica la Schermata 7.34.

1. Inserire il tubo nella valvola n. 4. Verificare che il tubo sia inserito in sicurezza nell'apertura della valvola (cfr. Figura 7.5). Prestare particolare attenzione all'area tra le valvole n. 4 e 5 (cfr. Figura 7.6) e tenere il raccordo a 4 ingressi dritto.
2. Inserire il tubo nella valvola n. 1.
3. Posizionare il raccordo a 4 ingressi appena sotto la valvola n. 2. Prestare particolare attenzione all'area sotto la valvola n. 2.
4. Inserire il tubo nelle valvole n. 2 e 3.
5. Inserire il tubo tra la valvola n. 2 e il cattura-bolle nel sensore per i liquidi. Verificare che il tubo sia inserito correttamente nel raccordo del sensore.

   IMPORTANTE
   Per garantire il corretto funzionamento, sia il sensore per i liquidi che il tubo devono essere inseriti asciutti. Controllare attentamente entrambi. In presenza di liquidi, asciugare l'area con un panno morbido e privo di lanugine.

Per proseguire, premere **ENT**.



Schermata 7.34: Caricare le valvole n. 1, 2, 3, 4 e il sensore per i liquidi

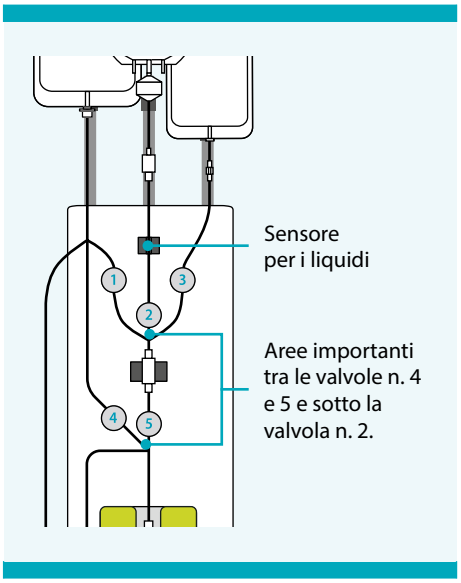
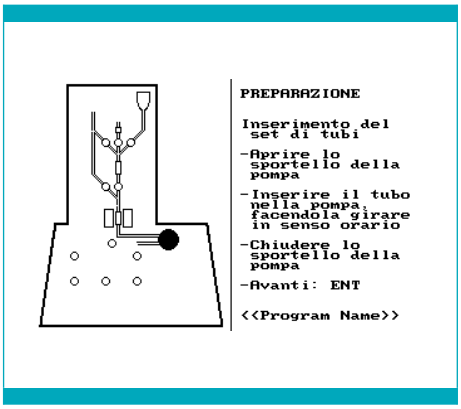


Figura 7.6: Tubi nelle valvole

Caricare il tubo della pompa

La finestra indica la Schermata 7.35.

1. Aprire la porta della pompa sollevando il bordo sinistro.
2. Inserire la guarnizione anulare superiore del tubo della pompa nella scanalatura dell'anello di ritenzione sull'alloggiamento della pompa (cfr. Figura 7.7).



Schermata 7.35: Caricare il tubo della pompa

3. Ruotare il rullo della pompa in senso orario finché il tubo non è infilato tra entrambe le serie di perni di guida del tubo e il tubo non si inserisce perfettamente nel rullo della pompa. Assicurarsi che il tubo non sia schiacciato all'estremità dei perni di guida. Se è necessario regolare il tubo all'interno della pompa, è possibile sganciarlo sollevando l'estremità inferiore e ruotando il rullo della pompa in senso antiorario.
4. Inserire la guarnizione anulare inferiore del tubo della pompa nella scanalatura dell'anello di ritenzione sull'alloggiamento della pompa.
5. Ruotare il rullo della pompa in senso orario e antiorario per assicurarsi che si muova liberamente.
6. Chiudere la porta della pompa.

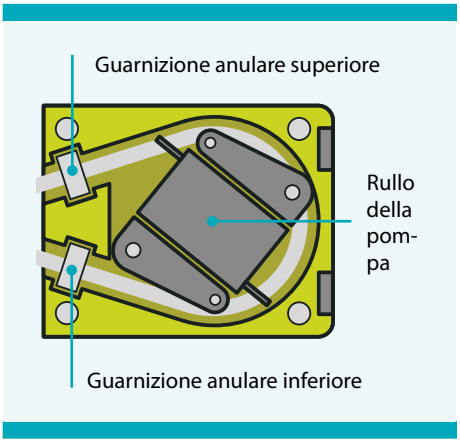


Figura 7.7: Caricare il tubo della pompa

IMPORTANTE
Durante il programma di separazione cellulare, la pompa interromperà immediatamente il ciclo ogni qualvolta si aprirà l'alloggiamento della pompa stessa. Se lasciato aperto per più di 600 secondi, lo strumento interromperà il ciclo in corso.

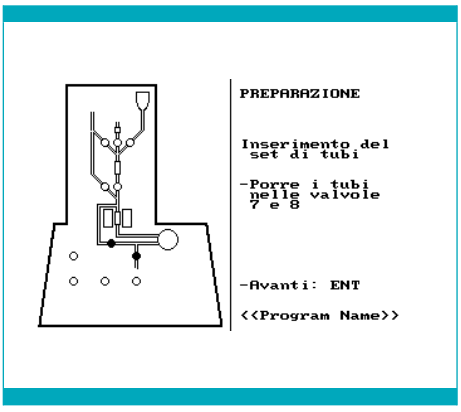
Per proseguire, premere **ENT**.

Caricare le valvole n. 7 e 8

La finestra indica la Schermata 7.36.

1. Inserire il tubo nella valvola n. 7.
2. Inserire il tubo nella valvola n. 8.

Per proseguire, premere **ENT**.



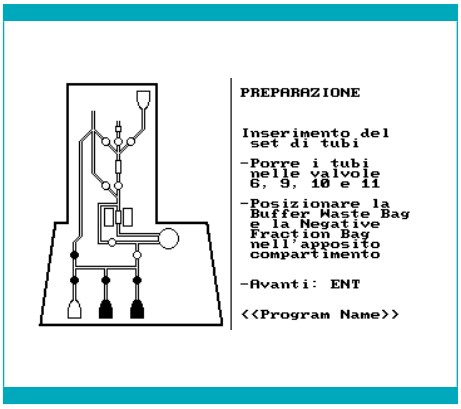
Schermata 7.36: Caricare le valvole n. 7 e 8

Caricare le valvole n. 6, 9, 10 e 11

La finestra indica la Schermata 7.37.

1. Inserire il tubo nelle valvole n. 6, 9, 10 e 11.
2. Mettere la Negative Fraction Bag e la Buffer Waste Bag nello scomparto per le sacche. Assicurarsi che il tubo non rimanga schiacciato sotto il coperchio dello scomparto per le sacche.

Per proseguire, premere **ENT**.



Schermata 7.37: Caricare le valvole n. 6, 9, 10 e 11

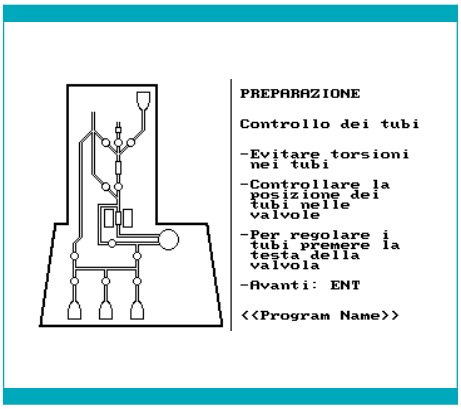
Ricontrollare tutti i tubi e i collegamenti

La finestra indica la Schermata 7.38.

Prima di iniziare la separazione cellulare, controllare di nuovo tutti i tubi e i collegamenti.

Nota: controllare tutte le valvole per verificare che il tubo sia correttamente inserito. Assicurarsi che i tubi siano distanziati in modo uniforme e che non ci siano attorcigliamenti o allungamenti nei tubi. Prestare particolare attenzione all'area della pre-colonna nonché all'area tra la pompa e le valvole n. 7 e 8 (cfr. Figura 7.8) e tra le valvole n. 4 e 5 (cfr. Figura 7.6). Se il tubo deve essere regolato dopo la chiusura di una valvola, non tirare il tubo senza aver premuto il pulsante della valvola per aprirla. Se un tubo è stato regolato, è assolutamente necessario premere saldamente le rispettive valvole due volte.

Per proseguire, premere **ENT**.



Schermata 7.38: Ricontrollare tutti i tubi e i collegamenti

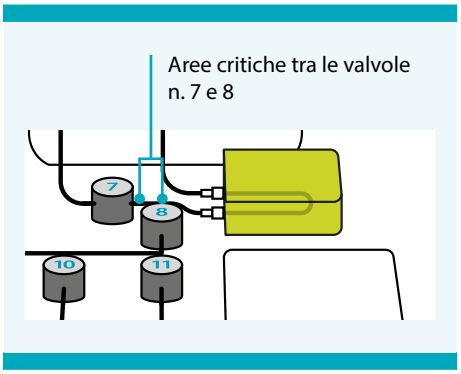


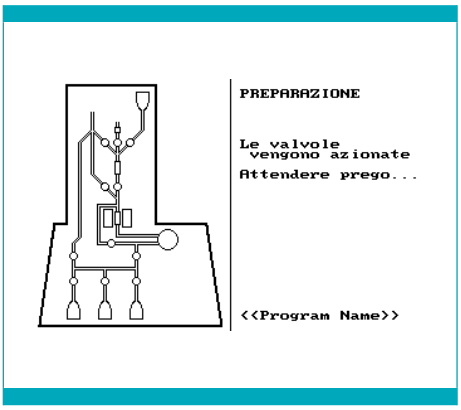
Figura 7.8: Tubi nelle valvole

Posizionamento delle valvole

La finestra indica la Schermata 7.39.

Per garantire il corretto inserimento dei tubi nelle valvole, lo strumento azionerà tutte le valvole in sequenza, per due volte. Osservare e ascoltare per verificare che tutte le valvole funzionino correttamente. Se una valvola non funziona correttamente, consultare il capitolo 8 “Risoluzione degli errori” a pagina 213. Questa fase può essere ripetuta premendo ◄ e poi **ENT** (cfr. la sezione “Descrizione” nel Manuale d’uso del CliniMACS Plus Instrument).

Durante questa sequenza di controllo viene testato anche il comando del magnete.

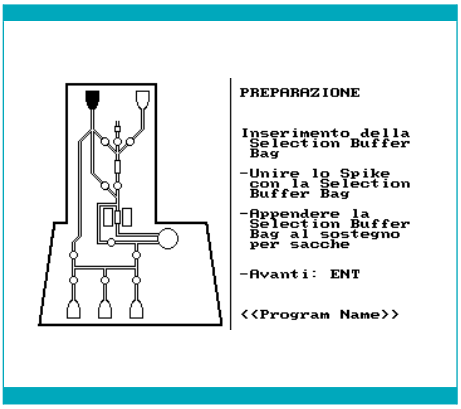


Schermata 7.39: Posizionamento delle valvole

Collegare CliniMACS PBS/EDTA Buffer

La finestra indica la Schermata 7.40.

Il tampone prescritto per le Separazioni CliniMACS Plus è CliniMACS PBS/EDTA Buffer integrato con HSA fino a una concentrazione finale dello 0,5% (p/v).



Schermata 7.40: Collegamento della sacca di tampone

1. Utilizzando tecniche asettiche, rimuovere il tappo dal perforatore per il tampone sul set di tubi (cfr. Figura 7.2 a pagina 157) e collegarlo alla sacca di tampone. Assicurarsi che il setto sia forato consentendo il libero passaggio del liquido. Comprimere delicatamente la sacca per verificare che il perforatore sia entrato nella sacca.

   Se per una separazione è necessario più di un litro di tampone, collegare le due sacche di tampone utilizzando un set di trasferimento di plasma.

2. Agganciare la sacca di tampone all'apposito gancio sull'appendi-sacca (cfr. Figura 7.9).

3. Regolare l'altezza dell'appendi-sacca per la sacca di tampone. Alzare o abbassare l'appendi-sacca per adattare l'altezza alle dimensioni della sacca di tampone. Accertarsi che la posizione sia sufficientemente alta per evitare che i tubi si pieghino eccessivamente limitando il flusso e sufficientemente bassa per evitare che i tubi o i collegamenti siano troppo tesi.

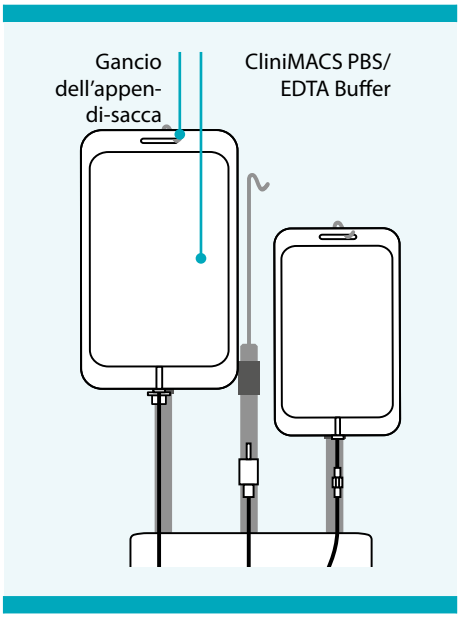


Figura 7.9: Collegamento della sacca di tampone

AVVISO

Rischio di danni allo strumento. Il sovraccarico degli appendi-sacche può danneggiare lo strumento. La capacità portante di un singolo appendi-sacca è di 3 kg. Non superare i limiti di carico degli appendi-sacche.

Per proseguire, premere **ENT**.

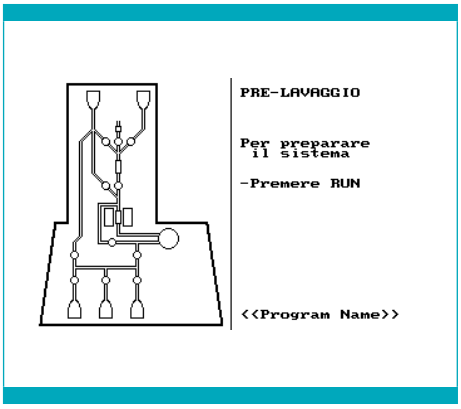
Avviare il priming

La finestra indica la Schermata 7.41.

Per avviare il priming, premere **RUN**.

La finestra indica la Schermata 7.42.

Durante la fase di priming il set di tubi viene riempito con tampone. Il tampone sarà fatto circolare attraverso il set di tubi, includendo sia la pre-colonna che la colonna di separazione. Gli scarti del priming vengono raccolti nella Priming Waste Bag e nella Buffer Waste Bag (cfr. Figura 7.2 a pagina 157). I cicli di priming continueranno ripetendo una serie di passi. La fase di priming richiederà circa 1 minuto. Lo stato del priming sarà aggiornato sul display.



Schermata 7.41: Avvio del priming

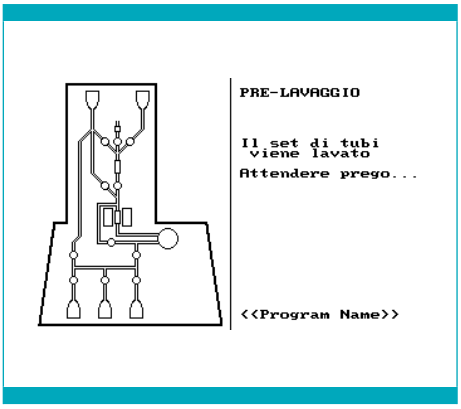
Controllo durante il priming

Durante la fase di priming, controllare tutti i tubi, i raccordi, le valvole e le colonne per verificare la presenza di eventuali perdite o pieghe che potrebbero bloccare il flusso dei liquidi.

Se si notano perdite o malfunzionamenti, premere **STOP** per arrestare il ciclo.

L'operatore avrà a disposizione 600 secondi per risolvere il problema.

Riprendere il processo premendo **RUN**.



Schermata 7.42: Priming in corso

Dopo 600 secondi la separazione sarà interrotta. Se l'operatore non riesce a risolvere il problema o se il set di tubi è difettoso, togliere il set di tubi e sostituirlo con uno nuovo.

Nota: una volta che il priming è stato avviato, non è possibile tornare alla procedura di configurazione dello strumento.

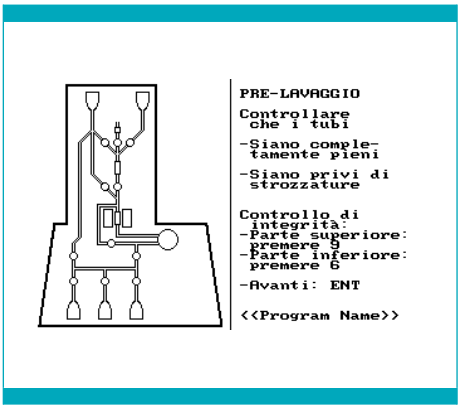
Controllo finale di tutti i tubi e collegamenti

La finestra indica la Schermata 7.43.

Prima di continuare il programma, controllare quanto segue:

- liquido in tutte le parti del set di tubi (eccetto il filtro di pre-sistema)
- assenza di aria in eccesso nel set di tubi
- liquido nella Priming Waste Bag e nella Buffer Waste Bag
- assenza di liquido nella Negative Fraction Bag o nella Cell Collection Bag

Non premere ancora ENT.



Schermata 7.43: Controllo finale dei tubi

Test di integrità

Per maggiore sicurezza, è necessario eseguire un test di integrità per verificare che il set di tubi non presenti perdite. La sequenza di test consiste in due sottosequenze automatizzate, che consentono di pressurizzare e osservare separatamente sia la parte superiore che quella inferiore del set di tubi.

Test di integrità per la parte superiore del set di tubi

1. Quando l'operatore esegue il "Controllo finale di tutti i tubi e collegamenti", la finestra indica la Schermata 7.43.
2. Dopo aver eseguito il "Controllo finale di tutti i tubi e collegamenti", proseguire con l'esecuzione del test di integrità. **Non** premere ENT.
3. Per eseguire il test di integrità per la parte superiore premere **9**.

   La finestra indica la Schermata 7.44.
4. Per avviare la sequenza del test, premere **RUN**.

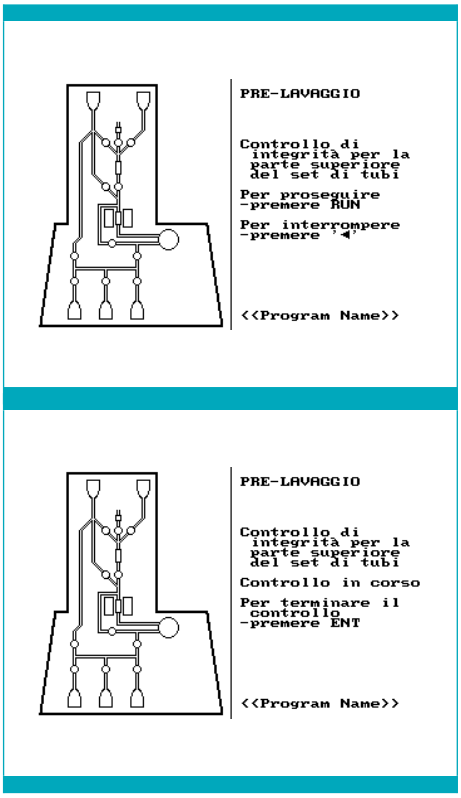
   Per tornare alla Schermata 7.43, premere ◄.
5. Una volta premuto il pulsante **RUN**, lo strumento avvierà la sequenza del test automatizzata per la parte superiore del test di tubi.

   La finestra indica la Schermata 7.45.

   Si genererà una sovrapressione che sarà mantenuta per due minuti. Durante questo lasso di tempo, l'operatore deve controllare tutte le connessioni al di sopra della connessione superiore del tubo della pompa.

   La sequenza del test può essere arrestata ad ogni punto premendo **ENT**.
6. Dopo due minuti la pressione viene automaticamente rilasciata e la finestra indica Schermata 7.43.

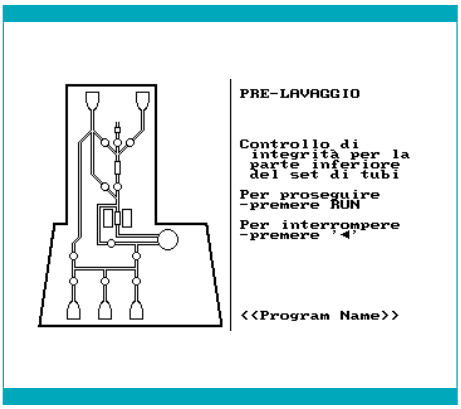
   Controllare se si sono verificate perdite durante la sequenza del test. Se si osservano perdite in qualsiasi connessione del set di tubi, il set di tubi deve essere rimosso e sostituito con uno nuovo. Contattare il Miltenyi Biotec Technical Support per indicazioni sulla restituzione del set di tubi difettoso.
7. Se non si osservano perdite, continuare con il test di integrità della parte inferiore del set di tubi.



Schermata 7.45: Test di integrità per la parte superiore in corso

Test di integrità per la parte inferiore del set di tubi

La finestra indica la Schermata 7.46.



Schermata 7.46: Avvio del test di integrità per la parte inferiore

1. Per avviare il test di integrità per la parte inferiore premere **6**.
   Non premere ENT.

   La finestra indica la Schermata 7.46.

2. Per avviare la sequenza del test, premere **RUN**.

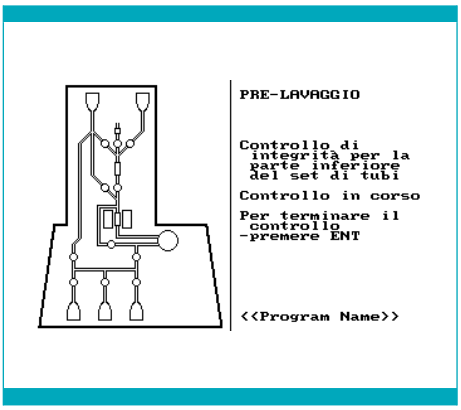
   Per tornare alla Schermata 7.43, premere ◄.

3. Una volta premuto il pulsante **RUN**, lo strumento avvierà la sequenza del test automatizzata per la parte inferiore del test di tubi.

   La finestra indica la Schermata 7.47.

   Si genererà una sovrapressione che sarà mantenuta per 30 secondi. Durante questo lasso di tempo, l'operatore deve controllare la connessione del tubo inferiore della pompa e i raccordi a T tra le valvole n. 6, 8, 9, 10 e 11.

   La sequenza di test può essere arrestata ad ogni punto premendo **ENT**.



Schermata 7.47: Test di integrità per la parte inferiore in corso

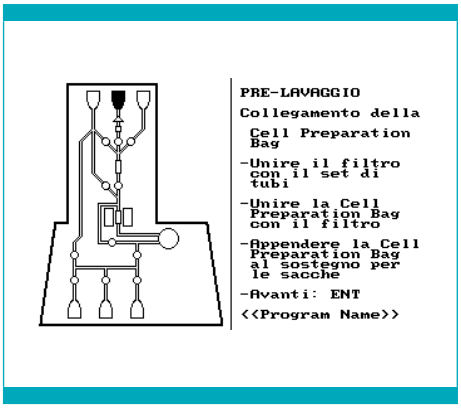
4. Dopo 30 secondi la pressione viene automaticamente rilasciata e la finestra indica Schermata 7.43.

   Controllare se si sono verificate perdite durante la sequenza del test. Se si osservano perdite in qualsiasi connessione del set di tubi, il set di tubi deve essere rimosso e sostituito con uno nuovo. Contattare il Miltenyi Biotec Technical Support per indicazioni sulla restituzione del set di tubi difettoso.

