



Miltyenyi Biotec

CliniMACS® Plus-applikationer

Användarhandbok



Komponenterna i CliniMACS-systemet, inklusive reagenser, slangset, instrument och buffert PBS/EDTA är utformade, tillverkade och testade enligt ISO 13485-certifierat kvalitetssystem. I EU är komponenterna i CliniMACS-systemet tillgängligt som CE-märkta medicintekniska produkter för deras respektive avsedda användning, om inte annat anges. I USA är CliniMACS CD34 Reagent-systemet, inklusive CliniMACS Plus Instrument, CliniMACS CD34 Reagent, CliniMACS Tubing Set TS och CliniMACS Tubing Set LS och CliniMACS PBS/EDTA Buffer godkända av FDA som HUD (Humanitarian Use Device, enhet för humanitär användning), godkända enligt amerikansk federal lagstiftning för användning vid behandling av patienter med akut myeloisk leukemi (AML) vid första fullständiga remission. Produktens effektivitet för denna indikation har inte påvisats. Övriga produkter i CliniMACS-serien är endast tillgängliga för användning enligt en godkänd IND-ansökan (Investigational New Drug), IDE-ansökan (Investigational Device Exemption) eller FDA-godkännande. I Australien är följande komponenter i CliniMACS Plus-systemet inkluderade i ARTG (Australian Register of Therapeutic Goods) och därmed godkända för leverans: CliniMACS Plus Instrument, CliniMACS CD34 Reagent, CliniMACS Tubing Set, CliniMACS Tubing Set LS, CliniMACS Depletion Tubing Set och CliniMACS PBS/EDTA Buffer. Alla produkter som är inkluderade i ARTG kan användas i Australien.

Om inte annat anges specifikt är produkter och tjänster från Miltenyi Biotec endast avsedda för forskningsanvändning och inte för terapeutisk eller diagnostisk användning.

Upphovsrätt © 2023 Miltenyi Biotec och/eller dess dotterbolag. Med ensamrätt.

Ingen del av denna publikation får reproduceras, sparas i ett söksystem, överföras, publiceras eller distribueras i någon form eller på något sätt, elektroniskt, mekaniskt, genom fotokopiering, mikrofilmning, inspelning eller på annat sätt, utan föregående skriftligt tillstånd av Miltenyi Biotec; men oaktat det föregående, får ägarna av CliniMACS Plus-systemet endast göra kopior endast syfte att utbilda personal i användning och service av enheten inom deras företag eller organisation.

CliniMACS, MACS, MACSmix, Miltenyi Biotec-logotypen och MiniMACS är registrerade varumärken eller varumärken som tillhör Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG och/eller dess dotterbolag i olika länder världen runt. Alla andra varumärken som nämns i detta dokument tillhör respektive ägare och används endast för identifieringsändamål.

CliniMACS® Plus-applikationer

Användarhandbok

Programvaruversion 2.4x

Utfärdad: 2023-04

210-003-258/01



CE 0123



Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG

Friedrich-Ebert-Straße 68

51429 Bergisch Gladbach

Tyskland

Miltenyi Biotec Technical Support

☎ +49 2204 8306-3803

✉ technicalsupport@miltenyi.com

🏠 www.miltenyibiotec.com



Grundläggande information

Denna användarhandbok innehåller information om användningen av CliniMACS Plus-applikationer. Anvisningar, varningar, förebyggande åtgärder och annan viktig information om användningen av CliniMACS Plus Instrument finns i användarhandboken för CliniMACS Plus Instrument.

VARNING

CliniMACS Plus-systemet får bara användas av professionella användare. Innan systemet tas i drift ska du noggrant läsa igenom och förstå säkerhetsinformationen, varningarna, de förebyggande åtgärderna och anvisningarna för korrekt drift av CliniMACS Plus Instrument som finns i bruksanvisningen för CliniMACS Plus-systemet (inklusive, utan begränsning, säkerhetsinformationen i användarhandboken för CliniMACS Plus-systemet och kapitel 3 "Varningar och förebyggande åtgärder" på sidan 27 i denna användarhandbok) och i alla säkerhetsrelaterade rekommendationer utfärdade av Miltenyi Biotec). Var särskilt uppmärksam på alla varningar som visas på instrumentet eller som medföljer engångsartiklar, tillbehör och ytterligare material och utrustning. Operatören måste alltid följa all säkerhetsinformation, alla varningar, förebyggande åtgärder och anvisningar och procedurer under driften av instrumentet och bekräfta att all säkerhetsinformation, alla varningar, förebyggande åtgärder och anvisningar beaktas. Underlåtenhet att följa säkerhetsinformationen, varningarna, de förebyggande åtgärderna och anvisningarna i bruksanvisningen kan leda till funktionsfel på instrumentet, sakskada, förlust av målceller, personskada och/eller dödsfall.

Innehåll

1	Inledning	11
1.1	Allmän information	11
1.2	Märkning av celler med CliniMACS-reagenser	12
1.3	Höggradient magnetisk cellseparation	13
1.4	Separationsstrategier	13
1.4.1	Anrikningsstrategi	14
1.4.2	Depletionsstrategi	15
2	Ordlista	19
2.1	Grafisk information	19
2.2	Symbolförklaringar	19
2.3	Ordlista med termer	20
3	Varningar och förebyggande åtgärder	27
3.1	Processrelaterad	27
3.2	CliniMACS-reagenser och biotinkonjugat	28
3.3	Hantering av biologiskt riskmaterial	29
3.4	Cellulär startprodukt	30
4	CliniMACS Plus-systemet	31
4.1	CliniMACS Plus Instrument	31
4.2	CliniMACS-reagenser och biotinkonjugat	31
4.3	CliniMACS-slangset	31
4.4	CliniMACS PBS/EDTA Buffer	31
4.5	CliniMACS-tillbehör	32
4.6	Ytterligare material som krävs	32
4.7	Utrustning som krävs	33
5	Översikt över applikationer	35
5.1	Fyra STEG till målceller	35
5.2	Översiktstabell	37

6	Applikationsspecifik översikt över STEG 1–4	41
6.1	Anrikning av CD34-positiva celler	41
6.1.1	STEG 1: Cellberedning och magnetisk märkning	41
6.1.2	STEG 2: Val av separationsprogram	43
6.1.3	STEG 3: Installation av CliniMACS-slangset	44
6.1.4	STEG 4: CliniMACS Plus-separation	44
6.2	Anrikning av CD14-positiva celler	44
6.2.1	STEG 1: Cellberedning och magnetisk märkning	44
6.2.2	STEG 2: Val av separationsprogram	47
6.2.3	STEG 3: Installation av CliniMACS-slangset	47
6.2.4	STEG 4: CliniMACS Plus-separation	47
6.3	Anrikning/depletion med CliniMACS Anti-Biotin Reagent	48
6.3.1	STEG 1: Cellberedning och magnetisk märkning	48
6.3.2	STEG 2: Val av separationsprogram	52
6.3.3	STEG 3: Installation av CliniMACS-slangset	52
6.3.4	STEG 4: CliniMACS Plus-separation	52
6.4	Anrikning av CD56-positiva celler	53
6.4.1	STEG 1: Cellberedning och magnetisk märkning	53
6.4.2	STEG 2: Val av separationsprogram	56
6.4.3	STEG 3: Installation av CliniMACS-slangset	56
6.4.4	STEG 4: CliniMACS Plus-separation	56
6.5	Depletion av CD3-positiva celler	57
6.5.1	STEG 1: Cellberedning och magnetisk märkning	57
6.5.2	STEG 2: Val av separationsprogram	61
6.5.3	STEG 3: Installation av CliniMACS-slangset	61
6.5.4	STEG 4: CliniMACS Plus-separation	61
6.6	Depletion av CD19-positiva celler	62
6.6.1	STEG 1: Cellberedning och magnetisk märkning	62
6.6.2	STEG 2: Val av separationsprogram	64
6.6.3	STEG 3: Installation av CliniMACS-slangset	64
6.6.4	STEG 4: CliniMACS Plus-separation	64

6.7	Depletion av CD3-positiva celler och CD19-positiva celler	65
6.7.1	STEG 1: Cellberedning och magnetisk märkning	65
6.7.2	STEG 2: Val av separationsprogram	68
6.7.3	STEG 3: Installation av CliniMACS-slangset	68
6.7.4	STEG 4: CliniMACS Plus-separation	68
6.8	Anrikning/depletion av CD8-positiva celler	69
6.8.1	STEG 1: Cellberedning och magnetisk märkning	69
6.8.2	STEG 2: Val av separationsprogram	72
6.8.3	STEG 3: Installation av CliniMACS-slangset	72
6.8.4	STEG 4: CliniMACS Plus-separation	73
6.9	Anrikning/depletion av CD25-positiva celler	73
6.9.1	STEG 1: Cellberedning och magnetisk märkning	73
6.9.2	STEG 2: Val av separationsprogram	78
6.9.3	STEG 3: Installation av CliniMACS-slangset	78
6.9.4	STEG 4: CliniMACS Plus-separation	78
6.10	Anrikning/depletion av CD4-positiva celler	79
6.10.1	STEG 1: Cellberedning och magnetisk märkning	79
6.10.2	STEG 2: Val av separationsprogram	82
6.10.3	STEG 3: Installation av CliniMACS-slangset	83
6.10.4	STEG 4: CliniMACS Plus-separation	83
6.11	Depletion av CD4-positiva celler och CD8-positiva celler	83
6.11.1	STEG 1: Cellberedning och magnetisk märkning	83
6.11.2	STEG 2: Val av separationsprogram	86
6.11.3	STEG 3: Installation av CliniMACS-slangset	87
6.11.4	STEG 4: CliniMACS Plus-separation	87
6.12	Anrikning av CD1c (BDCA-1)-positiva celler – Del 1: Depletion av CD19-positiva celler och märkning av CD1c (BDCA-1)-positiva celler	87
6.12.1	STEG 1: Cellberedning och magnetisk märkning	87
6.12.2	STEG 2: Val av separationsprogram	89
6.12.3	STEG 3: Installation av CliniMACS-slangset	90
6.12.4	STEG 4: CliniMACS Plus-separation	90

6.13	Anrikning av CD1c (BDCA-1)-positiva celler – Del 2: Flexible Labeling System	90
6.13.1	STEG 1: Cellberedning och magnetisk märkning	90
6.13.2	STEG 2: Val av separationsprogram	92
6.13.3	STEG 3: Installation av CliniMACS-slangset	92
6.13.4	STEG 4 : CliniMACS Plus-separation	92
6.14	Anrikning av CD304 (BDCA-4)-positiva celler	93
6.14.1	STEG 1: Cellberedning och magnetisk märkning	93
6.14.2	STEG 2: Val av separationsprogram	95
6.14.3	STEG 3: Installation av CliniMACS-slangset	95
6.14.4	STEG 4: CliniMACS Plus-separation	96
6.15	Depletion av TCR α / β -positiva celler	96
6.15.1	STEG 1: Cellberedning och magnetisk märkning	96
6.15.2	STEG 2: Val av separationsprogram	99
6.15.3	STEG 3: Installation av CliniMACS-slangset	99
6.15.4	STEG 4: CliniMACS Plus-separation	99
6.16	Depletion av CD45RA-positiva celler	100
6.16.1	STEG 1: Cellberedning och magnetisk märkning	100
6.16.2	STEG 2: Val av separationsprogram	102
6.16.3	STEG 3: Installation av CliniMACS-slangset	102
6.16.4	STEG 4: CliniMACS Plus-separation	103
6.17	Anrikning av humana IFN-gammautsöndrande celler med CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma)	103
6.17.1	STEG 1: Cellberedning och magnetisk märkning	103
6.17.2	STEG 2: Val av separationsprogram	116
6.17.3	STEG 3: Installation av CliniMACS-slangset	116
6.17.4	STEG 4: CliniMACS Plus-separation	116
7	Detaljerad information om STEG 1–4	117
7.1	STEG 1: Cellberedning och magnetisk märkning	117
7.1.1	Första åtgärder som krävs	117
7.1.2	Magnetisk märkning av celler	118

7.2	STEG 2: Val av separationsprogram	129
7.2.1	Slå på CliniMACS Plus Instrument	129
7.2.2	CD34 SELECTION 1/2	129
7.2.3	ENRICHMENT 1.1	131
7.2.4	ENRICHMENT 3.2	136
7.2.5	DEPLETION 2.1	138
7.2.6	DEPLETION 3.1	143
7.3	STEG 3: Installation av CliniMACS-slangset	148
7.3.1	CliniMACS Tubing Set och CliniMACS Tubing Set LS	148
7.3.2	Alternativ installation av CliniMACS-slangset	163
7.3.3	CliniMACS Depletion slangset	168
7.4	STEG 4: CliniMACS Plus-separation	182
7.4.1	CD34 SELECTION 1/2	182
7.4.2	ENRICHMENT 1.1	186
7.4.3	ENRICHMENT 3.2	190
7.4.4	DEPLETION 2.1	194
7.4.5	DEPLETION 3.1	198
8	Felsökning	203
8.1	Miltenyi Biotec Technical Support	203
8.2	Beredning av leukaferesprodukten	203
8.3	CliniMACS Plus Instrument och CliniMACS-slangset	204
8.3.1	Felmeddelanden	204
8.3.2	Laddning och priming av slangsetet	204
8.4	Automatisk cellseparation	205
8.4.1	Varningsmeddelanden	205
8.4.2	Oväntade händelser: Alla separationsprogram	206
8.4.3	Oväntade händelser: Endast anrikningsprogrammet	208
8.4.4	Oväntade händelser: CD34 SELECTION 1/2	208
8.4.5	Oväntade händelser: ENRICHMENT 1.1	209
8.4.6	Oväntade händelser: ENRICHMENT 3.2	210
8.4.7	Akutprogram (ska endast användas med anrikningsprogram)	211
8.4.8	Oväntade händelser: DEPLETION 2.1	212
8.4.9	Oväntade händelser: DEPLETION 3.1	212

8.5	Cellseparationsprestanda	214
8.5.1	Oväntade händelser: Endast anriktningsprogrammet	214
8.5.2	Oväntade händelser: CD34 SELECTION 1/2, ENRICHMENT 1.1	216
8.5.3	Oväntade händelser: CD34 SELECTION 1/2	216
8.5.4	Oväntade händelser: ENRICHMENT 1.1	217
8.5.5	Oväntade händelser: DEPLETION 2.1 och DEPLETION 3.1	217
9	Juridisk information	219
9.5.1	Begränsad garanti	219
9.5.2	Varumärken	220

1 Inledning

1.1 Allmän information

CliniMACS Plus-systemet erbjuder en uppsättning verktyg för högkvalitativa och standardiserade cellseparationer för terapeutiska applikationer.

CliniMACS Plus-systemet är baserat på den magnetiska cellseparationstekniken (MACS® teknologi) utvecklad av Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG. Miltenyi Biotec har gjort dessa produkter tillgängliga för kliniska applikationer som uppfyller kraven i europeiska regulatoriska standarder.

CliniMACS-reagenser och biotinkonjugat är endast avsedda för användning *in vitro* och är inte avsedda för terapeutisk användning eller för direkt infusion till patienter.

CliniMACS-reagenser i kombination med CliniMACS Plus-systemet är avsedda för att separera humana celler.

Miltenyi Biotec som tillverkare av CliniMACS Plus-systemet lämnar inga rekommendationer avseende användning av separerade celler för terapeutiska syften och lämnar ingen försäkran avseende klinisk nytta.

För tillverkning och användning av målceller hos människa måste nationella lagar och förordningar – t.ex. EU-direktiv 2004/23/EG (mänskliga vävnader och celler) eller direktiv 2002/98/EG (humanblod och blodkomponenter) – följas. Således är all klinisk applikation av målcellerna användaren av CliniMACS Plus-system ansvar.

BEGRÄNSAD GARANTI

Om CliniMACS Plus-systemet används på ett sätt som inte uttryckligen beskrivs i denna handbok blir alla garantier ogiltiga.

VIKTIGT

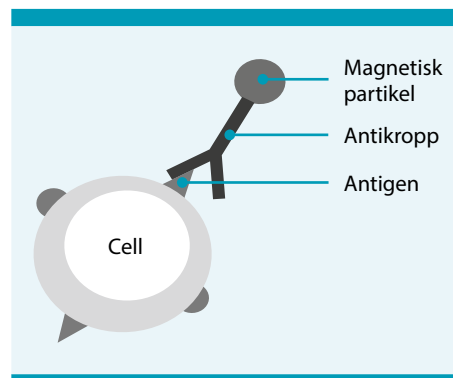
Innan CliniMACS Plus-systemet eller några komponenter används utanför det Europeiska ekonomiska samarbetsområdet, måste CliniMACS Plus-systemet eller annan komponent i CliniMACS vara godkänd av myndigheterna i det landet.

1.2 Märkning av celler med CliniMACS-reagenser

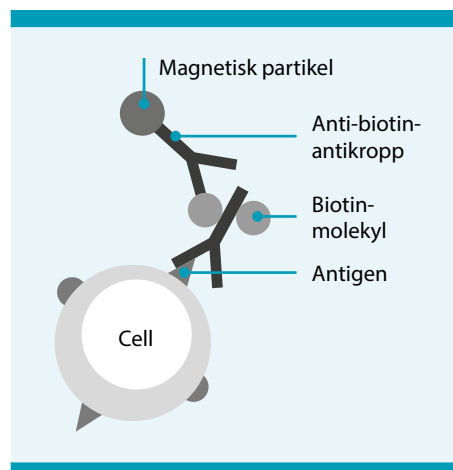
MACS Magnetisk cellsortering är ett väldokumenterat kraftfullt verktyg för separation av många celltyper, både i forskningslaboratorier och i kliniska applikationer. Cellblandningar separeras i ett magnetiskt fält med hjälp av en immunmagnetisk märkning specifik för celltypen av intresse, t.ex. humana CD34-positiva hematopoetiska progenitorceller från heterogena hematologiska cellpopulationer.

CliniMACS Plus-systemet celler kan märkas magnetiskt på tre olika sätt för användning:

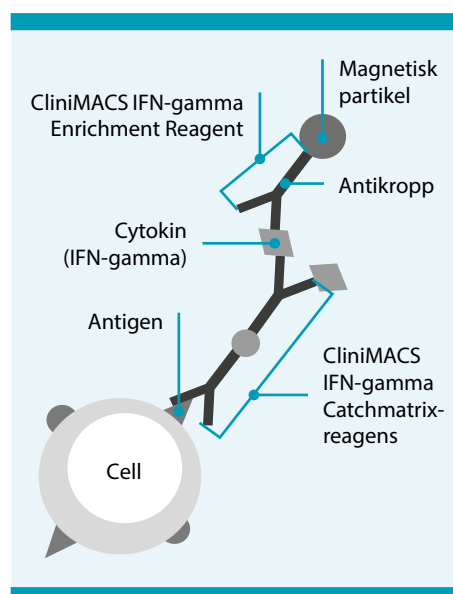
- Direkt i en märkningsprocess i ett steg med antigenspecifika antikroppar konjugerade till superparamagnetiska järndextrankulor (se Figur 1.1).
- Indirekt i en märkningsprocess i två steg som kallas Flexible Labeling System. I ett första steg märks cellerna med antigenspecifika antikroppar konjugerad till biotin. I ett andra steg märks dessa antikroppar med biotinspecifika antikroppar konjugerade till superparamagnetiska järndextrankulor (se Figur 1.2).
- Indirekt i en märkningsprocedur i två steg som kallas CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma). Först restimuleras cellerna *in vitro* för att utsöndra cytokinet (t.ex. IFN-gamma). I ett första märkningssteg märks de restimulerade cellerna med en hybridmolekyl som består av en leukocyt-specifik antikropp och en cytokinspecifik antikropp, som kallas CliniMACS IFN-gamma Catchmatrix-reagens. Därefter inkuberas cellerna för att utsöndra cytokinet, som "fångas" av matrisen på cellytan. Därefter, i ett andra märkningssteg, märks de cytokinutsöndrande cellerna med cytokinspecifika antikroppar konjugerade till superparamagnetiska järndextrankulor (CliniMACS IFN-gamma Enrichment-reagens), (se Figur 1.3).



Figur 1.1: Magnetisk märkning av celler



Figur 1.2: Flexible Labeling System



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

1.3 Höggradient magnetisk cellseparation

Den magnetiskt märkta cellsuspensionen laddas i CliniMACS Plus Instrument som är förberedd med ett slangset. Denna höggradienta magnetisk cellseparationsenhet består av en specifikt utvecklad, kraftfull permanent magnet och en separationskolonn med en ferromagnetisk matris.

I det höggradienta fältet kan starka magnetiska fältstyrkor genereras och snabbt avmagnetisering. När små ferromagnetiska strukturer, såsom kolonnmatriken, är placerade inom det magnetiska fältet stör de fältets homogenitet. Detta leder till att höga magnetiska gradienter genereras. I sin omedelbara omgivning genererar de ferromagnetiska strukturerna magnetiska krafter som är 10 000 gånger starkare än i konventionella geometrier. Det höggradienta fältet drar märkta celler till matrisen och håller effektivt kvar dem. Efter att kolonnen tagits bort från magneten innebär den snabba avmagnetiseringen av kolonnmatriken att de kvarhållna cellerna frisätts.

1.4 Separationsstrategier

CliniMACS Plus-systemet gör det möjligt för användaren att använda flera olika separationsprogram. Separationsprogrammen kan generellt delas in i anrikningsstrategier (CD34 SELECTION 1/2, ENRICHMENT 1.1 och ENRICHMENT 3.2) och depletionsstrategier (DEPLETION 2.1 och DEPLETION 3.1).

Anrikning av magnetiskt märkta celler

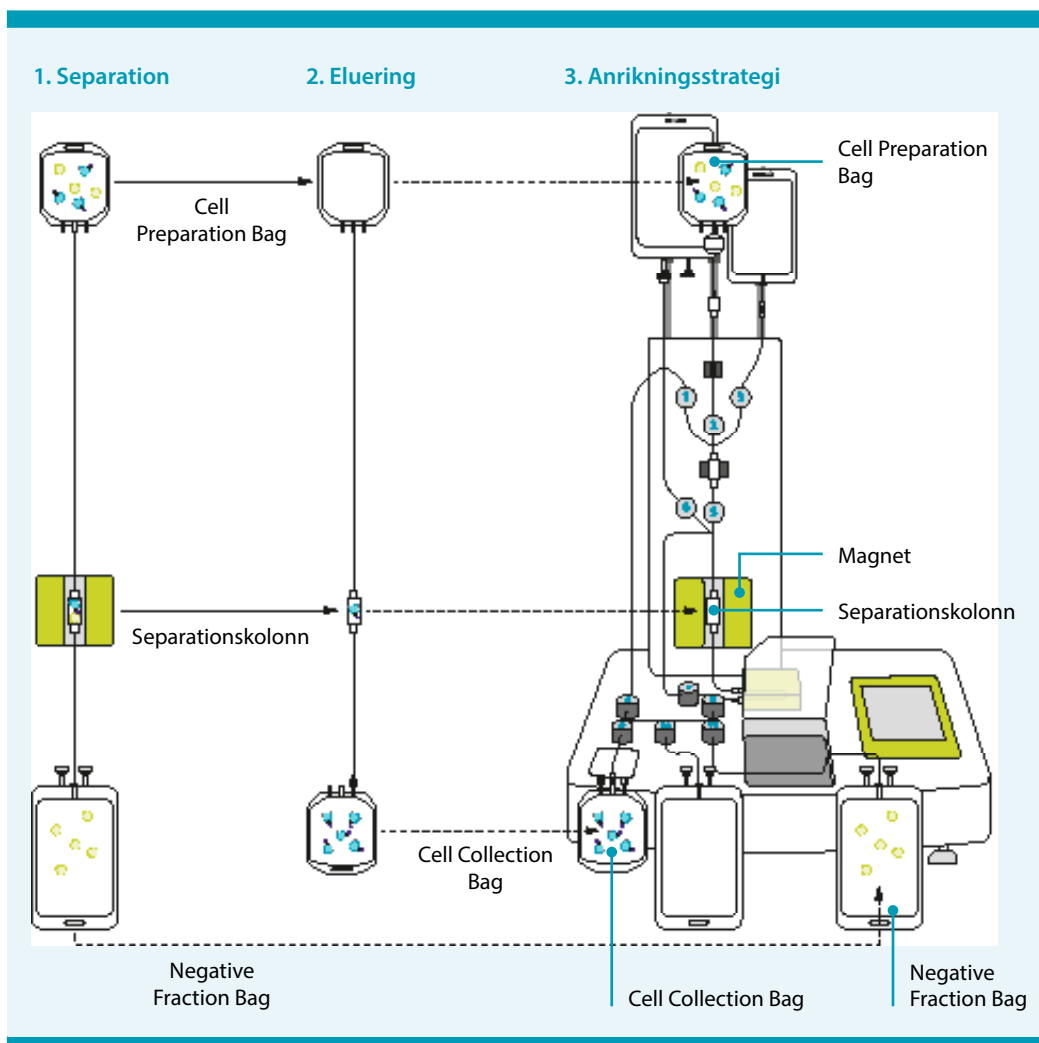
Vid val av anrikningsstrategi hålls de magnetiskt märkta cellerna (primärt märkta med CliniMACS-reagens) kvar i separationskolonnen och de icke-märkta cellerna passerar igenom. De märkta cellerna (målceller) samlas in i Cell Collection Bag och de icke-märkta cellerna (icke-målceller) i Negative Fraction Bag (se Figur 1.4).

Depletion av magnetiskt märkta celler

MACS-tekniken är också mycket effektiv för depletion av specifika cellpopulationer. Oönskade celler är specifikt märkta med superparamagnetiska partiklar och separeras från målceller vid passage genom den höggradienta magnetiska kolonnen. I motsats till anrikningsstrategin samlas de icke-märkta cellerna (målceller) in i Cell Collection Bag och de märkta cellerna (icke-målceller) in i Negative Fraction Bag (se Figur 1.5) eller i Non-Target Cell Bag (se Figur 1.6 respektive Figur 1.7).

1.4.1 Anrikningsstrategi

Anrikning av celler med CliniMACS Tubing Set eller CliniMACS Tubing Set LS

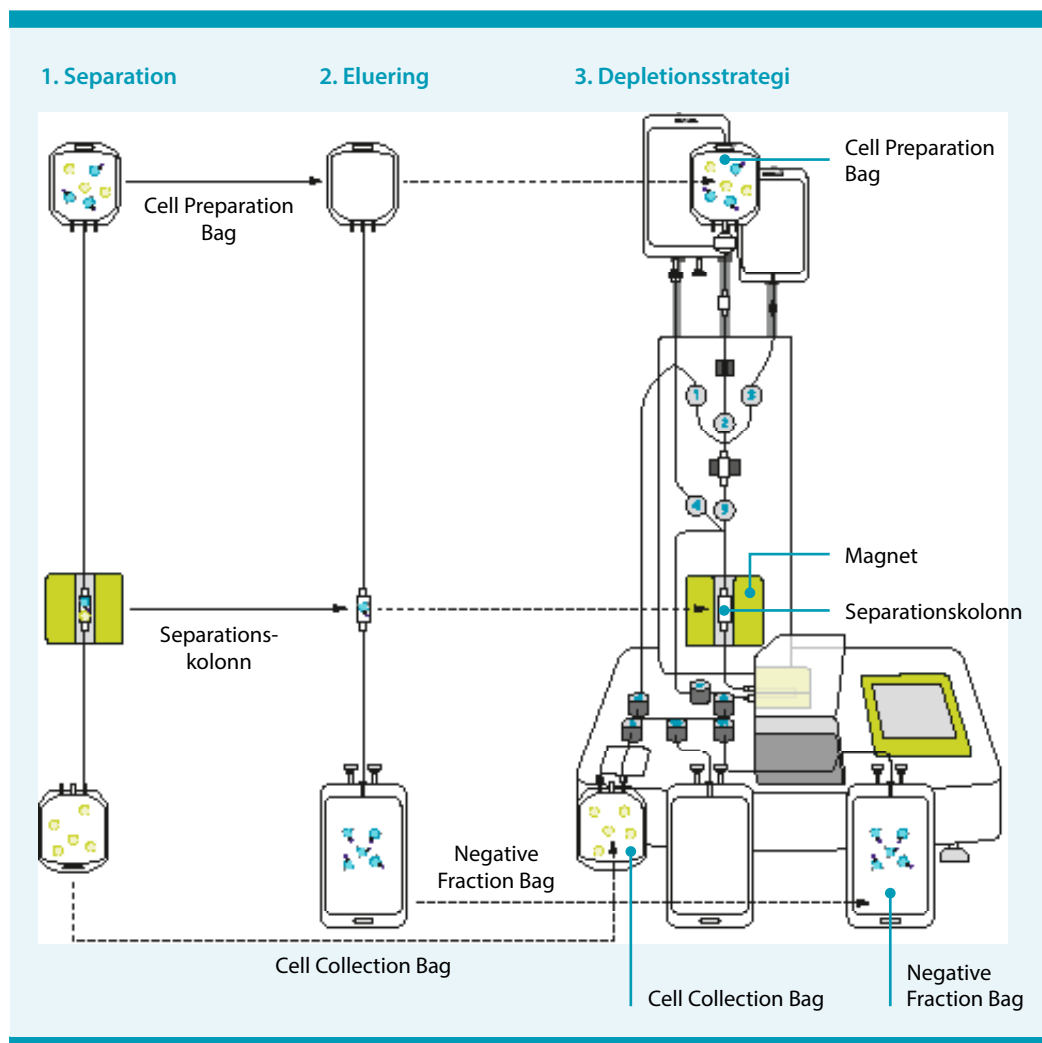


Figur 1.4: Strategi för anrikningsprogram med CliniMACS Tubing Set eller CliniMACS Tubing Set LS

1. Magneten är i läget "ON". Magnetiskt märkta celler hålls kvar i separationskolonnen, medan andra icke-märkta celler (icke-målceller) flödar igenom kolonnen och samlas in i Negative Fraction Bag.
2. Magneten är i läget "OFF". De magnetiskt märkta cellerna (målceller) frisätts från separationskolonnen och samlas in i Cell Collection Bag.
3. Anrikningsprogrammet håller kvar de magnetiskt märkta cellerna i separationskolonnen och de icke-märkta cellerna (icke-målceller) flödar igenom kolonnen och samlas in i Negative Fraction Bag. När magneten flyttats till läget "OFF" frisätts de magnetiskt märkta cellerna (målceller) från kolonnen och samlas in i Cell Collection Bag. **Notera:** Målcellsfraktionen samlas alltid in i Cell Collection Bag.

1.4.2 Depletionsstrategi

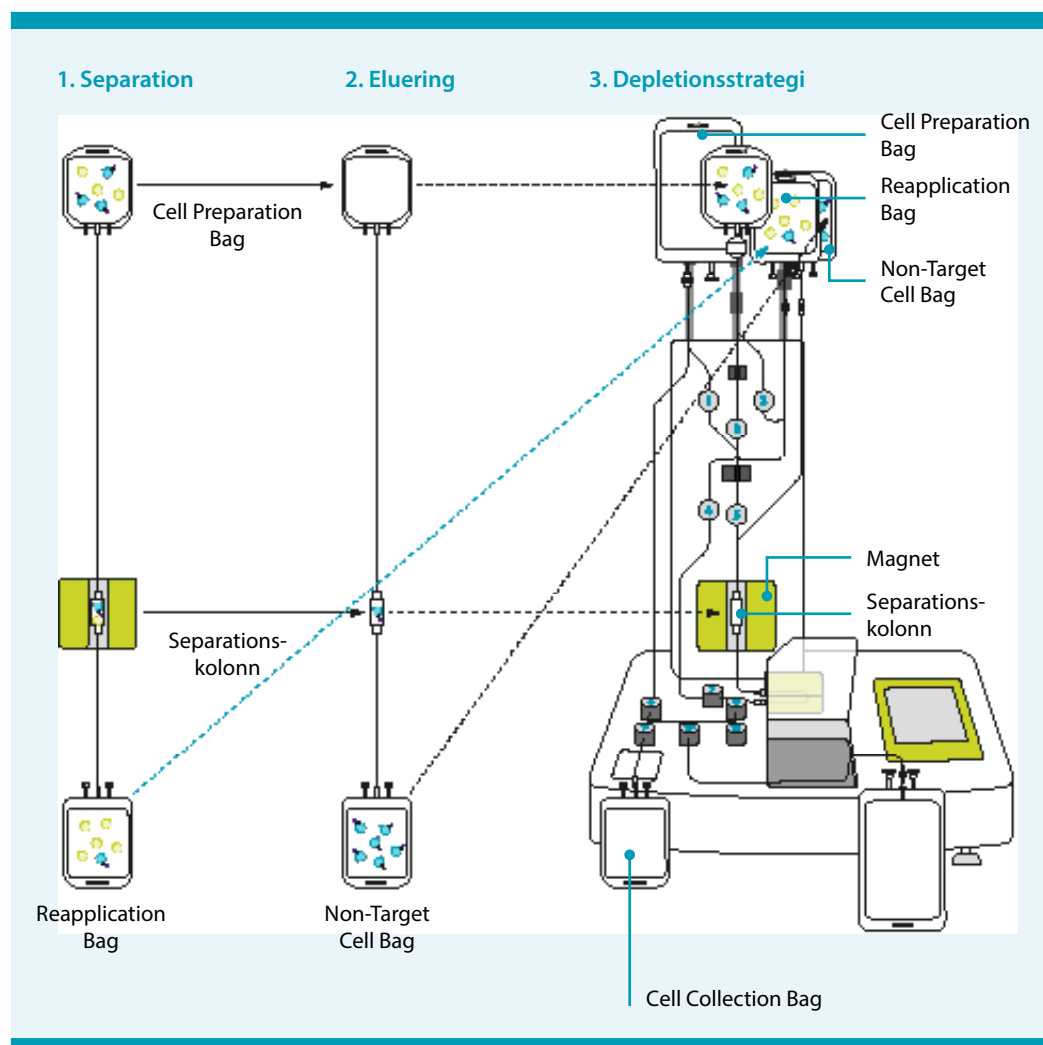
Depletion av celler med CliniMACS Tubing Set LS: DEPLETION 2.1



Figur 1.5: Strategi för depletionsprogrammet DEPLETION 2.1 med CliniMACS Tubing Set LS

1. Magneten är i läget "ON". Magnetiskt märkta celler hålls kvar i separationskolonnen, medan andra icke-märkta celler (målceller) flödar igenom kolonnen och samlas in i Cell Collection Bag.
2. Magneten är i läget "OFF". De magnetiskt märkta cellerna (icke-målceller) frisätts från separationskolonnen och samlas in i Negative Fraction Bag.
3. Depletionsprogrammet (DEPLETION 2.1) håller kvar de magnetiskt märkta cellerna i separationskolonnen och de icke-märkta cellerna (målceller) flödar igenom och samlas in i Cell Collection Bag. När magneten flyttats till läget "OFF" frisätts de magnetiskt märkta cellerna (icke-målceller) från kolonnen och samlas in i Negative Fraction Bag. **Notera:** Målcellsfraktionen samlas alltid in i Cell Collection Bag.

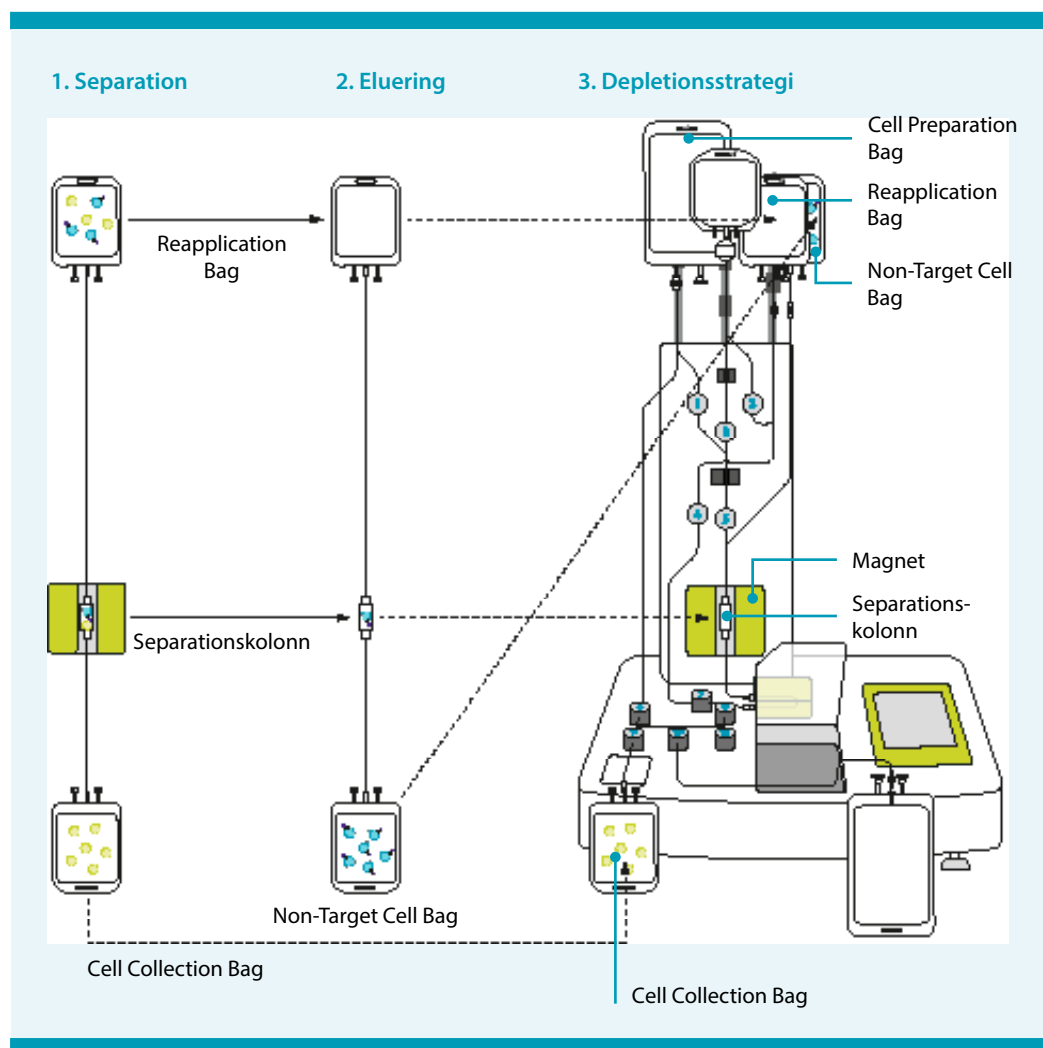
Depletion av celler med CliniMACS Depletion Tubing Set: DEPLETION 3.1 (Del 1: Staged Cell Loading [Bulk Loading Stage])



Figur 1.6: Strategi för depletionsprogrammet DEPLETION 3.1 med CliniMACS Depletion Tubing Set (Del 1)

1. Staged Cell Loading (Bulk Loading Stage): Magneten är i läget "ON". Magnetiskt märkta celler hålls kvar i separationskolonnen, medan andra icke-märkta celler (målceller) flödar igenom och samlas in i Reapplication Bag.
2. Magneten är i läget "OFF". De magnetiskt märkta cellerna (icke-målceller) frisätts från separationskolonnen och samlas in i Non-Target Cell Bag.
3. Depletionsprogrammet (DEPLETION 3.1) håller kvar de magnetiskt märkta cellerna i separationskolonnen och de icke-märkta cellerna (målceller) flödar igenom kolonnen och samlas in i Reapplication Bag för att på nytt laddas i separationskolonnen för en andra sensitiv deplektion (se Figur 1.7). När magneten flyttats till läget "OFF" frisätts de magnetiskt märkta cellerna (icke-målceller) från kolonnen och samlas in i Non-Target Cell Bag.

Depletion av celler med CliniMACS Depletion Tubing Set: DEPLETION 3.1 (Del 2: Känslig provladdning [steget känslig laddning])



Figur 1.7: Strategi för depletionsprogrammet DEPLETION 3.1 med CliniMACS Depletion Tubing Set (Del 2)

4. Känslig provladdning (steget Känslig laddning): Magneten är i läget "ON". Cellerna från Reapplication Bag laddas på nytt i separationskolonnen. De få kvarvarande magnetiskt märkta cellerna hålls kvar i separationskolonnen medan de icke-märkta cellerna (målceller) flödar igenom kolonnen och samlas in i Cell Collection Bag.
5. Magneten är i läget "OFF". De magnetiskt märkta cellerna (icke-målceller) frisätts från separationskolonnen och samlas in i Non-Target Cell Bag.
6. I slutet av separationen befinner sig de märkta cellerna (icke-målceller) i Non-Target Cell Bag och de icke-märkta cellerna (målceller) i Cell Collection Bag. **Notera:** Mållcellsfraktionen samlas alltid in i Cell Collection Bag.

2 Ordlista

2.1 Grafisk information

Följande framställning visar de paneler som används i denna användarhandbok för att informera användaren om eventuella risker om de angivna varningarna och de förebyggande åtgärderna inte beaktas. Risknivån klassificerar risken enligt beskrivning nedan. Nivån, typen och källan till risken samt eventuella konsekvenser, förbud och åtgärder indikeras enligt följande. Ikoner på vänster sida specificerar risken.

VARNING

Indikerar en farlig situation som, om den inte förhindras, kan leda till dödsfall eller allvarlig skada

FÖRSIKTIGHET

Indikerar en farlig situation som, om den inte förhindras, kan leda till mindre eller måttlig skada

OBS

Indikerar information som anses viktig, men inte riskrelaterad (t.ex. meddelanden som avser sakskada)

VIKTIGT

Ger användaren information om viktiga tillämpningar eller information som inte är relaterad till personskada eller sakskada

2.2 Symbolförklaringar

En översikt över symboler som används för CliniMACS Plus-systemet finns i användarhandboken för CliniMACS Plus Instrument. Symbolförklaringarna visar de symboler som används i användarhandböcker och märkningen av CliniMACS-produkter.

2.3 Ordlista med termer

Aferes	Metoden att samla in blod som innebär att helblod tas, en önskad komponent väljs ut och sparas och därefter återgår kvarvarande blod till donatorn
Antibiotinantikropp	Denna antikropp känner igen celler som tidigare märkts med en lämplig biotinylerad antikropp eller ligand.
BDCA	Dendritiskt cellantigen i blod
Buffer Waste Bag	Uppsamlingspåse för uppsamling av buffert under cellseparation med CliniMACS Plus Instrument
Buffertval	Se CliniMACS PBS/EDTA Buffer.
CD1c (BDCA-1)-antigen	CD1c är del av ett CD1-genkluster som tros vara relaterat till MHC. CD1-generna är kluster i ett 170 000 bp-område med human kromosom 1q23.1. Proteinerna kodade däri (CD1a-e) uttrycks som heterordimerer som består av CD1 tung kedja icke-kovalent parat med β 2-mikroglobulin. CD1c är involverat i antigenpresentation av mikrobiella glykolipider eller lipopeptidantigener mot T-lymfocyter. I humant perifert blod uttrycks CD1c (BDCA-1) på myeloida dendritiska celler av typ-1 (MDC1) och på en undergrupp av B-lymfocyter. De finns i lymfkörtlar, mantelcellszoner och germinalcenter, i marginalområden i mjälten och i fetalt och humant perifert blod.
CD3-antigen	CD3-antigenet finns på mogna humana T-celler, tymocyter och en undergrupp av NK-celler. Det är associerat med T-cellsreceptorn (TCR) och är ansvarigt för signalöverföringen av TCR. CD3-antigenet är ett komplex bestående av fem invariabla kedjor: γ , δ , ϵ , ζ och η . CD3-antikroppen känner igen alla T-celler, dvs. den reagerar med 70–80% av lymfocyterna i perifert humant blod och med 65–85% av tymocyterna. Epitopen som känns igen av antikroppen finns på ϵ -kedjan på CD3-komplexet.
CD4-antigen	CD4-antigenet uttrycks på de flesta tymocyter och cirka två tredjedelar av T-cellerna i perifert blod samt på monocyter och makrofager. CD4 är en accessorisk molekyl vid igenkänning av främmande antigener i association med MHC klass II. Dessutom är CD4 en receptor för HIV-1.

CD8-antigen	CD8-antigenet är en disulfidkopplad dimer som existerar antingen som en CD8 α homodimer eller som en CD8 α/β heterodimer. CD8 uttrycks kraftigt på CD8-positiva T-celler och tymocyter och på en undergrupp av NK-celler och CD8-positiva γ/δ T-celler. CD8 agerar som en co-receptor med T-cellsreceptorer begränsade till MHC-klass I vid igenkänning av antigen.
CD14-antigen	CD14-antigenet är ett 53–55 kD membranglykoprotein som uttrycks på monocyter. CD14-antigenet är känt som en receptor för komplex av LPS och LPS-bindande protein (LBP).
CD19-antigen	CD19-antigenet är en viktig signaltransduktionsmolekyl som reglerar B-lymfocyternas utveckling, aktivering och differentiering. Som en markör för B-cellshärkomst uttrycks CD19 från stadiet tidiga pro-B-celler till B-cellslymfoblaster men uttrycket är nedreglerat vid B-cellernas mognad till plasmaceller. CD19-antigenet uttrycks dessutom på de flesta maligna B-celler och en undergrupp av follikulära dendritiska celler.
CD25-antigen	CD25-antigenet, interleukin-2 receptors alfakedja (IL-2R α) med låg affinitet uttrycks på aktiverade T- och B-celler, NK-celler och monocyter, samt på reglerande CD4-positiva T-celler. CD25-antigenet visar tre epitopområden A, B och C. Antikroppen i CliniMACS CD25 Reagent känner igen epitop A i CD25-molekylen.
CD34-antigen	CD34-antigenet är ett mycket glykosylerat 115 kDa integralt membranprotein av typ 1 med okänd funktion som uttrycks på 1% till 4% av normala benmärgsceller och mindre än 0,2% av normala perifera blodleukocyter, på undergrupper av stromala benmärgsceller, och på små kärlendotel i olika vävnader.
CD45RA-antigen	CD45RA-antigenet uttrycks på naiva CD4- och CD8-positiva T-celler samt på undergrupper av B-celler, NK-celler och monocyter. Det är en isoform av det vanliga leukocytantigenet CD45, ett protein-tyrosin-fosfat transmembran.
CD56-antigen	CD56-antigenet tillhör NCAM-familjen (neurala celladhesionsmolekyler) som uttrycks i det hematopoetiska systemet på NK- och NKT-celler.
CD304 (BDCA-4)-antigen	CD304 (BDCA-4)-antigenet ett 130–140 kDa membranglykoprotein som uttrycks i färskt blod och benmärg exklusivt på plasmacytoida dendritiska celler.
Cell Collection Bag	Påse i vilken de renade målcellerna ackumuleras efter separation.

Cell Preparation Bag	Påse i vilken cellprodukt överförs och i vilken magnetisk märkning och tvättning av celler sker.
Cellulär startprodukt	Cellinnehållande produkt som används som startmaterial för CliniMACS Plus-separationsprocess, t.ex. leukoferes, PBMC eller benmärg
CliniMACS Anti-Biotin Reagent	Reagens för magnetisk märkning av celler som primärt märks med biotinylerade antikroppar eller ligander.
CliniMACS CD1c Biotin (BDCA-1)	Biotinylerad antikropp för märkning av humana celler som uttrycker CD1c (BDCA-1)-antigenet före magnetisk märkning med CliniMACS Anti-Biotin Reagent.
CliniMACS CD3 Reagent	Reagens för magnetisk märkning av celler som uttrycker CD3-antigenet
CliniMACS CD4 Reagent	Reagens för magnetisk märkning av celler som uttrycker CD4-antigenet
CliniMACS CD8 Reagent	Reagens för magnetisk märkning av celler som uttrycker CD8-antigenet
CliniMACS CD14 Reagent	Reagens för magnetisk märkning av celler som uttrycker CD14-antigenet
CliniMACS CD19 Reagent	Reagens för magnetisk märkning av celler som uttrycker CD19-antigenet
CliniMACS CD25 Reagent	Reagens för magnetisk märkning av celler som uttrycker CD25-antigenet
CliniMACS CD34 Reagent	Reagens för magnetisk märkning av celler som uttrycker CD34-antigenet
CliniMACS CD45RA Reagent	Reagens för magnetisk märkning av celler som uttrycker CD45RA-antigenet
CliniMACS CD56 Reagent	Reagens för magnetisk märkning av celler som uttrycker CD56-antigenet
CliniMACS CD304 (BDCA-4) Reagent	Reagens för magnetisk märkning av celler som uttrycker CD304 (BDCA-4)-antigenet
CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma)	Kombination av reagenser som består av CliniMACS IFN-gamma Catchmatrix Reagent och CliniMACS IFN-gamma Enrichment-reagens. Med CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma), kan IFN-gammautsöndrande celler anrikas efter restimulering <i>in vitro</i> .