5. Se non ci sono perdite, l'operatore può continuare con il passo successivo premendo **ENT**.

Collegare la Cell Preparation Bag

La finestra indica la Schermata 7.48.



Schermata 7.48: Collegare la Cell Preparation Bag

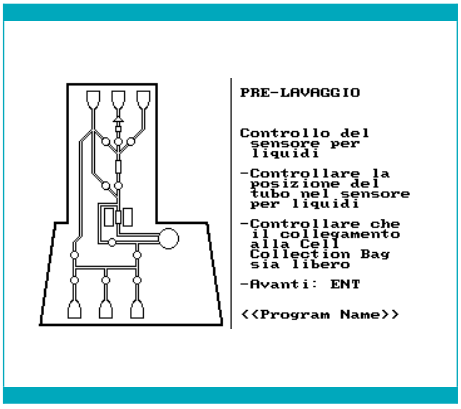
Collegare la Cell Preparation Bag contenente la preparazione cellulare già marcata:

1. Rimuovere il tappo dal perforatore del cattura-bolle del set di tubi (cfr. Figura 7.2).
2. Rimuovere il tappo dall'estremità smussata del filtro di pre-sistema (cfr. Figura 7.10). Inserire saldamente il perforatore nel filtro di pre-sistema.
3. Rimuovere il tappo dal perforatore del filtro di pre-sistema.
4. Introdurre il filtro di pre-sistema in una porta inutilizzata della Cell Preparation Bag assicurandosi che il setto sia forato e consenta il libero passaggio del liquido. Comprimere delicatamente la sacca per verificare che il perforatore sia entrato nella sacca.
5. Controllare attentamente la connessione tra il filtro di pre-sistema e il set di tubi per verificare che sia salda.
6. Appendere la Cell Preparation Bag al centro dell'appendi-sacca.
7. Regolare l'appendi-sacca per la Cell Preparation Bag in modo da tenere la sacca in posizione verticale.

Per proseguire, premere **ENT**.

Controllo finale del sensore per i liquidi

La finestra indica la Schermata 7.49.



Schermata 7.49: Controllo finale del sensore per i liquidi

1. Controllare il tubo del sensore per i liquidi. Assicurarsi che il tubo sia inserito correttamente, che sia privo di qualsiasi liquido esterno e che non sia stato spostato durante la procedura di caricamento.
2. Verificare che il passaggio del flusso verso la Cell Collection Bag sia libero (ad es. aprendo il morsetto sotto la valvola 9).

Per proseguire, premere **ENT**.

▶ **Continuare con la FASE 4.**

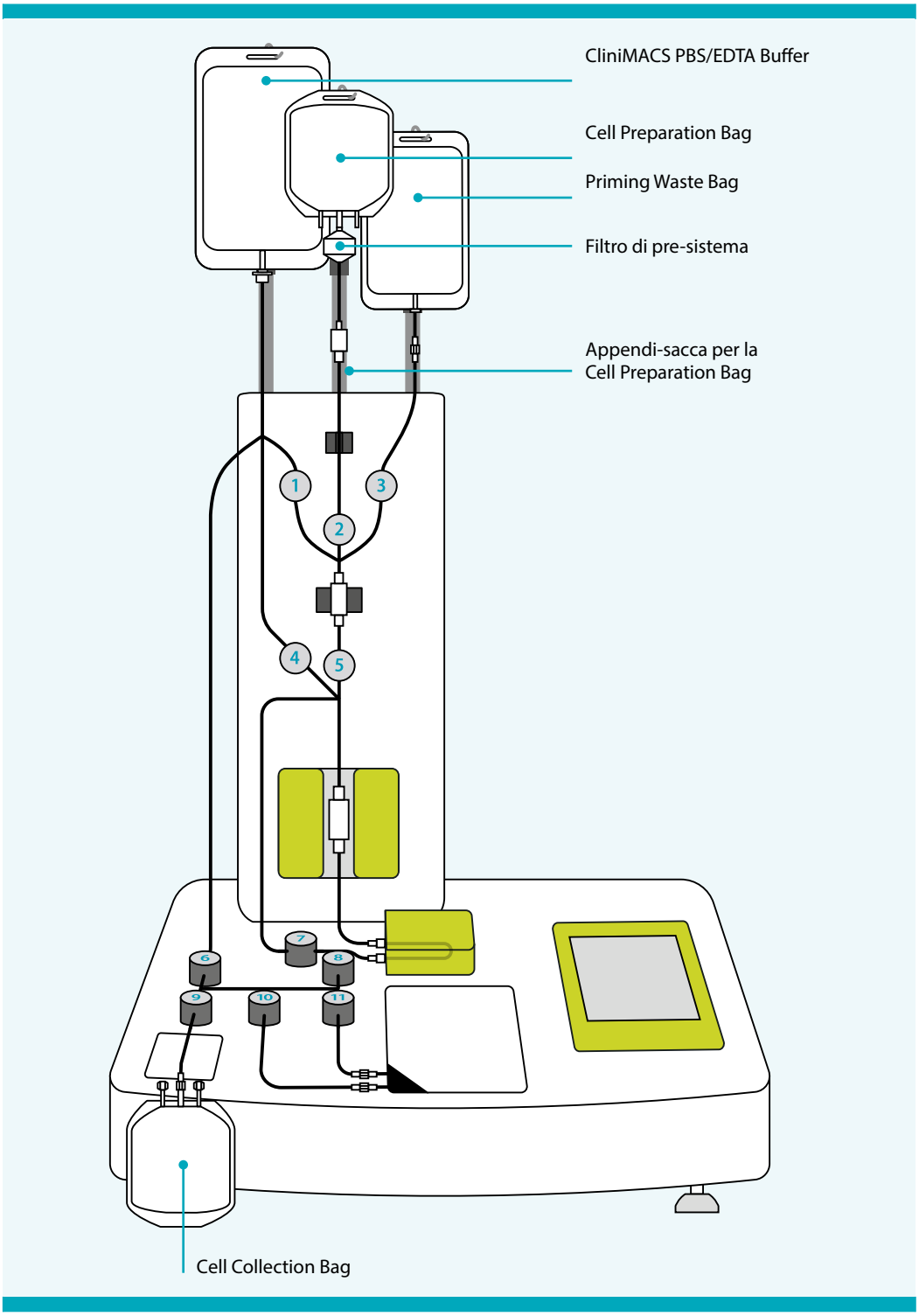


Figura 7.10: CliniMACS Plus Instrument con CliniMACS Tubing Set, CliniMACS PBS/EDTA Buffer, Cell Preparation Bag e Cell Collection Bag

7.3.2 Installazione alternativa del set di tubi CliniMACS

Le istruzioni della FASE 3 e le schermate visualizzate dal CliniMACS Plus Instrument descrivono l'installazione dei Set di tubi CliniMACS in condizioni di sterilità (camera bianca).

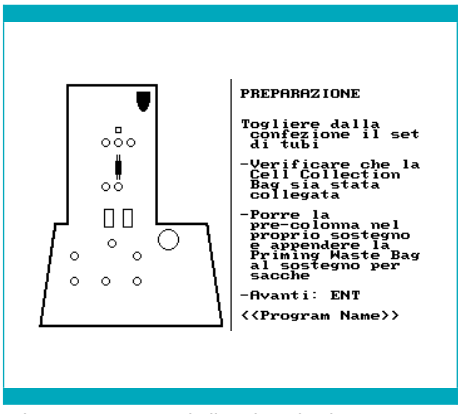
Il sistema CliniMACS Plus è un sistema chiuso che non deve necessariamente funzionare in una camera bianca. Tuttavia, se viene utilizzato al di fuori di una camera bianca, la procedura di installazione del set di tubi deve essere adattata per garantire la sterilità del processo di separazione cellulare.

La sterilità del processo di separazione cellulare può essere compromessa durante il collegamento della Cell Collection Bag, del CliniMACS PBS/EDTA Buffer, del filtro di pre-sistema e della Cell Preparation Bag. Per garantire che il sistema rimanga sterile, questi componenti devono essere collegati al set di tubi in condizioni di sterilità (ad es., cappa a flusso laminare). Se i componenti vengono collegati al set di tubi prima dell'installazione sul CliniMACS Plus Instrument, è necessario modificare l'ordine delle istruzioni fornite dallo strumento nonché le istruzioni della FASE 3 e intraprendere ulteriori azioni.

Quando si utilizza il CliniMACS Plus Instrument al di fuori di una camera bianca, seguire le seguenti istruzioni aggiuntive, modificando le istruzioni della FASE 3.

Preparazione dell'installazione del set di tubi

La finestra indica la Schermata 7.50.



Schermata 7.50: Disimballare il set di tubi

Come descritto, la Cell Collection Bag, il CliniMACS PBS/EDTA Buffer, il filtro di pre-sistema e la Cell Preparation Bag devono essere collegati al set di tubi prima che quest'ultimo venga montato sullo strumento in condizioni di sterilità.

Disimballare il set di tubi in condizioni di sterilità e, sempre in condizioni di sterilità, collegare i seguenti componenti:

- **Collegare la Cell Collection Bag**

  Cfr. pagina 159.

Collegamento del CliniMACS PBS/EDTA Buffer

IMPORTANTE

Prima di collegare il CliniMACS PBS/EDTA Buffer al set di tubi, bloccare il tubo sotto il perforatore per il tampone con una pinzetta per clampaggio per evitare che il tampone fluisca nel set di tubi prima dell'installazione (cfr. morsetto 1, Figura 7.11 a pagina 175).

Utilizzando tecniche asettiche, rimuovere il tappo dal perforatore per il tampone sul set di tubi e collegarlo alla sacca di tampone. Assicurarsi che il setto sia forato consentendo il libero passaggio del liquido. Comprimere delicatamente la sacca per assicurarsi che il perforatore sia entrato nella sacca.

Collegamento del filtro di pre-sistema

Rimuovere il tappo dal perforatore del cattura-bolle. Rimuovere il tappo dall'apertura inferiore del filtro di pre-sistema.

Inserire saldamente il perforatore nel filtro di pre-sistema. NON rimuovere il tappo superiore del filtro di pre-sistema. Chiudere il tubo appena sotto il cattura-bolle servendosi di una pinzetta per clampaggio (cfr. morsetto 2, Figura 7.11 a pagina 175). In questo modo si evita che la sospensione cellulare preparata nella Cell Preparation Bag penetri nel filtro di pre-sistema e nel set di tubi.

Collegamento della Cell Preparation Bag

Collegare la Cell Preparation Bag contenente la preparazione cellulare marcata magneticamente e le cellule lavate al set di tubi. Forare la Cell Preparation Bag con il filtro di pre-sistema assicurandosi che il setto sia forato e consenta il libero passaggio del liquido. Comprimere delicatamente la sacca per assicurarsi che il perforatore sia entrato nella sacca.

Installazione del CliniMACS Plus Instrument

Appendere la sacca di tampone all'appendi-sacca sinistro, la Cell Preparation Bag all'appendi-sacca centrale e la Priming Waste Bag all'appendi-sacca destro sullo strumento.

Per proseguire, premere **ENT**.

- **Collegare la Priming Waste Bag e inserire la pre-colonna**

  Cfr. pagina 159.

- **Inserire la colonna di separazione e caricare la valvola n. 5**

  Cfr. pagina 160.

- **Caricare le valvole n. 1, 2, 3 e 4**

  Cfr. pagina 161.

▶ Caricare il tubo della pompa

Cfr. pagina 161.

▶ Caricare le valvole n. 7 e 8

Cfr. pagina 162.

▶ Caricare le valvole n. 6, 9, 10 e 11

Cfr. pagina 163.

▶ Ricontrollare tutti i tubi e i collegamenti

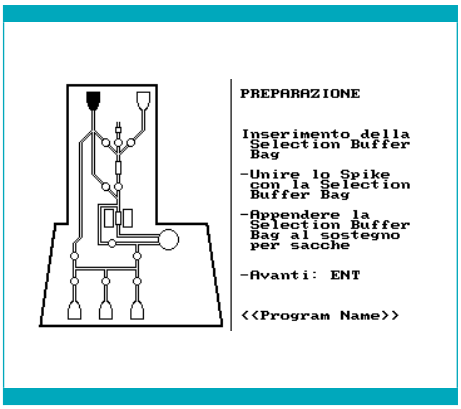
Cfr. pagina 163.

▶ Posizionamento delle valvole

Cfr. pagina 164.

Collegare il CliniMACS PBS/EDTA Buffer

La finestra indica la Schermata 7.51.



Schermata 7.51: Collegamento della sacca di tampone

1. La sacca di tampone è stata collegata durante la "Preparazione per l'installazione del set di tubi". Pertanto, potrebbe essere necessario regolare solo l'altezza del rispettivo appendi-sacca. Alzare o abbassare l'appendi-sacca per adattarlo alle dimensioni della sacca di tampone, assicurandosi che l'altezza sia sufficientemente alta per evitare che i tubi si pieghino in modo eccessivo limitando il flusso del liquido, e sufficientemente bassa per evitare di tendere eccessivamente i tubi o i collegamenti.
2. Rimuovere la pinzetta per clampaggio dal tubo appena sotto il perforatore per il tampone.

Per proseguire, premere **ENT**.

▶ Avviare il primingpriming

Cfr. pagina 165.

▶ ControlloControllo durante il primingpriming

Cfr. pagina 166.

▶ Controllo finale di tutti i tubi e collegamenti

Cfr. pagina 166.

▶ Test di integrità

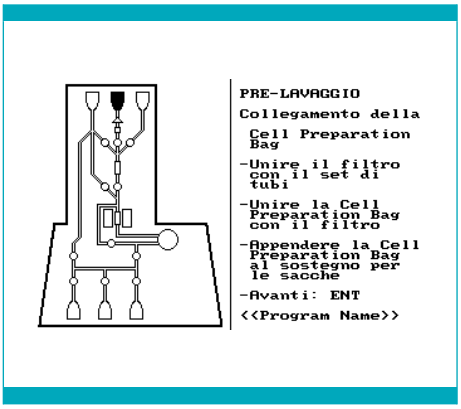
Cfr. pagina 167.

Collegare la Cell Preparation Bag (e filtro di pre-sistema)

La finestra indica la Schermata 7.52.

1. La Cell Preparation Bag e il filtro di pre-sistema sono stati collegati durante la “Preparazione per l’installazione del set di tubi”.
2. Rimuovere la pinzetta per clampaggio sotto il cattura-bolle.

Per proseguire, premere **ENT**.



Schermata 7.52: Collegare la Cell Preparation Bag

▶ Controllo finale del sensore per i liquidi

Cfr. pagina 169.

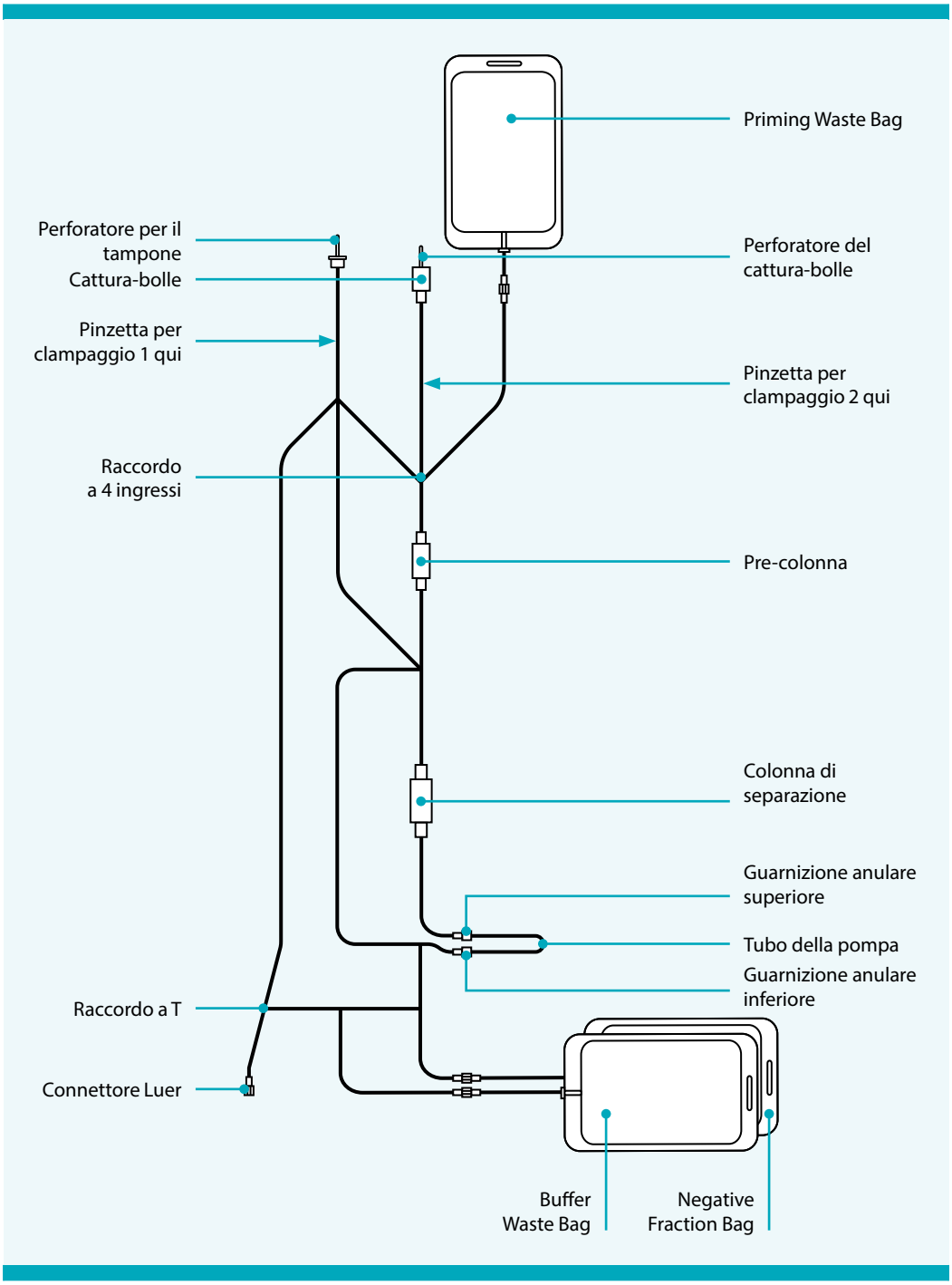


Figura 7.11: Struttura generale di un CliniMACS Tubing Set (ad es. CliniMACS Tubing Set) con posizioni di serraggio 1 e 2

7.3.3 CliniMACS Depletion Tubing Set

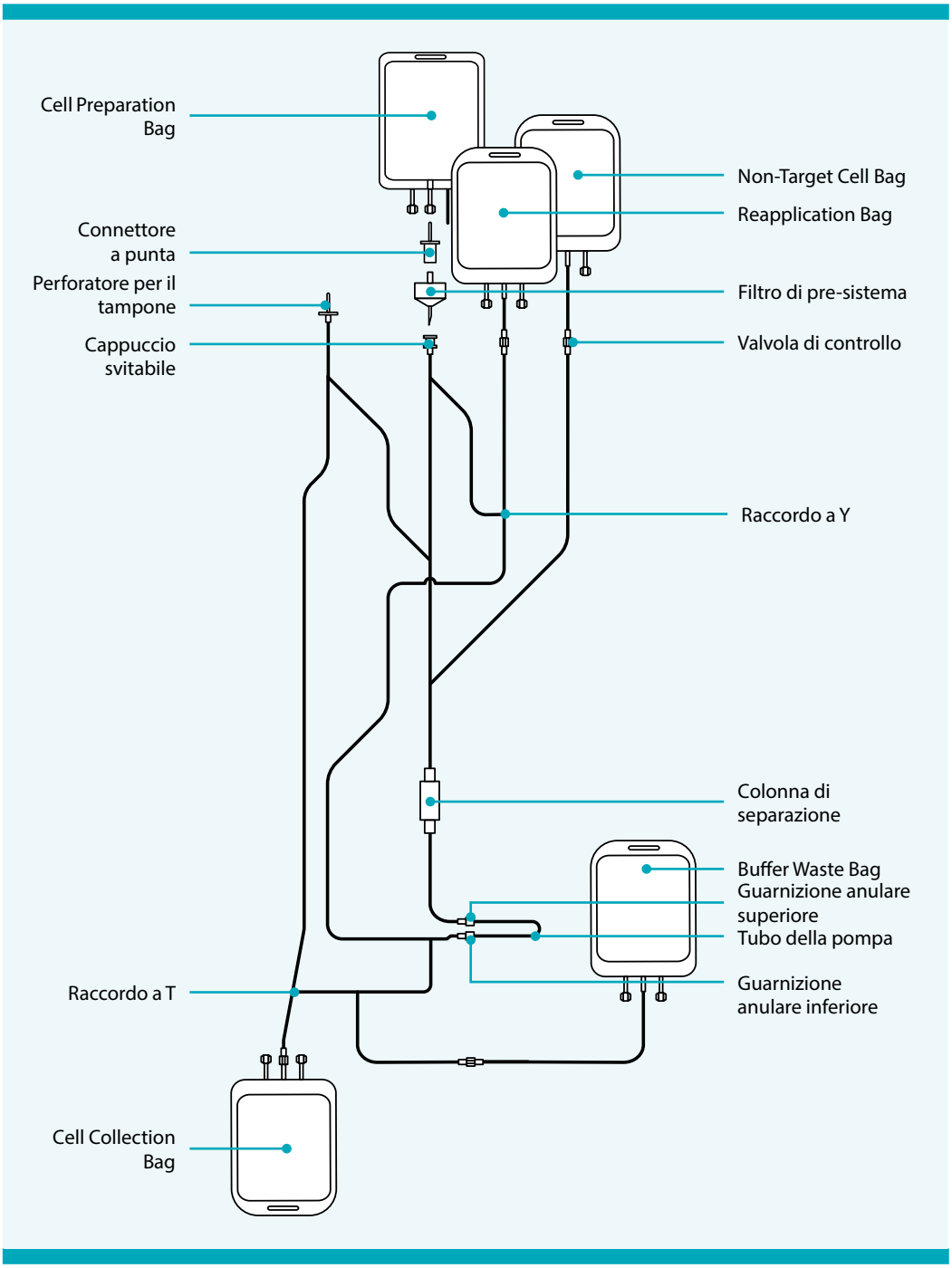


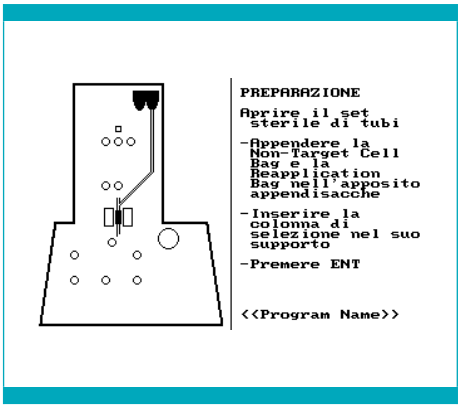
Figura 7.12: Struttura generale di un CliniMACS Depletion Tubing Set

Preparazione dell'installazione del set di tubi

La finestra indica la Schermata 7.53.

Le istruzioni sono sulla destra e il diagramma corrispondente alle istruzioni è sul lato sinistro. Gli elementi lampeggianti sullo schermo indicano le aree di attenzione.

Il CliniMACS Depletion Tubing Set è fornito in una confezione sterilizzata, sigillata. Ogni set di tubi contiene tubi preassemblati, colonna e sacche per una separazione cellulare (cfr. Figura 7.12). Se la confezione è intatta, il percorso del fluido è sterile.