CliniMACS Depletion Tubing Set	Slangar, anslutningar, kolonner och påsar med hjälp av vilka den magnetiskt märkta suspensionen bearbetas och i vilka den magnetiska cellseparationen äger rum, särskilt utformade för de specifika depletionsbehoven
CliniMACS IFN-gamma Catchmatrix Reagent	Komponent i CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma) för ytmärkning av leukocyter med IFN-gammaspecifika antikroppar
CliniMACS IFN-gamma Enrichment Reagent	Komponent i CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma) för magnetisk märkning av IFN-gamma bundet till CliniMACS IFN-gamma Catchmatrix Reagent på IFN-gammautsöndrande celler
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	Buffert som används för cellberedning och cellseparation med CliniMACS Plus-systemet: PBS (fosfatbuffrad saltlösning), med tillsats av 1 mM EDTA, pH 7,2. Före användning måste CliniMACS PBS/EDTA Buffer tillsättas med HSA av farmaceutisk kvalitet till en slutlig koncentration på 0,5% (vikt/volym, dvs. 5 g HSA per liter buffert)
CliniMACS Plus Instrument	Magnetiskt cellseparationsinstrument baserat på MACS-Teknologi
CliniMACS TCR α / β -biotin	Biotinylerad antikropp för märkning av humana celler som uttrycker TCR α / β -antigenet före magnetisk märkning med CliniMACS Anti-Biotin Reagent
CliniMACS Tubing Set, CliniMACS Tubing Set LS	Slangar, anslutningar, kolonner och påsar med hjälp av vilka den magnetiskt märkta cellsuspensionen bearbetas och i vilka den magnetiska cellseparationen äger rum
EDTA	Etylendiamintetraättiksyra
Förkolonn	Första kolonn i CliniMACS Tubing Set och CliniMACS Tubing Set LS, fungerar som ett filter för att fånga celler som har icke-specifika interaktioner med kolonnmatrisen
Förkolonnhållare	Stöd monterat på CliniMACS Plus Instrument som håller förkolonnen på plats
HSA	Humant serumalbumin
Priming	Steg före cellseparation i vilket buffert spolas genom slangsetet
Hematopoetiska progenitorceller	Progenitorceller av lymfoid, myeloid och erytroid härkomst

Humant serumalbumin	HSA av farmaceutisk kvalitet, godkänt i användarens land, krävs som en bufferttillsats vid användning med CliniMACS Plus-systemet.
Hållare för separationskolonn	Gjutna spår i magnetkåpan som håller separationskolonnen på plats
IgG	Immunoglobulin G
Leukoferes	Aferes som samlar in leukocyter
Luer-anslutning	Skruvkoppling, del av slangsetet
Luer/Spike Interconnector	Överföringsset med piercingstift (spike) och sprutadapter (honer) för plasma eller vätskor
Låsring	Del av slangsetet som håller pumpslangen på rätt plats
MDC	Myeloida dendritiska celler
Magnetisk antikropp	En superparamagnetiskt märkt antikropp
Monoklonala antikroppar	En enkel typ av antikropp som är riktad direkt mot en specifik epitop (antigen, epitop) och produceras av en enkel klon av B-celler eller en enkel hybridom cellinje, som formas av fusionen av en lymfocytcell med en myelomcell. Vissa myelomceller syntetiserar naturligt enstaka antikroppar.
Märkning	Reaktion av celler med magnetisk märkningsreagens, t.ex. CliniMACS CD34 Reagent till CD34-positiva celler
Negative Fraction Bag	Påse i CliniMACS Tubing Set och CliniMACS Tubing Set LS som innehåller cellfraktionen som inte är målet
Non-Target Cell Bag	Påse i CliniMACS Depletion Tubing Set som innehåller cellfraktionen som inte är målet
Orbital rotator	Instrument som används för att blanda cellprodukt under reaktionen med CliniMACS-reagenser
PBMC	Mononukleär cell i perifert blod
Peristaltisk pump	Slangpump som används i CliniMACS Plus Instrument för att kontrollera flödes hastigheten på vätskan i slangsetet
Plasma Waste Bag	Uppsamlingspåse för att samla upp överskott av plasma före märkningsproceduren
Priming Waste Bag	Påse i vilken buffert från primingsteget samlas in

Plasmaextraktor	Instrument som används för att extrahera vätska från Cell Preparation Bag efter celltvätt
Pre-system Filter	40 µm filterinstrument mellan Cell Preparation Bag och förkolonn som används för att fånga upp klumpar och celldebris
Procedur i påse	Steril bearbetning och överföring av cellerna i den slutna miljön i transferpåsar.
Provtagningskoppling	Injektionsport för exempelvis avlägsnande av prover eller tillsats av CliniMACS-reagenser till Cell Preparation Bag
Pumpens säkerhetsbrytare	Sensor som förhindrar pumpdrift när pumpdörren är öppen
Påsfack	Fack i CliniMACS Plus Instrument i vilken Negative Fraction Bag och Buffer Waste Bag ska placeras
Påshängare	Stöd på CliniMACS Plus Instrument för montering av Cell Preparation Bag, Non-Target Cell Bag, Priming Waste Bag, Reapplication Bag och buffertpåse
Reapplication Bag	Påse i CliniMACS Depletion Tubing Set i vilken icke-märkta celler samlas in tillfälligt under separationen. De icke-märkta cellerna från Reapplication Bag appliceras två gånger i separationskolonnen för att säkerställa hög renhet hos målcellerna.
Selektionskolonn	Se separationskolonn.
Separationreagens	Reagens för magnetisk märkning av celler, t.ex. CliniMACS CD34 Reagent
Separationsprogram	Programvara utformat för anrikning eller depletion av magnetiskt märkta subset av celler från en blandad cellpopulation. Välj från en meny med olika separationsprogram beroende på avsedd separation.
Separationskolonn	Kolonn i vilken magnetiskt märkta celler separeras när de exponeras för det magnetiska fältet
T-koppling	T-formad koppling på ett slangset där tre slangar möts

TCR α / β -antigen	TCR α / β är heterodimern för T-cellsreceptorn som består av två transmembranglykoproteinkedjor, α och β . Båda kedjorna tillhör Ig-superfamiljen och består av ett konstant och ett polymorft variabelt område. Det variabla området i TCR α / β är inblandat i igenkänning av antigena peptider som presenteras av MHC-komplexet i antigenpresenterade celler. TCR α / β -antigenet uttrycks på de flesta perifera T-cellerna i perifert blod.
Transferpåse	Påse med en slang och en spike i änden.
Transferset för plasma	Transferset med två piercingstift (spikes) för plasma eller vätskor
Val av kolonnhållare	Se hållare för separationskolonn.
Värmeförseglare	Värmeinstrument för steril försegling av PVC-slang
Vätskesensor	Komponent i CliniMACS Plus Instrument som detekterar vätska i slangen
WBC	Vita blodkroppar
Wash Waste Bag	Uppsamlingspåse i vilken den tvättade supernatanten samlas in genom separation från den sedimenterade cellsuspensionen efter centrifugeringsstegen under provberedning.
rpm	Varv per minut
$\times g$	Multipler av jordens tyngdkraftsacceleration

3 Varningar och förebyggande åtgärder

I detta kapitel förklaras de eventuella riskerna i samband med driften av CliniMACS Plus-systemet. Vid alla tidpunkter måste alltid lokala säkerhetsanvisningar för arbetsplatsen, principer, standarder för god tillverkningssed, hälsa, säkerhet och förebyggande av olyckor beaktas. För anvisningar om t.ex. varningar och förebyggande åtgärder med avseende på hanteringen av biologiskt riskmaterial och cellulär startprodukt samt komponenterna i CliniMACS Plus-systemet, se relevanta avsnitt i bruksanvisningen för respektive komponent. Detaljerad bruksanvisning för CliniMACS Plus Instrument beskrivs i användarhandboken för CliniMACS Plus Instrument.

Alla allvarliga incidenter som inträffat i samband med den här produkten ska rapporteras till Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG (med de kontaktuppgifter som anges) och till ansvarig myndighet i det EU-land där den som använder produkten är verksam.

3.1 Processrelaterad

VARNING

Risk för processfel eller skada på instrumentet. Risk för processfel och skada på instrumentet om procedurerna utförs av operatörer utan utbildning. Samtliga processprocedurer får endast utföras av professionella användare. Utbildning av operatörer sker av en kvalificerad representant för Miltenyi Biotec.

FÖRSIKTIGHET

Risk för nedsatt processprestanda. Temperaturer under eller över rumstemperatur kan leda till lägre viabilitet, renhet och färre antal målceller. Utför provberedning och cellseparation vid rumstemperatur (+19 °C till +25 °C [+66 °F till +77 °F]).

FÖRSIKTIGHET

Utrustningens säkerhet kan vara komprometterad. Utrustningens säkerhet kan vara komprometterad om instrumentet inte används enligt tillverkarens anvisningar. Du ska läsa igenom och förstå säkerhetsinformationen, varningarna, de förebyggande åtgärderna och anvisningar för säker drift av CliniMACS Plus-systemet som finns i CliniMACS Plus-bruksanvisning och i alla säkerhetsrelaterade rekommendationer utfärdade av Miltenyi Biotec.

- För tillverkning och användning av målceller hos människa måste nationella lagar och förordningar – t.ex. EU-direktiv 2004/23/EG (mänskliga vävnader och celler) eller direktiv 2002/98/EG (humanblod och blodkomponenter) – följas. Således är all klinisk användning av målcellerna användaren av CliniMACS Plus-system ansvar.
- Allt material som har kommit i kontakt med blod och blodprodukter måste hanteras som infektiöst material. Förordningar för hantering av infektiöst material måste beaktas.

- Alla slangar, kopplingar, ventiler samt förkolonnen och separationskolonnen ska kontrolleras noggrant för läckage under primingsteget.
- Alla påsar, inklusive de som använts vid provberedning, ska sparas till den sista analysen av de insamlade cellerna är avslutad och lyckad separation av målcellerna har bekräftats.

3.2 CliniMACS-reagenser och biotinkonjugat

- När målcellsfraktionen infunderas eller injiceras i patienten kan de erhålla spår av murin antikropp och järndextran.
- Järndextrankulor och/eller murina antikroppar kan orsaka allergiska eller anafylaktiska reaktioner hos patienterna. Intensivvårdsutrustning och läkemedel ska finnas tillgängliga.
- Separation av celler med CliniMACS-reagenser och biotinkonjugat får bara utföras av utbildade operatörer.
- Operatörer som använder CliniMACS-reagenser och biotinkonjugat ska ha erfarenhet av separation av celler från benmärg eller perifert blod.
- Icke-målcellerna är inte avsedda för terapeutisk användning och får inte infunderas till patienten.
- CliniMACS-reagenser och biotinkonjugat är endast avsedda för användning *in vitro* och är inte avsedda för terapeutisk användning eller för direkt infusion till patienter.
- CliniMACS-reagenser och biotinkonjugat rekommenderas inte för patienter med känd eller misstänkt överkänslighet mot musimmunglobuliner eller järndextran.
- Patienterna kan utveckla humana anti-musantikroppar (HAMA).
- Använd inte efter det utgångsdatum som är tryckt på produktetiketten.
- Använd inte om förpackningen är skadad. Använd endast reagens om flaskan är oskadad och förseglad.

3.3 Hantering av biologiskt riskmaterial

VARNING

Risk för svår skada eller dödsfall. Beroende på vilket biologiskt material som används kan kontakt leda till svår personskada eller dödsfall. Använd alltid personlig säkerhetsutrustning i enlighet med varningar och förebyggande åtgärder, framför allt om biologiskt riskmaterial används eller har använts.

- För att förhindra kontamination av den cellulära startprodukten ska alla förberedelsesteg utföras under sterila förhållanden med hjälp av aseptisk teknik (t.ex. i det laminära flödesskåpet).
- Operatören som utför cellseparationen måste ha fått utbildning i korrekt användning av utrustningen och i hanteringen av blodprodukter och benmärgsaspirat.
- Operatören som utför cellseparationen ska använda lämpliga kläder (t.ex. laboratorierock, handskar och skyddsglasögon) vid arbete med patientprover och hantering av eventuellt biologiskt riskmaterial.
- Alla blodprodukter måste hanteras som en eventuell biologisk risk. Leukaferesprodukt, blodprodukt, benmärgsaspirat, insamlade celler, använd buffert, använda slangset och andra material som har kommit i kontakt med dessa vätskor måste hanteras som biologiskt riskmaterial enligt vanliga sjukhus- eller institutionskrav.
- CliniMACS Plus Instrument ska beaktas som en potentiell biologisk risk efter varje separationskörning och rengöras med ett vattenbaserat biocidrengöringsmedel (t.ex. Bacillo® plus eller Meliseptol®, se även avsnittet "Rengöring och underhåll" i användarhandboken för CliniMACS Plus Instrument) enligt vanliga sjukhus- eller institutionskrav.
- Engångsmaterial måste behandlas som biologiskt riskmaterial enligt vanliga sjukhus- eller institutionskrav.

3.4 Cellulär startprodukt

VIKTIGT

Märkning och separation av celler ska påbörjas så snart som möjligt efter att den cellulära startprodukten har samlats in. Produkten ska inte vara äldre än 24 timmar när märknings- och separationsproceduren påbörjas.

- Den cellulära startprodukten (leukaferesprodukt) ska samlas in enligt vanliga sjukhus- eller institutionsprocedurer i vanliga uppsamlingspåsar.
- Behållaren som innehåller den cellulära startprodukten ska märkas med patient-ID, tidpunkt, datum och provtagningsställe enligt de procedurer som anges för användning i det kliniska protokollet.
- Vid transport ska den cellulära startprodukten packas i isolerade behållare och förvaras vid kontrollerad rumstemperatur (+19 °C till +25 °C [+66 °F till +77 °F]) enligt vanliga sjukhus- eller institutionsprocedurer för blodprovstagning som är godkända för användning i det kliniska protokollet. Får ej frysas. Cellkoncentrationen ska inte överstiga $0,2 \times 10^9$ celler per mL under transport.
- Undvik kraftig blandning av den cellulära startprodukten.
- Om den cellulära startprodukten exempelvis måste förvaras över natten ska detta ske vid kontrollerad rumstemperatur (+19 °C till +25 °C [+66 °F till +77 °F]). Under förvaring ska leukocytkoncentrationen aldrig överstiga $0,2 \times 10^9$ celler per mL.
- Celler ska förvaras i autolog plasma. Om cellkoncentrationen överstiger $0,2 \times 10^9$ celler per mL ska den cellulära startprodukten spädas med autolog plasma.

4 CliniMACS Plus-systemet

CliniMACS Plus Instrument, som består av komponenterna CliniMACS Plus Instrument, CliniMACS-reagens(er), CliniMACS Tubing Set, CliniMACS PBS/EDTA Buffer och ytterligare tillbehör, som måste användas i kombination, är avsedda för *in vitro* separation av specifika humana celler för kliniska applikationer.

VIKTIGT

För anvisningar, t.ex. varningar och förebyggande åtgärder för komponenter i CliniMACS Plus-systemet, se bruksanvisningen för respektive komponent.

4.1 CliniMACS Plus Instrument

CliniMACS Plus Instrument är ett elektromekaniskt instrument som består av en permanent magnet, en peristaltisk pump, klämventiler, elektronik och programvara.

4.2 CliniMACS-reagenser och biotinkonjugat

CliniMACS-reagenser är mörka, icke-viskösa, kolloidala lösningar som innehåller cellspecifika antikroppskonjugat i buffert. Reagenserna består av antikroppen som är kemiskt kopplad till superparamagnetiska partiklar.

CliniMACS biotinkonjugat är klara och färglösa lösningar som innehåller en antikropp som är kovalent bunden till biotin i buffert. Dessa antikroppar är mycket specifika och möjliggör märkning *in vitro* av sällsynta målceller.

4.3 CliniMACS-slangset

CliniMACS-slangset är sterila, slangset för engångsbruk avsedda att användas i kombination med CliniMACS Plus Instrument för anrikning eller depletion *in vitro* av humana celler från heterogena hematologiska cellpopulationer.

4.4 CliniMACS PBS/EDTA Buffer

CliniMACS PBS/EDTA Buffer är en tvätt- och transportvätska för *in vitro*-separation av humana celler.

4.5 CliniMACS-tillbehör

- **transferset för plasma:**
transferset med två spikes för plasma eller vätskor, Transfer Set Coupler/Coupler (REF 200-073-902), eller likvärdigt
- **Luer/Spike Interconnector:**
transferset med spike och sprutadapter (hon-luer) för plasma eller vätskor, Luer/Spike Interconnector (REF 200-073-903), eller likvärdig

4.6 Ytterligare material som krävs

Förutom CliniMACS-produkter kan ytterligare material krävas för CliniMACS Plus-separation.

- **cellodlingspåsar, gaspermeabla:**
MACS GMP Cell Differentiation Bag – 100 mL, eller likvärdig
- **transferpåsar, lämpliga för centrifugering:**
transferpåse 150 mL, Terumo, eller likvärdig
transferpåse 600 mL, Terumo, eller likvärdig
transferpåse 1 000 mL, Terumo, eller likvärdig
- **provtagningskoppling:**
provtagningskoppling, Terumo, eller likvärdig
- **förfilter:**
blodtransfusionsfilter, Haemonetics®, eller likvärdigt
- **sprutor och nålar:**
lämpliga sprutor (5 mL, 10 mL, 20 mL, 50 mL) och hypodermiska nålar i storleken 20 gauge
- **låsande peang**
- **provrör**
- **humant serumalbumin (HSA):**
Använd endast HSA av farmaceutisk kvalitet och som finns som en godkänd produkt i användarens land.
- **clinisk immunglobulin G:**
Använd endast IgG av farmaceutisk kvalitet och som finns som en godkänd produkt i användarens land, t.ex. i Tyskland: Gamunex® 10%, eller likvärdig.
- **cellodlingsmedium:**
t.ex. RPMI 1640, eller likvärdig
- **applikationsspecifika material:**
individuell biotinylerad cellspecifik antikropp eller ligand; AB-serum eller alternativt autologt serum.

4.7 Utrustning som krävs

- **avbrottsfri strömkälla:**
Rekommenderad UPS: APC Smart-UPS 1500 VA USB och seriell 230 V, tillverkad av APC (American Power Conversion) eller likvärdig.
- **laminärt flödesskåp**
- **steril slanganslutning:**
Terumo Sterile Connection Device (TSCD®), eller likvärdig
- **orbital rotator:**
plattformskakare, Heidolph-instrument, eller likvärdig
- **centrifug:**
centrifug, Sorvall eller likvärdig och behållare för centrifugering med lock för inneslutning av aerosol
- **plasmaextraktor:**
plasmaseparationställ, Terumo-utrustning eller likvärdig
- **bordsvåg:**
Laboratory Balance, Mettler Toledo eller likvärdig med en kapacitet på 1 kg; upplösning till 0,1 g
- **värmeförseglare för slang:**
Hematron III handförseglare, Baxter eller likvärdig
- **slangskalare:**
Tube Stripper, Baxter eller likvärdig
- **behållare för farligt avfall**

Ytterligare utrustning som krävs för CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma):

- Odlingsplatta med 24 brunnar Corning™, Costar™ odlingsplatta med 24 brunnar, Sigma Aldrich eller likvärdig
- MiniMACS™ Separation Unit, Miltenyi Biotec (REF 130-042-102)
- MS Columns, Miltenyi Biotec (REF 130-042-201)
- Pre-Separation Filter, Miltenyi Biotec (REF 130-041-407)
- MACSmix™ Tube Rotator, Miltenyi Biotec (REF 130-090-753)

5 Översikt över applikationer

5.1 Fyra STEG till målceller

I följande kapitel presenteras en översikt över CliniMACS Plus-separation. CliniMACS Plus-separation utförs i fyra STEG. I det första steget bereds cellerna och märks magnetiskt. I det andra steget väljs ett lämpligt separationsprogram. I det tredje steget ansluts slangsetet till CliniMACS Plus Instrument och i det fjärde steget separeras cellerna automatiskt.

Registrering av applikationsrelaterade processdata kan krävas. Kontakta Miltenyi Biotec Technical Support för stödjande arbetsblad.

Användarhandboken för CliniMACS Plus-applikationer omfattar olika alternativ för varje steg (olika reagenser, slangset och program). Innan du påbörjar en applikation måste du välja de applikationsspecifika kapitlen (kapitel 6) och utförlig information om STEG 1–4 (kapitel 7) genom att använda översiktstabellen på följande sida. Översiktstabellen innehåller information om tillämpliga avsnitt i användarhandboken. Översiktstabellen är baserad på typ av och antal reagenser, antal celler, typ av slangset och det relevanta separationsprogram som krävs för separationen.

STEG 1: Cellberedning och magnetisk märkning

I STEG 1 beskrivs beredningen av cellprodukten och den magnetiska märkningen av de specifika cellerna, vilka uttrycker respektive antigen. Följ anvisningarna i tillämpligt avsnitt. Fortsätt med STEG 2.

STEG 2: Val av separationsprogram

I STEG 2 beskrivs valet av separationsprogram i CliniMACS Plus Instrument. Beroende på celltyp och hur många celler som ska separeras måste du välja olika program. Gå till översiktstabellen på nästa sida för att fastställa vilket program som är lämpligt. Läs avsnittet för det valda separationsprogrammet. Följ anvisningarna i respektive avsnitt. Fortsätt med STEG 3.

STEG 3: Installation av CliniMACS-slangset

I STEG 3 beskrivs installationen av slangsetet i CliniMACS Plus Instrument. Följ anvisningarna i lämpligt avsnitt. Fortsätt med STEG 4.

STEG 4: CliniMACS Plus-separation

I STEG 4 beskrivs den automatiserade CliniMACS Plus-separation. CliniMACS Plus Instrument utför den automatiserade cellseparationen (väljs i STEG 2). Följ anvisningarna i tillämpligt avsnitt.

VIKTIGT

I översiktstabellen på följande sidor sammanfattas information om typiska applikationer för CliniMACS-reagenser. Om separation av olika antal målceller ska utföras, se anvisningarna i den applikationsspecifika översikten för att hitta om information om maximal kapacitet för respektive applikation. Följ anvisningarna i de applikationsspecifika avsnitten och detaljerad information om STEG 1–4. Se Översiktstabell.

5.2 Översiktstabell

Applikations- kapacitet	Reagens- flaska/-flaskor	Slangset	Separations- program	Applikations- specifikt avsnitt	Detaljerad information för STEG 1–4			
					STEG 1	STEG 2	STEG 3	STEG 4
Anti-Biotin (REF 173-01) – Anrikning								
≤40×10 ⁹ totala celler	1× Anti-Biotin Reagent	1× CliniMACS Tubing Set (REF 161-01)	ENRICHMENT 1.1	6.3	7.1	7.2.3	7.3.1	7.4.2
Anti-Biotin (REF 173-01) – Depletion (normalskalig applikation)								
≤40×10 ⁹ totala celler	1× Anti-Biotin Reagent	1× CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01)	DEPLETION 2.1	6.3	7.1	7.2.5	7.3.1	7.4.4
Anti-Biotin (REF 173-01) – Depletion (storskalig applikation)								
>40–80×10 ⁹ totala celler	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) – Anrikning								
IFN-utsöndrande celler från ≤1×10 ⁹ totala celler	1 kit (2 reagens- flaskor)	1× CliniMACS Tubing Set (REF 161-01)	ENRICHMENT 3.2	6.17	7.1	7.2.4	7.3.1	7.4.3
CD1c (BDCA-1)-Biotin (REF 277-01) – Depletion - Del 1 av 2								
≤5×10 ⁹ CD19- positiva celler från ≤40×10 ⁹ totala celler (WBC)	1× CD19 Reagent och 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) – Anrikning - Del 2 av 2								
≤0,2×10 ⁹ CD1c (BDCA-1)-positiva celler från ≤40×10 ⁹ totala celler (WBC)	1× Anti-Biotin Reagent	1× CliniMACS Tubing Set (REF 161-01)	ENRICHMENT 3.2	6.13	7.1	7.2.4	7.3.1	7.4.3
CD3 (REF 273-01) – Depletion (normalskalig applikation)								
≤15×10 ⁹ CD3- positiva celler från ≤40×10 ⁹ totala celler	1× CD3 Reagent	1× CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01)	DEPLETION 2.1	6.5	7.1	7.2.5	7.3.1	7.4.4
CD3 (REF 273-01) – Depletion (storskalig applikation)								
>15–20×10 ⁹ CD3-positiva celler från >40–80×10 ⁹ totala celler	2× CD3 Reagent	1× CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01)	DEPLETION 2.1	6.5	7.1	7.2.5	7.3.1	7.4.4
CD3 (REF 273-01) – Depletion (normalskalig applikation)								
≤15×10 ⁹ CD3- positiva celler från ≤40×10 ⁹ totala celler	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

Applikations- kapacitet	Reagens- flaska/-flaskor	Slangset	Separations- program	Applikations- specifikt avsnitt	Detaljerad information för STEG 1–4			
					STEG 1	STEG 2	STEG 3	STEG 4
CD3 (REF 273-01) – Depletion (storskalig applikation)								
>15–30×10 ⁹ CD3-positiva celler från >40–80×10 ⁹ totala celler	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) – Anrikning								
≤5×10 ⁹ CD4- positiva celler från ≤40×10 ⁹ totala celler	1× CD4 Reagent	1× CliniMACS Tubing Set (REF 161-01)	ENRICHMENT 1.1	6.10	7.1	7.2.3	7.3.1	7.4.2
CD4 (REF 276-01) – Depletion								
≤12×10 ⁹ CD4- positiva celler från ≤40×10 ⁹ totala celler	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) – Anrikning								
≤4×10 ⁹ CD8- positiva celler från ≤40×10 ⁹ totala celler	1× CD8 Reagent	1× CliniMACS Tubing Set (REF 161-01)	ENRICHMENT 1.1	6.8	7.1	7.2.3	7.3.1	7.4.2
CD8 (REF 275-01) – Depletion								
≤4×10 ⁹ CD8- positiva celler från ≤40×10 ⁹ totala celler	1× CD8 Reagent	1× CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01)	DEPLETION 2.1	6.8	7.1	7.2.5	7.3.1	7.4.4
CD4/CD8 kombination (REF 276-01/REF 275-01) – Depletion								
≤12×10 ⁹ CD4- positiva celler och ≤4×10 ⁹ CD8- positiva celler från ≤40×10 ⁹ totala celler	1× CD4 Reagent och 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) – Anrikning								
≤4×10 ⁹ CD14- positiva celler från ≤20×10 ⁹ totala celler	1× CD14 Reagent	1× CliniMACS Tubing Set (REF 161-01)	ENRICHMENT 1.1	6.2	7.1	7.2.3	7.3.1	7.4.2
CD19 (REF 179-01) – Depletion								
≤5×10 ⁹ CD19- positiva celler från ≤40×10 ⁹ totala celler	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

Applikations- kapacitet	Reagens- flaska/-flaskor	Slangset	Separations- program	Applikations- specfikt avsnitt	Detaljerad information för STEG 1–4			
					STEG 1	STEG 2	STEG 3	STEG 4
CD3/CD19 kombination (REF 273-01/REF 179-01) – Depletion								
≤15×10 ⁹ CD3-positiva celler och ≤5×10 ⁹ CD19-positiva celler från ≤40×10 ⁹ totala celler	1× CD3 Reagent och 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) – Anrikning								
≤0,6×10 ⁹ CD25-positiva celler från ≤40×10 ⁹ totala celler (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) – Anrikning								
≤0,6×10 ⁹ höguttryckande CD25-positiva celler från ≤40×10 ⁹ totala celler (WBC)	1× CD25 Reagent	1× CliniMACS Tubing Set (REF 161-01)	ENRICHMENT 3.2	6.9	7.1	7.2.4	7.3.1	7.4.3
CD25 (REF 274-01) – Depletion (normalskalig applikation)								
≤6×10 ⁹ CD25-positiva celler från ≤40×10 ⁹ totala celler (WBC)	1× CD25 Reagent	1× CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01)	DEPLETION 2.1	6.9	7.1	7.2.5	7.3.1	7.4.4
CD25 (REF 274-01) – Depletion (storskalig applikation)								
>6–12×10 ⁹ CD25-positiva celler från >40–80×10 ⁹ totala celler (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) – Anrikning (normalskalig applikation)								
≤0,6×10 ⁹ CD34-positiva celler från ≤60×10 ⁹ totala celler	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) – Anrikning (storskalig applikation)								
>0,6–1,2×10 ⁹ CD34-positiva celler från >60–120×10 ⁹ totala celler	2× CD34 Reagent	1× CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01)	CD34 SELECTION 2	6.1	7.1	7.2.2	7.3.1	7.4.1
CD45RA (REF 701-46) – Depletion								
≤20×10 ⁹ CD45RA-positiva celler från ≤50×10 ⁹ totala celler	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

Applikations- kapacitet	Reagens- flaska/-flaskor	Slangset	Separations- program	Applikations- specifikt avsnitt	Detaljerad information för STEG 1–4			
					STEG 1	STEG 2	STEG 3	STEG 4
CD56 (REF 271-01) – Anrikning								
≤5×10 ⁹ CD56- positiva celler från ≤40×10 ⁹ totala celler	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) – Anrikning								
≤0,2×10 ⁹ CD304 (BDCA-4)-positiva celler från ≤40×10 ⁹ totala celler	1× CD304 (BDCA-4) Reagent	1× CliniMACS Tubing Set (REF 161-01)	ENRICHMENT 3.2	6.14	7.1	7.2.4	7.3.1	7.4.3
TCRα/β-biotin (REF 701-48/REF 173-01) – Depletion								
≤24×10 ⁹ TCRα/β- positiva celler från ≤60×10 ⁹ totala celler	1× TCRα/β Biotin och 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

Tabell 5.1: Översikt över tillgängliga applikationer med motsvarande slangset och separationsprogram

6 Applikationsspecifik översikt över STEG 1–4

6.1 Anrikning av CD34-positiva celler

CliniMACS Plus CD34-systemet inklusive CliniMACS Plus Instrument, CliniMACS CD34 Reagent, CliniMACS Tubing Set eller CliniMACS Tubing Set LS och CliniMACS PBS/EDTA Buffer är avsedda för anrikning av humana CD34-positiva hematopoetiska progenitorceller *in vitro* från heterogena hematologiska cellpopulationer.