Schermata 7.53: Disimballare il set di tubi

Nota: il CliniMACS Plus Instrument indica il nome del programma scelto, ad es. DEPLETION 3.1, nella riga inferiore. In qualsiasi fase dell'installazione del set di tubi, è possibile premere il pulsante "Undo" (cfr. la sezione "Descrizione" nel Manuale d'uso del CliniMACS Plus Instrument) per tornare al passo precedente.

1. Registrare il numero di lotto e la data di scadenza del set di tubi.

   Disimballare il set di tubi sterili in condizioni di sterilità (ad es., cappa a flusso laminare). Rimuovere il morsetto a pinza utilizzato per l'imballaggio prima di usare il set di tubi. Il morsetto è dotato dell'etichetta "Rimuovere prima di assemblare il CliniMACS Plus Instrument".

2. Controllare i Luer Lock con le sacche. I Luer Locks devono essere chiusi bene.

Cell Collection Bag

Il CliniMACS Depletion Tubing Set viene fornito con una Cell Collection Bag collegata. Prendere nota del peso della Cell Collection Bag vuota. Se per una separazione è necessaria più di una Cell Collection Bag, collegare le sacche utilizzando un set di trasferimento di plasma. Assicurarsi che tutte le connessioni siano ben chiuse. Prendere nota del peso della/e Cell Collection Bag vuota/e.

Collegare la Non-Target Cell Bag, la Reapplication Bag e inserire la colonna di separazione.

1. Agganciare la Non-Target Cell Bag e la Reapplication Bag all'appendi-sacca destro sullo strumento (cfr. Figura 7.13).
2. Regolare l'altezza degli appendi-sacche. Alzare o abbassare gli appendi-sacche per adattare l'altezza alle dimensioni della Non-Target Cell Bag e della Reapplication Bag. Accertarsi che la posizione sia sufficientemente alta per evitare che i tubi si pieghino eccessivamente limitando il flusso e sufficientemente bassa per evitare che i tubi o i collegamenti siano troppo tesi.

   AVVISO

   Rischio di danni allo strumento. Il sovraccarico degli appendi-sacche può danneggiare lo strumento. La capacità portante di un singolo appendi-sacca è di 3 kg. Non superare i limiti di carico degli appendi-sacche.
3. Inserire la colonna di separazione nel suo supporto (cfr. Figura 7.14).

   ⚠ AVVERTENZA

   Rischio di lesioni. Se la colonna di separazione viene inserita o rimossa mentre l'unità magnetica è accesa, sussiste il rischio di lesioni personali. Inserire o rimuovere la colonna di separazione solo quando l'unità magnetica è spenta.

Per proseguire, premere **ENT**.

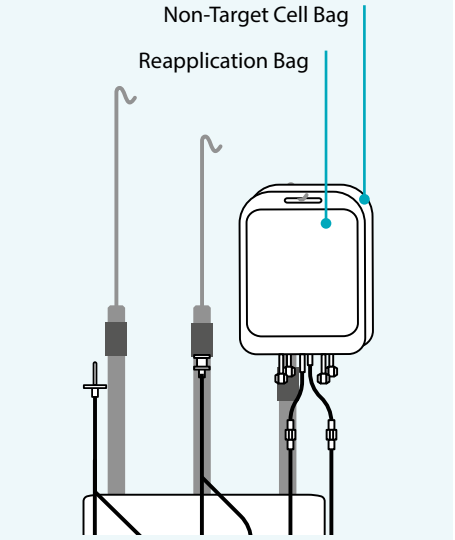


Figura 7.13: Collegare la Non-Target Cell Bag e la Reapplication Bag

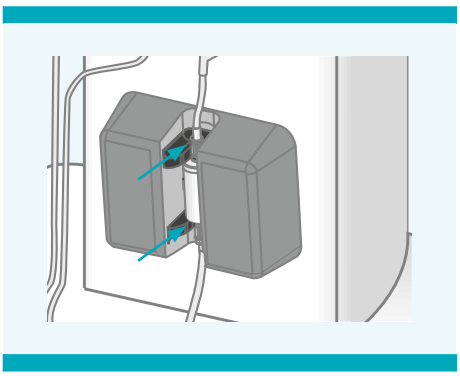


Figura 7.14: Colonna di separazione nel supporto della colonna di separazione

Caricare le valvole n. 1, 2, 3, 4 e 5

La finestra indica la Schermata 7.54.

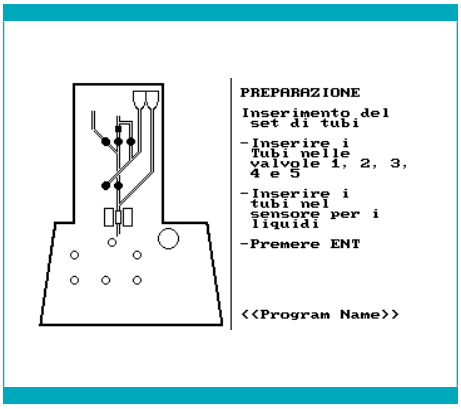
Le valvole visualizzate sullo schermo si apriranno automaticamente.

1. Inserire il tubo nelle valvole n. 1, 2, 3, 4 e 5.
2. Inserire il tubo sopra la valvola n. 2 nel sensore per i liquidi (cfr. Figura 7.15).

IMPORTANTE

- *Per garantire il corretto funzionamento, sia il sensore per i liquidi che il tubo devono essere inseriti asciutti. Controllare attentamente entrambi. In presenza di liquidi, asciugare l'area con un panno morbido e privo di lanugine.*
- *Durante ogni fase, controllare che tutti i tubi e gli attacchi non presentino attorcigliamenti o piegature eccessive che potrebbero limitare il flusso del liquido attraverso i tubi. Controllare tutte le valvole per verificare che il tubo si inserisca perfettamente.*
- *Inserire il set di tubi solo in valvole aperte (quando il pulsante è spinto verso l'interno). Il tubo non si adatta correttamente se viene inserito in una valvola chiusa.*
- *Se il tubo deve essere regolato dopo la chiusura di una valvola, non tirare il tubo senza aver premuto il pulsante della valvola per aprirla (cfr. Figura 7.16)*

Per proseguire, premere **ENT**.



Schermata 7.54: Caricare le valvole n. 1, 2, 3, 4 e 5

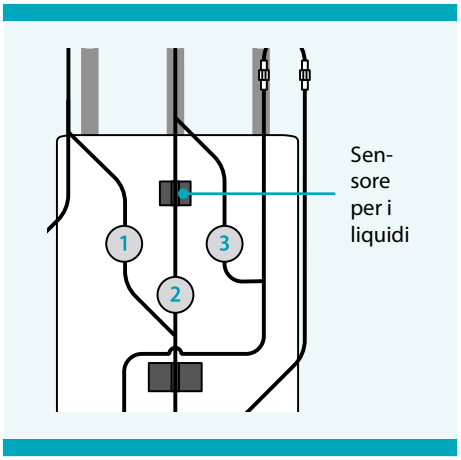


Figura 7.15: Tubi nelle valvole

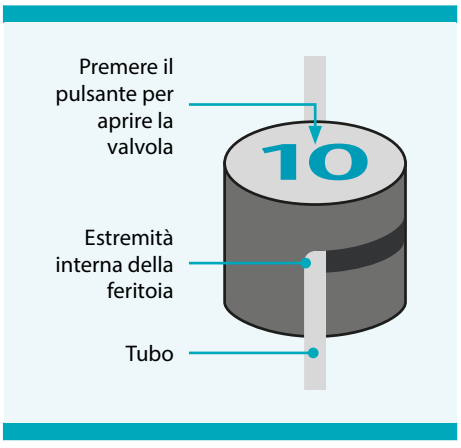
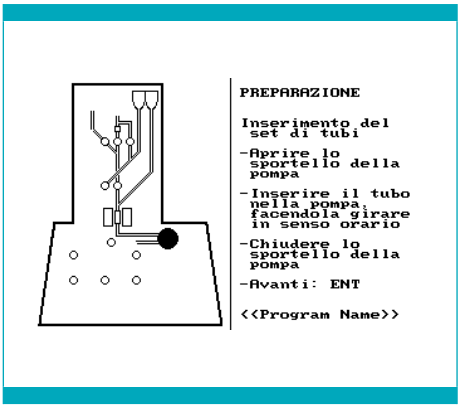


Figura 7.16: Tubi correttamente inseriti

Caricare il tubo della pompa

La finestra indica la Schermata 7.55.



Schermata 7.55: Caricare il tubo della pompa

1. Aprire la porta della pompa sollevando il bordo sinistro.
2. Inserire la guarnizione anulare superiore del tubo della pompa nella scanalatura dell'anello di ritenzione sull'alloggiamento della pompa (cfr. Figura 7.17).
3. Ruotare il rullo della pompa in senso orario finché il tubo non è infilato tra entrambe le serie di perni di guida del tubo e il tubo non si inserisce perfettamente nel rullo della pompa. Assicurarsi che il tubo non sia schiacciato all'estremità dei perni di guida. (Se è necessario regolare il tubo all'interno della pompa, è possibile sganciarlo sollevando l'estremità inferiore e ruotando il rullo della pompa in senso antiorario.)
4. Inserire la guarnizione anulare inferiore del tubo della pompa nella scanalatura dell'anello di ritenzione sull'alloggiamento della pompa.
5. Ripetere la rotazione del rullo della pompa in senso orario per accertarsi che il rullo della pompa si muova liberamente.
6. Chiudere la porta della pompa.

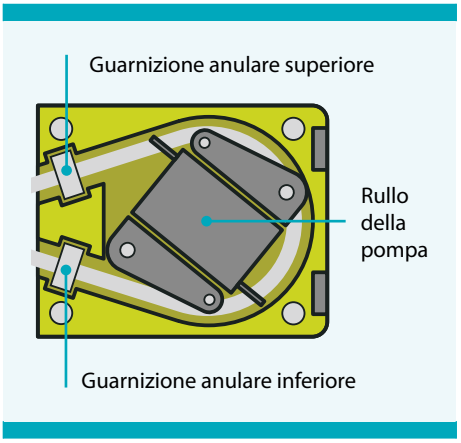


Figura 7.17: Caricare il tubo della pompa

IMPORTANTE

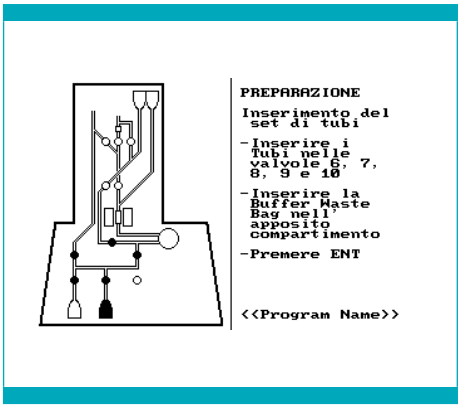
Durante il programma di separazione cellulare, la pompa interromperà immediatamente il ciclo ogni qualvolta si aprirà l'alloggiamento della pompa stessa. Se lasciato aperto per più di 600 secondi, lo strumento interromperà il ciclo in corso.

Per proseguire, premere **ENT**.

Caricare le valvole n. 6, 7, 8, 9 e 10

La finestra indica la Schermata 7.56.

1. Inserire il tubo nelle valvole n. 6, 7, 8, 9 e 10. Verificare che il tubo sia inserito in sicurezza nell'apertura delle valvole.
2. Mettere la Buffer Waste Bag nello scomparto per le sacche. Assicurarsi che il tubo non rimanga schiacciato sotto il coperchio dello scomparto per le sacche.
3. Assicurarsi che il passaggio del flusso verso la Cell Collection Bag sia libero.



Schermata 7.56: Caricare le valvole n. 6, 7, 8, 9 e 10

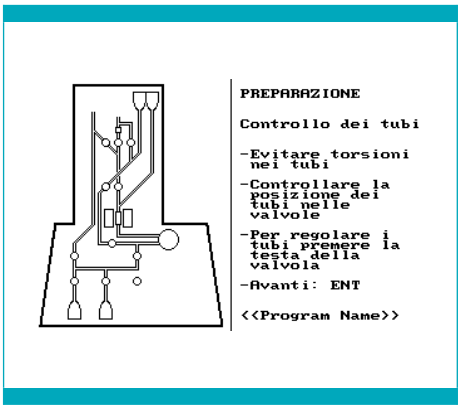
Per proseguire, premere **ENT**.

Ricontrollare tutti i tubi e i collegamenti

La finestra indica la Schermata 7.57.

1. Iniziando dalla valvola n. 1, verificare che il tubo sia adeguatamente inserito e posizionato correttamente in ogni valvola.

   Esaminare nuovamente il tubo in ogni valvola. Assicurarsi che il tubo entri ed esca da ciascuna valvola attraverso l'allargamento sull'estremità interna della feritoia (cfr. Figura 7.16).
2. Controllare che il tubo non sia piegato o attorcigliato.



Schermata 7.57: Ricontrollare tutti i tubi e i collegamenti

Nota: se il tubo deve essere regolato dopo la chiusura di una valvola, non tirare il tubo senza aver premuto il pulsante della valvola per aprirla.

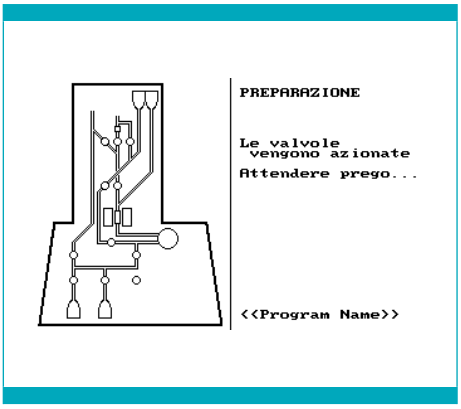
Per proseguire, premere **ENT**.

Posizionamento delle valvole

La finestra indica la Schermata 7.58.

Per garantire il corretto inserimento dei tubi nelle valvole, lo strumento azionerà tutte le valvole in sequenza per due volte. Osservare e ascoltare per verificare che tutte le valvole funzionino correttamente. Se una valvola non funziona correttamente, consultare il capitolo 8 “Risoluzione degli errori” a pagina 213. Questa fase può essere ripetuta premendo ◄ e poi **ENT** (cfr. la sezione “Descrizione” nel Manuale d’uso del CliniMACS Plus Instrument).

Durante questa sequenza di controllo viene testato anche il comando del magnete.



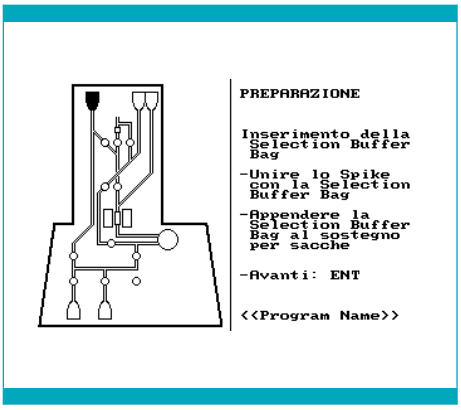
Schermata 7.58: Posizionamento delle valvole

Collegare CliniMACS PBS/EDTA Buffer

La finestra indica la Schermata 7.59.

Il tampone prescritto per le Separazioni CliniMACS Plus è CliniMACS PBS/EDTA Buffer integrato con HSA fino a una concentrazione finale dello 0,5% (p/v).

1. Utilizzando tecniche asettiche, rimuovere il tappo dal perforatore per il tampone (cfr. Figura 7.12 a pagina 176) sul set di tubi e collegarlo alla sacca di tampone. Assicurarsi che il setto sia forato consentendo il libero passaggio del liquido. Comprimere delicatamente la sacca per assicurarsi che il perforatore sia entrato nella sacca senza perdite esterne.
2. Agganciare la sacca di tampone all’apposito gancio sull’appendi-sacca (cfr. Figura 7.18).
3. Regolare l’altezza dell’appendi-sacca per la sacca di tampone. Alzare o abbassare l’appendi-sacca per adattare l’altezza alle dimensioni della sacca di tampone. Accertarsi che la posizione sia sufficientemente alta per evitare che i tubi si pieghino eccessivamente limitando il flusso e sufficientemente bassa per evitare che i tubi o i collegamenti siano troppo tesi.



Schermata 7.59: Collegamento della sacca di tampone

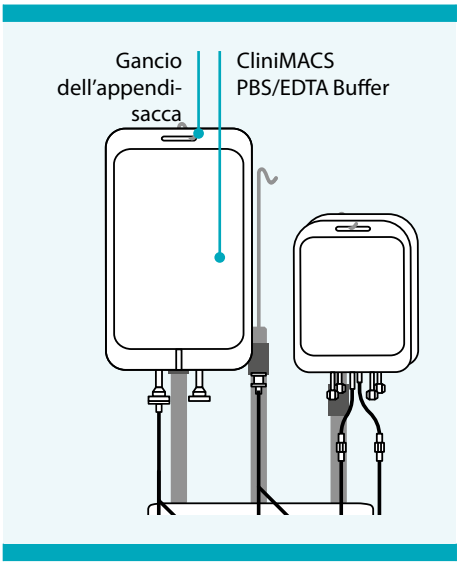


Figura 7.18: Collegamento della sacca di tampone

IMPORTANTE

A causa di diverse fasi gravimetriche di priming e risciacquo, è essenziale che la sacca di tampone sia posizionata il più in alto possibile, assicurandosi che si trovi a un'altezza superiore a quella della Reapplication Bag e della Non-Target Cell Bag (cfr. Figura 7.20 a pagina 187).

Per proseguire, premere **ENT**.

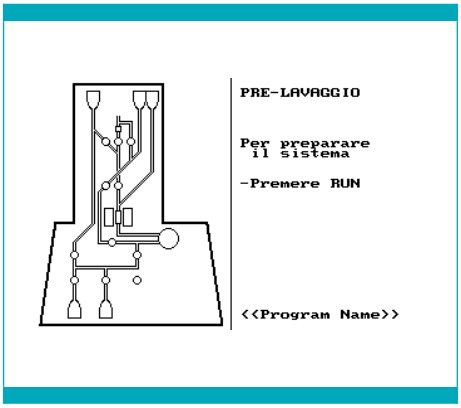
Avvio del priming

La finestra indica la Schermata 7.60.

Per avviare il priming, premere **RUN**.

La finestra indica la Schermata 7.61.

Durante la fase di priming il set di tubi viene riempito con CliniMACS PBS/EDTA Buffer. Il tampone sarà fatto circolare attraverso il set di tubi, includendo la colonna di separazione. Il liquido di priming viene raccolto nella Buffer Waste Bag, nella Reapplication Bag e nella Non-Target Cell Bag, mentre la Cell Collection Bag rimane vuota (cfr. Figura 7.12 a pagina 176). I cicli di priming continueranno ripetendo una serie di passi.



Schermata 7.60: Avvio del priming

La fase di priming dura ca. 2,5 minuti. Lo stato del priming sarà aggiornato sul display.

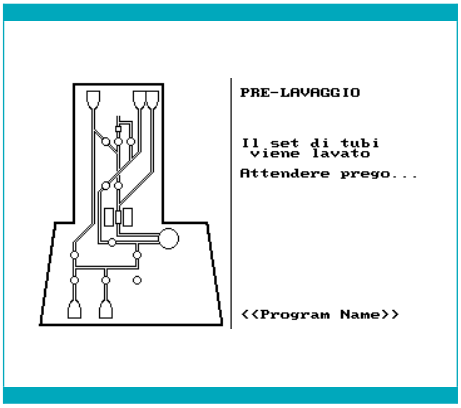
Controlli da eseguire durante il priming

Durante la fase di priming, controllare tutti i tubi, i raccordi, le valvole e la colonna di separazione per eventuali perdite o pieghe che potrebbero bloccare il flusso dei liquidi.

Se si notano perdite o malfunzionamenti, premere **STOP** per arrestare il ciclo.

L'operatore avrà a disposizione 600 secondi per risolvere il problema.

Riprendere il processo premendo **RUN**.



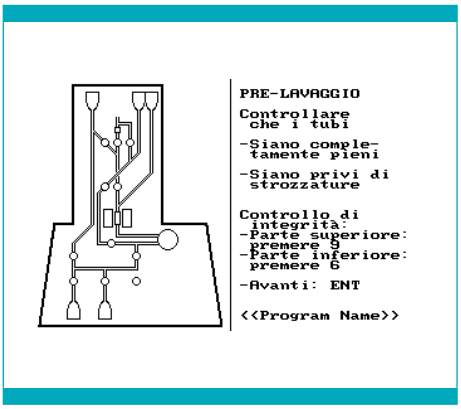
Schermata 7.61: Priming in corso

Dopo 600 secondi la separazione sarà interrotta. Se l'operatore non riesce a risolvere il problema o se il set di tubi è difettoso, togliere il set di tubi e sostituirlo con uno nuovo.

Nota: una volta che il priming è stato avviato, non è possibile tornare alla procedura di configurazione dello strumento.

Controllo finale di tutti i tubi e i collegamenti

La finestra indica la Schermata 7.62.



Schermata 7.62: Controllo finale di tutti i tubi e collegamenti

Prima di iniziare il ciclo, controllare quanto segue:

- liquido in tutte le parti del set di tubi eccetto il tubo sopra le valvole n. 2 e 3
- assenza di aria in eccesso nel set di tubi
- liquido nella Reapplication Bag, nella Buffer Waste Bag e nella Non-Target Cell Bag
- assenza di liquido nella Cell Collection Bag

Non premere ancora **ENT**.

Test di integrità

Per maggiore sicurezza, è necessario eseguire un test di integrità per verificare che il set di tubi non presenti perdite. La sequenza del test consiste in due sequenze automatizzate, che consentono di sovrapressurizzare e testare separatamente sia la parte superiore che quella inferiore del set di tubi.

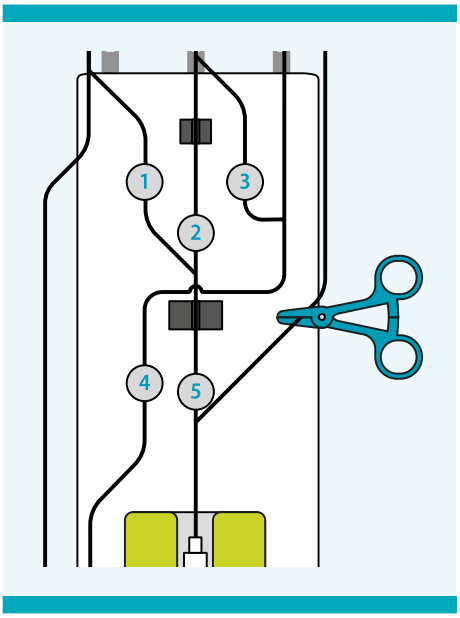


Figura 7.19: Allestimento per il test di integrità

⚠ ATTENZIONE

Rischio di ritardo del processo. Se al completamento del test di integrità la pinzetta per clampaggio sotto la Non-Target Cell Bag non è stato rimosso, potrebbe non essere possibile rimuovere le cellule non-bersaglio (marcate) dalla colonna di separazione durante l'eluizione. A quel punto un'ulteriore ritenzione delle cellule non-bersaglio risulta impossibile. La procedura di separazione deve essere ripetuta. Rimuovere la pinzetta per clampaggio dopo aver completato il test di integrità.

IMPORTANTE

Il test di integrità funziona correttamente solo se il tubo è clampato al di sotto della Non-Target Cell Bag. Clampare il tubo sotto la Non-Target Cell Bag prima di avviare il test di integrità. Rimuovere la pinzetta per clampaggio al termine del test di integrità.

Test di integrità per la parte superiore del set di tubi

1. Quando l'operatore esegue il "Controllo finale di tutti i tubi e collegamenti", la finestra indica la Schermata 7.63.

2. Dopo aver eseguito il "Controllo finale di tutti i tubi e collegamenti", **non** premere ENT.

3. Per avviare il test di integrità nella parte superiore premere 9.

   La finestra indica la Schermata 7.64.

   IMPORTANTE
   Clampare il tubo sotto la valvola di controllo della Non-Target Cell Bag.

4. Per avviare la sequenza del test, premere RUN.

   Per tornare alla Schermata 7.63, premere ◄.

5. Una volta premuto il pulsante RUN, lo strumento avvierà la sequenza del test automatizzata per la parte superiore del test di tubi.

   La finestra indica la Schermata 7.65.

   Si genererà una sovrapressione che sarà mantenuta per due minuti. Durante questo lasso di tempo, l'operatore deve controllare tutte le connessioni al di sopra della connessione superiore del tubo della pompa.

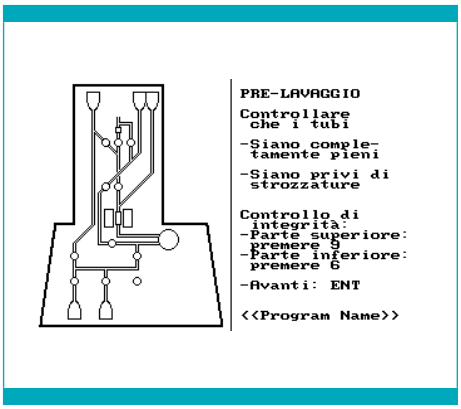
   La sequenza del test può essere arrestata ad ogni punto premendo ENT.

6. Dopo due minuti la pressione viene automaticamente rilasciata e la finestra indica la Schermata 7.63.

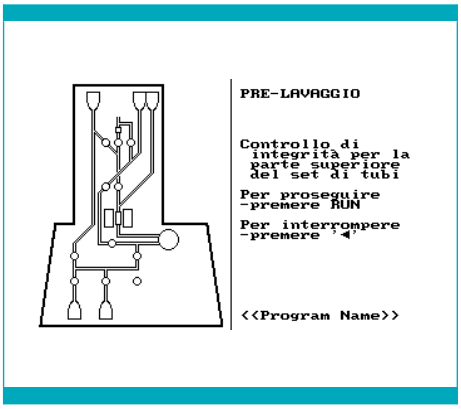
   Controllare se si sono verificate perdite durante la sequenza di test. Se si osservano perdite in qualsiasi connessione del set di tubi, il set di tubi deve essere rimosso e sostituito con uno nuovo.

   Contattare il Miltenyi Biotec Technical Support per indicazioni sulla restituzione del set di tubi difettoso.

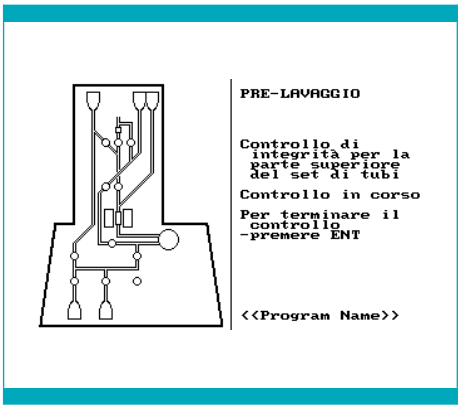
7. Se non si osservano perdite, continuare con il test di integrità della parte inferiore del set di tubi.



Schermata 7.63: Avvio del test di integrità per la parte superiore



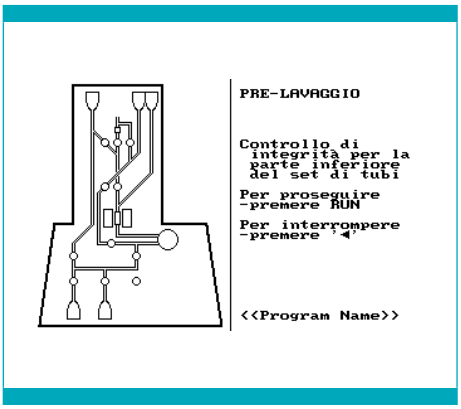
Schermata 7.64: Avvio del test di integrità per la parte superiore



Schermata 7.65: Avvio del test di integrità per la parte superiore

Test di integrità per la parte inferiore del set di tubi

La finestra indica la Schermata 7.63.



Schermata 7.66: Test di integrità per la parte inferiore

1. Per avviare il test di integrità premere **6**.
   Non premere **ENT**.

   La finestra indica la Schermata 7.66.

2. Per avviare la sequenza del test, premere **RUN**.

   Per tornare alla Schermata 7.63, premere ◄.

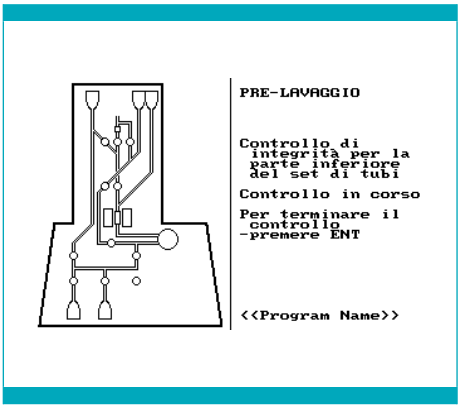
3. Una volta premuto il pulsante **RUN**, lo strumento avvierà la sequenza del test automatizzata per la parte inferiore del test di tubi.

   La finestra indica la Schermata 7.67.

   Si genererà una sovrapressione che sarà mantenuta per 30 secondi.

   Durante questo lasso di tempo, l'operatore deve controllare la connessione del tubo inferiore della pompa e i raccordi a T tra le valvole n. 6, 8, 9 e 10.

   La sequenza del test può essere arrestata ad ogni punto premendo **ENT**.



Schermata 7.67: Test di integrità per la parte inferiore in corso

4. Dopo 30 secondi la pressione viene automaticamente rilasciata e la finestra indica la Schermata 7.63.

   L'operatore deve controllare se si sono verificate perdite durante la sequenza del test. Se si osservano perdite in qualsiasi connessione del set di tubi, il set di tubi deve essere rimosso e sostituito con uno nuovo.

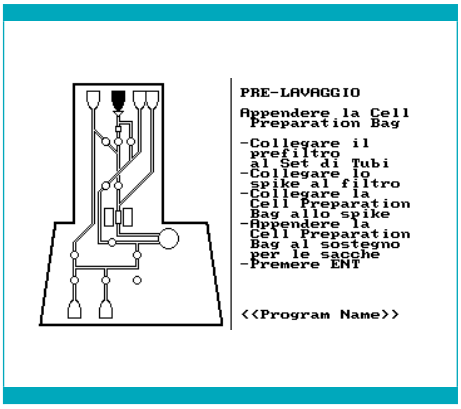
   Contattare il Miltenyi Biotec Technical Support per indicazioni sulla restituzione del set di tubi difettoso.

5. **Aprire il percorso verso la Non-Target Cell Bag togliendo la pinzetta per clampaggio al di sotto della valvola di controllo.**

6. Se non ci sono perdite, l'operatore può continuare con il passo successivo premendo **ENT**.

Collegare la Cell Preparation Bag

La finestra indica la Schermata 7.68.



Schermata 7.68: Collegare la Cell Preparation Bag

Collegare la Cell Preparation Bag (contenente le cellule marcate magneticamente) con il set di tubi:

1. Rimuovere il cappuccio svitabile (cfr. Figura 7.12 a pagina 176) dal set di tubi.
2. Rimuovere il tappo dal perforatore del filtro di pre-sistema. Inserire saldamente il perforatore del filtro di pre-sistema nel set di tubi, assicurandosi che il setto sia forato.
3. Rimuovere i tappi dal filtro di pre-sistema e l'estremità smussata del connettore a punta, quindi collegare entrambe le parti tra loro.
4. Rimuovere l'altro tappo dal connettore a punta e collegare il perforatore alla Cell Preparation Bag assicurandosi che il setto sia forato e consenta il libero passaggio del liquido. Comprimere delicatamente la sacca per assicurarsi che il perforatore sia entrato nella sacca.
5. Controllare la connessione tra la Cell Preparation Bag, il connettore a punta, il filtro di pre-sistema e il set di tubi per verificare che sia sicura.
6. Appendere la Cell Preparation Bag all'appendi-sacca (cfr. Figura 7.21).
7. Assicurarsi che le sacche e i tubi collegati all'appendi-sacca non siano né troppo tesi né piegati.

   A causa delle fasi gravimetriche di priming e risciacquo eseguite durante la separazione automatica, è molto importante che le sacche siano correttamente posizionate. Inoltre, per processare interamente il campione, è fondamentale posizionare la Reapplication e la Non-Target Cell Bag più in alto rispetto alla Cell Preparation Bag (cfr. Figura 7.20):

   - **Posizione più alta:** sacca di tampone
   - **Posizione intermedia:** Reapplication e Non-Target Cell Bag
   - **Posizione inferiore:** Cell Preparation Bag

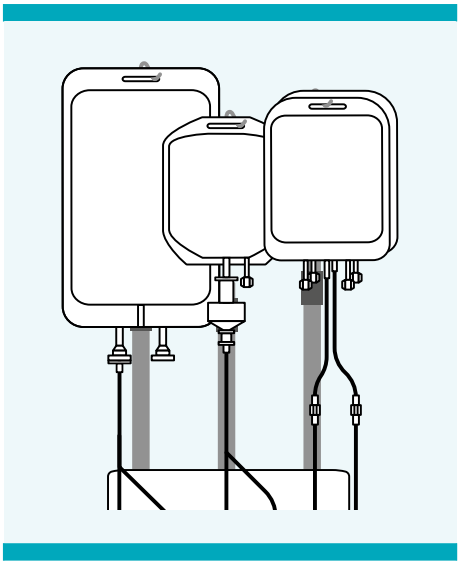


Figura 7.20: Sacche correttamente posizionate

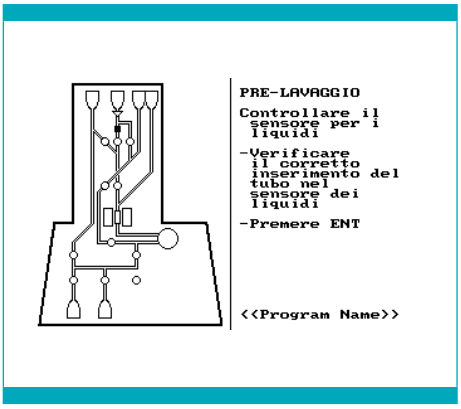
Per proseguire, premere **ENT**.

Controllo finale del sensore per i liquidi

La finestra indica la Schermata 7.69.

1. Controllare il tubo del sensore per i liquidi. Assicurarsi che il tubo sia stato inserito correttamente, che sia privo di qualsiasi liquido esterno e che non sia stato spostato durante la procedura di caricamento.
2. Verificare che il flusso di liquido verso ciascuna sacca sia libero.

Per proseguire, premere **ENT**.



Schermata 7.69: Controllo finale del sensore per i liquidi

▶ **Continuare con la FASE 4.**

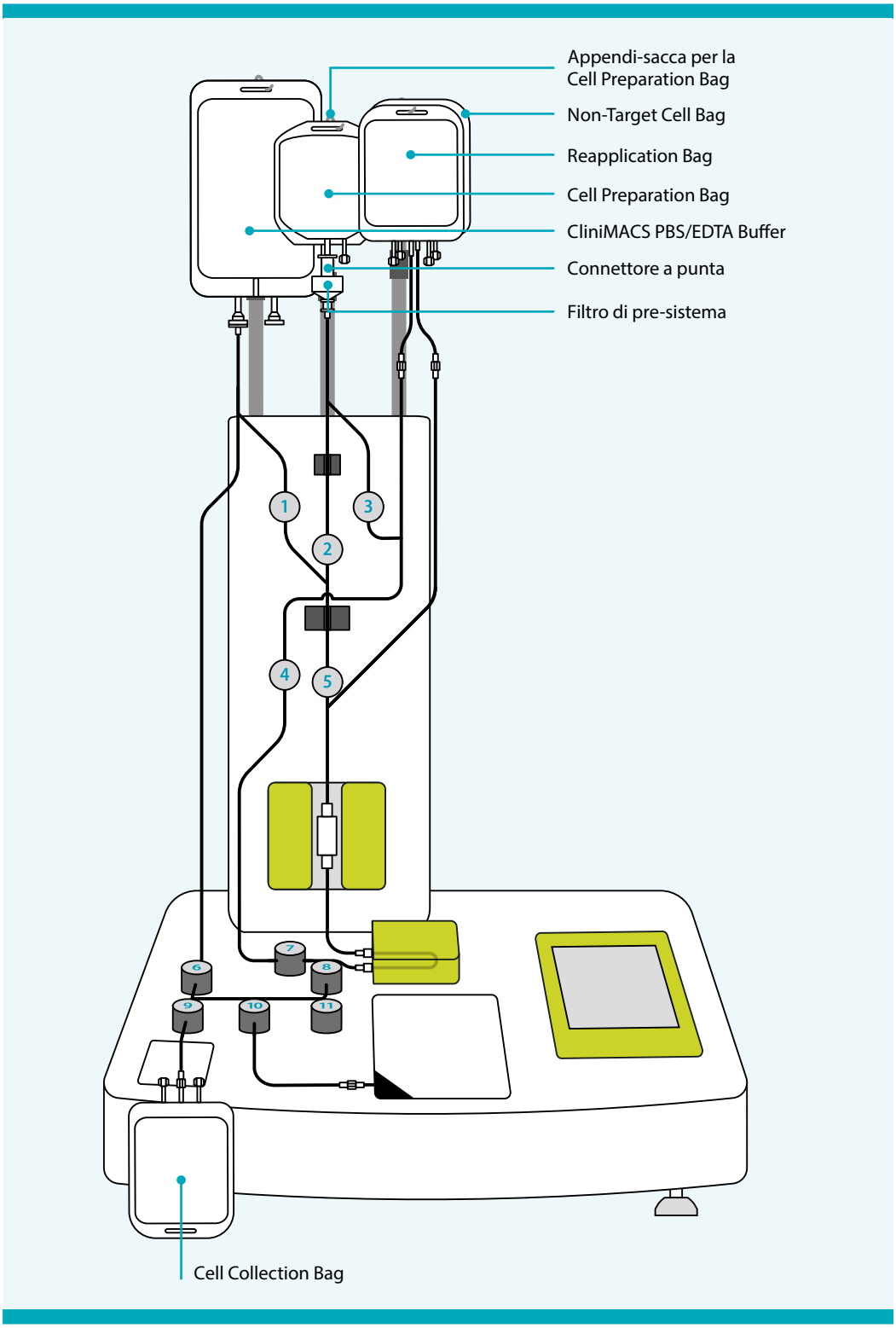
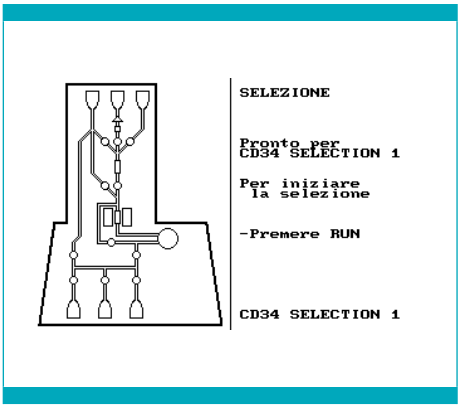


Figura 7.21: CliniMACS Plus Instrument con CliniMACS Depletion Tubing Set, CliniMACS PBS/EDTA Buffer, Cell Preparation Bag e Cell Collection Bag

7.4 FASE 4: Separazione sul CliniMACS Plus

7.4.1 CD34 SELECTION 1/2

Una volta terminato il controllo finale, il CliniMACS Plus Instrument è pronto per iniziare la separazione. La finestra indica la Schermata 7.70.

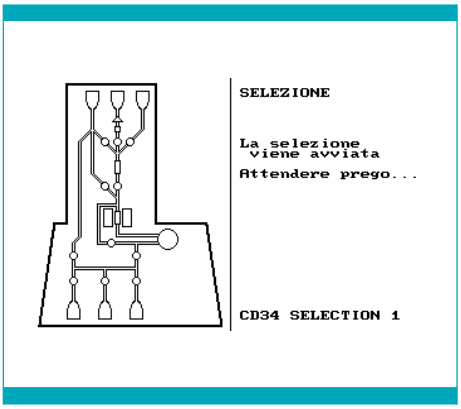


Schermata 7.70: Avvio della separazione

Per proseguire, premere **RUN**.

Una volta premuto **RUN**, lo strumento eseguirà automaticamente la procedura di separazione scelta.

Ad ogni fase dell'operazione, una schermata simile alla Schermata 7.71 visualizzerà lo stato della procedura di separazione.



Schermata 7.71: Separazione in corso

L'indicatore di posizione del magnete viene visualizzato con due caselle nere accanto alla colonna di separazione quando il magnete è "ON", cioè è stato spostato davanti per magnetizzare la colonna di separazione. Se la posizione dell'indicatore del magnete è trasparente (ad es. Schermata 7.70), il magnete è "OFF", cioè è stato spostato sul retro dello strumento. Con il magnete ritirato, la colonna di separazione si trova al di fuori del campo magnetico e non viene più magnetizzata.

Nota: Lo schermo può visualizzare il nome di un programma diverso in base al programma di separazione scelto (CD34 SELECTION 1 o 2).

Procedura di separazione

Caricamento delle cellule

La procedura di separazione inizia con il riempimento del filtro di pre-sistema per eliminare l'aria residua al suo interno.

Inizia poi la separazione delle cellule marcate. La pompa aspira il contenuto della Cell Preparation Bag nel set di tubi e carica la preparazione cellulare attraverso la pre-colonna sulla colonna di separazione. Le cellule marcate magneticamente (cellule bersaglio) vengono trattenute nella colonna di separazione, all'interno del campo magnetico, mentre le cellule non marcate (cellule non-bersaglio) vengono

fatte passare e raccolte nella Negative Fraction Bag. Quando la Cell Preparation Bag è vuota (stato rilevato automaticamente dal sensore per i liquidi), il filtro di pre-sistema viene risciacquato due volte con tampone.

Lavaggio della colonna I

La pre-colonna e la colonna di separazione vengono lavate a fondo per rimuovere tutte le cellule non marcate. Il tampone di lavaggio viene raccolto nella Buffer Waste Bag. Quando 'Column Wash I' inizia, viene visualizzato il tempo totale rimanente fino al termine della procedura di separazione.

IMPORTANTE
All'inizio della separazione, il tampone viene pompato verso l'alto in direzione della Cell Preparation Bag per riempire il filtro di pre-sistema. Picchiettare delicatamente il lato del filtro più volte per rimuovere eventuali bolle intrappolate nel filtro.

Rilascio di cellule I

Il magnete viene spostato sul retro dello strumento (posizione "OFF"). Le cellule trattenute vengono rilasciate con un flusso ad alta velocità, ma rimangono in di un ciclo interno di tubi.

Ricarica di cellule I

Il magnete viene spostato nuovamente in posizione "ON" per magnetizzare la colonna di separazione e le cellule vengono riapplicate alla colonna di separazione.

Lavaggio della colonna II

Dopo la ricarica delle cellule ha luogo una seconda fase di lavaggio per rimuovere le rimanenti cellule non marcate. Anche tutti i tubi vengono risciacquati più volte.

Rilascio delle cellule II, ricarica delle cellule II, lavaggio della colonna III

Le cellule vengono rilasciate e riapplicate alla colonna di separazione per una seconda volta al fine di rimuovere eventuali cellule non marcate che aderiscono in modo aspecifico alla matrice della colonna. La colonna di separazione viene nuovamente lavata.

Rilascio delle cellule III, ricarica delle cellule III, lavaggio della colonna IV

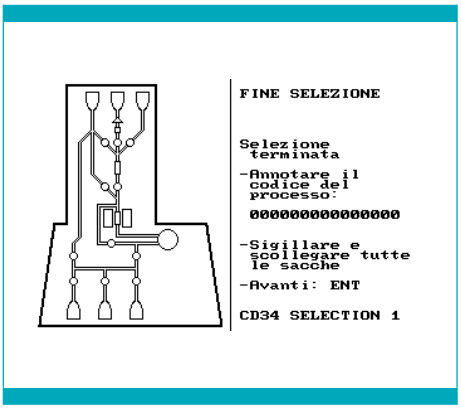
Il programma di separazione CD34 SELECTION 2 prevede una terza fase di rilascio e riapplicazione.

Eluizione finale delle cellule

Il magnete viene spostato nella posizione "OFF", le cellule marcate magneticamente vengono rilasciate dalla colonna di separazione e raccolte nella Cell Collection Bag collegata.

Scollegare le sacche e registrare il codice del processo

Al termine del ciclo la finestra indica la Schermata 7.72.



Schermata 7.72: Scollegare le sacche e registrare il codice del processo

1. Registrare il codice del processo.
2. Clampare o saldare il tubo sopra il blocco Luer che collega la Cell Collection Bag al set di tubi (cfr. Figura 7.22).

   Eseguire tre saldature nel tubo direttamente sotto la valvola n. 9. Tagliare con cautela la saldatura centrale per scollegare la Cell Collection Bag dal set di tubi.
3. Pesare la Cell Collection Bag riempita. Registrare il peso.

   Determinare il peso della frazione di cellule bersaglio sottraendo il peso della Cell Collection Bag vuota dal peso della Cell Collection Bag contenente le cellule bersaglio. Registrare il peso.
4. Mescolare accuratamente la sospensione cellulare target ruotando la sacca. Prelevare una quantità adeguata, ad es. 0,5 mL, e conservarla per l'analisi.
5. Con la termosaldatrice, saldare il tubo sopra il blocco Luer della Negative Fraction Bag. Eseguire tre saldature nel tubo. Tagliare la saldatura centrale per scollegare la Negative Fraction Bag.
6. Scollegare la Buffer Waste Bag allo stesso modo.
7. Togliere la Negative Fraction Bag e la Buffer Waste Bag. Conservare tutte le sacche fino al completamento dell'analisi finale di tutte le cellule.

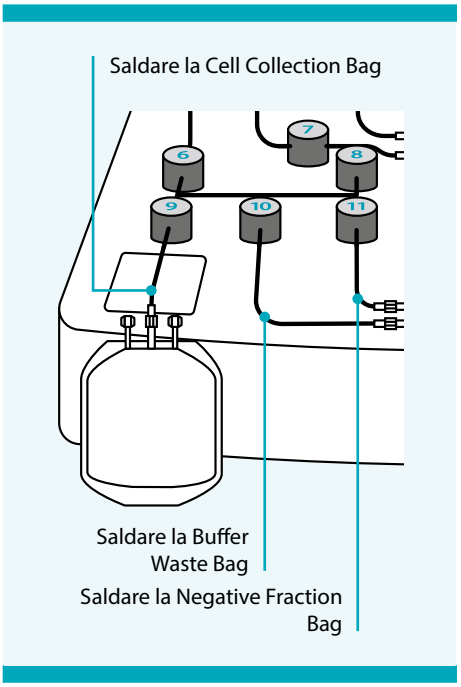


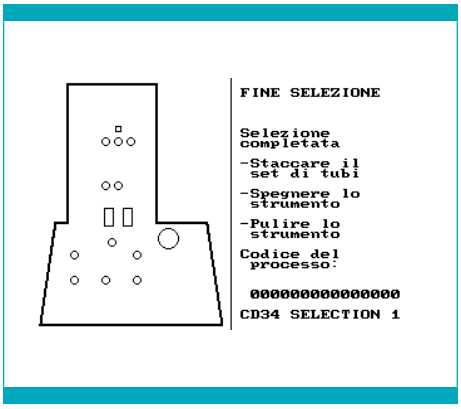
Figura 7.22: Scollegare le sacche

Ora è possibile processare le cellule bersaglio come da protocollo clinico.

Per proseguire, premere **RUN**.

Scollagare il set di tubi e spegnere

La finestra indica la Schermata 7.73.