6.1.1 STEG 1: Cellberedning och magnetisk märkning

Första åtgärder som krävs

Applikationskapacitet

- Normalskalig applikation: upp till $0,6 \times 10^9$ CD34-positiva celler av upp till 60×10^9 totala celler (WBC)
- Storskalig applikation: mer än $0,6 \times 10^9$ och upp till $1,2 \times 10^9$ CD34-positiva celler av upp till 120×10^9 totala celler (WBC)

FÖRSIKTIGHET

Risk för otillräcklig separationsprestanda av märkta celler. Om applikationsspecifikationerna överskrids finns en risk för otillräckligt specifik märkning. Använd det antal celler som krävs och reagenser enligt beskrivningen för respektive applikation.

CliniMACS-material som krävs

Material	Katalog-nummer	Kvantitet	Separationsprogram
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1	–
CliniMACS CD34 Reagent	171-01	• 1 flaska (normalskalig) • 2 flaskor (storskalig)	–
CliniMACS Tubing Set	161-01	1 slangset	CD34 SELECTION 1
CliniMACS Tubing Set LS	162-01	1 slangset	CD34 SELECTION 2
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	3×1 000 mL påsar ¹	–

¹ Tillsätt HSA till CliniMACS PBS/EDTA Buffer till en slutlig koncentration på 0,5% (v/v) före användning.

Tabell 6.1: CliniMACS-material som krävs för anrikning av CD34-positiva celler

Ytterligare material som krävs

- **Cell Preparation Bag:**
en 600 mL transferpåse, lämplig för centrifugering samt en provtagningskoppling och två transferset för plasma, för användning under cellberedningsproceduren
- **Plasma Waste Bag och Wash Waste Bag:**
tre 600 mL transferpåsar, lämpliga för centrifugering
- **Cell Collection Bag:**
en 150 mL transferpåse i kombination med en Luer/Spike Interconnector för att ansluta Cell Collection Bag till slangsetet
- ett förfilter
- låsande peang
- lämpliga sprutor (olika storlekar) och hypodermiska nålar i storleken 20 gauge
- humant serumalbumin (HSA) som ska tillsättas till CliniMACS PBS/EDTA Buffer till en slutlig koncentration på 0,5% (v/v)
- provrör

► Beredning av påsar

Fastställ vikten på den tomma Cell Collection Bag och Cell Preparation Bag enligt beskrivningen i avsnitt 7.1.1 på sidan 117.

Magnetisk märkning av celler

Se avsnitt 7.1 "STEG 1: Cellberedning och magnetisk märkning" på sidan 117 för detaljerad information om följande steg.

► Analys av cellulär startprodukt

► Överföring av cellulär startprodukt till Cell Preparation Bag

Om vikten av den cellulära startprodukten är mer än 200 g, men antalet celler är mindre än 120×10^9 totala celler och $1,2 \times 10^9$ CD34-positiva celler, centrifugera provet för att minska volymen till högst 200 g och fortsätt sedan med följande steg.

► Spädning av cellulär startprodukt

Tillsätt buffert: Vikt på den buffert som ska läggas till = Vikt på cellulär startprodukt $\times$ 2

► Centrifugering

Centrifugera vid $200 \times g$, utan broms, 15 minuter, rumstemperatur (RT: $+19^\circ\text{C}$ till $+25^\circ\text{C}$ [$+66^\circ\text{F}$ till $+77^\circ\text{F}$]).

► **Volymkontroll: märkningsvolym 95 g (± 5 g) (normalskalig applikation) eller 190 g (± 5 g) (storskalig applikation)**

1. Ta bort supernatanten för att justera provet med hjälp av följande ekvation:
vikt på supernatant som ska tas bort = vikt på spädd cellprodukt – märkningsvolym
2. Resuspendera cellpelletten.

► **Inkubation med CliniMACS CD34 Reagent**

1. Tillsätt 1 eller 2 flaskor CliniMACS CD34 Reagent (se Tabell 6.1). Blanda innehållet försiktigt.
2. Inkubera på en orbital rotator (25 rpm) under 30 minuter vid RT.

► **Borttagande av överskott av reagens**

1. Fyll en Cell Preparation Bag med buffert.
2. Centrifugera (200×g, utan broms, 15 minuter, RT).
3. Ta bort så mycket supernatant som möjligt. **Notera:** Ta bort minst 500 g supernatant. Om den supernatant som tas bort understiger dessa värden rekommenderas totalt tre tvättsteg (istället för endast två). Annars kan borttagandet av obundet reagens vara otillräcklig.
4. Resuspendera cellpelletten.
5. Fyll en Cell Preparation Bag med buffert.
6. Centrifugera (200×g, utan broms, 15 minuter, RT).
7. Ta bort så mycket supernatant som möjligt.
8. Resuspendera cellpelletten.
9. Justera provladdningsvolymen till 150 g (normalskalig applikation) eller 275 g (storskalig applikation).

Notera: Ta ett prov efter borttagande av överskott av reagens för senare analys (valfritt).

6.1.2 STEG 2: Val av separationsprogram

► **Slå på CliniMACS Plus Instrument**

► **Val av separationsprogram CD34 SELECTION 1/2**

(användning av 1 flaska: CD34 SELECTION 1 eller användning av 2 flaskor: CD34 SELECTION 2)

Se avsnitt 7.2.2 på sidan 129.

6.1.3 STEG 3: Installation av CliniMACS-slangset

► CliniMACS Tubing Set och CliniMACS Tubing Set LS

Se avsnitt 7.3.1 på sidan 148.

6.1.4 STEG 4: CliniMACS Plus-separation

► Separationsprocedur

► Koppla bort påsar och registrera processkod

► Ta bort slangset och stäng av

► Analys av celler

Se avsnitt 7.4.1 på sidan 182.

6.2 Anrikning av CD14-positiva celler

CliniMACS Plus CD14-systemet inklusive CliniMACS Plus Instrument, CliniMACS CD14 Reagent, CliniMACS Tubing Set och CliniMACS PBS/EDTA Buffer är avsedda för anrikning av humana CD14-positiva celler *in vitro* från heterogena hematologiska cellpopulationer.

6.2.1 STEG 1: Cellberedning och magnetisk märkning

Första åtgärder som krävs

Applikationskapacitet

Upp till 4×10^9 CD14-positiva celler av upp till 20×10^9 totala celler (WBC)

FÖRSIKTIGHET

Risk för otillräcklig separationsprestanda av märkta celler. Om applikationsspecifikationerna överskrids finns en risk för otillräckligt specifik märkning. Använd det antal celler som krävs och reagenser enligt beskrivningen för respektive applikation.

CliniMACS-material som krävs

Material	Katalog-nummer	Kvantitet
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS CD14 Reagent	272-01	1 flaska
CliniMACS Tubing Set	161-01	1 slangset
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	3×1 000 mL påsar ¹

¹ Se Tabell 6.3 och Tabell 6.4. Tillsätt HSA till CliniMACS PBS/EDTA Buffer med till en slutlig koncentration på 0,5% (v/v) för användning.

Tabell 6.2: CliniMACS-material som krävs för anrikning av CD14-positiva celler

Ytterligare material som krävs

- **Cell Preparation Bag:**
en 600 mL transferpåse, lämplig för centrifugering samt en provtagningskoppling och ett transferset för plasma, för användning under cellberedningsproceduren
- **Plasma Waste Bag och Wash Waste Bag:**
två 600 mL transferpåsar, lämpliga för centrifugering
- **Cell Collection Bag:**
en 150 mL eller en 600 mL transferpåse i kombination med en Luer/Spike Interconnector för att ansluta Cell Collection Bag till slangsetet (se Tabell 6.4)
- **Om byte av Negative Fraction Bag och uppsamlingspåsen för buffert är nödvändig:**
två 1 000 mL transferpåsar i kombination med två Luer/Spike Interconnectors för att ansluta påsarna till slangsetet (se Tabell 6.4)
- **Om mer än en liter buffert krävs för separationen:**
ett transferset för plasma för att ansluta buffertpåsarna (se Tabell 6.4)
- ett förfilter
- låsande peang
- lämpliga sprutor (olika storlekar) och hypodermiska nålar i storleken 20 gauge

Översikt över material som krävs

Cellberedning	
Totalt antal celler (WBC)	$\leq 20 \times 10^9$
Märkta celler	$\leq 4 \times 10^9$
Antal reagensflaskor	1–2
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1 000 mL
Transferset för plasma	1

Tabell 6.3: Material som krävs för cellberedning av CD14-positiva celler

Separation		
Märkta celler	$\leq 2 \times 10^9$	$> 2-4 \times 10^9$
Negative Fraction Bag	–	Byt ut slangsetets originalpåsar mot 1 000 mL transferpåsar
Buffer Waste Bag	–	
Priming Waste Bag	–	–
Cell Collection Bag	150 mL	600 mL
Luer/Spike Interconnector	1	3
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1 000 mL	2 000 mL
Transferset för plasma	–	1

Tabell 6.4: Material som krävs för anrikning av CD14-positiva celler

► Beredning av påsar

Fastställ vikten på den tomma Cell Collection Bag och Cell Preparation Bag enligt beskrivningen i avsnitt 7.1.1 på sidan 117.

Magnetisk märkning av celler

Se avsnitt 7.1 "STEG 1: Cellberedning och magnetisk märkning" på sidan 117 för detaljerad information om följande steg.

► Analys av cellulär startprodukt

► Överföring av cellulär startprodukt till Cell Preparation Bag

► Spädning av cellulär startprodukt

Tillsätt buffert: Vikt på buffert som ska tillsättas = 600 g – Vikt på cellulär startprodukt

► Centrifugering

Centrifugera vid $300 \times g$, utan broms, 15 minuter, rumstemperatur (RT: $+19^\circ\text{C}$ till $+25^\circ\text{C}$ [$+66^\circ\text{F}$ till $+77^\circ\text{F}$]).

► Volymkontroll: märkningsvolym 50 g (± 5 g)

1. Ta bort supernatanten för att justera provet med hjälp av följande ekvation:
vikt på supernatant som ska tas bort = vikt på spädd cellulär startprodukt – märkningsvolym
2. Resuspendera cellpelletten.

► Inkubation med CliniMACS CD14 Reagent

1. Tillsätt 1 flaska CliniMACS CD14 Reagent. Blanda innehållet försiktigt.
2. Inkubera på en orbital rotator (25 rpm) under 30 minuter vid RT.

► **Borttagande av överskott av reagens**

1. Fyll en Cell Preparation Bag med buffert.
2. Centrifugera (300×g, utan broms, 15 minuter, RT).
3. Ta bort så mycket supernatant som möjligt. **Notera:** Ta bort minst 500 g supernatant. Om den supernatant som tas bort understiger 500 g rekommenderas totalt två tvättsteg (istället för endast ett). Annars kan borttagandet av obundet reagens vara otillräcklig.
4. Resuspendera cellpelletten.
5. Justera provladdningsvolymen till 100 g.

Notera: Ta ett prov efter borttagande av överskott av reagens för senare analys (valfritt).

6.2.2 STEG 2: Val av separationsprogram

► **Slå på CliniMACS Plus Instrument**

► **Val av separationsprogram ENRICHMENT 1.1**

► **Inmatning av provparameter**

Se avsnitt 7.2.3 på sidan 131.

6.2.3 STEG 3: Installation av CliniMACS-slangset

► **CliniMACS Tubing Set och CliniMACS Tubing Set LS**

Se avsnitt 7.3.1 på sidan 148.

6.2.4 STEG 4: CliniMACS Plus-separation

► **Separationsprocedur**

► **Koppla bort påsar och registrera processkod**

► **Ta bort slangset och stäng av**

► **Analys av celler**

Se avsnitt 7.4.2 på sidan 186.

6.3 Anrikning/depletion med CliniMACS Anti-Biotin Reagent

CliniMACS Plus Anti-Biotin-systemet inklusive CliniMACS Plus Instrument, CliniMACS Anti-Biotin Reagent, CliniMACS Tubing Set eller CliniMACS Tubing Set LS och CliniMACS PBS/EDTA Buffer är avsedda för anrikning eller depletion av humana celler *in vitro* som tidigare märkts med biotinylerade antikroppar.

6.3.1 STEG 1: Cellberedning och magnetisk märkning

Första åtgärder som krävs

Applikationskapacitet

- **Anrikning:** upp till 40×10^9 totala celler (WBC)
- **Depletion:**
 Normalskalig applikation: upp till 40×10^9 totala celler (WBC)
 Storskalig applikation: mer än 40×10^9 och upp till 80×10^9 totala celler (WBC)

FÖRSIKTIGHET

Risk för otillräcklig separationsprestanda av märkta celler. Om applikationsspecifikationerna överskrids finns en risk för otillräckligt specifik märkning. Använd det antal celler som krävs och reagenser enligt beskrivningen för respektive applikation.

CliniMACS-material som krävs

Material	Katalog-nummer	Kvantitet	Separationsprogram
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1	–
CliniMACS Anti-Biotin Reagent	173-01	• 1 flaska (normalskalig) • 2 flaskor (storskalig)	–
CliniMACS Tubing Set	161-01	1 slangset	ENRICHMENT 1.1
CliniMACS Tubing Set LS	162-01	1 slangset	DEPLETION 2.1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	• $3 \times 1\,000$ mL påsar¹ (normalskalig) • $4 \times 1\,000$ mL påsar¹ (storskalig)	–

¹ Mängden buffert varierar beroende på det valda separationsprogrammet och antalet märkta celler (se Tabell 6.6 till Tabell 6.9).
 Tillsätt HSA till CliniMACS PBS/EDTA Buffer med till en slutlig koncentration på 0,5% (v/v) för användning.

Tabell 6.5: CliniMACS-material som krävs för anrikning/depletion med CliniMACS Anti-Biotin Reagent

Ytterligare material som krävs

- **Cell Preparation Bag:**
en 600 mL transferpåsar, lämpliga för centrifugering samt en provtagningskoppling och två transferset för plasma, för användning under cellberedningsproceduren
- **Plasma Waste Bag och Wash Waste Bag:**
två 600 mL transferpåsar, lämpliga för centrifugering
- **Cell Collection Bag:**
en 600 mL eller en 1 000 mL transferpåse i kombination med en Luer/Spike Interconnector för att ansluta Cell Collection Bag till slangsetet (se Tabell 6.7 och Tabell 6.9)
- **Om byte av Negative Fraction Bag, Buffer Waste Bag och/eller Priming Waste Bag är nödvändig:**
två till tre 1 000 mL transferpåsar i kombination med två Luer/Spike Interconnectors för att ansluta påsarna till slangsetet (se Tabell 6.7 och Tabell 6.9). Byt ut uppsamlingspåsen för priming mot den sterila slanganslutningen.
- **Om mer än en liter buffert krävs för separationen:**
ett till två transferset för plasma för att ansluta buffertpåsarna (se Tabell 6.7 och Tabell 6.9)
- ett förfilter
- låsande peang
- lämpliga sprutor (olika storlekar) och hypodermiska nålar i storleken 20 gauge
- humant serumalbumin (HSA) som ska tillsättas till CliniMACS PBS/EDTA Buffer till en slutlig koncentration på 0,5% (v/v)
- provrör
- individuell biotinylerad cellspecifik antikropp eller ligand

Översikt över material

Cellberedning (ENRICHMENT 1.1)	
Totalt antal celler (WBC)	$\leq 40 \times 10^9$
Antal reagensflaskor	1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	2 000 mL
Transferset för plasma	2

Tabell 6.6: Material som krävs för cellberedning (ENRICHMENT 1.1)

Separation (ENRICHMENT 1.1)

Märkta celler	$\leq 2 \times 10^9$	$> 2-5 \times 10^9$
Negative Fraction Bag	–	Byt ut slangsetets originalpåsar mot 1 000 mL transferpåsar
Buffer Waste Bag	–	
Priming Waste Bag	–	–
Cell Collection Bag	600 mL	600 mL
Luer/Spike Interconnector	1	3
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1 000 mL	2 000 mL
Transferset för plasma	–	1

Tabell 6.7: Material som krävs för anrikning (ENRICHMENT 1.1)

Cellberedning (DEPLETION 2.1)

Totalt antal celler (WBC)	$\leq 40 \times 10^9$	$> 40-80 \times 10^9$
Antal reagensflaskor	1	2
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	2 000 mL	2 000 mL
Transferset för plasma	2	2

Tabell 6.8: Material som krävs för cellberedning (DEPLETION 2.1)

Separation (DEPLETION 2.1)

Märkta celler	$< 5 \times 10^9$	$5-13 \times 10^9$	$> 13-20 \times 10^9$
Negative Fraction Bag	–	Byt ut slangsetets originalpåsar mot 1 000 mL transferpåsar	Byt ut slangsetets originalpåsar mot 1 000 mL transferpåsar
Buffer Waste Bag	–		
Priming Waste Bag	–	–	
Cell Collection Bag	600 mL	1 000 mL	1 000 mL
Luer/Spike Interconnector	1	3	4
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1 000 mL	2 000 mL	3 000 mL
Transferset för plasma	–	1	2

Tabell 6.9: Material som krävs för deplektion (DEPLETION 2.1)

► **Beredning av påsar**

Fastställ vikten på den tomma Cell Collection Bag och Cell Preparation Bag enligt beskrivningen i avsnitt 7.1.1 på sidan 117.

Magnetisk märkning av celler

Se avsnitt 7.1 "STEG 1: Cellberedning och magnetisk märkning" på sidan 117 för detaljerad information om följande steg.

► **Analys av cellulär startprodukt**► **Överföring av cellulär startprodukt till Cell Preparation Bag**

► **Spädning av cellulär startprodukt**

Tillsätt buffert: Vikt på den buffert som ska läggas till = Vikt på cellulär startprodukt × 2

► **Centrifugering**

1. Centrifugera vid 300×g, utan broms, 15 minuter, rumstemperatur (RT: +19 °C till +25 °C [+66 °F till +77 °F]).
2. Ta bort supernatanten för att justera volymen för primär antikropps-märkning enligt rekommendation från tillverkaren av den primära antikroppen.
3. Resuspendera cellpelletten.

► **Märkning av cellerna: inkubation med den primära antikroppen**

Följ bruksanvisningen från tillverkaren av den primära antikroppen.

► **Ta bort överskott av konjugat (1:a tvätt)**

1. Tillsätt buffert: Vikt på buffert som ska tillsättas = 600 g – Vikt på cellprodukt
2. Centrifugera vid 300×g, utan broms, 15 minuter, rumstemperatur (RT: +19 °C till +25 °C [+66 °F till +77 °F]).

► **Volymkontroll: märkningsvolym 95 g (±5 g) (normalskalig applikation) eller 190 g (±5 g) (storskalig applikation)**

1. Ta bort supernatanten för att justera provet med hjälp av följande ekvation:
vikt på supernatant som ska tas bort = vikt på spädd cellprodukt – märkningsvolym

Notera: Ta bort minst 500 g supernatant. Om den supernatant som tas bort understiger 500 g rekommenderas totalt två tvättsteg (istället för endast ett). Annars kan borttagandet av obundet reagens vara otillräcklig.

2. Resuspendera cellpelletten.

► **Magnetisk märkning av celler: inkubation med CliniMACS Anti-Biotin Reagent**

1. Tillsätt 1 eller 2 flaskor CliniMACS Anti-Biotin Reagent (se Tabell 6.6 och Tabell 6.8). Blanda innehållet försiktigt.
2. Inkubera på en orbital rotator (25 rpm) under 30 minuter vid RT.

► **Borttagande av överskott av reagens (2:a tvätt)**

1. Fyll en Cell Preparation Bag med buffert.
2. Centrifugera (300×g, utan broms, 15 minuter, RT).
3. Ta bort så mycket supernatant som möjligt. **Notera:** Ta bort minst 500 g supernatant. Om den supernatant som tas bort understiger det värde som anges ovan, rekommenderas totalt två tvättsteg (istället för endast ett). Annars kan borttagandet av obundet reagens vara otillräcklig.
4. Resuspendera cellpelletten.
5. Justera provladdningsvolymen till 100 g (normalskalig applikation) eller 200 g (storskalig applikation).

Notera: Ta ett prov efter borttagande av överskott av reagens för senare analys (valfritt).

6.3.2 STEG 2: Val av separationsprogram

- **Slå på CliniMACS Plus Instrument**
- **Val av separationsprogram ENRICHMENT 1.1 eller DEPLETION 2.1**
- **Inmatning av provparameter**

Se avsnitt 7.2.3 på sidan 131 eller 7.2.5 på sidan 138.

6.3.3 STEG 3: Installation av CliniMACS-slangset

- **CliniMACS Tubing Set och CliniMACS Tubing Set LS**

Se avsnitt 7.3.1 på sidan 148.

6.3.4 STEG 4: CliniMACS Plus-separation

- **Separationsprocedur**
- **Koppla bort påsar och registrera processkod**
- **Ta bort slangset och stäng av**
- **Analys av celler**

Se avsnitt 7.4.2 på sidan 186 eller 7.4.4 på sidan 194.

6.4 Anrikning av CD56-positiva celler

CliniMACS Plus CD56-systemet inklusive CliniMACS Plus Instrument, CliniMACS CD56 Reagent, CliniMACS Tubing Set och CliniMACS PBS/EDTA Buffer är avsedda för anrikning av humana CD56-positiva celler *in vitro* från heterogena hematologiska cellpopulationer.

6.4.1 STEG 1: Cellberedning och magnetisk märkning

Första åtgärder som krävs

Applikationskapacitet

Upp till 5×10^9 CD56-positiva celler av upp till 40×10^9 totala celler (WBC)

FÖRSIKTIGHET

Risk för otillräcklig separationsprestanda av märkta celler. Om applikationsspecifikationerna överskrids finns en risk för otillräckligt specifik märkning. Använd det antal celler som krävs och reagenser enligt beskrivningen för respektive applikation.

CliniMACS-material som krävs

Material	Katalog-nummer	Kvantitet
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS CD56 Reagent	271-01	1 flaska
CliniMACS Tubing Set	161-01	1 slangset
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	3×1 000 mL påsar ¹

¹ Se Tabell 6.11 och Tabell 6.12. Tillsätt HSA till CliniMACS PBS/EDTA Buffer med till en slutlig koncentration på 0,5% (v/v) för användning.

Tabell 6.10: CliniMACS-material som krävs för anrikning av CD56-positiva celler

Ytterligare material som krävs

- **Cell Preparation Bag:**
en 600 mL transferpåse, lämplig för centrifugering samt en provtagningskoppling och ett transferset för plasma, för användning under cellberedningsprocessen
- **Plasma Waste Bag och Wash Waste Bag:**
två 600 mL transferpåsar, lämpliga för centrifugering
- **Cell Collection Bag:**
en 150 mL eller en 600 mL transferpåse i kombination med en Luer/Spike Interconnector för att ansluta Cell Collection Bag till slangsetet (se Tabell 6.12)

- **Om byte av Negative Fraction Bag och uppsamlingspåsen för buffert är nödvändig:**
två 1 000 mL transferpåsar i kombination med två Luer/Spike Interconnectors för att ansluta påsarna till slangsetet (se Tabell 6.12)
- **Om mer än en liter buffert krävs för separationen:**
ett transferset för plasma för att ansluta buffertpåsarna (se Tabell 6.12)
- ett förfilter
- låsande peang
- sprutor (olika storlekar) och hypodermiska nålar i storleken 20 gauge
- humant serumalbumin (HSA) som ska tillsättas till CliniMACS PBS/EDTA Buffer till en slutlig koncentration på 0,5% (v/v)
- provrör

Översikt över material som krävs

Cellberedning	
Totalt antal celler (WBC)	$\leq 40 \times 10^9$
Antal reagensflaskor	1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1 000 mL
Transferset för plasma	1

Tabell 6.11: Material som krävs för cellberedning av CD56-positiva celler

Separation		
Märkta celler	$\leq 2 \times 10^9$	$> 2 - 5 \times 10^9$
Negative Fraction Bag	–	Byt ut slangsetets originalpåsar mot 1 000 mL transferpåsar
Buffer Waste Bag	–	
Priming Waste Bag	–	–
Cell Collection Bag	150 mL	600 mL
Luer/Spike Interconnector	1	3
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1 000 mL	2 000 mL
Transferset för plasma	–	1

Tabell 6.12: Material som krävs för anrikning av CD56-positiva celler

► Beredning av påsar

Fastställ vikten på den tomma Cell Collection Bag och Cell Preparation Bag enligt beskrivningen i avsnitt 7.1.1 på sidan 117.