Schermata 7.73: Scollegare il set di tubi e spegnere

1. Rimuovere il set di tubi: iniziare con le valvole n. 6, 9, 10 e 11 e, procedendo verso l'alto, rilasciare il tubo dal sensore per i liquidi e dalle valvole premendo sulle valvole stesse. Rilasciare le colonne dai rispettivi supporti. Smaltire il set di tubi come materiale a rischio biologico secondo le procedure ospedaliere standard.
2. Spegnere il CliniMACS Plus Instrument.
3. Pulire lo strumento come da istruzioni, cfr. la sezione "Pulizia e disinfezione" nel Manuale d'uso del CliniMACS Plus Instrument. Seguire le procedure standard per il trattamento di materiale infetto.

Analisi delle cellule

IMPORTANTE

- *Se il volume non supera i 100 mL per trapianto a velocità di infusione adeguate, il CliniMACS PBS/EDTA Buffer non deve essere rimosso prima della somministrazione delle cellule bersaglio separate. Devono essere tenuti in considerazione le condizioni renali del paziente e gli effetti sugli elettroliti nel sangue. Soprattutto nei bambini, la velocità di infusione deve essere adattata di conseguenza.*
- *Se il volume della frazione di cellule bersaglio supera i 100 mL, deve essere ridotto con metodi idonei, ad esempio mediante centrifugazione o sostituzione del tampone, fino ad ottenere una soluzione per infusione approvata nel Paese dell'utilizzatore.*

⚠ ATTENZIONE

Rischio di ridotta qualità delle cellule bersaglio. Le cellule bersaglio devono essere analizzate per confermare che soddisfino i requisiti dell'utilizzatore, diversamente l'idoneità per l'applicazione clinica può essere compromessa. Esaminare le cellule bersaglio rispetto alla qualità e alla quantità a seconda dell'uso previsto.

Il controllo deve comprendere i seguenti parametri:

- numero totale di leucociti
- vitalità e numero totale di cellule target
- purezza e recupero delle cellule bersaglio

Si raccomanda inoltre di verificare il numero totale di leucociti e la vitalità della frazione di cellule non-bersaglio. L'elenco è un esempio e dovrebbe comprendere altri test in base all'uso previsto e ai protocolli clinici. Registrare i dati dell'analisi.

7.4.2 ENRICHMENT 1.1

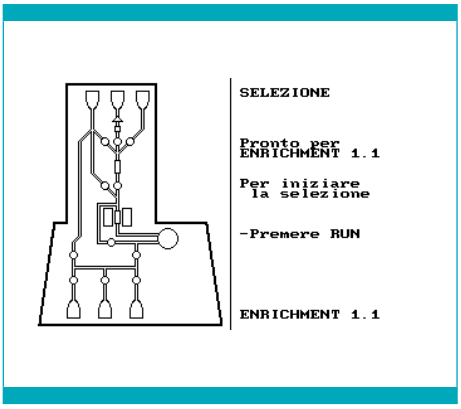
Una volta terminato il controllo finale, il CliniMACS Plus Instrument è pronto per iniziare la separazione. La finestra indica la Schermata 7.74.

Per proseguire, premere **RUN**.

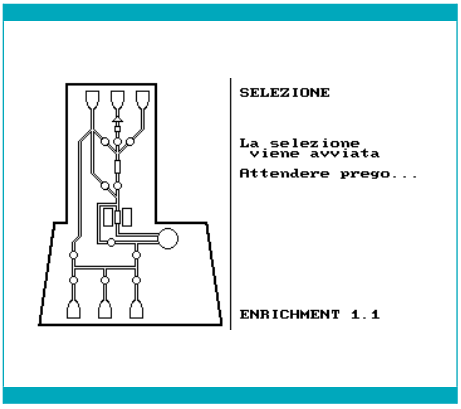
Una volta premuto **RUN**, lo strumento eseguirà automaticamente la procedura di separazione scelta.

Ad ogni fase dell'operazione, una schermata simile alla Schermata 7.75 visualizzerà lo stato della procedura di separazione.

L'indicatore di posizione del magnete è rappresentato da due caselle nere accanto alla colonna di separazione quando il magnete è "ON", cioè è stato spostato davanti per magnetizzare la colonna di separazione. Se la posizione dell'indicatore del magnete è trasparente (ad es. Schermata 7.74), il magnete è "OFF", cioè è stato spostato sul retro dello strumento. Con il magnete ritirato, la colonna di separazione si trova al di fuori del campo magnetico e non viene magnetizzata.



Schermata 7.74: Avvio della separazione



Schermata 7.75: Separazione in corso

Procedura di separazione

Caricamento delle cellule

La procedura di separazione inizia con il riempimento del filtro di pre-sistema per eliminare l'aria residua al suo interno. Ha inizio poi la separazione delle cellule marcate. La pompa aspira il contenuto della Cell Preparation Bag nel set di tubi e carica la preparazione cellulare attraverso la pre-colonna sulla colonna di separazione. Le cellule marcate magneticamente (cellule bersaglio) vengono trattenute nella colonna di separazione, all'interno del campo magnetico, mentre le cellule non marcate (cellule non-bersaglio) vengono fatte passare e raccolte nella Negative Fraction Bag.

IMPORTANTE

All'inizio della separazione, il tampone viene pompato verso l'alto in direzione della Cell Preparation Bag per riempire il filtro di pre-sistema. Picchiettare delicatamente il lato del filtro più volte per rimuovere eventuali bolle intrappolate nel filtro.

Note

- Se il numero di cellule marcate magneticamente (calcolato dal CliniMACS Plus Software) supera la capacità di legame della colonna di separazione, il programma di separazione carica e separa automaticamente il campione di cellule in porzioni adeguate (“staged loading”).
- Il caricamento si interromperà quando sarà stata raggiunta la capacità della colonna di separazione e il programma di separazione procederà alla fase di separazione successiva. Al termine dell’ultima fase (eluizione finale delle cellule), la porzione successiva del campione sarà caricata nella colonna e processata allo stesso modo.

Lavaggio della colonna I

La pre-colonna e la colonna di separazione vengono lavate a fondo per rimuovere tutte le cellule non marcate. Il tampone di lavaggio viene raccolto nella Buffer Waste Bag.

Rilascio di cellule

Il magnete viene spostato sul retro dello strumento (posizione “OFF”). Le cellule trattenute vengono rilasciate con un flusso ad alta velocità, ma rimangono in un ciclo interno di tubi.

Ricarica di cellule

Il magnete viene spostato nuovamente in posizione “ON” per magnetizzare la colonna di separazione e le cellule vengono riapplicate alla colonna di separazione.

Lavaggio della colonna II

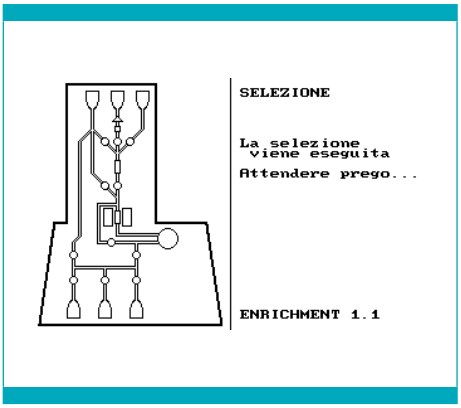
Dopo la ricarica delle cellule ha luogo una seconda fase di lavaggio per rimuovere le rimanenti cellule non marcate. Anche tutti i tubi vengono risciacquati più volte.

Eluizione finale delle cellule

Il magnete viene spostato nella posizione “OFF” e le cellule marcate magneticamente (cellule bersaglio) vengono rilasciate dalla colonna di separazione e raccolte nella Cell Collection Bag.

Scollegare le sacche e registrare il codice del processo

Al termine del ciclo la finestra indica la Schermata 7.76.



Schermata 7.76: Scollegare le sacche e registrare il codice del processo

1. Registrare il codice del processo.
2. Clampare o saldare il tubo sopra il blocco Luer che collega la Cell Collection Bag al set di tubi (cfr. Figura 7.23).

   Eseguire tre saldature nel tubo direttamente sotto la valvola n. 9. Tagliare con cautela la saldatura centrale per scollegare la Cell Collection Bag dal set di tubi.
3. Pesare la Cell Collection Bag riempita. Registrare il peso.

   Determinare il peso della frazione di cellule bersaglio sottraendo il peso della Cell Collection Bag vuota dal peso della Cell Collection Bag contenente le cellule bersaglio. Registrare il peso.
4. Mescolare accuratamente la sospensione cellulare target ruotando la sacca. Prelevare una quantità adeguata, ad es. 0,5 mL, e conservarla per l'analisi.
5. Con la termosaldatrice, saldare il tubo sopra il blocco Luer della Negative Fraction Bag. Eseguire tre saldature nel tubo. Tagliare la saldatura centrale per scollegare la Negative Fraction Bag.
6. Scollegare la Buffer Waste Bag allo stesso modo.
7. Togliere la Negative Fraction Bag e la Buffer Waste Bag. Conservare tutte le sacche fino al completamento dell'analisi finale di tutte le cellule.

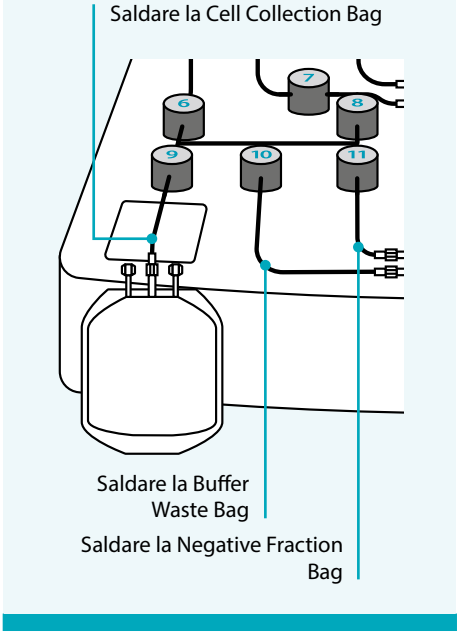


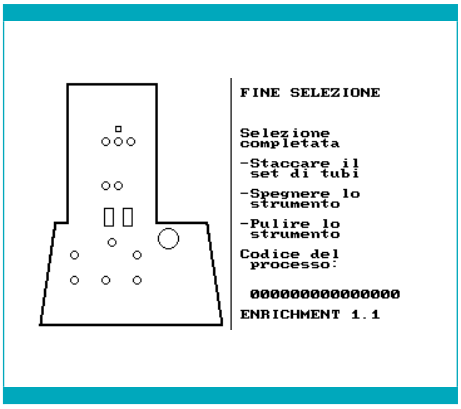
Figura 7.23: Scollegare le sacche

Ora è possibile processare le cellule bersaglio come da protocollo clinico.

Per proseguire, premere **ENT**.

Scollegare il set di tubi e spegnere

La finestra indica la Schermata 7.77.



Schermata 7.77: Scollegare il set di tubi e spegnere

1. Rimuovere il set di tubi: iniziare con le valvole n. 6, 9, 10 e 11 e, procedendo verso l'alto, rilasciare il tubo dal sensore per i liquidi e dalle valvole premendo sulle valvole stesse. Rilasciare le colonne dai rispettivi supporti. Smaltire il set di tubi come materiale a rischio biologico secondo le procedure ospedaliere standard.
2. Spegnere il CliniMACS Plus Instrument.
3. Pulire lo strumento come da istruzioni, cfr. la sezione "Pulizia e disinfezione" nel Manuale d'uso del CliniMACS Plus Instrument. Seguire le procedure standard per il trattamento di materiale infetto.

Analisi delle cellule

IMPORTANTE

- *Se il volume non supera i 100 mL per trapianto a velocità di infusione adeguate, il CliniMACS PBS/EDTA Buffer non deve essere rimosso prima della somministrazione delle cellule bersaglio separate. Devono essere tenuti in considerazione le condizioni renali del paziente e gli effetti sugli elettroliti nel sangue. Soprattutto nei bambini, la velocità di infusione deve essere adattata di conseguenza.*
- *Se il volume della frazione di cellule bersaglio supera i 100 mL, deve essere ridotto con metodi idonei, ad esempio mediante centrifugazione o sostituzione del tampone, fino ad ottenere una soluzione per infusione approvata nel Paese dell'utilizzatore.*

⚠ ATTENZIONE

Rischio di qualità ridotta delle cellule bersaglio. Le cellule bersaglio devono essere analizzate per confermare che soddisfino i requisiti dell'utilizzatore, diversamente l'idoneità per l'applicazione clinica può essere compromessa. Esaminare le cellule bersaglio rispetto alla qualità e alla quantità a seconda dell'uso previsto.

Il controllo deve comprendere i seguenti parametri:

- numero totale di leucociti
- vitalità e numero totale di cellule target
- purezza (efficacia della deplezione) e recupero delle cellule bersaglio

Si raccomanda inoltre di verificare il numero totale di leucociti e la vitalità della frazione di cellule non-bersaglio. L'elenco è un esempio e dovrebbe comprendere altri test in base all'uso previsto e ai protocolli clinici. Registrare i dati dell'analisi.

7.4.3 ENRICHMENT 3.2

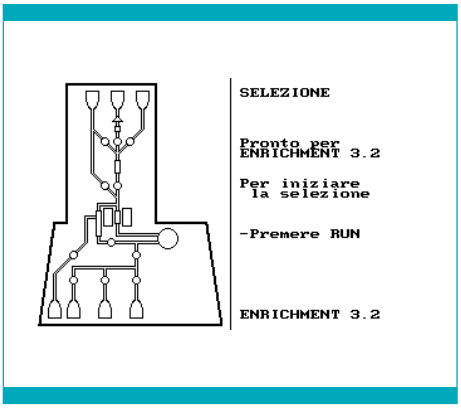
Una volta terminato il controllo finale, il CliniMACS Plus Instrument è pronto per iniziare la separazione. La finestra indica la Schermata 7.78.

Per proseguire, premere **RUN**.

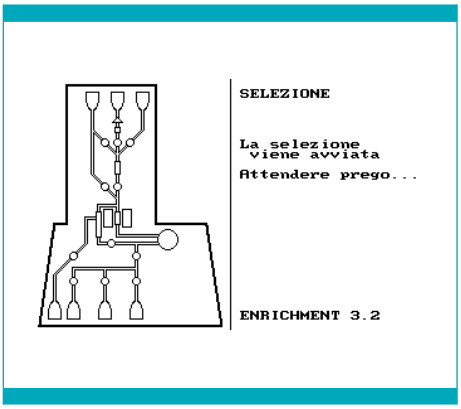
Una volta premuto **RUN**, lo strumento eseguirà automaticamente la procedura di separazione scelta.

Ad ogni fase dell'operazione, una schermata simile alla Schermata 7.79 visualizzerà lo stato della procedura di separazione.

L'indicatore di posizione del magnete è rappresentato da due caselle nere accanto alla colonna di separazione quando il magnete è "ON", cioè è stato spostato davanti per magnetizzare la colonna di separazione. Se la posizione dell'indicatore del magnete è trasparente (ad es. Schermata 7.78), il magnete è "OFF", cioè è stato spostato sul retro dello strumento. Con il magnete ritirato, la colonna di separazione si trova al di fuori del campo magnetico e non viene magnetizzata.



Schermata 7.78: Avvio della separazione



Schermata 7.79: Separazione in corso

Procedura di separazione

Caricamento delle cellule

La procedura di separazione inizia con il riempimento del filtro di pre-sistema per eliminare l'aria residua al suo interno. Poi ha inizio la separazione delle cellule marcate. La pompa aspira il contenuto della Cell Preparation Bag nel set di tubi e carica la preparazione cellulare attraverso la pre-colonna sulla colonna di separazione. Le cellule marcate magneticamente (cellule bersaglio) vengono trattenute nella colonna di separazione, all'interno del campo magnetico, mentre le cellule non marcate (cellule non-bersaglio) vengono fatte passare e raccolte nella Negative Fraction Bag. Quando la Cell Preparation Bag è vuota (stato rilevato automaticamente dal sensore per i liquidi), il filtro di pre-sistema viene risciacquato due volte con tampone.

IMPORTANTE

All'inizio della separazione, il tampone viene pompato verso l'alto in direzione della Cell Preparation Bag per riempire il filtro di pre-sistema. Picchiettare delicatamente il lato del filtro più volte per rimuovere eventuali bolle intrappolate nel filtro.

Lavaggio della colonna I

La pre-colonna e la colonna di separazione vengono lavate a fondo per rimuovere tutte le cellule non marcate. Il tampone di lavaggio viene raccolto nella Buffer Waste Bag.

Rilascio di cellule I

Il magnete viene spostato sul retro dello strumento (posizione "OFF"). Le cellule trattenute vengono rilasciate con un flusso ad alta velocità, ma rimangono in un ciclo interno di tubi.

Ricarica di cellule I

Il magnete viene spostato nuovamente in posizione "ON" per magnetizzare la colonna di separazione e le cellule vengono riapplicate alla colonna di separazione.

Lavaggio della colonna II

Dopo la ricarica delle cellule ha luogo una seconda fase di lavaggio per rimuovere le rimanenti cellule non marcate. Anche tutti i tubi vengono risciacquati più volte.

Rilascio delle cellule II, ricarica delle cellule II, lavaggio della colonna III

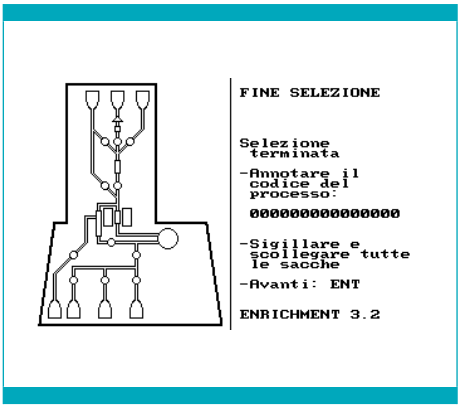
Le cellule vengono rilasciate e riapplicate alla colonna di separazione per una seconda volta al fine di rimuovere eventuali cellule non marcate che aderiscono in modo aspecifico alla matrice della colonna. La colonna di separazione viene poi nuovamente lavata.

Eluizione finale delle cellule

Quando il magnete viene spostato nella posizione "OFF", le cellule marcate magneticamente (cellule bersaglio) vengono rilasciate e raccolte nella Cell Collection Bag.

Scollegare le sacche e registrare il codice del processo

Al termine del ciclo la finestra indica la Schermata 7.80.



Schermata 7.80: Scollegare le sacche e registrare il codice del processo

1. Registrare il codice del processo.
2. Clampare o saldare il tubo sopra il blocco Luer che collega la Cell Collection Bag al set di tubi (cfr. Figura 7.24).

   Eseguire tre saldature nel tubo direttamente sotto la valvola n. 9. Tagliare con cautela la saldatura centrale per scollegare la Cell Collection Bag dal set di tubi.
3. Pesare la Cell Collection Bag riempita. Registrare il peso.

   Determinare il peso della frazione di cellule bersaglio sottraendo il peso della Cell Collection Bag vuota dal peso della Cell Collection Bag contenente le cellule bersaglio. Registrare il peso.
4. Mescolare accuratamente la sospensione cellulare target ruotando la sacca. Prelevare una quantità adeguata, ad es. 0,5 mL, e conservarla per l'analisi.
5. Con la termosaldatrice, saldare il tubo sopra il Luer Lock della Negative Fraction Bag. Eseguire tre saldature nel tubo. Tagliare la saldatura centrale per scollegare la Negative Fraction Bag.
6. Scollegare la Buffer Waste Bag allo stesso modo.
7. Togliere la Negative Fraction Bag e la Buffer Waste Bag. Conservare tutte le sacche fino al completamento dell'analisi finale di tutte le cellule.

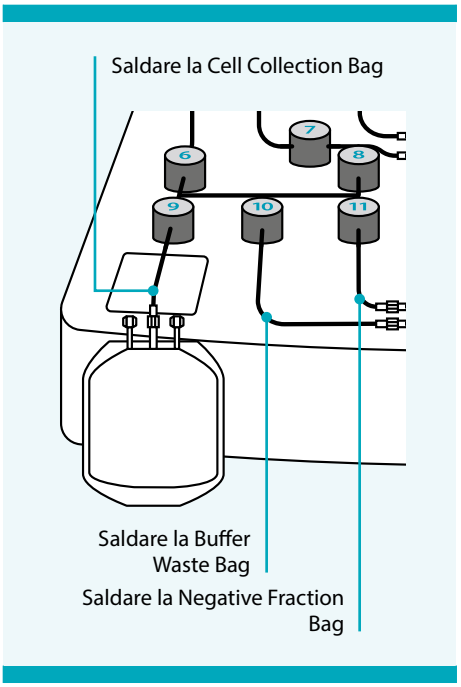


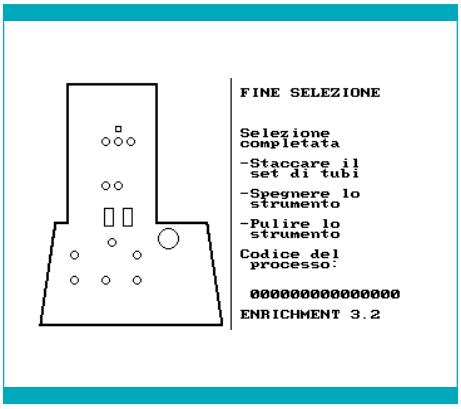
Figura 7.24: Scollegare le sacche

Ora è possibile processare le cellule bersaglio come da protocollo clinico.

Per proseguire, premere **ENT**.

Scollegare il set di tubi e spegnere

La finestra indica la Schermata 7.81.



Schermata 7.81: Scollegare il set di tubi e spegnere

1. Rimuovere il set di tubi: iniziare con le valvole n. 6, 9, 10 e 11 e, procedendo verso l'alto, rilasciare il tubo dal sensore per i liquidi e dalle valvole premendo sulle valvole stesse. Rilasciare le colonne dai rispettivi supporti. Smaltire il set di tubi come materiale a rischio biologico secondo le procedure ospedaliere standard.
2. Spegnere il CliniMACS Plus Instrument.
3. Pulire lo strumento come da istruzioni, cfr. la sezione "Pulizia e disinfezione" nel Manuale d'uso del CliniMACS Plus Instrument. Seguire le procedure standard per il trattamento di materiale infetto.

Analisi delle cellule

IMPORTANTE

- *Se il volume non supera i 100 mL per trapianto a velocità di infusione adeguate, il CliniMACS PBS/EDTA Buffer non deve essere rimosso prima della somministrazione delle cellule bersaglio separate. Devono essere tenuti in considerazione le condizioni renali del paziente e gli effetti sugli elettroliti nel sangue. Soprattutto nei bambini, la velocità di infusione deve essere adattata di conseguenza.*
- *Se il volume della frazione di cellule bersaglio supera i 100 mL, deve essere ridotto con metodi idonei, ad esempio mediante centrifugazione o sostituzione del tampone, fino ad ottenere una soluzione per infusione approvata nel Paese dell'utilizzatore.*

⚠ ATTENZIONE

Rischio di ridotta qualità delle cellule bersaglio. Le cellule bersaglio devono essere analizzate per confermare che soddisfino i requisiti dell'utilizzatore, diversamente l'idoneità per l'applicazione clinica può essere compromessa. Esaminare le cellule bersaglio rispetto alla qualità e alla quantità a seconda dell'uso previsto.

Il controllo deve comprendere i seguenti parametri:

- numero totale di leucociti
- vitalità e numero totale di cellule target
- purezza e recupero delle cellule bersaglio

Si raccomanda inoltre di verificare il numero totale di leucociti e la vitalità della frazione di cellule non-bersaglio. L'elenco è un esempio e dovrebbe comprendere altri test in base all'uso previsto e ai protocolli clinici. Registrare i dati dell'analisi.