Magnetisk märkning av celler

Se avsnitt 7.1 "STEG 1: Cellberedning och magnetisk märkning" på sidan 117 för detaljerad information om följande steg.

► Analys av cellulär startprodukt

► Överföring av cellulär startprodukt till Cell Preparation Bag

► Spädning av cellulär startprodukt

Tillsätt buffert: Vikt på buffert som ska tillsättas = 600 g – Vikt på cellulär startprodukt

► Centrifugering

Centrifugera vid 200×g, utan broms, 15 minuter, rumstemperatur (RT: +19 °C till +25 °C [+66 °F till +77 °F]).

► Volymkontroll: märkningsvolym 95 g (±5 g)

1. Ta bort supernatanten helt och var försiktig så att du inte resuspenderar cellpelletten.
2. Resuspendera cellpelletten försiktigt efter borttagande av supernatanten.
3. Justera vikten på Cell Preparation Bag (CPB) genom att tillsätta buffert med hjälp av följande ekvation: målvikt på fylld CPB = 95 g + vikt på tom CPB
4. Resuspendera cellerna.

► Inkubation med CliniMACS CD56 Reagent

1. Tillsätt 1 flaska CliniMACS CD56 Reagent. Blanda innehållet försiktigt.
2. Inkubera på en orbital rotator (25 rpm) under 30 minuter vid RT.

► Borttagande av överskott av reagens

1. Fyll en Cell Preparation Bag med buffert.
2. Centrifugera (300×g, utan broms, 15 minuter, RT).
3. Ta bort så mycket supernatant som möjligt. **Notera:** Ta bort minst 500 g supernatant. Om den supernatant som tas bort understiger 500 g rekommenderas totalt två tvättsteg (istället för endast ett). Annars kan borttagandet av obundet reagens vara otillräcklig.
4. Resuspendera cellpelletten försiktigt efter borttagande av supernatanten.
5. Justera provladdningsvolymen till 150 g.

Notera: Ta ett prov efter borttagande av överskott av reagens för senare analys (valfritt).

6.4.2 STEG 2: Val av separationsprogram

- ▶ Slå på CliniMACS Plus Instrument
- ▶ Val av separationsprogram ENRICHMENT 1.1
- ▶ Inmatning av provparameter

Se avsnitt 7.2.3 på sidan 131.

6.4.3 STEG 3: Installation av CliniMACS-slangset

- ▶ CliniMACS Tubing Set och CliniMACS Tubing Set LS

Se avsnitt 7.3.1 på sidan 148.

6.4.4 STEG 4: CliniMACS Plus-separation

- ▶ Separationsprocedur
- ▶ Koppla bort påsar och registrera processkod
- ▶ Ta bort slangset och stäng av
- ▶ Analys av celler

Se avsnitt 7.4.2 på sidan 186.

6.5 Depletion av CD3-positiva celler

CliniMACS Plus CD3-systemet inklusive CliniMACS Plus Instrument, CliniMACS CD3 Reagent, CliniMACS Tubing Set LS eller CliniMACS Depletion Tubing Set och CliniMACS PBS/EDTA Buffer är avsedda för depletion av humana CD3-positiva celler *in vitro* från heterogena hematologiska cellpopulationer.

6.5.1 STEG 1: Cellberedning och magnetisk märkning

Första åtgärder som krävs

Applikationskapacitet

- Normalskalig applikation: upp till 15×10^9 CD3-positiva celler av upp till 40×10^9 totala celler (WBC) med hjälp av antingen CliniMACS Tubing Set LS eller CliniMACS Depletion Tubing Set
- Storskalig applikation: mer än 15×10^9 och upp till 20×10^9 CD3-positiva celler av mer än 40×10^9 och upp till 80×10^9 totala celler (WBC) med hjälp av CliniMACS Tubing Set LS eller mer än 15×10^9 och upp till 30×10^9 CD3-positiva celler av mer än 40×10^9 och upp till 80×10^9 totala celler (WBC) med hjälp av CliniMACS Depletion Tubing Set

FÖRSIKTIGHET

Risk för otillräcklig separationsprestanda av märkta celler. Om applikationsspecifikationerna överskrids finns en risk för otillräckligt specifik märkning. Använd det antal celler som krävs och reagenser enligt beskrivningen för respektive applikation.

CliniMACS-material som krävs

Material	Katalog-nummer	Kvantitet	Separationsprogram
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1	
CliniMACS CD3 Reagent	273-01	• 1 flaska (normalskalig) • 2 flaskor (storskalig)	
CliniMACS Tubing Set LS	162-01	1 slangset	DEPLETION 2.1
CliniMACS Depletion Tubing Set	261-01	1 slangset	DEPLETION 3.1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	Upp till $5 \times 1\,000$ mL påsar ¹	

1 Se Tabell 6.14 till Tabell 6.16. Tillsätt HSA till CliniMACS PBS/EDTA Buffer med till en slutlig koncentration på 0,5% (v/v) för användning.

2 **Notera:** Vid ett stort antal celler bör CliniMACS Depletion Tubing Set användas för att spara tid (t.ex. 20×10^9 märkta celler bearbetas inom fem timmar med CliniMACS Tubing Set LS mot två timmar med CliniMACS Depletion Tubing Set).

Tabell 6.13: CliniMACS-material som krävs för depletion av CD3-positiva celler

Ytterligare material som krävs

- **Cell Preparation Bag:**
en 600 mL transferpåsar, lämpliga för centrifugering samt en provtagningskoppling och två transferset för plasma, för användning under cellberedningsproceduren
- **Plasma Waste Bag och Wash Waste Bag:**
två 600 mL transferpåsar, lämpliga för centrifugering
- **Cell Collection Bag:**
en till två 600 mL transferpåsar i kombination med en Luer/Spike Interconnector för att ansluta Cell Collection Bag till slangsetet

Om två cellinsamlingspåsar krävs för separationen, använd ett transferset för plasma för att ansluta båda påsarna. En 600 mL transferpåse är redan ansluten till CliniMACS Depletion Tubing Set (se Tabell 6.15 och Tabell 6.16).
- **Om byte av Negative Fraction Bag, Buffer Waste Bag och/eller Priming Waste Bag är nödvändig:**
två till tre 1 000 mL transferpåsar i kombination med två Luer/Spike Interconnectors för att ansluta påsarna till slangsetet (se Tabell 6.15 och Tabell 6.16)

Byt ut uppsamlingspåsen för priming mot den sterila slanganslutningen.
- **Om mer än en liter buffert krävs för separationen:**
ett till två transferset för plasma för att ansluta buffertpåsarna (se Tabell 6.15 och Tabell 6.16)
- ett förfilter
- Låsande peang
- sprutor (olika storlekar) och hypodermiska nålar i storleken 20 gauge
- humant serumalbumin (HSA) som ska tillsättas till CliniMACS PBS/EDTA Buffer till en slutlig koncentration på 0,5% (v/v)
- kliniskt immunglobulin G
- provrör

VIKTIGT

Efter inmatning av provparametrar (STEG 2) beräknar CliniMACS Plus-programvaran de volymer som kommer att samlas in i Reapplication Bag, Cell Collection Bag, Non-Target Cell Bag och uppsamlingspåsen för buffert. Om volymen på den beräknade vätskan överskrider standardvolymen på 500 mL måste påsarna bytas ut.

Översikt över material som krävs

Cellberedning		
Totalt antal celler (WBC)	$\leq 40 \times 10^9$	$> 40-80 \times 10^9$
Märkta celler	$\leq 15 \times 10^9$	$> 15-30 \times 10^9$
Antal reagensflaskor	1	2
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	2 000 mL	2 000 mL
Transferset för plasma	2	2
Provladdningsvolym	150 mL	250–300 mL

Tabell 6.14: Material som krävs för cellberedning av CD3-positiva celler

Separation (DEPLETION 2.1)			
Märkta celler	$\leq 5 \times 10^9$	$> 5-13 \times 10^9$	$> 13-20 \times 10^9$
Negative Fraction Bag	–	Byt ut slangsetets originalpåsar mot 1 000 mL transferpåsar	Byt ut slangsetets originalpåsar mot 1 000 mL transferpåsar
Buffer Waste Bag	–		
Priming Waste Bag	–	–	
Cell Collection Bag	600 mL	1–2×600 mL	2×600 mL
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1 000 mL	2 000 mL	3 000 mL
Luer/Spike Interconnector	1	3	3
Transferset för plasma	–	1–2	3

Tabell 6.15: Material som krävs för deplektion av CD3-positiva celler (DEPLETION 2.1)

Separation (DEPLETION 3.1)		
Märkta celler	$\leq 29 \times 10^9$	$> 29-30 \times 10^9$
Non-Target Cell Bag	Inget påsbyte krävs	
Buffer Waste Bag		
Reapplication Bag		
Cell Collection Bag	–	1×600 mL (som tillägg)
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1 000 mL	
Transferset för plasma	–	1

Tabell 6.16: Material som krävs för deplektion av CD3-positiva celler (DEPLETION 3.1)

Notera: De material som krävs för separationen kan också fastställas genom att slå på CliniMACS Plus Instrument, välja det separationsprogram som ska användas (DEPLETION 2.1 för CliniMACS Tubing Set LS och DEPLETION 3.1 för CliniMACS Depletion Tubing Set) och ange provparametrarna. CliniMACS Plus-programvaran kommer att beräkna vilken storlek som krävs på de påsar som ska anslutas till slangsetet och vikten som krävs för bufferten.

► Beredning av påsar

Fastställ vikten på den tomma Cell Collection Bag och Cell Preparation Bag enligt beskrivningen i avsnitt 7.1.1 på sidan 117.

Magnetisk märkning av celler

Se avsnitt 7.1 "STEG 1: Cellberedning och magnetisk märkning" på sidan 117 för detaljerad information om följande steg.

► Analys av cellulär startprodukt

Fastställ antalet CD3-märkta celler (inklusive ospecifik CD3-bindning, inte bara verkliga T-celler). Beakta detta antal för applikationsspecifikationer och inmatning av provparametrar (se STEG 2).

► Överföring av cellulär startprodukt till Cell Preparation Bag

► Spädning av cellulär startprodukt

Tillsätt buffert: Vikt på buffert som ska tillsättas = 600 g – Vikt på cellulär startprodukt

► Centrifugering

Centrifugera vid 200×g, utan broms, 15 minuter, rumstemperatur (RT: +19 °C till +25 °C [+66 °F till +77 °F]).

► Volymkontroll: märkningsvolym 95 g (±5 g) (normalskalig applikation) eller 190 g (±5 g) (storskalig applikation)

1. Ta bort supernatanten helt och var försiktig så att du inte resuspenderar cellpelletten.
2. Resuspendera cellpelletten försiktigt efter borttagande av supernatanten.
3. Justera vikten på Cell Preparation Bag (CPB) genom att tillsätta buffert med hjälp av följande ekvation (beakta IgG-vikten): målvikt på fylld CPB = IgG + märkningsvolym – IgG-vikt + vikt på tom CPB
4. Resuspendera cellpelletten.

► Inkubation med kliniskt immunglobulin

1. Tillsätt IgG (1,5 mg/mL).
2. Inkubera på en orbital rotator (25 rpm) under 5 minuter vid RT.

► Inkubation med CliniMACS CD3 Reagent

1. Tillsätt 1 eller 2 flaskor CliniMACS CD3 Reagent (se Tabell 6.14). Blanda innehållet försiktigt.
2. Inkubera på en orbital rotator (25 rpm) under 30 minuter vid RT.

► **Borttagande av överskott av reagens**

1. Fyll en Cell Preparation Bag med buffert.
2. Centrifugera (300×g, utan broms, 15 minuter, RT).
3. Ta bort så mycket supernatant som möjligt. **Notera:** Ta bort minst 500 g supernatant. Om den supernatant som tas bort understiger 500 g rekommenderas totalt två tvättsteg (istället för endast ett). Annars kan borttagandet av obundet reagens vara otillräcklig.
4. Resuspendera cellpelletten.
5. Justera provladdningsvolymen till 150 g (normalskalig applikation) eller 250–300 g (storskalig applikation).

6.5.2 STEG 2: Val av separationsprogram

► **Slå på CliniMACS Plus Instrument**

- **Val av separationsprogram DEPLETION 2.1 eller DEPLETION 3.1**
(vid användning av CliniMACS Tubing Set LS respektive CliniMACS Depletion Tubing Set)

- **Inmatning av provparameter**
(enligt analys av cellulär startprodukt [se STEG 1])

Se avsnitt 7.2.5 på sidan 138 eller 7.2.6 på sidan 143.

6.5.3 STEG 3: Installation av CliniMACS-slangset

- **CliniMACS Tubing Set och CliniMACS Tubing Set LS**
eller
► **CliniMACS Depletion Tubing Set**

Se avsnitt 7.3.1 på sidan 148 eller 7.3.3 på sidan 168.

6.5.4 STEG 4: CliniMACS Plus-separation

- **Separationsprocedur**
- **Koppla bort påsar och registrera processkod**
- **Ta bort slangset och stäng av**
- **Analys av celler**

Se avsnitt 7.4.4 på sidan 194 eller 7.4.5 på sidan 198.

6.6 Depletion av CD19-positiva celler

CliniMACS Plus CD19-systemet inklusive CliniMACS Plus Instrument, CliniMACS CD19 Reagent, CliniMACS Tubing Set LS och CliniMACS PBS/EDTA Buffer är avsedda för depletion av humana CD19-positiva celler *in vitro* från heterogena hematologiska cellpopulationer.

6.6.1 STEG 1: Cellberedning och magnetisk märkning

Första åtgärder som krävs

Applikationskapacitet

Upp till 5×10^9 CD19-positiva celler av upp till 40×10^9 totala celler (WBC)

FÖRSIKTIGHET

Risk för otillräcklig separationsprestanda av märkta celler. Om applikationsspecifikationerna överskrids finns en risk för otillräckligt specifik märkning. Använd det antal celler som krävs och reagenser enligt beskrivningen för respektive applikation.

CliniMACS-material som krävs

Material	Katalog-nummer	Kvantitet
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS CD19 Reagent	179-01	1 flaska
CliniMACS Tubing Set LS	162-01	1 slangset
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	2×1 000 mL påsar ¹

¹ Tillsätt HSA till CliniMACS PBS/EDTA Buffer till en slutlig koncentration på 0,5% (v/v) före användning.

Tabell 6.17: CliniMACS-material som krävs för depletion av CD19-positiva celler

Ytterligare material som krävs

- **Cell Preparation Bag:**
en 600 mL transferpåsar, lämpliga för centrifugering samt en provtagningskoppling och ett transferset för plasma, för användning under cellberedningsprocessen
- **Plasma Waste Bag och Wash Waste Bag:**
två 600 mL transferpåsar, lämpliga för centrifugering
- **Cell Collection Bag:**
en 600 mL transferpåse i kombination med en Luer/Spike Interconnector för att ansluta Cell Collection Bag till slangsetet
- ett förfilter
- låsande peang

- sprutor (olika storlekar) och hypodermiska nålar i storleken 20 gauge
- humant serumalbumin (HSA) som ska tillsättas till CliniMACS PBS/EDTA Buffer till en slutlig koncentration på 0,5% (v/v)
- provrör

► Beredning av påsar

Fastställ vikten på den tomma Cell Collection Bag och Cell Preparation Bag enligt beskrivningen i avsnitt 7.1.1 på sidan 117.

Magnetisk märkning av celler

Se avsnitt 7.1 "STEG 1: Cellberedning och magnetisk märkning" på sidan 117 för detaljerad information om följande steg.

► Analys av cellulär startprodukt

► Överföring av cellulär startprodukt till Cell Preparation Bag

► Spädning av cellulär startprodukt

Tillsätt buffert: Vikt på buffert som ska tillsättas = 600 g – Vikt på cellulär startprodukt

► Centrifugering

Centrifugera vid 200×g, utan broms, 15 minuter, rumstemperatur (RT: +19 °C till +25 °C [+66 °F till +77 °F]).

► Volymkontroll: märkningsvolym 95 g (±5 g)

1. Ta bort supernatanten helt och var försiktig så att du inte resuspenderar cellpelletten.
2. Resuspendera cellpelletten försiktigt efter borttagande av supernatanten.
3. Justera vikten på Cell Preparation Bag (CPB) genom att tillsätta buffert med hjälp av följande ekvation: målvikt på fylld CPB = 95 g + vikt på tom CPB
4. Resuspendera cellpelletten.

► Inkubation med CliniMACS CD19 Reagent

1. Tillsätt 1 flaska CliniMACS CD19 Reagent. Blanda innehållet försiktigt.
2. Inkubera på en orbital rotator (25 rpm) under 30 minuter vid RT.

► **Borttagande av överskott av reagens**

1. Fyll en Cell Preparation Bag med buffert.
2. Centrifugera (300×g, utan broms, 15 minuter, RT).
3. Ta bort så mycket supernatant som möjligt. **Notera:** Ta bort minst 500 g supernatant. Om den supernatant som tas bort understiger 500 g rekommenderas totalt två tvättsteg (istället för endast ett). Annars kan borttagandet av obundet reagens vara otillräcklig.
4. Resuspendera cellpelletten.
5. Justera provladdningsvolymen till 100 g.

6.6.2 STEG 2: Val av separationsprogram

► **Slå på CliniMACS Plus Instrument**

► **Val av separationsprogram DEPLETION 2.1**

► **Inmatning av provparameter**

Se avsnitt 7.2.5 på sidan 138.

6.6.3 STEG 3: Installation av CliniMACS-slangset

► **CliniMACS Tubing Set och CliniMACS Tubing Set LS**

Se avsnitt 7.3.1 på sidan 148.

6.6.4 STEG 4: CliniMACS Plus-separation

► **Separationsprocedur**

► **Koppla bort påsar och registrera processkod**

► **Ta bort slangset och stäng av**

► **Analys av celler**

Se avsnitt 7.4.4 på sidan 194.

6.7 Depletion av CD3-positiva celler och CD19-positiva celler

CliniMACS Plus CD3/CD19-systemet inklusive CliniMACS Plus Instrument, CliniMACS CD3 Reagent, CliniMACS CD19 Reagent, CliniMACS Depletion Tubing Set och CliniMACS PBS/EDTA Buffer är avsedda för samtidig depletion av humana CD3-positiva celler och humana CD19-positiva celler *in vitro* från heterogena hematologiska cellpopulationer.

6.7.1 STEG 1: Cellberedning och magnetisk märkning

Första åtgärder som krävs

Applikationskapacitet

Upp till 15×10^9 CD3-positiva celler och upp till 5×10^9 CD19-positiva celler av upp till 40×10^9 totala celler (WBC)

FÖRSIKTIGHET

Risk för otillräcklig separationsprestanda av märkta celler. Om applikationsspecifikationerna överskrids finns en risk för otillräckligt specifik märkning. Använd det antal celler som krävs och reagenser enligt beskrivningen för respektive applikation.

CliniMACS-material som krävs

Material	Katalog-nummer	Kvantitet
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS CD3 Reagent	273-01	1 flaska
CliniMACS CD19 Reagent	179-01	1 flaska
CliniMACS Depletion Tubing Set	261-01	1 slangset
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	4×1 000 mL påsar ¹

¹ Tillsätt HSA till CliniMACS PBS/EDTA Buffer till en slutlig koncentration på 0,5% (v/v) före användning

Tabell 6.18: CliniMACS-material som krävs för depletion av CD3-positiva celler och CD19-positiva celler

Ytterligare material som krävs

- **Cell Preparation Bag:**
en 600 mL transferpåsar, lämpliga för centrifugering samt en provtagningskoppling och två transferset för plasma, för användning under cellberedningsproceduren
- **Plasma Waste Bag och Wash Waste Bag:**
två 600 mL transferpåsar, lämpliga för centrifugering
- **Cell Collection Bag:**
en till två 600 mL transferpåsar i kombination med en Luer/Spike Interconnector för att ansluta Cell Collection Bag till slangsetet
- ett förfilter
- låsande peang
- sprutor (olika storlekar) och hypodermiska nålar i storleken 20 gauge
- humant serumalbumin (HSA) som ska tillsättas till CliniMACS PBS/EDTA Buffer till en slutlig koncentration på 0,5% (v/v)
- kliniskt immunglobulin G
- provrör

VIKTIGT

Efter inmatning av provparametrar (STEG 2) beräknar CliniMACS Plus-programvaran de volymer som kommer att samlas in i Reapplication Bag, Cell Collection Bag, Non-Target Cell Bag och uppsamlingspåsen för buffert. Om volymen på den beräknade vätskan överskrider standardvolymen på 500 mL måste de påsar som krävs bytas ut.

► Beredning av påsar

Fastställ vikten på den tomma Cell Collection Bag och Cell Preparation Bag enligt beskrivningen i avsnitt 7.1.1 på sidan 117.

Magnetisk märkning av celler

Se avsnitt 7.1 "STEG 1: Cellberedning och magnetisk märkning" på sidan 117 för detaljerad information om följande steg.

► Analys av cellulär startprodukt

Fastställ antalet CD3 och CD19-märkta celler (inklusive ospecifika CD3- och CD19-bindningar, inte bara verkliga T- och B-celler). Beakta detta antal för applikationsspecifikationer och inmatning av provparametrar (se STEG 2).

► Överföring av cellulär startprodukt till Cell Preparation Bag

► Spädning av cellulär startprodukt

Tillsätt buffert: Vikt på buffert som ska tillsättas = 600 g – Vikt på cellulär startprodukt

► **Centrifugering**

Centrifugera vid 200×g, utan broms, 15 minuter, rumstemperatur (RT: +19 °C till +25 °C [+66 °F till +77 °F]).

► **Volymkontroll: märkningsvolym 87,5 g (±5 g)**

1. Ta bort supernatanten helt och var försiktig så att du inte resuspenderar cellpelletten.
2. Resuspendera cellpelletten försiktigt efter borttagande av supernatanten.
3. Justera vikten på Cell Preparation Bag (CPB) genom att tillsätta buffert med hjälp av följande ekvation (beakta IgG-vikten): Målvikt på fylld CPB = 87,5 g – IgG-vikt – IgG-vikt + vikt på tom CPB
4. Resuspendera cellpelletten.

► **Inkubation med kliniskt immunglobulin**

1. Tillsätt IgG (1,5 mg/mL).
2. Inkubera på en orbital rotator (25 rpm) under 5 minuter vid RT.

► **Inkubation med CliniMACS CD3 Reagent och CliniMACS CD19 Reagent**

1. Tillsätt 1 flaska CliniMACS CD3 Reagent och 1 flaska CliniMACS CD19 Reagent. Blanda innehållet försiktigt.
2. Inkubera på en orbital rotator (25 rpm) under 30 minuter vid RT.

► **Borttagande av överskott av reagens**

1. Fyll en Cell Preparation Bag med buffert.
2. Centrifugera (300×g, utan broms, 15 minuter, RT).
3. Ta bort så mycket supernatant som möjligt. **Notera:** Ta bort minst 500 g supernatant. Om den supernatant som tas bort understiger 500 g rekommenderas totalt två tvättsteg (istället för endast ett). Annars kan borttagandet av obundet reagens vara otillräcklig.
4. Resuspendera cellpelletten.
5. Justera provladdningsvolymen till 150 g.

6.7.2 STEG 2: Val av separationsprogram

- ▶ **Slå på CliniMACS Plus Instrument**
- ▶ **Val av separationsprogram DEPLETION 3.1**
- ▶ **Inmatning av provparameter**
(enligt analys av cellulär startprodukt [se STEG 1])

Se avsnitt 7.2.6 på sidan 143.

6.7.3 STEG 3: Installation av CliniMACS-slangset

- ▶ **CliniMACS Depletion Tubing Set**

Se avsnitt 7.3.3 på sidan 168.

6.7.4 STEG 4: CliniMACS Plus-separation

- ▶ **Separationsprocedur**
- ▶ **Koppla bort påsar och registrera processkod**
- ▶ **Ta bort slangset och stäng av**
- ▶ **Analys av celler**

Se avsnitt 7.4.5 på sidan 198.

6.8 Anrikning/depletion av CD8-positiva celler

CliniMACS Plus CD8-systemet inklusive CliniMACS Plus Instrument, CliniMACS CD8 Reagent, CliniMACS Tubing Set eller CliniMACS Tubing Set LS och CliniMACS PBS/EDTA Buffer är avsedda för anrikning eller depletion av humana CD8-positiva celler *in vitro* från heterogena hematologiska cellpopulationer.

6.8.1 STEG 1: Cellberedning och magnetisk märkning

Första åtgärder som krävs

Applikationskapacitet

- **Anrikning:** upp till 4×10^9 märkta celler av upp till 40×10^9 totala celler (WBC) med hjälp av CliniMACS Tubing Set
- **Depletion:** upp till 4×10^9 märkta celler av upp till 40×10^9 totala celler (WBC) med hjälp av CliniMACS Tubing Set LS

FÖRSIKTIGHET

Risk för otillräcklig separationsprestanda av märkta celler. Om applikationsspecifikationerna överskrids finns en risk för otillräckligt specifik märkning. Använd det antal celler som krävs och reagenser enligt beskrivningen för respektive applikation.