7.4.4 DEPLETION 2.1

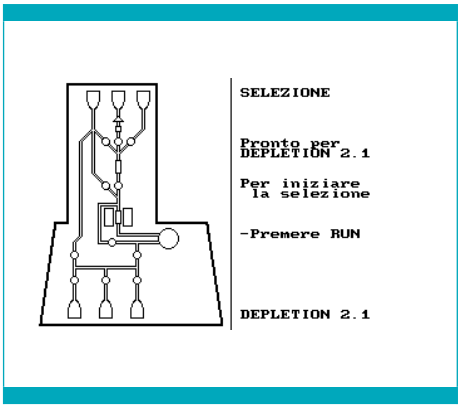
Una volta terminato il controllo finale, il CliniMACS Plus Instrument è pronto per iniziare la separazione. La finestra indica la Schermata 7.82.

Per proseguire, premere **RUN**.

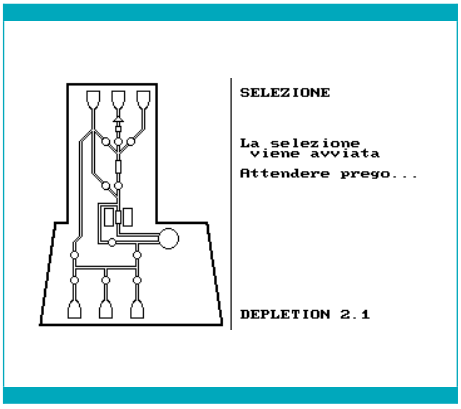
Una volta premuto **RUN**, lo strumento eseguirà automaticamente la procedura di separazione scelta.

Ad ogni fase dell'operazione, una schermata simile alla Schermata 7.83 visualizzerà lo stato della procedura di separazione.

L'indicatore di posizione del magnete è rappresentato da due caselle nere accanto alla colonna di separazione quando il magnete è "ON", cioè è stato spostato davanti per magnetizzare la colonna di separazione. Se la posizione dell'indicatore del magnete è trasparente (ad es. Schermata 7.82), il magnete è "OFF", cioè è stato spostato sul retro dello strumento. Con il magnete ritirato, la colonna di separazione si trova al di fuori del campo magnetico e non viene magnetizzata.



Schermata 7.82: Avvio della separazione



Schermata 7.83: Separazione in corso

Procedura di separazione

Caricamento delle cellule

La procedura di separazione inizia con il riempimento del filtro di pre-sistema per completare il prelavaggio del sistema. Poi ha inizio la separazione delle cellule marcate. La pompa aspira il contenuto della Cell Preparation Bag nel set di tubi. Le cellule marcate magneticamente (cellule non-bersaglio) vengono trattenute nella colonna di separazione, all'interno del campo magnetico, mentre le cellule non marcate (cellule bersaglio) vengono fatte passare e raccolte nella Cell Collection Bag.

IMPORTANTE

All'inizio della separazione, il tampone viene pompato verso l'alto in direzione della Cell Preparation Bag per riempire il filtro di pre-sistema. Picchiettare delicatamente il lato del filtro più volte per rimuovere eventuali bolle intrappolate nel filtro.

Risciacquare il filtro di pre-sistema

Dopo che il campione cellulare è stato completamente caricato nel set di tubi, il filtro di pre-sistema viene risciacquato due volte con tampone per ridurre la perdita di cellule nel filtro.

Note

- Se il numero di cellule marcate magneticamente (calcolato dal CliniMACS Plus Software) supera la capacità di legame della colonna di separazione, il programma di separazione carica e separa automaticamente il campione di cellule in porzioni più piccole ("staged loading").
- Il caricamento si interromperà quando sarà stata raggiunta la capacità della colonna di separazione e il programma di separazione procederà alla fase di separazione successiva. Al termine dell'ultima fase (eluizione finale delle cellule), la porzione successiva del campione sarà caricata nella colonna.

Lavaggio della colonna

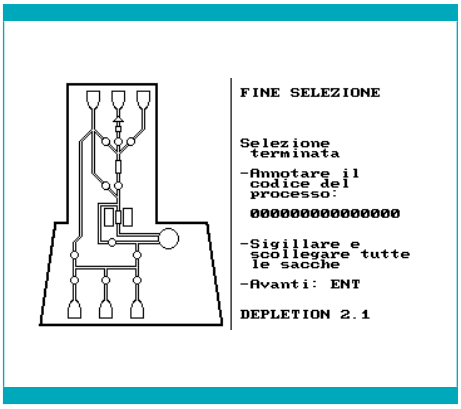
La pre-colonna e la colonna di separazione vengono lavate a fondo per rimuovere tutte le cellule non marcate. Il tampone di lavaggio viene raccolto nella Buffer Waste Bag.

Eluizione finale delle cellule

Il magnete viene spostato nella posizione "OFF". All'inizio le cellule marcate magneticamente vengono eluite nella Priming Waste Bag. Solo al termine dell'ultima fase di caricamento, tutte le cellule marcate magneticamente (cellule non-bersaglio) vengono rilasciate dalla colonna di separazione e raccolte nella Negative Fraction Bag per ridurre il carryover con le cellule marcate nel tubo della pompa.

Scollegare le sacche e registrare il codice del processo

Al termine del ciclo la finestra indica la Schermata 7.84.



Schermata 7.84: Scollegare le sacche e registrare il codice del processo

1. Registrare il codice del processo.
2. Clampare o saldare il tubo sopra il blocco Luer che collega la Cell Collection Bag al set di tubi (cfr. Figura 7.25).

   Eseguire tre saldature nel tubo direttamente sotto la valvola n. 9. Tagliare con cautela la saldatura centrale per scollegare la Cell Collection Bag dal set di tubi.
3. Pesare la Cell Collection Bag riempita. Registrare il peso.

   Determinare il peso della frazione di cellule bersaglio sottraendo il peso della Cell Collection Bag vuota dal peso della Cell Collection Bag contenente le cellule bersaglio. Registrare il peso.
4. Mescolare accuratamente la sospensione cellulare target ruotando la sacca. Prelevare una quantità adeguata, ad es. 0,5 mL, e conservarla per l'analisi.
5. Con la termosaldatrice, saldare il tubo sopra il Luer Lock della Negative Fraction Bag. Eseguire tre saldature nel tubo. Tagliare la saldatura centrale per scollegare la Negative Fraction Bag.
6. Scollegare la Buffer Waste Bag allo stesso modo.
7. Togliere la Negative Fraction Bag e la Buffer Waste Bag. Conservare tutte le sacche fino al completamento dell'analisi finale di tutte le cellule.

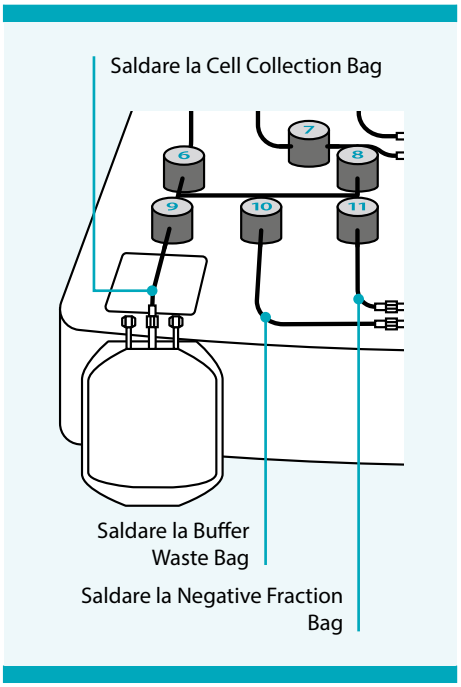


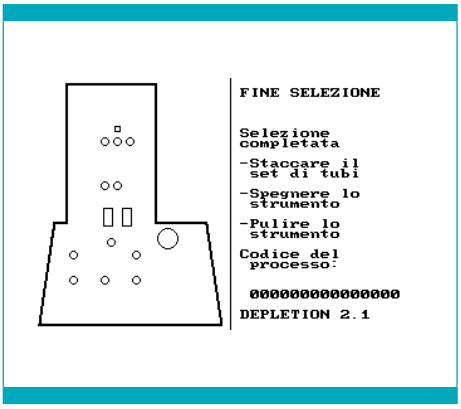
Figura 7.25: Scollegare le sacche

Ora è possibile processare le cellule bersaglio come da protocollo clinico.

Per proseguire, premere **ENT**.

Scollegare il set di tubi e spegnere

La finestra indica la Schermata 7.85.



Schermata 7.85: Scollegare il set di tubi e spegnere

1. Rimuovere il set di tubi: iniziare con le valvole n. 6, 9, e 10 e, procedendo verso l'alto, rilasciare il tubo dal sensore per i liquidi e dalle valvole premendo sulle valvole stesse. Rilasciare la colonna dal rispettivo supporto. Smaltire il set di tubi come materiale a rischio biologico secondo le procedure ospedaliere standard.
2. Spegnere il CliniMACS Plus Instrument.
3. Pulire lo strumento come da istruzioni, cfr. la sezione "Pulizia e disinfezione" nel Manuale d'uso del CliniMACS Plus Instrument. Seguire le procedure standard per il trattamento di materiale infetto.

Analisi delle cellule

IMPORTANTE

- *Se il volume non supera i 100 mL per trapianto a velocità di infusione adeguate, il CliniMACS PBS/EDTA Buffer non deve essere rimosso prima della somministrazione delle cellule bersaglio separate. Devono essere tenuti in considerazione le condizioni renali del paziente e gli effetti sugli elettroliti nel sangue. Soprattutto nei bambini, la velocità di infusione deve essere adattata di conseguenza.*
- *Se il volume della frazione di cellule bersaglio supera i 100 mL, deve essere ridotto con metodi idonei, ad esempio mediante centrifugazione o sostituzione del tampone, fino ad ottenere una soluzione per infusione approvata nel Paese dell'utilizzatore.*

⚠ ATTENZIONE

Rischio di ridotta qualità delle cellule bersaglio. Le cellule bersaglio devono essere analizzate per confermare che soddisfino i requisiti dell'utilizzatore, diversamente l'idoneità per l'applicazione clinica può essere compromessa. Esaminare le cellule bersaglio rispetto alla qualità e alla quantità a seconda dell'uso previsto.

Il controllo deve comprendere i seguenti parametri:

- numero totale di leucociti
- vitalità e numero totale di cellule target
- efficienza della deplezione

Si raccomanda inoltre di verificare il numero totale di leucociti e la vitalità della frazione di cellule non-bersaglio. L'elenco è un esempio e dovrebbe comprendere altri test in base all'uso previsto e ai protocolli clinici. Registrare i dati dell'analisi.

7.4.5 DEPLETION 3.1

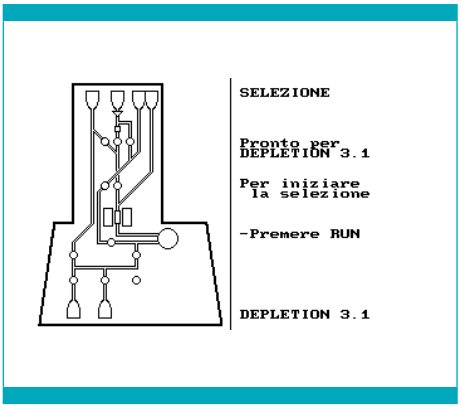
Una volta terminato il controllo finale, il CliniMACS Plus Instrument è pronto per iniziare la separazione. La finestra indica la Schermata 7.86.

Per proseguire, premere **RUN**.

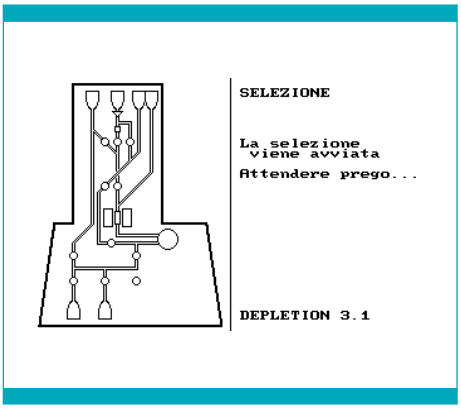
Una volta premuto **RUN**, lo strumento eseguirà automaticamente la procedura di separazione scelta.

Ad ogni fase dell'operazione, una schermata simile alla Schermata 7.87 visualizzerà lo stato della procedura di separazione.

L'indicatore di posizione del magnete è rappresentato da due caselle nere accanto alla colonna di separazione quando il magnete è "ON", cioè è stato spostato davanti per magnetizzare la colonna di separazione. Se la posizione dell'indicatore del magnete è trasparente (ad es. Schermata 7.86), il magnete è "OFF", cioè è stato spostato sul retro dello strumento. Con il magnete ritirato, la colonna di separazione si trova al di fuori del campo magnetico e non viene magnetizzata.



Schermata 7.86: Avvio della separazione



Schermata 7.87: Separazione in corso

Procedura di separazione

Depletion 3.1 è un programma di deplezione in due fasi, ovvero le cellule vengono applicate due volte alla colonna di separazione.

Nella prima parte del processo, la maggior parte delle cellule marcate subisce deplezione (Staged Cell Loading [Bulk Loading Stage]). Nella seconda parte del processo vengono depletate le poche cellule marcate rimaste (Sensitive Sample Loading [Sensitive Loading Stage]).

IMPORTANTE

All'inizio della separazione, il tampone viene pompato verso l'alto in direzione della Cell Preparation Bag per riempire il filtro di pre-sistema. Picchiettare delicatamente il lato del filtro più volte per rimuovere eventuali bolle intrappolate nel filtro.

Nota: se il numero di cellule marcate magneticamente (calcolato dal CliniMACS Plus Software) supera la capacità di legame della colonna di separazione, il programma di separazione carica e separa automaticamente il campione di cellule in porzioni più piccole ("staged loading"). Negli intervalli tra ogni stadio di caricamento, la colonna di separazione viene lavata per rimuovere tutte le cellule marcate. Le cellule marcate saranno eluite e conservate nella Non-Target Cell Bag. Il tampone di lavaggio viene raccolto nella Reapplication Bag.

Staged cell loading (Bulk Loading Stage)

La procedura di separazione inizia con il riempimento del filtro di pre-sistema per completare il priming del sistema. Poi ha inizio la separazione delle cellule marcate. La pompa aspira il contenuto della Cell Preparation Bag nel set di tubi. Le cellule marcate magneticamente (cellule non-bersaglio) vengono trattenute nella colonna di separazione, all'interno del campo magnetico, mentre le cellule non marcate (cellule bersaglio) vengono fatte passare e raccolte nella Cell Reapplication Bag.

Sensitive sample loading (Sensitive Loading Stage)

Per la deplezione successiva, le cellule nella Reapplication Bag vengono ricaricate nella colonna di separazione a una velocità più bassa. Mentre le poche cellule marcate rimanenti vengono ora trattenute nella colonna, le cellule non marcate (cellule bersaglio) passano attraverso il campo magnetico e vengono raccolte nella Cell Collection Bag.

Risciacquo del filtro di pre-sistema e della Reapplication Bag

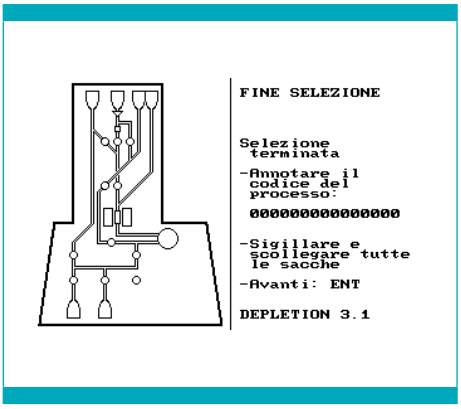
Dopo che il campione cellulare ha completato entrambe le deplezioni (bulk e sensibile), la Reapplication Bag e il filtro di pre-sistema vengono risciacquati due volte con tampone per ridurre la perdita di cellule nel sistema.

Rimozione delle cellule non-bersaglio

Il magnete viene spostato nella posizione "OFF". Le cellule marcate magneticamente (cellule non-bersaglio) vengono rilasciate dalla colonna di separazione e raccolte nella Non-Target Cell Bag dopo ogni fase di caricamento.

Scollegare le sacche e registrare il codice del processo

Al termine del ciclo la finestra indica la Schermata 7.88.



Schermata 7.88: Scollegare le sacche e registrare il codice del processo

1. Registrare il codice del processo.
2. Clampare o saldare il tubo sopra il blocco Luer che collega la Cell Collection Bag al set di tubi (cfr. Figura 7.26).

   Eseguire tre saldature nel tubo direttamente sotto la valvola n. 9. Tagliare con cautela la saldatura centrale per scollegare la Cell Collection Bag dal set di tubi.
3. Pesare la Cell Collection Bag riempita. Registrare il peso.

   Determinare il peso della frazione di cellule bersaglio sottraendo il peso della Cell Collection Bag vuota dal peso della Cell Collection Bag contenente le cellule bersaglio. Registrare il peso.
4. Mescolare accuratamente la sospensione cellulare target ruotando la sacca. Prelevare una quantità adeguata, ad es. 0,5 mL, e conservarla per l'analisi.
5. Con la termosaldatrice, saldare il tubo sopra il blocco Luer della Buffer Waste Bag. Eseguire tre saldature nel tubo. Tagliare la saldatura centrale per scollegare la Buffer Waste Bag.
6. Scollegare la Non-Target Cell Bag allo stesso modo.
7. Rimuovere la Non-Target Cell Bag e la Buffer Waste Bag. Conservare tutte le sacche fino al completamento dell'analisi finale di tutte le cellule.

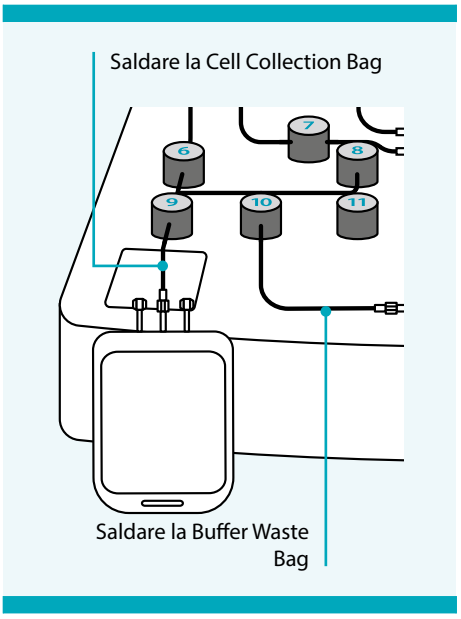


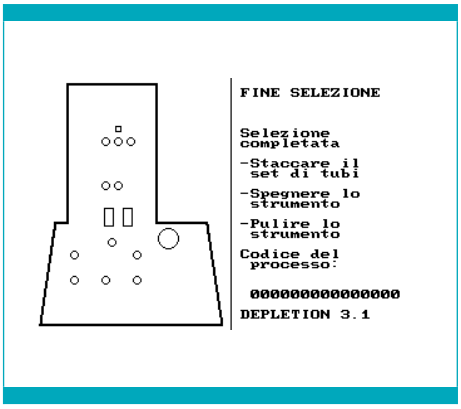
Figura 7.26: Scollegare le sacche

Ora è possibile processare le cellule bersaglio come da protocollo clinico.

Per proseguire, premere **ENT**.

Scollegare il set di tubi e spegnere

La finestra indica la Schermata 7.89.



Schermata 7.89: Scollegare il set di tubi e spegnere

1. Rimuovere il set di tubi: iniziare con le valvole n. 6, 9, e 10 e, procedendo verso l'alto, rilasciare il tubo dal sensore per i liquidi e dalle valvole premendo sulle valvole stesse. Rilasciare la colonna dal rispettivo supporto. Smaltire il set di tubi come materiale a rischio biologico secondo le procedure ospedaliere standard.
2. Spegnere il CliniMACS Plus Instrument.
3. Pulire lo strumento come da istruzioni, cfr. la sezione "Pulizia e disinfezione" nel Manuale d'uso del CliniMACS Plus Instrument. Seguire le procedure standard per il trattamento di materiale infetto.

Analisi delle cellule

IMPORTANTE

- *Se il volume non supera i 100 mL per trapianto a velocità di infusione adeguate, il CliniMACS PBS/EDTA Buffer non deve essere rimosso prima della somministrazione delle cellule bersaglio separate. Devono essere tenuti in considerazione le condizioni renali del paziente e gli effetti sugli elettroliti nel sangue. Soprattutto nei bambini, la velocità di infusione deve essere adattata di conseguenza.*
- *Se il volume della frazione di cellule bersaglio supera i 100 mL, deve essere ridotto con metodi idonei, ad esempio mediante centrifugazione o sostituzione del tampone, fino ad ottenere una soluzione per infusione approvata nel Paese dell'utilizzatore.*

⚠ ATTENZIONE

Rischio di ridotta qualità delle cellule bersaglio. Le cellule bersaglio devono essere analizzate per confermare che soddisfino i requisiti dell'utilizzatore, diversamente l'idoneità per l'applicazione clinica può essere compromessa. Esaminare le cellule bersaglio rispetto alla qualità e alla quantità a seconda dell'uso previsto.

Il controllo deve comprendere i seguenti parametri:

- numero totale di leucociti
- vitalità e numero totale di cellule target
- efficienza della deplezione

Si raccomanda inoltre di verificare il numero totale di leucociti e la vitalità della frazione di cellule non-bersaglio. L'elenco è un esempio e dovrebbe comprendere altri test in base all'uso previsto e ai protocolli clinici. Registrare i dati dell'analisi.

8 Risoluzione degli errori

Questo capitolo costituisce un riferimento per possibili eventi imprevisti che potrebbero verificarsi e per azioni correttive adeguate. Per informazioni su eventi non contemplati in questo capitolo, si invita a contattare quanto prima il Miltenyi Biotec Technical Support.

Nota: l'ordine di questo capitolo segue la sequenza di separazione.

8.1 Miltenyi Biotec Technical Support

In caso di malfunzionamenti dello strumento o interruzioni del processo che non possono essere ripristinati dall'operatore (messaggi di errore), contattare il team del Miltenyi Biotec Technical Support:

+49 2204 8306-3803
technicalsupport@miltenyi.com

Per le informazioni di contatto del Miltenyi Biotec Technical Support locale, visitare il sito www.miltenyibiotec.com.

8.2 Preparazione del prodotto di leucaferesi

Il campione ricevuto è diluito

La marcatura magnetica viene eseguita preferibilmente in un prodotto di leucaferesi diluito. Aggiustare il prodotto di leucaferesi ad una diluizione finale di circa 1:3. Se il campione ricevuto presenta una diluizione superiore al rapporto 1:3, o se l'operatore non conosce esattamente la concentrazione di plasma nel campione, aggiungere immunoglobulina al campione prima dell'aggiunta del reagente (concentrazione raccomandata di immunoglobulina nel volume di marcatura: 1,5 mg/mL). È importante avere una determinata quantità di immunoglobulina nel campione durante la marcatura allo scopo di ridurre al minimo il legame aspecifico del reagente.

Il numero delle cellule bersaglio nel prodotto di leucaferesi è basso

La mobilizzazione delle cellule staminali è stata insufficiente. Controllare l'analisi del prodotto di leucaferesi.

■ Scarsa vitalità delle cellule nel prodotto di leucaferesi

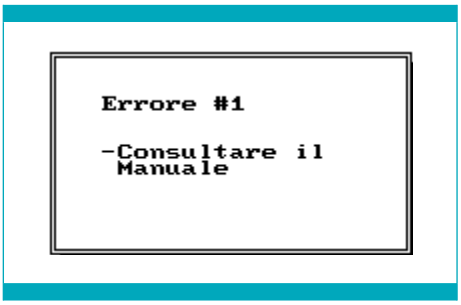
Il prodotto di leucaferesi potrebbe essere stato raccolto, conservato o trasportato in modo inappropriato. Per garantire una migliore qualità del campione, la preparazione e la separazione del prodotto di leucaferesi devono essere eseguite immediatamente dopo la leucaferesi. Conservare il prodotto di leucaferesi ad una concentrazione di leucociti inferiore a $0{,}2\times10^9$ per mL. Se necessario, diluire il prodotto di leucaferesi con plasma autologo. Il prodotto di leucaferesi non deve avere più di 24 ore quando si inizia la procedura di marcatura e separazione. Se il prodotto di leucaferesi deve essere conservato, ad esempio per una notte, va mantenuto a temperatura ambiente controllata (tra +19 °C e +25 °C [tra +66 °F e +77 °F]).

8.3 CliniMACS Plus Instrument e set di tubi CliniMACS

8.3.1 Messaggi di errore

Possono verificarsi diversi malfunzionamenti dello strumento o del software, che vengono contrassegnati come tali e visualizzati sullo schermo. Si tratta di errori interni che non possono essere corretti dall'operatore. Registrare il numero di errore e contattare il Miltenyi Biotec Technical Support.

Un possibile messaggio di errore viene mostrato nella Schermata 8.1.



Schermata 8.1: Messaggio di errore n.°1

Al di là dei messaggi di errore, i malfunzionamenti che possono essere corretti dall'operatore sono contrassegnati come "Messaggi di avviso" (cfr. sezione 8.4.1).

8.3.2 Caricamento e priming del set di tubi

■ La valvola non si apre quando l'operatore deve inserire il tubo in una particolare valvola

Le valvole sono progettate per funzionare correttamente una volta inserito il tubo. Premere la valvola manualmente per aprirla. Osservare attentamente la valvola durante la sequenza di azionamento della valvola. Se la valvola non si abbassa, cfr. sezione "La valvola non si abbassa durante la sequenza di azionamento".

■ La valvola non si abbassa durante la sequenza di azionamento

Verificare che i tubi siano correttamente inseriti. Controllare che le valvole siano state pulite a fondo. Eventuali valvole contaminate da liquidi devono essere sostituite. Contattare il Miltenyi Biotec Technical Support.

- Perdita di tampone dal set di tubi durante il priming

  Il set di tubi è difettoso. Spegnere il CliniMACS Plus Instrument e riavviare il priming con un nuovo set di tubi installato e una quantità sufficiente di nuovo tampone.

- Eccessiva presenza di aria nel set di tubi dopo il priming

  La sacca di tampone non è stata perforata correttamente. Usare un nuovo set di tubi e una quantità sufficiente di nuovo tampone e riavviare la separazione CliniMACS Plus. Verificare che il setto della sacca di tampone sia correttamente forato.

- Volume di tampone imprevisto nelle sacche dopo il priming. Dopo il priming, il liquido deve essere raccolto solo nella Priming Waste Bag e nella Buffer Waste Bag

  Il set di tubi non è stato montato correttamente. Se il set di tubi non è installato correttamente o le valvole non funzionano correttamente, il liquido può fuoriuscire dietro le valvole. Rimuovere il set di tubi e sostituirlo con uno nuovo. Riavviare la procedura di priming con una quantità sufficiente di nuovo tampone. Prestazioni scadenti della separazione sul CliniMACS Plus possono essere conseguenza di un set di tubi non correttamente inserito.

- Il motore della pompa si blocca durante il priming

  Il tubo della pompa non è stato inserito correttamente. Premere **STOP** per interrompere il priming, quindi spegnere (“OFF”) e riaccendere (“ON”) l’alimentazione. Clampare la linea del tampone con una pinzetta per clampaggio durante la procedura di installazione, correggere la posizione del tubo della pompa e rimuovere la pinzetta per clampaggio prima di riavviare la sequenza di priming.

8.4 Separazione automatica delle cellule

8.4.1 Messaggi di avviso

A differenza dei messaggi di errore (cfr. sezione 8.3.1), i messaggi di avviso compaiono sullo schermo quando il sistema di controllo interno del CliniMACS Plus Instrument riconosce un malfunzionamento che può essere corretto dall’operatore. Di solito un messaggio di avviso è accompagnato da un messaggio acustico (“beep”). Se durante la separazione sul CliniMACS Plus compare un messaggio di avviso, seguire le istruzioni sullo schermo per procedere con la separazione cellulare. In generale, i messaggi di avviso vengono visualizzati quando si preme **STOP**, quando la porta della pompa è aperta, quando la pompa si blocca o quando il sensore per i liquidi rileva un errore.

Poiché durante i diversi programmi di separazione possono verificarsi diversi tipi di eventi imprevisti, la sezione seguente è suddivisa su questa base.

8.4.2 Eventi imprevisti: tutti i programmi di separazione

Rilevato errore nel sensore per i liquidi

Il messaggio di avviso n. 1 appare durante la fase iniziale del processo di caricamento delle cellule se il sensore per i liquidi non è in grado di rilevare il liquido nel tubo. Poiché il filtro di pre-sistema viene risciacquato con il tampone prima del caricamento delle cellule, deve essere presente del liquido nel tubo.



Figura 8.1: Messaggio di avviso n. 1

Controllare i seguenti punti:

1. Il set di tubi è stato inserito correttamente? Nel sensore per i liquidi? Se la risposta è negativa, inserirlo correttamente.
2. Il tubo è riempito con tampone? Se la risposta è negativa, cfr. punto 3.
3. Se il tubo non è pieno di tampone, ispezionare il tubo per verificare la presenza di attorcigliamenti che bloccano il flusso del tampone verso l'alto nel filtro di pre-sistema e nella Cell Preparation Bag. Aggiustare la posizione del set di tubi. Se necessario, alzare o abbassare gli appendi-sacche servendosi dei rispettivi morsetti. Regolare la posizione dei tubi nelle valvole. Per modificare la posizione dei tubi, aprire la valvola premendo il pulsante manualmente. Verificare che il tubo non sia piegato, attorcigliato o in tensione.
4. La Cell Preparation Bag è correttamente perforata? Verificare che il filtro di pre-sistema sia penetrato nel setto della porta della Cell Preparation Bag.
5. Se il set di tubi non è stato completamente riempito con tampone: il perforatore per il tampone del set di tubi è penetrato nella sacca di tampone? Per la correzione cfr. "Eccessiva presenza di aria nel set di tubi dopo il priming" nella sezione 8.3.2.

Dopo l'intervento correttivo, continuare la separazione in corso e premere **5**. Se il messaggio di avviso n. 1 compare di nuovo dopo che sono state escluse tutte le possibili cause sopra elencate, il sensore per i liquidi potrebbe essere difettoso. Contattare il Miltenyi Biotec Technical Support.

Le cellule si spostano nella parte sbagliata del set di tubi. Il liquido fuoriesce dalla/e valvola/e

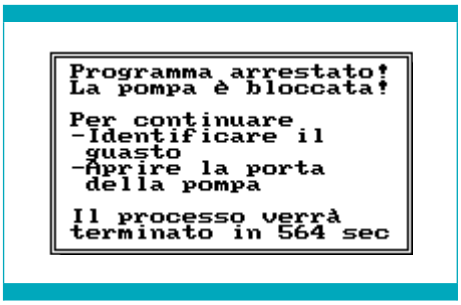
- Il set di tubi non è stato inserito correttamente. Se lo strumento è in funzione, premere **STOP** e clampare la linea con una pinzetta per clampaggio. Regolare il tubo premendo prima la relativa valvola. Rimuovere la pinzetta per clampaggio e premere **RUN** per riprendere la separazione. Se non si preme **RUN** entro 600 secondi, la separazione cellulare sarà interrotta.
- La valvola non funziona correttamente. Premere **STOP**. Clampare la linea con una pinzetta per clampaggio. Premere manualmente la valvola più volte per sbloccare la valvola bloccata. Rimuovere la pinzetta per clampaggio e premere **RUN** per continuare. Se non si preme **RUN** entro 600 secondi, la separazione cellulare sarà interrotta. Se l'utilizzatore non è in grado di sbloccare la valvola, contattare il Miltenyi Biotec Technical Support.
- Si sta usando il programma di software errato. Controllare sul display il nome del programma attualmente in uso. Interrompere il ciclo premendo **STOP** e contattare immediatamente il Miltenyi Biotec Technical Support.

Il magnete non si muove

Il comando del magnete non funziona. Si è verificato un guasto al comando del magnete. Viene visualizzato un messaggio di errore (cfr. sezione 8.3.1). Registrare il numero di errore e contattare il Miltenyi Biotec Technical Support.

Il motore della pompa si blocca durante la separazione cellulare

Il tubo della pompa non è stato inserito correttamente, quindi la pompa potrebbe non essere in grado di ruotare. In questo caso viene visualizzato sullo schermo il messaggio di avviso n. 2. L'operatore ha quindi 600 secondi per correggere la posizione del tubo della pompa.



Schermata 8.2: Messaggio di avviso n. 2

1. Rimuovere con attenzione il tubo della pompa dalla pompa.
2. Verificare che il tubo della pompa non sia stato danneggiato da un inserimento errato. Se il tubo della pompa perde, clampare il tubo al di sopra e al di sotto della colonna di separazione per salvare le cellule trattenute sulla colonna e contattare il Miltenyi Biotec Technical Support.
3. Se il tubo della pompa non è stato danneggiato, può essere reinserito nell'alloggiamento della pompa.
4. Premere **RUN** per riavviare la separazione entro 600 secondi, altrimenti la separazione verrà interrotta.

Se il tubo della pompa è piatto e collassato, significa che la colonna è intasata. In questo caso contattare il Miltenyi Biotec Technical Support.

■ Il caricamento del campione non si arresta anche se la Cell Preparation Bag e il filtro di pre-sistema sono vuoti

Il sensore per i liquidi non funziona correttamente, ad esempio perché la superficie del tubo all'interno del sensore è bagnata. Premere **STOP** per interrompere la separazione. Togliere il tubo dal sensore per i liquidi. Asciugare il tubo e l'area di contatto con un panno di carta o un materiale assorbente. Riposizionare il tubo nel sensore per i liquidi e premere **RUN**. Non interrompere la sequenza per più di 600 secondi, altrimenti la separazione cellulare verrà interrotta.

Se non è possibile attivare il sensore per i liquidi in questo modo, premere **STOP**, quindi **2** e confermare con **ENT** per saltare il caricamento del campione e continuare la separazione.

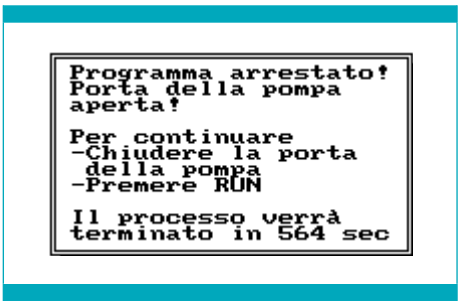
8.4.3 Eventi imprevisti: solo programmi di arricchimento

■ Il ciclo viene interrotto prima del termine del programma di separazione cellulare

- Porta della pompa aperta: per motivi di sicurezza, la separazione in corso si arresta automaticamente durante il funzionamento dello strumento se viene aperta la porta della pompa. Sullo schermo verrà visualizzato il messaggio n. 5.

  Chiudere la porta della pompa e premere **RUN**.

  Se, come in questo caso, **RUN** non viene premuto entro 600 secondi, la separazione cellulare si interromperà e non verrà completata. Recuperare la maggior parte possibile del campione dal set di tubi eseguendo l'EMERGENCY PROGRAM.



Schermata 8.3: Messaggio di avviso n. 5

- Interruzione di alimentazione: l'interruzione di alimentazione comporta l'arresto della separazione sul CliniMACS Plus. La separazione cellulare non sarà completata dopo il ripristino dell'alimentazione. Recuperare la maggior parte possibile del campione dal set di tubi eseguendo l'EMERGENCY PROGRAM.

8.4.4 Eventi imprevisti: CD34 SELECTION 1/2

- Il caricamento si interrompe prima che il campione sia stato caricato completamente nelle colonne

  Il filtro di pre-sistema è intasato a causa di una grande quantità di detriti cellulari o di un riempimento incompleto del filtro. A causa del continuo pompaggio, si è creato un vuoto che ha portato alla generazione di bolle d'aria che hanno attivato il sensore per i liquidi. Pertanto il processo di separazione è proseguito con i lavaggi della colonna prima di poter caricare tutto il campione. Non è possibile riavviare il caricamento del campione una volta interrotta la sequenza di caricamento.

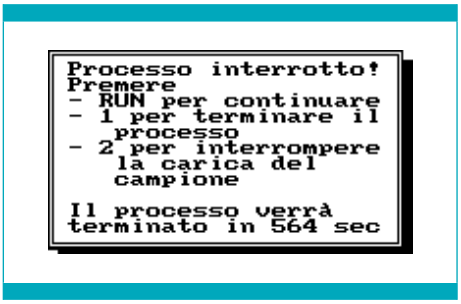
  Consentire al CliniMACS Plus Instrument di terminare il programma di separazione. Non interrompere il ciclo in corso, perché l'interruzione potrebbe comportare inutili perdite di cellule. Al termine della procedura di separazione, filtrare il campione rimanente con un filtro per sangue in-linea da 200 µm e trasferirlo in una nuova sacca di trasferimento. Eseguire immediatamente una seconda separazione con un nuovo set di tubi e una quantità sufficiente di nuovo tampone.

- Tubo della pompa collassato e/o aria in eccesso nel set di tubi sotto la pre-colonna durante il caricamento delle cellule

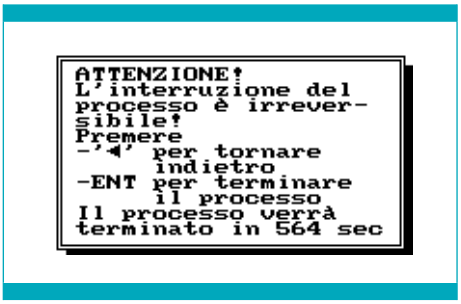
  La pre-colonna è intasata a causa di una grande quantità di detriti cellulari nella Cell Preparation Bag. È necessario saltare manualmente il caricamento del campione rimanente e continuare la separazione con le cellule che sono già state caricate nel sistema.

1. Premere **STOP** per interrompere il caricamento delle cellule. Verrà visualizzato il messaggio di avviso n. 3.
2. Premere **2** per saltare il processo di caricamento delle cellule.

   Verrà visualizzato il messaggio di avviso n. 4, che darà all'operatore la possibilità di confermare o modificare la decisione, poiché saltare il caricamento del campione è un'operazione irreversibile.
3. Premendo **ENT**, il programma di separazione interromperà il caricamento del campione e continuerà con i lavaggi della colonna.



Schermata 8.4: Messaggio di avviso n. 3



Schermata 8.5: Messaggio di avviso n. 4

Clampare il tubo al di sotto del filtro di pre-sistema per evitare che le cellule fuoriescano dalla Cell Preparation Bag e penetrino nel set di tubi. Al termine della procedura di separazione, filtrare il campione rimanente con un filtro per sangue in-linea da 200 µm e trasferirlo in una nuova sacca di trasferimento.

Eseguire immediatamente una seconda separazione con un nuovo set di tubi e una quantità sufficiente di nuovo tampone.

8.4.5 Eventi imprevisti: ENRICHMENT 1.1

- Il caricamento si interrompe prima che il campione sia stato caricato completamente nelle colonne

  Il filtro di pre-sistema è intasato a causa di una grande quantità di detriti cellulari o di un riempimento incompleto del filtro. A causa del continuo pompaggio, si è creato un vuoto che ha portato alla generazione di bolle d'aria, che a loro volta hanno attivato il sensore per i liquidi, e il processo di separazione è passato direttamente allo stadio finale di caricamento del campione. Al termine della separazione, una parte del campione potrebbe rimanere nella Cell Preparation Bag.

  Consentire al CliniMACS Plus Instrument di terminare il programma di separazione. Non interrompere il ciclo in corso, perché l'interruzione potrebbe comportare inutili perdite di cellule.

Determinare il numero totale di cellule, la percentuale di cellule bersaglio e il volume di caricamento del campione rimanente nella Cell Preparation Bag, quindi inserire i parametri del campione corrente durante la configurazione dello strumento (FASE 2). Al termine della procedura di separazione, filtrare il campione rimanente con un filtro per sangue in-linea da 200 µm e trasferirlo in una nuova sacca di trasferimento. Eseguire immediatamente una seconda separazione con un nuovo set di tubi e una quantità sufficiente di nuovo tampone.

- Sono stati inseriti parametri del campione errati

  Il volume di caricamento del campione inserito era inferiore al volume effettivo nella Cell Preparation Bag collegata. Non è possibile riavviare il caricamento del campione una volta che è stato interrotto.

  Consentire al CliniMACS Plus Instrument di terminare il programma di separazione. Non interrompere il ciclo in corso, perché l'interruzione potrebbe comportare inutili perdite di cellule.

  Determinare il numero totale di cellule, la percentuale di cellule bersaglio e il volume di caricamento del campione rimanente nella Cell Preparation Bag, quindi inserire i parametri del campione corrente durante la configurazione dello strumento (FASE 2). Processare il campione rimanente con un nuovo set di tubi, un nuovo filtro di pre-sistema e una quantità sufficiente di nuovo tampone.

- Il motore della pompa si blocca durante l'eluizione delle cellule bersaglio nella Cell Collection Bag

  La pinzetta per clampaggio sulla Cell Collection Bag non è aperta durante la sequenza di eluizione. Pertanto il percorso verso la Cell Collection Bag è bloccato.

  Premere **STOP** e aprire la pinzetta per clampaggio sulla Cell Collection Bag. Aprire la porta della pompa e controllare che il tubo della pompa sia correttamente inserito. Chiudere la porta della pompa e premere **RUN** per riavviare la sequenza di eluizione entro 600 secondi.

8.4.6 Eventi imprevisti: ENRICHMENT 3.2

- Il caricamento si interrompe prima che il campione sia stato caricato completamente nelle colonne

  Il filtro di pre-sistema è intasato a causa di una grande quantità di detriti cellulari o di un riempimento incompleto del filtro. A causa del continuo pompaggio, si è creato un vuoto che ha portato alla generazione di bolle d'aria, che a loro volta hanno attivato il sensore per i liquidi, e il processo di separazione è proseguito con i lavaggi della colonna prima che fosse caricato tutto il campione. Non è possibile riavviare il caricamento del campione una volta interrotta la sequenza di caricamento.

  Consentire al CliniMACS Plus Instrument di terminare il programma di separazione. Non interrompere il ciclo in corso, perché l'interruzione potrebbe comportare inutili perdite di cellule.

Al termine della procedura di separazione, filtrare il campione rimanente con un filtro per sangue in-linea da 200 µm e trasferirlo in una nuova sacca di trasferimento. Eseguire immediatamente una seconda separazione con un nuovo set di tubi e una quantità sufficiente di nuovo tampone.

- Il motore della pompa si blocca durante l'eluizione delle cellule bersaglio nella Cell Collection Bag

  La pinzetta per clampaggio sulla Cell Collection Bag non è aperta durante la sequenza di eluizione. Pertanto il percorso verso la Cell Collection Bag è bloccato.

  Premere **STOP** e aprire la pinzetta per clampaggio sulla Cell Collection Bag. Aprire la porta della pompa e controllare se il tubo della pompa sia correttamente inserito. Chiudere la porta della pompa e premere **RUN** per riavviare la sequenza di eluizione entro 600 secondi.

8.4.7 Programma di emergenza (da usare solo con i programmi di arricchimento)

Se, per qualsiasi motivo, un ciclo si è interrotto in maniera irreversibile prima dell'eluizione delle cellule bersaglio dalla colonna di separazione, è possibile eseguire il programma di emergenza per eluire le cellule dalla colonna di separazione. Questo programma è stato progettato solo per essere utilizzato con tutti i programmi di arricchimento insieme a un CliniMACS Tubing Set (REF 161-01) o a un CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01).

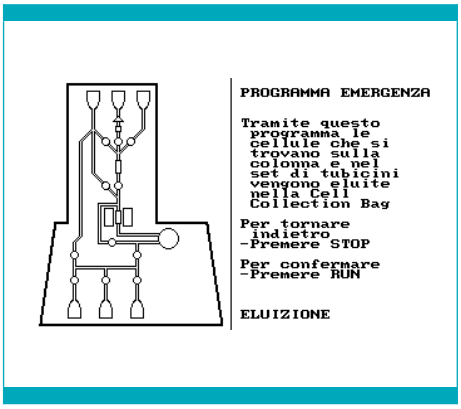
Il programma di emergenza non deve essere usato con i programmi di deplezione.

Nota: il programma di emergenza eluirà ca. 75 mL di liquido. Verificare che al set di tubi sia collegata una Cell Collection Bag idonea.

1. Per verificare che la colonna di separazione non sia magnetizzata, spegnere lo strumento, attendere 5 secondi e riaccenderlo. Il magnete verrà ritirato dall'unità di separazione magnetica (cfr. la sezione "Descrizione" nel Manuale d'uso del CliniMACS Plus Instrument). Verificare ciò tenendo un piccolo oggetto magnetizzabile sull'unità di separazione magnetica. Se il magnete non è stato ritirato, o se vi è un'interruzione di alimentazione in corso, contattare il Miltenyi Biotec Technical Support.

2. Attendere che venga visualizzata la schermata principale (cfr. la sezione "Installazione" nel Manuale d'uso del CliniMACS Plus Instrument).

   Per richiamare un programma di emergenza, premere **4**. La finestra indica la Schermata 8.6.



Schermata 8.6: Programma di emergenza

3. Per continuare con l'eluizione delle cellule bloccate, premere **RUN**.

   Nota: per uscire dal programma di emergenza senza avviare l'eluizione delle cellule bloccate, premere **STOP**.

4. Trasferire le cellule eluite raccolte nella Cell Collection Bag in una nuova sacca di trasferimento da 600 mL. Eventualmente unire le cellule rimanenti nella Cell Preparation Bag con le cellule eluite dal programma di emergenza. Avviare una nuova procedura di separazione con un nuovo set di tubi e una quantità sufficiente di nuovo tampone.

8.4.8 Eventi imprevisti: DEPLETION 2.1

■ Le cellule bersaglio non raggiungono la Cell Collection Bag

La pompa non è in grado di caricare il prodotto dalla Cell Preparation Bag perché la pinzetta per clampaggio sulla Cell Collection Bag non è aperta durante la sequenza di caricamento delle cellule. Premere **STOP** e aprire la pinzetta per clampaggio sulla Cell Collection Bag. Continuare il processo di deplezione premendo **RUN**.

Consentire al CliniMACS Plus Instrument di terminare il programma di separazione. Non interrompere il ciclo in corso perché l'interruzione potrebbe comportare inutili perdite di cellule. Se una parte del prodotto rimane nella Cell Preparation Bag dopo il completamento della procedura di deplezione, processare le cellule rimanenti con un nuovo set di tubi, un nuovo filtro di pre-sistema e una quantità sufficiente di nuovo tampone.

Determinare il numero totale di cellule, la percentuale di cellule marcate e il volume di caricamento del campione, quindi inserire i parametri del campione corrente durante la configurazione dello strumento (FASE 2) e avviare la nuova deplezione.

■ Il caricamento si interrompe prima che il campione sia stato caricato completamente nelle colonne

Bolle d'aria dal campione e/o dal filtro di pre-sistema hanno attivato il sensore per i liquidi prima che fosse caricato tutto il campione. Interrompere il ciclo corrente e controllare il numero totale di cellule e l'efficienza della deplezione delle cellule nella Cell Collection Bag. Se necessario, processare il campione rimanente con un nuovo set di tubi, un nuovo filtro di pre-sistema e una quantità sufficiente di nuovo tampone.