CliniMACS-material som krävs

Material	Katalog-nummer	Kvantitet	Separationsprogram
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1	–
CliniMACS CD8 Reagent	275-01	1 flaska	–
CliniMACS Tubing Set	161-01	1 slangset	ENRICHMENT 1.1
CliniMACS Tubing Set LS	162-01	1 slangset	DEPLETION 2.1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	Upp till $3 \times 1\,000$ mL påsar ¹	–

¹ Se Tabell 6.20 till Tabell 6.22. Tillsätt HSA till CliniMACS PBS/EDTA Buffer med till en slutlig koncentration på 0,5% (v/v) för användning.

Tabell 6.19: CliniMACS-material som krävs för anrikning/depletion av CD8-positiva celler

Ytterligare material som krävs

- **Cell Preparation Bag:**
en 600 mL transferpåsar, lämpliga för centrifugering samt en provtagningskoppling och ett transferset för plasma, för användning under cellberedningsprocessen
- **Plasma Waste Bag och Wash Waste Bag:**
två 600 mL transferpåsar, lämpliga för centrifugering

- **Cell Collection Bag:**
en 600 mL transferpåse i kombination med en Luer/Spike Interconnector för att ansluta Cell Collection Bag till slangsetet (se Tabell 6.21 och Tabell 6.22)
- **Om byte av Negative Fraction Bag och uppsamlingspåsen för buffert är nödvändig:**
två 1 000 mL transferpåsar i kombination med två Luer/Spike Interconnectors för att ansluta påsarna till slangsetet (se Tabell 6.21 och Tabell 6.22)
- **Om mer än en liter buffert krävs för separationen:**
ett transferset för plasma för att ansluta buffertpåsarna (se Tabell 6.21 och Tabell 6.22)
- ett förfilter
- låsande peang
- sprutor (olika storlekar) och hypodermiska nålar i storleken 20 gauge
- humant serumalbumin (HSA) som ska tillsättas till CliniMACS PBS/EDTA Buffer till en slutlig koncentration på 0,5% (v/v)
- provrör

VIKTIGT

Efter inmatning av provparametrar (STEG 2) beräknar CliniMACS Plus-programvaran de volymer som kommer att samlas in i uppsamlingspåsen för priming, Cell Collection Bag, Negative Fraction Bag och uppsamlingspåsen för buffert. Om volymen på den beräknade vätskan överskrider standardvolymen på 500 mL måste de påsar som krävs bytas ut enligt följande översikt över material som krävs.

Översikt över material som krävs

Cellberedning	
Totalt antal celler	$\leq 40 \times 10^9$
Märkta celler	$\leq 4 \times 10^9$
Antal reagensflaskor	1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1 000 mL
Transferset för plasma	1
Provladdningsvolym	100 mL

Tabell 6.20: Material som krävs för cellberedning av CD8-positiva celler

Separation (ENRICHMENT 1.1)		
Märkta celler	$<2 \times 10^9$	$2-4 \times 10^9$
Negative Fraction Bag	–	Byt ut slangsetets originalpåsar mot 1 000 mL transferpåsar
Buffer Waste Bag	–	
Priming Waste Bag	–	–
Cell Collection Bag	600 mL	600 mL
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1 000 mL	2 000 mL
Luer/Spike Interconnector	1	3
Transferset för plasma	–	1

Tabell 6.21: Material som krävs för anrikning av CD8-positiva celler

Separation (DEPLETION 2.1)	
Märkta celler	$\leq 4 \times 10^9$
Negative Fraction Bag	Inget påsbyte krävs
Buffer Waste Bag	
Priming Waste Bag	
Cell Collection Bag	600 mL
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1 000 mL
Luer/Spike Interconnector	1

Tabell 6.22: Material som krävs för depletion av CD8-positiva celler

► Beredning av påsar

Fastställ vikten på den tomma Cell Collection Bag och Cell Preparation Bag enligt beskrivningen i avsnitt 7.1.1 på sidan 117.

Magnetisk märkning av celler

Se avsnitt 7.1 "STEG 1: Cellberedning och magnetisk märkning" på sidan 117 för detaljerad information om följande steg.

► Analys av cellulär startprodukt

► Överföring av cellulär startprodukt till Cell Preparation Bag

► Spädning av cellulär startprodukt

Tillsätt buffert: Vikt på buffert som ska tillsättas = Vikt på cellulär startprodukt $\times$ 2

► Centrifugering

Centrifugera vid $300 \times g$, utan broms, 15 minuter, rumstemperatur (RT: $+19^\circ\text{C}$ till $+25^\circ\text{C}$ [$+66^\circ\text{F}$ till $+77^\circ\text{F}$]).

► **Volymkontroll: märkningsvolym 95 g (± 5 g)**

1. Ta bort supernatanten helt och var försiktig så att du inte resuspenderar cellpelletten.
2. Resuspendera cellpelletten försiktigt efter borttagande av supernatanten.
3. Justera vikten på Cell Preparation Bag (CPB) genom att tillsätta buffert. Beräkna målvikten på CPB fylld med spädd cellprodukt med hjälp av följande ekvation: målvikt på fylld CPB = 95 g – vikt på tom CPB
4. Resuspendera cellpelletten.

► **Inkubation med CliniMACS CD8 Reagent**

1. Tillsätt 1 flaska CliniMACS CD8 Reagent. Blanda innehållet försiktigt.
2. Inkubera på en orbital rotator (25 rpm) under 30 minuter vid RT.

► **Borttagande av överskott av reagens**

1. Fyll en Cell Preparation Bag med buffert.
2. Centrifugera (300×g, utan broms, 15 minuter, RT).
3. Ta bort så mycket supernatant som möjligt. **Notera:** Ta bort minst 500 g supernatant. Om den supernatant som tas bort understiger 500 g rekommenderas totalt två tvättsteg (istället för endast ett). Annars kan borttagandet av obundet reagens vara otillräcklig.
4. Resuspendera cellpelletten.
5. Justera provladdningsvolymen till 100 g.

6.8.2 STEG 2: Val av separationsprogram

► **Slå på CliniMACS Plus Instrument**

► **Val av separationsprogram ENRICHMENT 1.1 eller DEPLETION 2.1**

► **Inmatning av provparameter**

Se avsnitt 7.2.3 på sidan 131 eller 7.2.5 på sidan 138.

6.8.3 STEG 3: Installation av CliniMACS-slangset

► **CliniMACS Tubing Set och CliniMACS Tubing Set LS**

Se avsnitt 7.3.1 på sidan 148.

6.8.4 STEG 4: CliniMACS Plus-separation

- ▶ Separationsprocedur
- ▶ Koppla bort påsar och registrera processkod
- ▶ Ta bort slangset och stäng av
- ▶ Analys av celler

Se avsnitt 7.4.2 på sidan 186 eller 7.4.4 på sidan 194.

6.9 Anrikning/depletion av CD25-positiva celler

CliniMACS Plus CD25-systemet inklusive CliniMACS Plus Instrument, CliniMACS CD25 Reagent, CliniMACS Tubing Set eller CliniMACS Tubing Set LS och CliniMACS PBS/EDTA Buffer är avsedda för anrikning eller depletion av humana CD25-positiva celler – helst höguttryckande CD25-celler – *in vitro* från heterogena hematologiska cellpopulationer.

6.9.1 STEG 1: Cellberedning och magnetisk märkning

Första åtgärder som krävs

Applikationskapacitet

- **Anrikning:** CD25-positiva eller höguttryckande CD25-celler: upp till $0,6 \times 10^9$ märkta celler av upp till 40×10^9 totala celler (WBC) med hjälp av CliniMACS Tubing Set
- **Depletion:**
 Normalskalig applikation: upp till 6×10^9 CD25-positiva celler av upp till 40×10^9 totala celler (WBC) med hjälp av CliniMACS Tubing Set LS
 Storskalig applikation: mer än 6×10^9 och upp till 12×10^9 CD25-positiva celler av mer än 40×10^9 och upp till 80×10^9 totala celler (WBC) med hjälp av CliniMACS Tubing Set LS

FÖRSIKTIGHET

Risk för otillräcklig separationsprestanda av märkta celler. Om applikationsspecifikationerna överskrids finns en risk för otillräckligt specifik märkning. Använd det antal celler som krävs och reagenser enligt beskrivningen för respektive applikation.

CliniMACS-material som krävs

Material	Katalog-nummer	Kvantitet	Separationsprogram
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1	–
CliniMACS CD25 Reagent	274-01	• 1 flaska (normalskalig) • 2 flaskor (storskalig)	–
CliniMACS Tubing Set	161-01	1 slangset	ENRICHMENT 3.2
CliniMACS Tubing Set LS	162-01	1 slangset	DEPLETION 2.1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	Upp till 4×1 000 mL påsar ¹	–

¹ Se Tabell 6.24 till Tabell 6.27. Tillsätt HSA till CliniMACS PBS/EDTA Buffer med till en slutlig koncentration på 0,5% (v/v) för användning.

Tabell 6.23: CliniMACS-material som krävs för anrikning/depletion av CD25-positiva celler

Ytterligare material som krävs

- **Cell Preparation Bag:**
en 600 mL transferpåsar, lämpliga för centrifugering samt en provtagningskoppling och ett till två transferset för plasma, för användning under cellberedningsprocessen
- **Plasma Waste Bag och Wash Waste Bag:**
två 600 mL (eller två 1 000 mL) transferpåsar, lämpliga för centrifugering
- **Cell Collection Bag:**
En 150 mL eller en till två 600 mL transferpåsar i kombination med en Luer/Spike Interconnector för att ansluta Cell Collection Bag till slangsetet

Om två cellinsamlingspåsar krävs för separationen, använd ett transferset för plasma för att ansluta båda påsarna (se Tabell 6.25 och Tabell 6.27).
- **Om byte av Negative Fraction Bag och uppsamlingspåsen för buffert är nödvändig:**
två 1 000 mL transferpåsar i kombination med två Luer/Spike Interconnectors för att ansluta påsarna till slangsetet (se Tabell 6.25 och Tabell 6.27)
- **Om mer än en liter buffert krävs för separationen:**
ett transferset för plasma för att ansluta buffertpåsarna (se Tabell 6.25 och Tabell 6.27)
- ett förfilter
- låsande peang
- sprutor (olika storlekar) och hypodermiska nålar i storleken 20 gauge
- humant serumalbumin (HSA) som ska tillsättas till CliniMACS PBS/EDTA Buffer till en slutlig koncentration på 0,5% (v/v)
- provrör

VIKTIGT

Efter inmatning av provparametrar (STEG 2) beräknar CliniMACS Plus-programvaran de volymer som kommer att samlas in i uppsamlingspåsen för priming, Cell Collection Bag, Negative Fraction Bag och uppsamlingspåsen för buffert. Om volymen på den beräknade vätskan överskrider standardvolymen på 500 mL måste de påsar som krävs bytas ut enligt följande översikt över material som krävs.

Översikt över material som krävs

Cellberedning (ENRICHMENT 3.2)		
Användning	Anrikning av CD25-positiva celler	Anrikning av höguttryckande CD25-celler
Totalt antal celler (WBC)	$\leq 40 \times 10^9$	$\leq 40 \times 10^9$
Märkta celler	$\leq 0,6 \times 10^9$	$\leq 0,6 \times 10^9$
Antal reagensflaskor	1	1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1 000 – 2 000 mL	2 000 mL
Transferset för plasma	1–2	2
Märkningsvolym	190 mL	380 mL
Märkningstemperatur	Rumstemperatur	+4 °C till +8 °C (+39 °F till +46 °F)

Tabell 6.24: Material som krävs för cellberedning av CD25-positiva/höguttryckande celler (ENRICHMENT 3.2)

Separation (ENRICHMENT 3.2)		
Användning	Anrikning av CD25-positiva celler	Anrikning av höguttryckande CD25-celler
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1 000 mL	1 000 mL
Negative Fraction Bag		
Buffer Waste Bag	Inget påsbyte krävs	
Priming Waste Bag		
Cell Collection Bag	150 mL	150 mL
Luer/Spike Interconnector	1	1

Tabell 6.25: Material som krävs för anrikning av CD25-positiva/höguttryckande celler (ENRICHMENT 3.2)

Cellberedning (DEPLETION 2.1)		
Totalt antal celler (WBC)	$\leq 40 \times 10^9$	$> 40-80 \times 10^9$
Märkta celler	$\leq 6 \times 10^9$	$> 6-12 \times 10^9$
Antal reagensflaskor	1	2
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1 000–2 000 mL	1 000–2 000 mL
Transferset för plasma	1–2	1–2
Märkningsvolym	95 mL	190 mL
Märkningstemperatur	Rumstemperatur	Rumstemperatur

Tabell 6.26: Material som krävs för cellberedning av CD25-positiva celler (DEPLETION 2.1)

Separation (DEPLETION 2.1)		
Totalt antal celler (WBC)	$\leq 40 \times 10^9$	$> 40-80 \times 10^9$
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1 000 mL för $< 5 \times 10^9$ märkta celler	2 000 mL för $5-12 \times 10^9$ märkta celler
Negative Fraction Bag	–	Byt ut slangsetets originalpåsar mot 1 000 mL transferpåsar
Buffer Waste Bag	–	
Priming Waste Bag	–	–
Cell Collection Bag	600 mL	2×600 mL
Luer/Spike Interconnector	1	3
Transferset för plasma	–	2

Tabell 6.27: Material som krävs för depletion av CD25-positiva celler (DEPLETION 2.1)

► Beredning av påsar

Fastställ vikten på den tomma Cell Collection Bag och Cell Preparation Bag enligt beskrivningen i avsnitt 7.1.1 på sidan 117.

Magnetisk märkning av celler

Se avsnitt 7.1 "STEG 1: Cellberedning och magnetisk märkning" på sidan 117 för detaljerad information om följande steg.

VIKTIGT

- *Förvara bufferten för cellberedning för anrikning eller depletion av CD25-positiva celler vid +19 °C till +25 °C (+66 °F till +77 °F).*
- *Magnetisk märkning under cellberedning för anrikning av höguttryckande CD25-celler måste utföras med kall buffert (+4 °C till +8 °C [+39 °F till +46 °F]). Högre eller lägre temperatur kan leda till lägre renhet och ge färre antal målceller.*

► Analys av cellulär startprodukt

► Överföring av cellulär startprodukt till Cell Preparation Bag

► Spädning av cellulär startprodukt

Tillsätt buffert: Vikt på den buffert som ska läggas till = Vikt på cellulär startprodukt × 2

► Centrifugering

Centrifugera vid 300×g, utan broms, 15 minuter, rumstemperatur (RT: +19 °C till +25 °C [+66 °F till +77 °F]).

► Volymkontroll: märkningsvolym för

anrikning av CD25-positiva celler: 190 g (±5 g)

anrikning av höguttryckande CD25-celler: 380 g (±5 g)¹

depletion av CD25-positiva celler (normalskalig applikation): 95 g

depletion av CD25-positiva celler (storskalig applikation): 190 g

1. Ta bort supernatanten helt och var försiktig så att du inte resuspenderar cellpelletten.
2. Resuspendera cellpelletten försiktigt efter borttagande av supernatanten.
3. Justera vikten på Cell Preparation Bag (CPB) genom att tillsätta buffert med hjälp av följande ekvation: målvikt på fylld CPB = märkningsvolym + VIKT på tom CPB
4. Resuspendera cellpelletten.

► Inkubation med CliniMACS CD25 Reagent

1. Tillsätt 1 eller 2 flaskor CliniMACS CD25 Reagent (se Tabell 6.24 och Tabell 6.26). Blanda innehållet försiktigt.
2. Inkubera på orbital rotator (25 rpm):
 - a) anrikning eller depletion av CD25-positiva celler: 30 minuter vid RT
 - b) anrikning av höguttryckande CD25-celler: 15 minuter vid +4 °C till +8 °C (+39 °F till +46 °F)

► Borttagande av överskott av reagens

1. Fyll en Cell Preparation Bag med buffert.
2. Centrifugera (300×g, utan broms, 15 minuter, RT).
3. Ta bort så mycket supernatant som möjligt. **Notera:** Ta bort minst 500 g supernatant. Om den supernatant som tas bort understiger 500 g rekommenderas totalt två tvättsteg (istället för endast ett). Annars kan borttagandet av obundet reagens vara otillräcklig.
4. Resuspendera cellpelletten.
5. Justera provladdningsvolymen till 100 g (normalskalig applikation) eller 200 g (storskalig applikation).

¹ Magnetisk märkning för anrikning av höguttryckande CD25-celler måste utföras med kall buffert (+4 °C till +8 °C [+39 °F till +46 °F]).

6.9.2 STEG 2: Val av separationsprogram

- ▶ Slå på CliniMACS Plus Instrument
- ▶ Val av separationsprogram ENRICHMENT 3.2 eller DEPLETION 2.1
- ▶ Inmatning av provparameter
(Inte för ENRICHMENT 3.2)

Se avsnitt 7.2.4 på sidan 136 eller 7.2.5 på sidan 138.

6.9.3 STEG 3: Installation av CliniMACS-slangset

- ▶ CliniMACS Tubing Set och CliniMACS Tubing Set LS

Se avsnitt 7.3.1 på sidan 148.

6.9.4 STEG 4: CliniMACS Plus-separation

- ▶ Separationsprocedur
- ▶ Koppla bort påsar och registrera processkod
- ▶ Ta bort slangset och stäng av
- ▶ Analys av celler

Se avsnitt 7.4.3 på sidan 190 eller 7.4.4 på sidan 194.

6.10 Anrikning/depletion av CD4-positiva celler

CliniMACS Plus CD4-systemet inklusive CliniMACS Plus Instrument, CliniMACS CD4 Reagent, CliniMACS Tubing Set eller CliniMACS Tubing Set LS och CliniMACS PBS/EDTA Buffer är avsedda för anrikning eller depletion av humana CD4-positiva celler *in vitro* från heterogena hematologiska cellpopulationer.

6.10.1 STEG 1: Cellberedning och magnetisk märkning

Första åtgärder som krävs

Applikationskapacitet

- **Anrikning:** upp till 5×10^9 märkta celler av upp till 40×10^9 totala celler (WBC) med hjälp av CliniMACS Tubing Set
- **Depletion:** upp till 12×10^9 märkta celler av upp till 40×10^9 totala celler (WBC) med hjälp av CliniMACS Tubing Set LS

Notera: Om antalet beräknade celler överskrider applikationskapaciteten, dela provet och fortsätt med varje prov separat samt använd ett nytt slangset för varje körning i CliniMACS Plus Instrument.

FÖRSIKTIGHET

Risk för otillräcklig separationsprestanda av märkta celler. Om applikationsspecifikationerna överskrids finns en risk för otillräckligt specifik märkning. Använd det antal celler som krävs och reagenser enligt beskrivningen för respektive applikation.

CliniMACS-material som krävs

Material	Katalog-nummer	Kvantitet	Separationsprogram
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1	–
CliniMACS CD4 Reagent	276-01	1 flaska	–
CliniMACS Tubing Set	161-01	1 slangset	ENRICHMENT 1.1
CliniMACS Tubing Set LS	162-01	1 slangset	DEPLETION 2.1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	Upp till 4×1 000 mL påsar ¹	–

¹ Se Tabell 6.29 till Tabell 6.32. Tillsätt HSA till CliniMACS PBS/EDTA Buffer med till en slutlig koncentration på 0,5% (v/v) för användning.

Tabell 6.28: CliniMACS-material som krävs för anrikning/depletion av CD4-positiva celler

Ytterligare material som krävs

- **Cell Preparation Bag:**
en 600 mL transferpåsar, lämpliga för centrifugering samt en provtagningskoppling och ett transferset för plasma, för användning under cellberedningsprocessen
- **Plasma Waste Bag och Wash Waste Bag:**
två 600 mL (eller två 1 000 mL) transferpåsar, lämpliga för centrifugering
- **Cell Collection Bag:**
En 150 mL eller en till två 600 mL transferpåsar i kombination med en Luer/Spike Interconnector för att ansluta Cell Collection Bag till slangsetet

Om två cellinsamlingspåsar krävs för separationen, använd ett transferset för plasma för att ansluta båda påsarna (se Tabell 6.30 och Tabell 6.32).
- **Om byte av Negative Fraction Bag, Buffer Waste Bag och/eller Priming Waste Bag är nödvändig:**
upp till tre 1 000 mL transferpåsar i kombination med två Luer/Spike Interconnectors för att ansluta påsarna till slangsetet (se Tabell 6.30 och Tabell 6.32)

Byt ut uppsamlingspåsen för priming mot den sterila slanganslutningen.
- **Om mer än en liter buffert krävs för separationen:**
ett till två transferset för plasma för att ansluta buffertpåsarna (se Tabell 6.30 och Tabell 6.32)
- ett förfilter
- låsande peang
- sprutor (olika storlekar) och hypodermiska nålar i storleken 20 gauge
- humant serumalbumin (HSA) som ska tillsättas till CliniMACS PBS/EDTA Buffer till en slutlig koncentration på 0,5% (v/v)
- provrör

VIKTIGT

Efter inmatning av provparametrar (STEG 2) beräknar CliniMACS Plus-programvaran de volymer som kommer att samlas in i uppsamlingspåsen för priming, Cell Collection Bag, Negative Fraction Bag och uppsamlingspåsen för buffert. Om volymen på den beräknade vätskan överskrider standardvolymen på 500 mL måste de påsar som krävs bytas ut enligt följande översikt över material som krävs.

Översikt över material som krävs

Cellberedning (ENRICHMENT 1.1)	
Totalt antal celler (WBC)	$\leq 40 \times 10^9$
Märkta celler	$\leq 5 \times 10^9$
Antal reagensflaskor	1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1 000 mL
Transferset för plasma	1

Tabell 6.29: Material som krävs för cellberedning av CD4-positiva celler (ENRICHMENT 1.1)

Separation (ENRICHMENT 1.1)		
Märkta celler	$\leq 2 \times 10^9$	$> 2-5 \times 10^9$
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1 000 mL	2 000 mL
Negative Fraction Bag	–	Byt ut slangsetets originalpåsar mot 1 000 mL transferpåsar
Buffer Waste Bag	–	
Priming Waste Bag	–	–
Cell Collection Bag	150 mL	600 mL
Luer/Spike Interconnector	1	3
Transferset för plasma	–	1

Tabell 6.30: Material som krävs för anrikning av CD4-positiva celler (ENRICHMENT 1.1)

Cellberedning (DEPLETION 2.1)	
Totalt antal celler (WBC)	$\leq 40 \times 10^9$
Märkta celler	$\leq 12 \times 10^9$
Antal reagensflaskor	1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1 000 mL
Transferset för plasma	1

Tabell 6.31: Material som krävs för cellberedning av CD4-positiva celler (DEPLETION 2.1)

Separation (DEPLETION 2.1)		
Märkta celler	$< 5 \times 10^9$	$5-12 \times 10^9$
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1 000 mL	2 000 mL
Negative Fraction Bag	–	Byt ut slangsetets originalpåsar mot 1 000 mL transferpåsar
Buffer Waste Bag	–	
Priming Waste Bag	–	–
Cell Collection Bag	1×600 mL	1–2×600 mL
Luer/Spike Interconnector	1	3
Transferset för plasma	–	1–2

Tabell 6.32: Material som krävs för depletion av CD4-positiva celler (DEPLETION 2.1)

► Beredning av påsar

Fastställ vikten på den tomma Cell Collection Bag och Cell Preparation Bag enligt beskrivningen i avsnitt 7.1.1 på sidan 117.

Magnetisk märkning av celler

Se avsnitt 7.1 "STEG 1: Cellberedning och magnetisk märkning" på sidan 117 för detaljerad information om följande steg.

- ▶ **Analys av cellulär startprodukt**
- ▶ **Överföring av cellulär startprodukt till Cell Preparation Bag**
- ▶ **Spädning av cellulär startprodukt**

Tillsätt buffert: Vikt på den buffert som ska läggas till = Vikt på cellulär startprodukt × 2

- ▶ **Centrifugering**

Centrifugera vid 300×g, utan broms, 15 minuter, rumstemperatur (RT: +19 °C till +25 °C [+66 °F till +77 °F]).

- ▶ **Volymkontroll: märkningsvolym 95 g (±5 g)**

1. Ta bort supernatanten för att justera provet med hjälp av följande ekvation:
vikt på supernatant som ska tas bort = vikt på spädd cellprodukt – 95 g
2. Resuspendera cellpelletten.

- ▶ **Inkubation med CliniMACS CD4 Reagent**

1. Tillsätt 1 flaska CliniMACS CD4 Reagent. Blanda innehållet försiktigt.
2. Inkubera på en orbital rotator (25 rpm) under 30 minuter vid RT.

- ▶ **Borttagande av överskott av reagens**

1. Fyll en Cell Preparation Bag med buffert.
2. Centrifugera (300×g, utan broms, 15 minuter, RT).
3. Ta bort så mycket supernatant som möjligt. **Notera:** Ta bort minst 500 g supernatant. Om den supernatant som tas bort understiger 500 g rekommenderas totalt två tvättsteg (istället för endast ett). Annars kan borttagandet av obundet reagens vara otillräcklig.
4. Resuspendera cellpelletten.
5. Justera provladdningsvolymen till 100 g.

6.10.2 STEG 2: Val av separationsprogram

- ▶ **Slå på CliniMACS Plus Instrument**

- ▶ Val av separationsprogram ENRICHMENT 1.1 eller DEPLETION 2.1
- ▶ Inmatning av provparameter

Se avsnitt 7.2.3 på sidan 131 eller 7.2.5 på sidan 138.

6.10.3 STEG 3: Installation av CliniMACS-slangset

- ▶ CliniMACS Tubing Set och CliniMACS Tubing Set LS

Se avsnitt 7.3.1 på sidan 148.

6.10.4 STEG 4: CliniMACS Plus-separation

- ▶ Separationsprocedur
- ▶ Koppla bort påsar och registrera processkod
- ▶ Ta bort slangset och stäng av
- ▶ Analys av celler

Se avsnitt 7.4.2 på sidan 186 eller 7.4.4 på sidan 194.

6.11 Depletion av CD4-positiva celler och CD8-positiva celler

CliniMACS Plus CD4/CD8-systemet inklusive CliniMACS Plus Instrument, CliniMACS CD4 Reagent, CliniMACS CD8 Reagent, CliniMACS Tubing Set LS och CliniMACS PBS/EDTA Buffer är avsedda för samtidig depletion av humana CD4-positiva humana och CD8-positiva celler *in vitro* från heterogena hematologiska cellpopulationer.

6.11.1 STEG 1: Cellberedning och magnetisk märkning

Första åtgärder som krävs

Applikationskapacitet

Upp till 12×10^9 CD4-positiva celler och upp till 4×10^9 CD8-positiva celler av upp till 40×10^9 totala celler (WBC)

Notera: Om antalet beräknade celler överskrider applikationskapaciteten, dela provet och fortsätt med varje prov separat samt använd ett nytt slangset för varje körning i CliniMACS Plus Instrument.

⚠ FÖRSIKTIGHET

Risk för otillräcklig separationsprestanda av märkta celler. Om applikationsspecifikationerna överskrids finns en risk för otillräckligt specifik märkning. Använd det antal celler som krävs och reagenser enligt beskrivningen för respektive applikation.

CliniMACS-material som krävs

Material	Katalog-nummer	Kvantitet
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS CD4 Reagent	276-01	1 flaska
CliniMACS CD8 Reagent	275-01	1 flaska
CliniMACS Tubing Set LS	162-01	1 slangset
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	Upp till 4×1 000 mL påsar ¹

¹ Se Tabell 6.34 och Tabell 6.35. Tillsätt HSA till CliniMACS PBS/EDTA Buffer med till en slutlig koncentration på 0,5% (v/v) för användning.

Tabell 6.33: CliniMACS-material som krävs för deplektion av CD4-positiva celler och CD8-positiva celler

Ytterligare material som krävs

- **Cell Preparation Bag:**
en 600 mL transferpåsar, lämpliga för centrifugering samt en provtagningskoppling och ett transferset för plasma, för användning under cellberedningsprocessen
- **Plasma Waste Bag och Wash Waste Bag:**
två 600 mL (eller två 1 000 mL) transferpåsar, lämpliga för centrifugering
- **Cell Collection Bag:**
en till två 600 mL transferpåsar i kombination med en Luer/Spike Interconnector för att ansluta Cell Collection Bag till slangsetet

Om två cellinsamlingspåsar krävs för separationen, använd ett transferset för plasma för att ansluta båda påsarna (se Tabell 6.35).
- **Om byte av Negative Fraction Bag, Buffer Waste Bag och/eller Priming Waste Bag är nödvändig:**
upp till tre 1 000 mL transferpåsar i kombination med två Luer/Spike Interconnectors för att ansluta påsarna till slangsetet (se Tabell 6.35)

Byt ut uppsamlingspåsen för priming mot den sterila slanganslutningen.
- **Om mer än en liter buffert krävs för separationen:**
ett till två transferset för plasma för att ansluta buffertpåsarna (se Tabell 6.35)
- ett förfilter
- låsande peang
- sprutor (olika storlekar) och hypodermiska nålar i storleken 20 gauge

- humant serumalbumin (HSA) som ska tillsättas till CliniMACS PBS/EDTA Buffer till en slutlig koncentration på 0,5% (v/v)
- provrör

VIKTIGT

Efter inmatning av provparametrar (STEG 2) beräknar CliniMACS Plus-programvaran de volymer som kommer att samlas in i uppsamlingspåsen för priming, Cell Collection Bag, Negative Fraction Bag och uppsamlingspåsen för buffert. Om volymen på den beräknade vätskan överskrider standardvolymen på 500 mL måste de påsar som krävs bytas ut enligt följande översikt över material som krävs.

Översikt över material som krävs

Cellberedning	
Totalt antal celler (WBC)	$\leq 40 \times 10^9$
Märkta celler	$\leq 12 \times 10^9$ CD4-positiva celler och $\leq 4 \times 10^9$ CD8-positiva celler
Antal reagensflaskor	1 flaska CliniMACS CD4 Reagent och 1 flaska CliniMACS CD8 Reagent
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1 000 mL
Transferset för plasma	1

Tabell 6.34: Material som krävs för cellberedning av CD4-positiva och CD8-positiva celler

Separation			
Märkta celler	$< 5 \times 10^9$	$5 - 13 \times 10^9$	$> 13 - 16 \times 10^9$
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1 000 mL	2 000 mL	3 000 mL
Negative Fraction Bag	–	Byt ut slangsetets originalpåsar mot 1 000 mL transferpåsar	Byt ut slangsetets originalpåsar mot 1 000 mL transferpåsar
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
Transferset för plasma	–	1–2	3

Tabell 6.35: Material som krävs för deplektion av CD4-positiva och CD8-positiva celler

► Beredning av påsar

Fastställ vikten på den tomma Cell Collection Bag och Cell Preparation Bag enligt beskrivningen i avsnitt 7.1.1 på sidan 117.

Magnetisk märkning av celler

Se avsnitt 7.1 "STEG 1: Cellberedning och magnetisk märkning" på sidan 117 för detaljerad information om följande steg.

► **Analys av cellulär startprodukt**

► **Överföring av cellulär startprodukt till Cell Preparation Bag**

► **Spädning av cellulär startprodukt**

Tillsätt buffert: Vikt på den buffert som ska läggas till = Vikt på cellulär startprodukt × 2

► **Centrifugering**

Centrifugera vid 300×g, utan broms, 15 minuter, rumstemperatur (RT: +19 °C till +25 °C [+66 °F till +77 °F])

► **Volymkontroll: märkningsvolym 88 g (±5 g)**

1. Ta bort supernatanten för att justera provet med hjälp av följande ekvation:
vikt på supernatant som ska tas bort = vikt på spädd cellprodukt – märkningsvolym
2. Resuspendera cellpelletten.

► **Inkubation med CliniMACS CD4 Reagent och CliniMACS CD8 Reagent**

1. Tillsätt 1 flaska CliniMACS CD4 Reagent och 1 flaska CliniMACS CD8 Reagent. Blanda innehållet försiktigt.
2. Inkubera på en orbital rotator (25 rpm) under 30 minuter vid RT.

► **Borttagande av överskott av reagens**

1. Fyll en Cell Preparation Bag med buffert.
2. Centrifugera (300×g, utan broms, 15 minuter, RT).
3. Ta bort så mycket supernatant som möjligt. **Notera:** Ta bort minst 500 g supernatant. Om den supernatant som tas bort understiger 500 g rekommenderas totalt två tvättsteg (istället för endast ett). Annars kan borttagandet av obundet reagens vara otillräcklig.
4. Resuspendera cellpelletten.
5. Justera provladdningsvolymen till 100 g.

6.11.2 STEG 2: Val av separationsprogram

► **Slå på CliniMACS Plus Instrument**

► **Val av separationsprogram DEPLETION 2.1**

► **Inmatning av provparameter**

Se avsnitt 7.2.5 på sidan 138.

6.11.3 STEG 3: Installation av CliniMACS-slangset

► CliniMACS Tubing Set och CliniMACS Tubing Set LS

Se avsnitt 7.3.1 på sidan 148.

6.11.4 STEG 4: CliniMACS Plus-separation

► Separationsprocedur

► Koppla bort påsar och registrera processkod

► Ta bort slangset och stäng av

► Analys av celler

Se avsnitt 7.4.4 på sidan 194.

6.12 Anrikning av CD1c (BDCA-1)-positiva celler – Del 1: Depletion av CD19-positiva celler och märkning av CD1c (BDCA-1)-positiva celler

CliniMACS Plus CD1c (BDCA-1)-Biotin-systemet inklusive CliniMACS Plus Instrument, CliniMACS CD1c (BDCA-1)-Biotin, CliniMACS CD19 Reagent, CliniMACS Anti-Biotin Reagent, CliniMACS Tubing Set LS, CliniMACS Tubing Set och CliniMACS PBS/EDTA Buffer är avsedda för anrikning av humana CD1c (BDCA-1)-positiva celler *in vitro* från heterogena hematologiska cellpopulationer efter depletion av CD19-positiva celler.

6.12.1 STEG 1: Cellberedning och magnetisk märkning

Första åtgärder som krävs

Applikationskapacitet

Depletion av upp till 5×10^9 CD19-positiva celler och märkning av upp till $0,2 \times 10^9$ CD1c (BDCA-1)-positiva celler av upp till 40×10^9 totala celler (WBC)

FÖRSIKTIGHET

Risk för otillräcklig separationsprestanda av märkta celler. Om applikationsspecifikationerna överskrids finns en risk för otillräckligt specifik märkning. Använd det antal celler som krävs och reagenser enligt beskrivningen för respektive applikation.

CliniMACS-material som krävs

Material	Katalog-nummer	Kvantitet
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS CD1c (BDCA-1)-Biotin	277-01	1 flaska
CliniMACS CD19 Reagent	179-01	1 flaska
CliniMACS Tubing Set LS	162-01	1 slangset
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	2×1 000 mL påsar ¹

¹ Tillsätt HSA till buffert med en slutlig koncentration på 0,5% (v/v) före användning.

Tabell 6.36: CliniMACS-material som krävs för anrikning av CD1c (BDCA-1)-positiva celler (Del 1)

Ytterligare material som krävs (för Del 1 och Del 2)

- **Cell Preparation Bag:**
två 600 mL transferpåsar lämpliga för centrifugering samt två kopplingar vid provtagningsställe och tre transferset för plasma, för användning under cellberedningsprocessen
- **Plasma Waste Bag och Wash Waste Bag:**
fem 600 mL transferpåsar lämpliga för centrifugering
- **Cell Collection Bag (Del 1):**
en 600 mL transferpåse lämplig för centrifugering i kombination med en Luer/Spike Interconnector för att ansluta Cell Collection Bag till slangsetet
- **Cell Collection Bag (Del 2):**
en 150 mL transferpåse lämplig för centrifugering i kombination med en Luer/Spike Interconnector för att ansluta transferpåsen till slangsetet
- två förfilter
- låsande peang
- sprutor (olika storlekar) och hypodermiska nålar i storleken 20 gauge
- humant serumalbumin (HSA) som ska tillsättas till CliniMACS PBS/EDTA Buffer till en slutlig koncentration på 0,5% (v/v)
- provrör

Magnetisk märkning av celler (del 1)

Se avsnitt 7.1 "STEG 1: Cellberedning och magnetisk märkning" på sidan 117 för detaljerad information om följande steg.

- ▶ **Analys av cellulär startprodukt**
- ▶ **Överföring av cellulär startprodukt till Cell Preparation Bag**

► **Spädning av cellulär startprodukt**

Tillsätt buffert: Vikt på den buffert som ska läggas till = Vikt på cellulär startprodukt × 2

► **Centrifugering**

Centrifugera vid 200×g, utan broms, 15 minuter, rumstemperatur (RT: +19 °C till +25 °C [+66 °F till +77 °F]).

► **Volymkontroll: märkningsvolym 90 g (±5 g)**

1. Resuspendera cellpelletten försiktigt efter borttagande av supernatanten.
2. Justera vikten på Cell Preparation Bag Del 1 (CPB) genom att tillsätta buffert med hjälp av följande ekvation: målvikt på fylld CPB 1 = 90 g + vikt på tom CPB
3. Resuspendera cellpelletten.

► **Inkubation med CliniMACS CD19 Reagent och CliniMACS CD1c (BDCA-1)-Biotin**

1. Tillsätt 1 flaska CliniMACS CD19 Reagent och 1 flaska CliniMACS CD1c (BDCA-1)-Biotin. Blanda innehållet försiktigt.
2. Inkubera på en orbital rotator (25 rpm) under 30 minuter vid RT.

► **Borttagande av överskott av reagens**

1. Fyll en Cell Preparation Bag Del 1 med buffert.
2. Centrifugera (300×g, utan broms, 15 minuter, RT).
3. Ta bort så mycket supernatant som möjligt. **Notera:** Ta bort minst 500 g supernatant. Om den supernatant som tas bort understiger 500 g rekommenderas totalt två tvättsteg (istället för endast ett). Annars kan borttagandet av obundet reagens vara otillräckligt.
4. Resuspendera cellpelletten.
5. Justera provladdningsvolymen till 100 g.

6.12.2 STEG 2: Val av separationsprogram

► **Slå på CliniMACS Plus Instrument**

► **Val av separationsprogram DEPLETION 2.1**

► **Inmatning av provparameter**

Se avsnitt 7.2.5 på sidan 138.

6.12.3 STEG 3: Installation av CliniMACS-slangset

► CliniMACS Tubing Set och CliniMACS Tubing Set LS

Se avsnitt 7.3.1 på sidan 148.

6.12.4 STEG 4: CliniMACS Plus-separation

► Separationsprocedur

► Koppla bort påsar och registrera processkod

► Ta bort slangset och stäng av

► Analys av celler

Se avsnitt 7.4.4 på sidan 194.

6.13 Anrikning av CD1c (BDCA-1)-positiva celler – Del 2: Flexible Labeling System

CliniMACS Plus CD1c (BDCA-1)-Biotin-systemet inklusive CliniMACS Plus Instrument, CliniMACS CD1c (BDCA-1)-Biotin, CliniMACS CD19 Reagent, CliniMACS Anti-Biotin Reagent, CliniMACS Tubing Set LS, CliniMACS Tubing Set och CliniMACS PBS/EDTA Buffer är avsedda för anrikning av humana CD1c (BDCA-1)-positiva celler *in vitro* från heterogena hematologiska cellpopulationer efter depletion av CD19-positiva celler.

6.13.1 STEG 1: Cellberedning och magnetisk märkning

Första åtgärder som krävs

Applikationskapacitet

Upp till $0,2 \times 10^9$ CD1c (BDCA-1)-positiva celler av upp till 40×10^9 totala celler (WBC)

FÖRSIKTIGHET

Risk för otillräcklig separationsprestanda av märkta celler. Om applikationsspecifikationerna överskrids finns en risk för otillräckligt specifik märkning. Använd det antal celler som krävs och reagenser enligt beskrivningen för respektive applikation.

CliniMACS-material som krävs

Material	Katalog-nummer	Kvantitet
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS Anti-Biotin Reagent	173-01	1 flaska
CliniMACS Tubing Set	161-01	1 slangset
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	3×1 000 mL påsar ¹

¹ Tillsätt HSA till buffert med en slutlig koncentration på 0,5% (v/v) före användning.

Tabell 6.37: CliniMACS-material som krävs för anrikning av CD1c (BDCA-1)-positiva celler (Del 2)

Ytterligare material som krävs

Se del 1 för de ytterligare material som krävs.

► Beredning av påsar

Fastställ vikten på den tomma Cell Collection Bag och Cell Preparation Bag enligt beskrivningen i avsnitt 7.1.1 på sidan 117.

Magnetisk märkning av celler (cellprodukt utan CD19-celler [del 2])

Se avsnitt 7.1 "STEG 1: Cellberedning och magnetisk märkning" på sidan 117 för detaljerad information om följande steg.

► Överföring av CD19-depleterad cellulär startprodukt till Cell Preparation Bag Del 2

► Spädning av CD19-depleterad cellulär startprodukt

Tillsätt buffert: Vikt på buffert som ska tillsättas = 600 g – Vikt på CD19-depleterad cellulär startprodukt

► Centrifugering

Centrifugera vid 300×g, utan broms, 15 minuter, rumstemperatur (RT: +19 °C till +25 °C [+66 °F till +77 °F]).

► Volymkontroll: märkningsvolym 95 g (±5 g)

1. Ta bort supernatanten för att justera provet med hjälp av följande ekvation:
vikt på supernatant som ska tas bort = vikt på spädd cellprodukt – märkningsvolym
2. Resuspendera cellpelletten.

► Inkubation med CliniMACS Anti-Biotin Reagent

1. Tillsätt 1 flaska CliniMACS Anti-Biotin Reagent. Blanda innehållet försiktigt.
2. Inkubera på en orbital rotator (25 rpm) under 30 minuter vid RT.

► **Borttagande av överskott av reagens**

1. Fyll en Cell Preparation Bag Del 2 med buffert.
2. Centrifugera (300×g, utan broms, 15 minuter, RT).
3. Ta bort så mycket supernatant som möjligt.
4. Resuspendera cellpelletten.
5. Fyll en Cell Preparation Bag Del 2 med buffert.
6. Centrifugera (300×g, utan broms, 15 minuter, RT).
7. Ta bort så mycket supernatant som möjligt.
8. Resuspendera cellpelletten.
9. Justera provladdningsvolymen till 100 g.

6.13.2 STEG 2: Val av separationsprogram

► **Slå på CliniMACS Plus Instrument**

► **Val av separationsprogram ENRICHMENT 3.2**

Se avsnitt 7.2.4 på sidan 136.

6.13.3 STEG 3: Installation av CliniMACS-slangset

► **CliniMACS Tubing Set och CliniMACS Tubing Set LS**

Se avsnitt 7.3.1 på sidan 148.

6.13.4 STEG 4 : CliniMACS Plus-separation

► **Separationsprocedur**

► **Koppla bort påsar och registrera processkod**

► **Ta bort slangset och stäng av**

► **Analys av celler**

Se avsnitt 7.4.3 på sidan 190.

6.14 Anrikning av CD304 (BDCA-4)-positiva celler

CliniMACS Plus CD304 (BDCA-4) inklusive CliniMACS Plus Instrument, CliniMACS CD304 (BDCA-4) Reagent, CliniMACS Tubing Set och CliniMACS PBS/EDTA Buffer är avsedda för anrikning av humana CD304 (BDCA-4)-positiva celler *in vitro* från heterogena hematologiska cellpopulationer.

6.14.1 STEG 1: Cellberedning och magnetisk märkning

Första åtgärder som krävs

Applikationskapacitet

Upp till $0,2 \times 10^9$ CD304 (BDCA-4)-positiva celler av upp till 40×10^9 totala celler (WBC)

FÖRSIKTIGHET

Risk för otillräcklig separationsprestanda av märkta celler. Om applikationsspecifikationerna överskrids finns en risk för otillräckligt specifik märkning. Använd det antal celler som krävs och reagenser enligt beskrivningen för respektive applikation.

CliniMACS-material som krävs

Material	Katalog-nummer	Kvantitet
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS CD304 (BDCA-4) Reagent	278-01	1 flaska
CliniMACS Tubing Set	161-01	1 slangset
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	4×1 000 mL påsar ¹

¹ Tillsätt HSA till CliniMACS PBS/EDTA Buffer till en slutlig koncentration på 0,5% (v/v) före användning

Tabell 6.38: CliniMACS-material som krävs för anrikning av CD304 (BDCA-4)-positiva celler

Ytterligare material som krävs

- **Cell Preparation Bag:**
en 600 mL transferpåse lämplig för centrifugering samt en provtagningskoppling och tre transferset för plasma, för användning under cellberedningsprocessen
- **Plasma Waste Bag och Wash Waste Bag:**
fem 600 mL transferpåsar lämpliga för centrifugering
- **Cell Collection Bag:**
en 150 mL transferpåse i kombination med en Luer/Spike Interconnector för att ansluta Cell Collection Bag till slangsetet
- ett förfilter

- låsande peang
- sprutor (olika storlekar) och hypodermiska nålar i storleken 20 gauge
- humant serumalbumin (HSA) som ska tillsättas till CliniMACS PBS/EDTA Buffer till en slutlig koncentration på 0,5% (v/v)
- provrör

► Beredning av påsar

Fastställ vikten på den tomma Cell Collection Bag och Cell Preparation Bag enligt beskrivningen i avsnitt 7.1.1 på sidan 117.

Magnetisk märkning av celler

Se avsnitt 7.1 "STEG 1: Cellberedning och magnetisk märkning" på sidan 117 för detaljerad information om följande steg.

► Analys av cellulär startprodukt

► Överföring av cellulär startprodukt till Cell Preparation Bag

► Spädning av depleterad cellulär startprodukt

Tillsätt buffert: Vikt på buffert som ska tillsättas = 600 g – Vikt på cellulär startprodukt

► Centrifugering

Centrifugera vid 200×g, utan broms, 15 minuter, rumstemperatur (RT: +19 °C till +25 °C [+66 °F till +77 °F]).

► Upprepa steg "Spädning av cellulär startprodukt" och "Centrifugering" två gånger

1. Fyll en transferpåse till 600 g
2. Centrifugera vid 300×g, utan broms, 15 minuter, rumstemperatur (RT: +19 °C till +25 °C [+66 °F till +77 °F]).
3. Ta bort supernatanten.

► **Volymkontroll: märkningsvolym 95 g (± 5 g)**

1. Ta bort supernatanten helt och var försiktig så att du inte resuspenderar cellpelletten.
2. Resuspendera cellpelletten försiktigt efter borttagande av supernatanten.
3. Justera vikten på Cell Preparation Bag (CPB) genom att tillsätta buffert med hjälp av följande ekvation: målvikt på fylld CPB = 95 g + vikt på tom CPB.
4. Resuspendera cellpelletten.

► **Inkubation med CliniMACS CD304 (BDCA-4) Reagent**

1. Tillsätt 1 flaska CliniMACS CD304 (BDCA-4) Reagent. Blanda innehållet försiktigt.
2. Inkubera på en orbital rotator (25 rpm) under 30 minuter vid RT.

► **Borttagande av överskott av reagens**

1. Fyll en Cell Preparation Bag med buffert.
2. Centrifugera (300×g, utan broms, 15 minuter, RT).
3. Ta bort så mycket supernatant som möjligt.
4. Resuspendera cellpelletten.
5. Justera provladdningsvolymen till 100 g.

6.14.2 STEG 2: Val av separationsprogram

► **Slå på CliniMACS Plus Instrument**

► **Val av separationsprogram ENRICHMENT 3.2**

Se avsnitt 7.2.4 på sidan 136.

6.14.3 STEG 3: Installation av CliniMACS-slangset

► **CliniMACS Tubing Set och CliniMACS Tubing Set LS**

Se avsnitt 7.3.1 på sidan 148.

6.14.4 STEG 4: CliniMACS Plus-separation

- ▶ Separationsprocedur
- ▶ Koppla bort påsar och registrera processkod
- ▶ Ta bort slangset och stäng av
- ▶ Analys av celler

Se avsnitt 7.4.3 på sidan 190.

6.15 Depletion av TCRα/β-positiva celler

CliniMACS Plus TCRα/β-Biotin-systemet inklusive CliniMACS Plus Instrument, CliniMACS TCRα/β-Biotin-systemet, CliniMACS Anti-Biotin Reagent, CliniMACS Depletion Tubing Set och CliniMACS PBS/EDTA Buffer är avsedda för depletion av humana TCRα/β-positiva celler *in vitro* från heterogena hematologiska cellpopulationer.

6.15.1 STEG 1: Cellberedning och magnetisk märkning

Första åtgärder som krävs

Applikationskapacitet

Upp till 24×10^9 TCRα/β-positiva celler av upp till 60×10^9 totala celler (WBC)

FÖRSIKTIGHET

Risk för otillräcklig separationsprestanda av märkta celler. Om applikationsspecifikationerna överskrids finns en risk för otillräckligt specifik märkning. Använd det antal celler som krävs och reagenser enligt beskrivningen för respektive applikation.

CliniMACS-material som krävs

Material	Katalog-nummer	Kvantitet
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS TCRα/β-Biotin	701-48	1 flaska
CliniMACS Anti-Biotin Reagent	173-01	2 flaskor
CliniMACS Depletion Tubing Set	261-01	1 slangset
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	Upp till 4×1 000 mL påsar ¹

¹ Tillsätt HSA till CliniMACS PBS/EDTA Buffer till en slutlig koncentration på 0,5% (v/v) före användning

Tabell 6.39: CliniMACS-material som krävs för depletion av TCRα/β-positiva celler

Ytterligare material som krävs

- **Cell Preparation Bag:**
en 600 mL transferpåsar lämpliga för centrifugering samt en provtagningskoppling och två transferset för plasma, för användning under cellberedningsprocessen
- **Plasma Waste Bag och Wash Waste Bag:**
fyra 600 mL (eller 1 000 mL) transferpåsar lämpliga för centrifugering
- **Cell Collection Bag:**
En 600 mL Cell Collection Bag är redan ansluten till CliniMACS Depletion Tubing Set.
- ett förfilter
- låsande peang
- sprutor (olika storlekar) och hypodermiska nålar i storleken 20 gauge
- humant serumalbumin (HSA) som ska tillsättas till CliniMACS PBS/EDTA Buffer till en slutlig koncentration på 0,5% (v/v)
- provrör

► Beredning av påsar

Fastställ vikten på den tomma Cell Collection Bag och Cell Preparation Bag enligt beskrivningen i avsnitt 7.1.1 på sidan 117.

Magnetisk märkning av celler

Se avsnitt 7.1 "STEG 1: Cellberedning och magnetisk märkning" på sidan 117 för detaljerad information om följande steg.

► Analys av cellulär startprodukt

Fastställ procentantal/totalt antal TCR α / β -märkta celler (inklusive ospecifik TCR α / β -bindning, inte bara verkliga TCR α / β -positiva celler). Beakta detta antal för applikationsspecifikationer och inmatning av provparametrar (se STEG 2).

► Överföring av cellulär startprodukt till Cell Preparation Bag

► Spädning av cellulär startprodukt

Tillsätt buffert: Vikt på den buffert som ska läggas till = Vikt på cellulär startprodukt $\times$ 2

► Centrifugering

1. Centrifugera vid 200 $\times$ g, utan broms, 15 minuter, rumstemperatur (RT: +19 °C till +25 °C [+66 °F till +77 °F]).
2. Ta bort supernatanten.