Determinare il numero totale di cellule, la percentuale di cellule marcate e il volume di caricamento del campione, quindi inserire i parametri del campione corrente durante la configurazione dello strumento (FASE 2) e avviare la nuova deplezione.

8.4.9 Eventi imprevisti: DEPLETION 3.1

■ Il caricamento si interrompe durante lo Staged Cell Loading, prima che il campione sia stato caricato completamente nelle colonne

- Il filtro di pre-sistema è stato inserito al contrario. Pertanto la funzione della camera di gocciolamento non è disponibile e le bolle d'aria possono passare direttamente attraverso il sensore per i liquidi, causando la fine del caricamento del campione prima che sia stato caricato l'intero campione. Lo strumento continua il processo di deplezione iniziando direttamente la fase successiva. Non è possibile riavviare il caricamento del campione una volta che è stato interrotto.
- Il filtro di pre-sistema è intasato a causa di una grande quantità di detriti cellulari o di un riempimento incompleto del filtro. A causa del continuo pompaggio, si è creato un vuoto che ha portato alla generazione di bolle d'aria, che a loro volta hanno attivato il sensore per i liquidi, e il processo di separazione è passato direttamente allo stadio finale di caricamento del campione. Al termine della separazione, una parte del campione potrebbe rimanere nella Cell Preparation Bag.

Interrompere il ciclo in corso e unire i contenuti della Reapplication Bag e della Cell Preparation Bag. Processare le cellule rimanenti con un nuovo set di tubi, un nuovo filtro di pre-sistema e una quantità sufficiente di nuovo tampone.

■ Arresto del caricamento durante il Sensitive Sample Loading (Sensitive Loading Stage)

La Reapplication Bag è appesa più in basso rispetto alla Cell Preparation Bag. Durante la fase di caricamento sensibile, la Cell Preparation Bag funziona a vuoto prima che il volume della Reapplication Bag sia completamente caricato. È quindi possibile che una bolla d'aria attivi il sensore per i liquidi prima che il campione sia completamente caricato dalla Reapplication Bag al termine della procedura di deplezione. Non è possibile riavviare il caricamento del campione una volta che è stato interrotto.

Consentire al CliniMACS Plus Instrument di terminare il programma di separazione. Non interrompere il ciclo in corso, perché l'interruzione potrebbe comportare inutili perdite di cellule. Processare il campione rimanente con un nuovo set di tubi, un nuovo filtro di pre-sistema e una quantità sufficiente di nuovo tampone.

Determinare il numero totale di cellule, la percentuale di cellule marcate e il volume di caricamento del campione, quindi inserire i parametri del campione corrente durante la configurazione dello strumento (FASE 2). Considerare la

necessità obbligataoria di tre appendi-sacche grandi per il programma DEPLETION 3.1 e fare riferimento alle istruzioni di installazione per le altezze adeguate delle sacche (cfr. sezione 7.3.3).

- Le cellule bersaglio (cellule non marcate) non raggiungono la Reapplication Bag durante lo Staged Cell Loading Bulk (Loading Stage)

  È stato inserito un tubo sbagliato nella valvola n. 3 (braccio destro del tubo della Reapplication Bag al posto del braccio sinistro (raccordo a Y) del tubo). Premere **STOP** e rimuovere il tubo sbagliato dalla valvola n. 3. Inserire manualmente il tubo corretto (braccio sinistro del tubo della Reapplication Bag) nella valvola n. 3 come descritto nelle istruzioni di installazione. Premere **RUN** per continuare con la procedura di deplezione entro 600 secondi.

  Consentire al CliniMACS Plus Instrument di terminare il programma di separazione. Non interrompere il ciclo in corso perché l'interruzione potrebbe comportare inutili perdite di cellule. Controllare l'efficacia della deplezione della frazione di cellule bersaglio nella Cell Collection Bag. Se l'efficacia della deplezione non è sufficiente, ripetere la procedura di deplezione con un nuovo set di tubi, un nuovo filtro di pre-sistema e una quantità sufficiente di nuovo tampone.

  Determinare il numero totale di cellule, la percentuale di cellule marcate e il volume di caricamento del campione, quindi inserire i valori dei parametri del campione corrente durante la configurazione dello strumento (FASE 2) e avviare la nuova deplezione.

- Le cellule fluiscono nella sacca di tampone durante le fasi di risciacquo gravimetrico

  La sacca di tampone è appesa troppo in basso (più in basso della Cell Preparation Bag). Premere **STOP** e regolare l'appendi-sacca nella posizione corretta. Verificare che siano installati tre appendi-sacche grandi per il programma DEPLETION 3.1 e fare riferimento alle istruzioni di installazione per le altezze adeguate delle sacche (cfr. sezione 7.3.3).

  - Se le cellule non hanno raggiunto la sacca di tampone, è sufficiente aprire manualmente le valvole n. 1 e 2 per consentire un breve controflusso delle cellule nella Cell Preparation Bag. Quando la sacca di tampone è di nuovo vuota, chiudere le valvole n. 1 e 2, quindi premere **RUN** per continuare con la procedura di deplezione entro 600 secondi.
  - Se le cellule non hanno raggiunto la sacca di tampone, sostituire la sacca aprendo manualmente le valvole n. 1 e 2 per un breve lavaggio del tubo della sacca di tampone e premere **RUN** per continuare con la procedura di deplezione entro 600 secondi. Se necessario, processare il campione rimanente nella sacca di tampone (se il volume supera i 300 mL, trasferire prima il campione in una sacca centrifugabile per la riduzione del volume) utilizzando un nuovo set di tubi, un nuovo filtro di pre-sistema e una quantità sufficiente di nuovo tampone.

■ Il motore della pompa si blocca durante la prima eluizione delle cellule marcate nella Non-Target Cell Bag

- La inzetta per clampaggio non è stata rimossa dopo il test di integrità. Premere **STOP** e rimuovere la pinzetta per clampaggio. Aprire la porta della pompa e controllare che il tubo della pompa sia correttamente inserito. Chiudere la porta della pompa e premere **RUN** per riavviare la sequenza di eluizione entro 600 secondi.
- È stato inserito un tubo sbagliato nella valvola n. 3 (il tubo della Non-Target Cell Bag al posto del braccio sinistro (raccordo a Y) della Reapplication Bag). Premere **STOP** e rimuovere il tubo della Non-Target Cell Bag dalla valvola n. 3. Inserire manualmente il tubo corretto (braccio sinistro del tubo della Reapplication Bag) nella valvola n. 3 come descritto nelle istruzioni di installazione. Premere **RUN** per riavviare la sequenza di eluizione entro 600 secondi.

8.5 Performance di separazione cellulare

8.5.1 Eventi imprevisti: solo programmi di arricchimento

■ La resa delle cellule bersaglio è bassa

- Le cellule bersaglio erano scarsamente marcate con il reagente.
  - Il reagente è scaduto. Controllare la data di scadenza. Non usare i reagenti dopo la data di scadenza.
  - Il reagente non è stato conservato correttamente. Controllare la temperatura di conservazione. Non utilizzare reagenti che non siano stati correttamente conservati (cfr. istruzioni per l'uso dei reagenti).
  - Non è stata seguita la procedura di marcatura raccomandata. Fare riferimento alle sezioni relative alla procedura di preparazione e separazione del campione nel manuale d'uso.
- Sono andate perse cellule durante le fasi di preparazione.
  - Le cellule sono state rimosse con il sovranatante nella Plasma Waste Bag e nelle Wash Waste Bag a causa di sedimentazione incompleta o risospensione troppo precoce, ad esempio quando la sacca è stato tolta dalla centrifuga. Confrontare il contenuto di leucociti della preparazione cellulare non marcata e di quella marcata. Controllare le impostazioni di centrifugazione per una corretta centrifugazione. Determinare la conta cellulare da tutte le sacche degli scarti.
  - Il tampone non conteneva HSA. Aggiungere HSA al tampone fino ad una concentrazione finale dello 0,5% (p/v), (cfr. la sezione "Materiali CliniMACS necessari" della rispettiva applicazione).
  - Le impostazioni della centrifuga erano sub-ottimali. Controllare le impostazioni di centrifugazione.

  - Squilibrio della centrifuga o uso del freno o carico asimmetrico della centrifuga.

- L'analisi non era corretta.
  - Si è verificato un errore di campionamento. Verificare la presenza di cellule agglomerate o sedimentate nella sospensione cellulare. Verificare che siano stati prelevati campioni rappresentativi e ripetere l'analisi.
  - Si è verificato un errore di marcatura. Controllare i reagenti della citometria a flusso. Ripetere la marcatura.
  - Le impostazioni del citometro a flusso non erano corrette. Controllare le impostazioni dello strumento.

■ La purezza delle cellule bersaglio è bassa.

- La preparazione cellulare è stata conservata in modo inappropriato. La preparazione e la separazione del prodotto di leucaferesi devono essere eseguite immediatamente dopo la leucaferesi. Conservare la preparazione cellulare a una concentrazione di leucociti inferiore a $0{,}2\times10^9$ per mL. Se necessario, diluire la preparazione cellulare con plasma autologo. La preparazione cellulare non deve avere più di 24 ore quando si inizia la procedura di marcatura e separazione. Se la preparazione cellulare deve essere conservata, ad es. per una notte, va mantenuta a temperatura ambiente controllata (tra +19 °C e +25 °C [tra +66 °F e +77 °F]).
- Il protocollo di marcatura magnetica non è stato seguito (ad es., volumi errati durante la marcatura magnetica). Seguire le istruzioni fornite per la marcatura magnetica (cfr. FASE 1 nella sezione della rispettiva applicazione). Ai fini della risoluzione degli errori, verificare quali tipi di leucociti (cellule B, cellule T, monociti, granulociti e piastrine) contaminano la frazione di cellule bersaglio e contattare il Miltenyi Biotec Technical Support per una consulenza.
- Un numero elevato di granulociti ha contaminato la preparazione iniziale (configurazione dell'aferesi sub-ottimale). I granulociti che stanno morendo legheranno poi il CliniMACS Reagent in modo aspecifico, il che può causare una ridotta purezza delle cellule bersaglio.
- Si è verificato un malfunzionamento di una valvola. La frazione di cellule bersaglio eluite è stata contaminata da parte della frazione non-bersaglio o dalla frazione di scarto del tampone. Ispezionare il posizionamento dei tubi all'interno delle valvole per garantire il corretto funzionamento. Valutare il contenuto di cellule bersaglio nella frazione di cellule non-bersaglio e gli scarti di tampone. Se necessario, unire la frazione di cellule bersaglio e non-bersaglio, ridurre a un volume adeguato e ripetere la separazione con un nuovo set di tubi e una quantità sufficiente di nuovo tampone.

■ Ritenzione aspecifica di cellule morte nella preparazione cellulare o elevate perdite di cellule aspecifiche durante tutta la procedura

- Il tampone non conteneva HSA. Aggiungere HSA al tampone fino ad una concentrazione finale dello 0,5% (p/v), (cfr. la sezione "Materiali CliniMACS necessari" della rispettiva applicazione).
- La preparazione cellulare potrebbe essere stata conservata in modo inadeguato. La preparazione e la separazione del prodotto di leucaferesi devono essere eseguite immediatamente dopo la leucaferesi. Conservare la preparazione cellulare a una concentrazione di leucociti inferiore a $0{,}2\times10^9$ per mL. Se necessario, diluire la leucaferesi con plasma autologo. La preparazione cellulare non deve avere più di 24 ore quando si inizia la procedura di marcatura e separazione. Se la preparazione cellulare deve essere conservata, ad es. per una notte, va mantenuta a temperatura ambiente controllata (tra +19 °C e +25 °C [tra +66 °F e +77 °F]).
- Caricamento del campione incompleto a causa dell'intasamento della colonna di separazione, del filtro di pre-sistema o della pre-colonna. Controllare il numero totale di cellule e l'efficacia di deplezione delle cellule rimanenti.

8.5.2 Eventi imprevisti: CD34 SELECTION 1/2, ENRICHMENT 1.1

■ La purezza delle cellule bersaglio è bassa

L'eluizione dalla colonna di separazione è stata incompleta.

- Il programma di separazione è stato interrotto. Controllare se sullo schermo compare un messaggio di errore. Continuare con la sezione ""Il ciclo viene interrotto prima del termine del programma di separazione cellulare"" (cfr. sezione 8.4.3 a pagina 218).
- Si è verificato un guasto alla pompa o alla valvola. Recuperare le cellule dal set di tubi seguendo il programma di emergenza descritto nella sezione 8.4.7. Controllare i volumi di tutte le frazioni. Valutare il contenuto di cellule bersaglio nella Buffer Waste Bag e nella Negative Fraction Bag.
- Il percorso verso la Cell Collection Bag è bloccato. Controllare il set di tubi per verificare che non vi siano pinzette per clampaggio chiuse, occlusioni o attorcigliamenti.
- È stata superata la capacità del reagente e/o del set di tubi. Fare riferimento al limite di capacità dell'applicazione in uso.
- Il set di tubi non è stato inserito correttamente. Controllare tutte le valvole per verificare che il tubo sia correttamente inserito.

8.5.3 Eventi imprevisti: CD34 SELECTION 1/2

■ La purezza delle cellule bersaglio è bassa

Sono state trattenute cellule non-bersaglio.

- La mobilizzazione delle cellule bersaglio era scadente. Il numero di cellule bersaglio era molto basso. Pertanto un basso numero di cellule non-bersaglio contaminanti (ad es. granulociti, monociti, piastrine) può portare a una riduzione della purezza.
- Durante la marcatura magnetica erano presenti plasma o immunoglobuline insufficienti. Seguire le istruzioni fornite per la marcatura magnetica (cfr. FASE 1 della rispettiva applicazione).

  Se non è possibile garantire una concentrazione finale di circa il 30% di plasma autologo nel campione durante la marcatura magnetica, aggiungere immunoglobulina al campione. Si raccomanda una concentrazione finale di 1,5 mg/mL per il blocco efficiente del legame aspecifico del reagente durante la marcatura magnetica.

8.5.4 Eventi imprevisti: ENRICHMENT 1.1

■ La resa delle cellule bersaglio è bassa

Inserimento non corretto dei parametri del campione. Effettuare una verifica incrociata dei parametri inseriti con i risultati dell'analisi.

8.5.5 Eventi imprevisti: DEPLETION 2.1 e DEPLETION 3.1

■ L'efficacia della deplezione è bassa

Se l'efficacia della deplezione è insufficiente, processare il campione rimanente con un nuovo set di tubi e una quantità sufficiente di nuovo tampone. Sarebbe opportuna una nuova marcatura delle cellule da depletare. Determinare il numero di cellule e la percentuale di cellule da depletare, quindi inserire i parametri del campione corrente durante la configurazione dello strumento (FASE 2). Se si formano aggregati visibili, può essere utile filtrare le cellule prima di un nuovo ciclo. Occorre tenere presente che aggregazione e filtrazione supplementare possono causare perdita di cellule.

- È stata superata la capacità del reagente e/o del set di tubi. Fare riferimento al limite di capacità dell'applicazione in uso.
- Determinazione non corretta delle cellule da marcare con il reagente.
- Inserimento non corretto dei parametri del campione. Verifica incrociata dei parametri inseriti con i risultati dell'analisi.
- Vitalità ridotta delle cellule. Le cellule morte possono legarsi in modo aspecifico alla colonna di separazione, riducendo così la capacità di marcatura della colonna, con conseguente potenziale minore efficienza della deplezione. Garantire una migliore qualità della preparazione cellulare

e un prodotto di processo il più fresco possibile. Non utilizzare prodotti conservati che hanno più di 24 ore. In caso di necessità, la preparazione cellulare deve essere conservata a temperatura ambiente (tra +19 °C e +25 °C [tra +66 °F e +77 °F]). La concentrazione cellulare non deve superare $0{,}2\times10^{9}$/mL. Se necessario, diluire la preparazione cellulare con plasma autologo per ottenere una concentrazione cellulare ottimale.

9 Note legali

9.1 Garanzia limitata

Fatta eccezione per quanto indicato in una dichiarazione di garanzia specifica, che può accompagnare questo prodotto, o salvo diversamente convenuto per iscritto da un rappresentante di Miltenyi Biotec debitamente autorizzato, la garanzia di Miltenyi Biotec per i prodotti acquistati direttamente da Miltenyi Biotec sarà soggetta ai termini e alle condizioni di vendita previsti dalla rispettiva organizzazione di vendita di Miltenyi Biotec. I termini e le condizioni di vendita applicabili possono variare in base al Paese e all'area geografica. Questi termini e condizioni sono disponibili su richiesta o all'indirizzo www.miltenyibiotec.com. Nulla di quanto qui contenuto può essere interpretato come garanzia aggiuntiva.

Per i prodotti acquistati presso distributori o rivenditori terzi (ad esempio, acquistati presso un fornitore di servizi autorizzato Miltenyi Biotec locale) potrebbero applicarsi termini e condizioni diversi.

Per stabilire la garanzia fornita con il prodotto, consultare il documento di trasporto, la fattura, la ricevuta o altra documentazione di vendita. Alcuni componenti di una combinazione di prodotti acquistati potrebbero avere una garanzia più breve di quella riportata sul documento di trasporto, sulla fattura, sulla ricevuta o su altra documentazione di vendita (ad es. prodotti soggetti a scadenza e obsolescenza).

La garanzia di Miltenyi Biotec per questo prodotto copre unicamente problemi dovuti a difetti di materiali o di lavorazione durante il normale utilizzo. Non copre problemi legati al prodotto per qualsiasi altra causa, inclusi a titolo puramente esemplificativo, quelli dovuti all'utilizzo del prodotto in modo diverso da quanto specificamente descritto in questo manuale, ad esempio: uso non appropriato o improprio; montaggio o installazione non corretti da parte di un operatore o di terzi; normale usura; uso, manipolazione, conservazione, assistenza o manutenzione negligenti o non corretti; mancata aderenza alle istruzioni operative; modifiche non autorizzate di/a qualsiasi parte del prodotto; o uso di materiali di consumo, accessori o materiali di lavoro non appropriati.

La garanzia di Miltenyi Biotec non copre i prodotti venduti nello stato in cui si trovano ("AS IS") o CON POSSIBILI DIFETTI né i materiali di consumo. Nulla di quanto qui contenuto può essere interpretato come garanzia aggiuntiva.

Miltenyi Biotec deve essere informata immediatamente nel caso in cui venga presentata una richiesta secondo i termini di tale garanzia. In caso di difetti di materiali o di fabbricazione entro il periodo di garanzia, Miltenyi Biotec adotterà le misure appropriate per ripristinare la piena usabilità dello strumento.

Restrizione relativa ai danni: Miltenyi Biotec non è responsabile per danni incidentali o indiretti dovuti alla violazione di qualsiasi condizione o garanzia esplicita o implicita su questo prodotto.

Alcuni Paesi/Stati o giurisdizioni non consentono l'esclusione o la restrizione di danni accidentali o consequenziali, pertanto le restrizioni o le esclusioni di cui sopra potrebbero non essere applicabili nel caso specifico. La presente dichiarazione di garanzia riconosce specifici diritti legali e l'utilizzatore potrebbe disporre di altri diritti, che variano da Stato a Stato o da giurisdizione a giurisdizione.

9.2 Marchi registrati

CliniMACS, MACS, MACSmix, il logo Miltenyi Biotec e MiniMACS sono marchi registrati di Miltenyi Biotec e/o delle sue consociate in diversi Paesi nel mondo. Tutti gli altri marchi citati in questo documento sono di proprietà dei rispettivi proprietari e sono utilizzati solo a scopo identificativo.

Miltenyi Biotec

Germania/Austria
Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG
Friedrich-Ebert-Straße 68
51429 Bergisch Gladbach
Germania
+49 2204 8306-0
+49 2204 85197
macsde@miltenyi.com

Stati Uniti/Canada
Miltenyi Biotec Inc.
2303 Lindbergh Street
Auburn, CA 95602
Stati Uniti
800 FOR MACS
+1 866 811 4466
+1 877 591 1060
macsus@miltenyi.com

Australia
Miltenyi Biotec
Australia Pty. Ltd.
Unit 11, 2 Eden Park Drive
Macquarie Park NSW 2113
Australia
+61 2 8877 7400
+61 2 9889 5044
macsau@miltenyi.com

Benelux
Miltenyi Biotec B.V.
Dellaertweg 9C
2316 WZ Leiden
Paesi Bassi
macsnl@miltenyi.com
Servizio clienti Paesi Bassi
0800 4020120
0800 4020100
Servizio clienti Belgio
0800 94016
0800 99626
Servizio clienti Lussemburgo
800 24971
800 24984

China
Miltenyi Biotec Technology &
Trading (Shanghai) Co., Ltd.
Room A401, 4/F
No. 1077, Zhangheng Road
Pudong New Area
201203 Shanghai
P.R. China
+86 21 6235 1005-0
+86 21 6235 0953
macscn@miltenyi.com.cn

Corea del Sud
Miltenyi Biotec Korea Co., Ltd.
Donggeuk 7F
562 Nonhyeon-ro
Gangnam-gu
Seúl 06136
Corea del Sud
+82 2 555 1988
+82 2 555 8890
macskr@miltenyi.com

Francia
Miltenyi Biotec SAS
10 rue Mercoeur
75011 París
Francia
+33 1 56 98 16 16
macsfr@miltenyi.com

Giappone
Miltenyi Biotec K.K.
NEX-Eitai Building 5F
16-10 Fuyuki, Koto-ku
Tokio 135-0041
Giappone
+81 3 5646 8910
+81 3 5646 8911
macsjp@miltenyi.com

Hong Kong
Miltenyi Biotec Hong Kong Ltd.
Unit 301, Lakeside 1
No. 8 Science Park West Avenue
Hong Kong Science Park
Pak Shek Kok, New Territories
Hong Kong
+852 3751 6698
+852 3619 5772
macshk@miltenyi.com.hk

Italia
Miltenyi Biotec S.r.l.
Via Paolo Nanni Costa, 30
40133 Bologna
Italia
+39 051 6 460 411
+39 051 6 460 499
macsit@miltenyi.com

Scandinavia e Paesi Baltici
Miltenyi Biotec Norden AB
Medicon Village
Scheeletorget 1
223 81 Lund
Suecia
macsse@miltenyi.com
Servizo clienti Svezia
0200 111 800
+46 280 72 99
Servizo clienti Danimarca
80 20 30 10
+46 46 280 72 99
Servizio clienti Norvegia, Finlandia, Islanda e Paesi Baltici
+46 46 280 72 80
+46 46 280 72 99

Regno Unito
Miltenyi Biotec Ltd.
Almac House, Church Lane
Bisley, Surrey GU24 9DR
Regno Unito
+44 1483 799 800
+44 1483 799 811
macsuk@miltenyi.com

Singapore
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

Spagna
Miltenyi Biotec S.L.
C/Luis Buñuel 2
Ciudad de la Imagen
28223 Pozuelo de Alarcón (Madrid)
Spagna
+34 91 512 12 90
+34 91 512 12 91
macses@miltenyi.com

Svizzera
Miltenyi Biotec Swiss AG
Gibelinstrasse 27
4500 Solothurn
Svizzera
+41 32 623 08 47
+49 2204 85197
macsch@miltenyi.com

www.miltenyibiotec.com

Miltenyi Biotec fornisce prodotti e servizi in tutto il mondo. Visitare **www.miltenyibiotec.com/local** per trovare il contatto Milteny Biotec più vicino.

CliniMACS, MACS, MACSmix, il logo Miltenyi Biotec e MiniMACS sono marchi registrati o marchi di Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG e/o le sue affiliate in vari paesi in tutto il mondo. Copyright © 2023 Miltenyi Biotec e/o le sue affiliate. Tutti i diritti riservati.

210-003-242/01 | Edizione: 2023-02