► **Volymkontroll: märkningsvolym 95 g (± 5 g)**

1. Ta bort supernatanten helt och var försiktig så att du inte resuspenderar cellpelletten.
2. Resuspendera cellpelletten försiktigt efter borttagande av supernatanten.
3. Justera vikten på Cell Preparation Bag (CPB) genom att tillsätta buffert med hjälp av följande ekvation: målvikt på fylld CPB = 95 g + vikt på tom CPB
4. Resuspendera cellpelletten.

► **Märkning av cellerna: inkubation med CliniMACS TCR α / β -Biotin**

1. Tillsätt 1 flaska CliniMACS TCR α / β -Biotin. Blanda innehållet försiktigt.
2. Inkubera på en orbital rotator (25 rpm) under 30 minuter vid RT.

► **Ta bort överskott av konjugat: upprepa detta steg**

1. Fyll en Cell Preparation Bag med buffert.
2. Centrifugera (300 $\times$ g, utan broms, 15 minuter, RT).
3. Ta bort så mycket supernatant som möjligt.
4. Resuspendera cellpelletten och justera vikten till 190 g efter den andra tvätten.

► **Magnetisk märkning av celler: inkubation med CliniMACS Anti-Biotin Reagent**

1. Tillsätt 2 flaskor CliniMACS Anti-Biotin Reagent. Blanda innehållet försiktigt.
2. Inkubera på en orbital rotator (25 rpm) under 30 minuter vid RT.

► **Borttagande av överskott av reagens**

1. Fyll en Cell Preparation Bag med buffert.
2. Centrifugera (300 $\times$ g, utan broms, 15 minuter, RT).
3. Ta bort så mycket supernatant som möjligt. **Notera:** Ta bort minst 500 g supernatant. Om den supernatant som tas bort understiger 500 g rekommenderas totalt två tvättsteg (istället för endast ett). Annars kan borttagandet av obundet reagens vara otillräcklig.
4. Resuspendera cellpelletten.
5. Justera provladdningsvolymen till 150 g. En maximal WBC-koncentration på $0,4 \times 10^9$ WBC/mL rekommenderas.

6.15.2 STEG 2: Val av separationsprogram

- ▶ Slå på CliniMACS Plus Instrument
- ▶ Val av separationsprogram DEPLETION 3.1
- ▶ Inmatning av provparameter

Se avsnitt 7.2.6 på sidan 143.

6.15.3 STEG 3: Installation av CliniMACS-slangset

- ▶ CliniMACS Depletion Tubing Set

Se avsnitt 7.3.3 på sidan 168.

6.15.4 STEG 4: CliniMACS Plus-separation

- ▶ Separationsprocedur
- ▶ Koppla bort påsar och registrera processkod
- ▶ Ta bort slangset och stäng av
- ▶ Analys av celler

Se avsnitt 7.4.5 på sidan 198.

6.16 Depletion av CD45RA-positiva celler

CliniMACS Plus CD45RA-systemet inklusive CliniMACS Plus Instrument, CliniMACS CD45RA Reagent med CliniMACS Depletion Tubing Set och CliniMACS PBS/EDTA Buffer är avsedda för depletion av humana CD45RA-positiva celler *in vitro* från heterogena hematologiska cellpopulationer.

6.16.1 STEG 1: Cellberedning och magnetisk märkning

Första åtgärder som krävs

Applikationskapacitet

Upp till 20×10^9 CD45RA-positiva celler av upp till 50×10^9 totala celler (WBC)

FÖRSIKTIGHET

Risk för otillräcklig separationsprestanda av märkta celler. Om applikationsspecifikationerna överskrids finns en risk för otillräckligt specifik märkning. Använd det antal celler som krävs och reagenser enligt beskrivningen för respektive applikation.

CliniMACS-material som krävs

Material	Katalog-nummer	Kvantitet
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS CD45RA Reagent	701-46	1 flaska
CliniMACS Depletion Tubing Set	261-01	1 slangset
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	3×1 000 mL påsar ¹

¹ Tillsätt HSA till CliniMACS PBS/EDTA Buffer till en slutlig koncentration på 0,5% (v/v) före användning

Tabell 6.40: CliniMACS-material som krävs för depletion av CD45RA-positiva celler

Ytterligare material som krävs

- **Cell Preparation Bags:**
en 600 mL transferpåsar lämpliga för centrifugering samt en provtagningskoppling och två transferset för plasma, för användning under cellberedningsprocessen
- **Plasma Waste Bag och Wash Waste Bag:**
två 600 mL transferpåsar lämpliga för centrifugering
- **Cell Collection Bag:**
En 600 mL Cell Collection Bag är redan ansluten till CliniMACS Depletion Tubing Set.
- ett förfilter
- låsande peang

- sprutor (olika storlekar) och hypodermiska nålar i storleken 20 gauge
- humant serumalbumin (HSA) som ska tillsättas till CliniMACS PBS/EDTA Buffer till en slutlig koncentration på 0,5% (v/v)
- provrör

VIKTIGT

En alternativ startcellkälla kan vara cellfraktion som inte innehåller målet i CliniMACS Plus CD34 Separation. Användning av CliniMACS CD45RA Reagent rekommenderas endast för cellulära startprodukter som innehåller CD45RA-positiva celler inom det normala frekvensområdet (upp till 80%). Högre frekvenser har observerats hos ett fåtal donatorer hos vilka CD45RA uttrycks av nästan alla PBMC på grund av en sällsynt mutation i CD45-genen. I sådana fall kan depletionseffekten och/eller återhämtning bli inadekvat.

► Beredning av påsar

Fastställ vikten på den tomma Cell Collection Bag och Cell Preparation Bag enligt beskrivningen i avsnitt 7.1.1 på sidan 117.

Magnetisk märkning av celler

Se avsnitt 7.1 "STEG 1: Cellberedning och magnetisk märkning" på sidan 117 för detaljerad information om följande steg.

► Analys av cellulär startprodukt

Fastställ procentantal/totalt antal CD45RA-märkta celler (inklusive ospecifik CD45RA-bindning, inte bara verkliga CD45RA-positiva celler). Beakta detta antal för applikationsspecifikationer och inmatning av provparametrar (se STEG 2).

► Överföring av cellulär startprodukt till Cell Preparation Bag

► Spädning av depleterad cellulär startprodukt

Tillsätt buffert: Vikt på den buffert som ska läggas till = Vikt på cellulär startprodukt × 2

► Centrifugering

Centrifugera vid 200×g, utan broms, 15 minuter, rumstemperatur (RT: +19 °C till +25 °C [+66 °F till +77 °F]).

Om den cell som inte är målfraktionen i en CliniMACS CD34 Separation används som alternativ startcellkälla kan spädningssteget hoppas över. Fortsätt med centrifugeringssteget och centrifugera cellerna vid 300×g (utan broms) under 15 minuter vid RT.

► **Volymkontroll: märkningsvolym 95 g (± 5 g)**

1. Ta bort supernatanten helt och var försiktig så att du inte resuspenderar cellpelletten.
2. Resuspendera cellpelletten försiktigt efter borttagande av supernatanten.
3. Justera vikten på Cell Preparation Bag (CPB) genom att tillsätta buffert med hjälp av följande ekvation: målvikt på fylld CPB = 95 g + vikt på tom CPB
4. Resuspendera cellpelletten.

► **Inkubation med CliniMACS CD45RA Reagent**

1. Tillsätt 1 flaska CliniMACS CD45RA Reagent. Blanda innehållet försiktigt.
2. Inkubera på en orbital rotator (25 rpm) under 30 minuter vid RT.

► **Borttagande av överskott av reagens**

1. Fyll en Cell Preparation Bag med buffert.
2. Centrifugera ($300\times g$, utan broms, 15 minuter, RT).
3. Ta bort så mycket supernatant som möjligt. **Notera:** Ta bort minst 500 g supernatant. Om den supernatant som tas bort understiger 500 g rekommenderas totalt två tvättsteg (istället för endast ett). Annars kan borttagandet av obundet reagens vara otillräcklig.
4. Resuspendera cellpelletten.
5. Justera provladdningsvolymen. Beräkna vikten på den buffert som krävs för att justera vikten på cellsuspensionen till cirka 125 g. Cellkoncentrationen ska inte överstiga $0,4 \times 10^9$ WBC/mL: Vikt på buffert som ska tillsättas (g) = 125 g – Vikt på cellprodukt efter tvätt (g)

6.16.2 STEG 2: Val av separationsprogram

► **Slå på CliniMACS Plus Instrument**

► **Val av separationsprogram DEPLETION 3.1**

► **Inmatning av provparameter**

Se avsnitt 7.2.6 på sidan 143.

6.16.3 STEG 3: Installation av CliniMACS-slangset

► **CliniMACS Depletion Tubing Set**

Se avsnitt 7.3.3 på sidan 168.

6.16.4 STEG 4: CliniMACS Plus-separation

- ▶ Separationsprocedur
- ▶ Koppla bort påsar och registrera processkod
- ▶ Ta bort slangset och stäng av
- ▶ Analys av celler

Se avsnitt 7.4.5 på sidan 198.

6.17 Anrikning av humana IFN-gammautsöndrande celler med CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma)

CliniMACS Plus CCS (IFN-gamma)-systemet inklusive CliniMACS Plus Instrument, CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma), CliniMACS Tubing Set och CliniMACS PBS/EDTA Buffer är avsedda för anrikning av humana IFN-gammautsöndrande celler *in vitro* från heterogena hematologiska cellpopulationer.

6.17.1 STEG 1: Cellberedning och magnetisk märkning

Första åtgärder som krävs

Applikationskapacitet

IFN-gammautsöndrande celler av upp till 1×10^9 totala celler (WBC)

FÖRSIKTIGHET

Risk för otillräcklig separationsprestanda av märkta celler. Om applikationsspecifikationerna överskrids finns en risk för otillräckligt specifik märkning. Använd det antal celler som krävs och reagenser enligt beskrivningen för respektive applikation.

CliniMACS-material som krävs

Material	Katalog-nummer	Kvantitet
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma)	279-01	1 set
CliniMACS Tubing Set	161-01	1 slangset
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	3×1 000 mL påsar ¹

1 Tillsätt HSA till CliniMACS PBS/EDTA Buffer till en slutlig koncentration på 0,5% (v/v) före användning

Tabell 6.41: CliniMACS-material som krävs för anrikning av humana IFN-gammautsöndrande celler

VIKTIGT

Förvara bufferten för cellberedning kallt vid +2 °C till +8 °C (+36 °F till +46 °F). Lägre eller högre omgivningstemperatur kan leda till lägre renhet och ge färre antal målceller.

Ytterligare material som krävs

- **Cell Preparation Bags:**
två 600 mL transferpåsar lämpliga för centrifugering samt två provtagningskopplingar och två transferset för plasma, för användning under cellberedningsprocessen
- **Plasma Waste Bag och Wash Waste Bag:**
nio 600 mL transferpåsar lämpliga för centrifugering
- **Medium bag:**
åtta 600 mL transferpåsar lämpliga för centrifugering
- **Cell Collection Bag (Del 2):**
en 150 mL transferpåse lämplig för centrifugering i kombination med en Luer/Spike Interconnector för att ansluta transferpåsen till slangsetet
- en 100 mL gaspermeabel cellodlingspåse
- ett förfilter
- låsande peang
- sprutor (olika storlekar) och hypodermiska nålar i storleken 20 gauge
- humant serumalbumin (HSA) som ska tillsättas till CliniMACS PBS/EDTA Buffer till en slutlig koncentration på 0,5% (v/v)
- provrör
- 120 mL AB-serum alternativt autologt serum som ett tillägg till det medium som används
- 1 000 mL cellodlingsmedium (RPMI 1640), +4 °C (+39 °F)
- 1 100 mL cellodlingsmedium (RPMI 1640), +37 °C (+99 °F) med tillsats av 10% (v/v) AB-serum alternativt autologt serum

- 500 mL cellodlingsmedium (RPMI 1640), +4 °C (+39 °F) med tillsats av 2% (v/v) AB-serum alternativt autologt serum

► Utrustning som krävs

Information om den utrustning som krävs för en CliniMACS Plus-separation finns i avsnitt 4.7.

Ytterligare utrustning som krävs för en applikation med CliniMACS Plus CCS (IFN-gamma)-systemet:

- odlingsplatta med 24 brunnar
- MiniMACS Separation Unit
- MS Columns
- förseparationsfilter (endast för MS Columns)
- MACSmix Tube Rotator

► Beredning av påsar

Fastställ vikten på den tomma Cell Collection Bag och Cell Preparation Bag enligt beskrivningen i avsnitt 7.1.1 på sidan 117.

Notera: Förkyl centrifugen till +4 °C (+39 °F). Efter utsöndringsfasen krävs en tredje Cell Preparation Bag för att rekombinera cellsuspensionerna. Märk således en av de fyra 600 mL transferpåsar (beredd med 125 mL medium [RPMI] med tillsats av 10% AB-serum) som **Cell Preparation nr 3 (separation)**.

Beredning av cellulär startprodukt

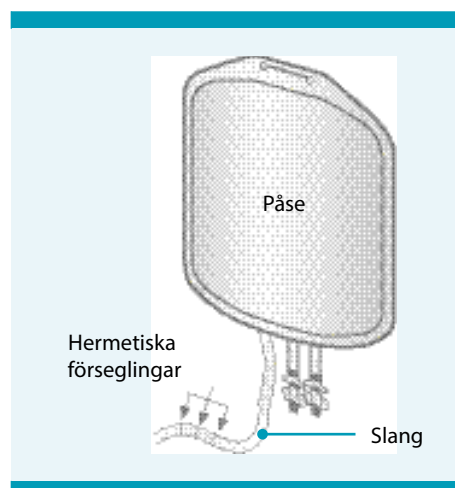
I de följande avsnitten beskrivs den rekommenderade proceduren i påse för beredning av den cellulära startprodukten med hjälp av den sterila slanganslutningen.

- Operatören måste vara bekant med drift och användning av den sterila slanganslutningen.
- Säkerställ innan du påbörjar cellmärkningen och separationsproceduren att all utrustning finns till hands.

Överföring av cellulär startprodukt till Cell Preparation Bag nr 1

1. Registrera datum och starttid innan du börjar bereda den cellulära startprodukten.
2. Fastställ volymen på den ursprungliga cellulära startprodukten genom att uppskatta att 1 mL av originalprodukten motsvarar 1 g ($1 \text{ g} \triangleq 1 \text{ mL}$).
3. Håll påsen som innehåller den cellulära startprodukten med båda händerna och blanda innehållet noggrant med en varsam roterande rörelse.

4. Använd den sterila slanganslutningen och anslut Preparation Bag nr 1 till påsen som innehåller den cellulära startprodukten.
5. Öppna den låsande peangen för att överföra lämplig vikt av den cellulära startprodukten (som innehåller maximalt 1×10^9 celler, enligt den leukocytfrekvens som fastställts tidigare) till Cell Preparation Bag nr 1. Kontrollera visuellt (på vågen) att lämplig vikt har överförts. Stäng den låsande peangen bredvid Cell Preparation Bag.
6. Försegla slangen och separera påsarna, lämna minst 15 cm av slangen på Cell Preparation Bag nr 1 för ytterligare anslutningar (se Figur 6.1). Använd en värmeförseglare för att skapa tre närliggande förseglingar på slangen. Kontrollera att förseglingarna är korrekta. Avskilj vid den centrala förseglingen. Spara påsen med den cellulära startprodukten tills separationen och den slutliga analysen av alla celler är avslutad.
7. Tarera vågen. Lägg den fyllda Cell Preparation Bag nr 1 på vågen, låt slangen ligga på bordet. Registrera vikten på den fyllda Cell Preparation Bag nr 1.
8. Fastställ vikten på den cellulära startprodukten genom att dra vikten på den tomma Cell Preparation Bag nr 1 från vikten på Cell Preparation Bag nr 1 fylld med den ursprungliga cellulära startprodukten. Registrera den beräknade vikten.



Figur 6.1: Försegla en påse

$$\begin{array}{rcl} \text{Vikt på cellulär} & & \text{Vikt på fylld Cell} & & \text{Vikt på tom Cell} \\ \text{startprodukt (g)} & = & \text{Preparation} & - & \text{Preparation} \\ & & \text{Bag nr 1 (g)} & & \text{Bag nr 1 (g)} \end{array}$$

Spädning av cellulär startprodukt

Den cellulära startprodukten måste spädas med odlingsmedium. Späd produkten med kallt medium (+2 °C till +8 °C [+36 °F till +46 °F]) till en total volym på 500 mL. Beräkna vikten på det medium som ska tillsättas med hjälp av följande ekvation och registrera den.

$$\begin{array}{rcl} \text{Vikt på det} & & & & \text{Vikt på spädd cellulär} \\ \text{medium som ska} & = & 500 \text{ g} & - & \text{startprodukt (g)} \\ \text{tillsättas (g)} & & & & \end{array}$$

1. Ta en av mediumpåsarna och anslut den till Cell Preparation Bag nr 1 med den sterila slanganslutningen.
2. Placera Cell Preparation Bag nr 1 på vågen och tarera vågen. Häng Medium Bag på en påshängare.
3. Öppna den låsande peangen bredvid Cell Preparation Bag nr 1. Övervaka skalan på vågen visuellt och överför den beräknade mediumvikten till Cell Preparation Bag nr 1.

4. När lämplig mediumvikt har överförts, stäng den låsande peangen bredvid Cell Preparation Bag nr 1 för att avbryta vätskeflödet.
5. Använd värmeförseglaren, försegla slangen och lämna minst 15 cm av slangen på Cell Preparation Bag Nr 1 för ytterligare anslutningar. Koppla bort Medium Bag.
6. Håll Cell Preparation Bag nr 1 med båda händerna och blanda innehållet noggrant med en varsam roterande rörelse. Undvik intensiv blandning av cellerna.
7. Tarera vågen och väg den fyllda Cell Preparation Bag nr 1. Registrera vikten.
8. Fastställ vikten på den spädda cellulära startprodukten genom att dra vikten på den tomma Cell Preparation Bag nr 1 från vikten på den fyllda Cell Preparation Bag nr 1. Registrera den beräknade vikten.

$$\begin{array}{rcl} \text{Vikt på spädd} & & \text{Vikt på fylld Cell} \\ \text{cellulär} & = & \text{Preparation Bag} \\ \text{startprodukt (g)} & & \text{nr 1 (g)} \end{array} \quad - \quad \begin{array}{r} \text{Vikt på tom Cell} \\ \text{Preparation Bag} \\ \text{nr 1 (g)} \end{array}$$

WARNING

Risk för kontamination. Om påsarna inte är lämpliga för cellberedning eller inte är korrekt placerade i centrifugbehållaren finns en risk för kontamination på grund av skada på påsen. Använd lämpliga påsar, vik alla lösa delar på påsar eller slangar nedåt, var försiktig så att du inte förstör påsen och placera påsarna på ett säkert sätt i centrifugbehållaren.

FÖRSIKTIGHET

Risk för lägre cellseparationsprestanda. Om påsarna inte är korrekt placerade i centrifugbehållaren finns en risk för cellförlust under borttagande av supernatanten. Vik alla lösa delar på påsar eller slangar nedåt och placera påsarna på ett säkert sätt i centrifugbehållaren.

Centrifugering

1. Använd den sterila slanganslutningen och anslut den tomma uppsamlingspåsen för plasma nr 1 till Cell Preparation Bag nr 1.
2. Vik alla lösa delar på Cell Preparation Bag nr 1 eller slangar nedåt. Placera de två påsarna på ett säkert sätt i centrifugbehållaren.
3. Balansera den laddade behållaren med en lämplig vägd behållare. Det är viktigt att centrifugen är korrekt balanserad.
4. Centrifugera cellerna vid 200×g (utan broms) under 10 minuter vid rumstemperatur (+19 °C till +25 °C [+66 °F till +77 °F]).
5. Ta ut påsarna ur centrifugen och var försiktig så att inte cellpelleten rubbas. Ladda Cell Preparation Bag nr 1 på plasmaextraktorn.

6. Öppna den låsande peangen bredvid Cell Preparation Bag nr 1. Ta bort supernatanten helt och var försiktig så att du inte resuspenderar cellpelletten när du tar bort supernatanten. När supernatanten har tagits bort, stäng den låsande den låsande peangen bredvid Cell Preparation Bag nr 1 för att avbryta vätskeflödet.
7. Använd värmeförseglaren, försegla slangen och lämna minst 15 cm av slangen på Cell Preparation Bag Nr 1 för ytterligare anslutningar. Koppla bort Plasma Waste Bag nr 1.
8. Upprepa spädning och centrifugering med den andra mediumpåsen som beretts med kallt medium och Plasma Waste Bag nr 2.
9. Spara Plasma Waste Bag tills separationen och den slutliga analysen av alla celler är avslutad.

Volymkontroll

1. För restimulering av cellerna *in vitro* måste volymen på cellprovet justeras till 100 mL. När supernatanten har tagits bort, resuspendera pelleten försiktigt.
2. Justera vikten på Cell Preparation Bag 1 genom att tillsätta odlingsmedium. Beräkna vikten på det medium som ska tillsättas med hjälp av följande ekvation:

$$\begin{array}{lcl} \text{Vikt på fylld Cell Preparation} & & \text{Vikt på tom Cell} \\ \text{Bag nr 1 efter} & = & 100 \text{ g} + \text{Preparation Bag} \\ \text{volymkontroll (g)} & & \text{nr 1 (g)} \end{array}$$

3. Använd den sterila slanganslutningen och anslut Cell Preparation Bag nr 1 till den beredda Medium Bag 10% (innehållande 600 mL förvämt odlingsmedium med tillsats av 10% AB-serum). Häng Medium Bag 10% på en påhängare.
4. Tarera vågen. Placera Cell Preparation Bag nr 1 med cellpelletten på vågen.
5. Öppna den låsande peangen bredvid Cell Preparation Bag nr 1. Fyll Cell Preparation Bag nr 1 med medium tills beräknad "Vikt på fylld Cell Preparation Bag nr 1 efter volymkontroll" har nåtts. Stäng den låsande den låsande peangen bredvid Cell Preparation Bag nr 1 för att avbryta vätskeflödet.
6. Använd värmeförseglaren, försegla slangen och lämna minst 15 cm av slangen på Cell Preparation Bag för ytterligare anslutningar. Koppla bort Medium Bag 10%.
7. Använd den sterila slanganslutningen och anslut Cell Preparation Bag nr 1 till en 100 mL gaspermeabel odlingspåse. Öppna den låsande den låsande peangen bredvid Cell Preparation Bag nr 1 och överför allt innehåll.

FÖRSIKTIGHET

Risk för sämre prestanda. Om påsarna inte är lämpliga för cellberedning finns en risk för kontamination på grund av skada på påsen. Använd gaspermeabla odlingspåsar lämpliga för cellberedning.

Märkning av celler

Ett CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma) som består av två flaskor (7,5 mL vardera) är bruksfärdiga och tillräckliga för en applikation enligt beskrivning nedan. Reagenserna är inte avsedda för parental administrering.

Målprov och kontrollprov

I protokollet beskrivs märkningsproceduren för "målprovet" och "kontrollprovet". Båda proverna bearbetas parallellt, kontrollprovet behandlas på exakt samma sätt som målprovet, men utan tillsats av antigen. Analysen av kontrollprovet ger således information om spontan cytokinutsöndring.

Restimulering *in vitro*

VIKTIGT

■ *Ett litet negativt kontrollprov (kontrollprov) som behandlas på exakt samma sätt som det antigenstimulerade målprovet utan tillsats av antigen ska inkluderas som ett mått på spontan cytokinutsöndring.*

■ *För restimulering *in vitro* är den optimala celldensiteten $0,5\text{--}1\times 10^9$ celler/cm² och 1×10^9 celler/mL.*

1. Använd en steril spruta (1 mL) med en nål med storleken 20 gauge och ta en liten alikvot (t.ex. 1 mL = cirka 1×10^9 celler) av cellerna som **kontrollprov (ostimulerat)**.
2. Odlå alikvoten under optimala förhållanden i en brunn på en odlingsplatta med 24 brunnar.
3. Injicera antigenet i cellerna i den gaspermeabla cellodlingspåsen (**målprov**) vid en förbestämd koncentration via en av portarna med en spruta.
4. Inkubera båda proverna vid +37 °C (+99 °F) och 5–7.5% CO₂ under lämplig tid i inkubatorn. När proteiner eller celllysats används som antigener är inkubationstiden mellan 4 och 16 timmar. För peptider är inkubationstiden 3 till 6 timmar. Eftersom den optimala stimuleringstiden påverkas av specifika egenskaper hos antigenet rekommenderar Miltenyi Biotec att en dedikerad valideringsprocedur används för att uppnå bästa resultat.

Märkning med CliniMACS IFN-gamma Catchmatrix Reagent

Registrera lotnummer och utgångsdatum för CliniMACS IFN-gamma Catchmatrix Reagent.

Målprov

VIKTIGT

För utsöndringsfasen måste de kärl som väljs ha tillräcklig storlek för att minst 1 volym kall buffert ska kunna tillsättas i slutet av utsöndringsfasen. Celldensiteten får inte överskrida 1×10^6 celler/mL. Således måste 1×10^9 celler inkuberas för utsöndring i totalt 1 000 mL varmt odlingsmedium.

1. Använd den sterila slanganslutningen för att ansluta odlingspåsen till Cell Preparation Bag nr 2 (utsöndring) och överför cellerna. Säkerställ komplett överföring av cellerna till Cell Preparation Bag nr 2. Stäng den låsande peangen bredvid Cell Preparation Bag nr 2 för att avbryta vätskeflödet.
2. Använd värmeförseglaren för att försegla slangen och lämna minst 15 cm av slangen på Cell Preparation Bag nr 2 för ytterligare anslutningar. Koppla bort den tomma odlingspåsen.
3. Använd den sterila slanganslutningen för att ansluta den beredda Medium Bag 2% (innehållande 500 mL kallt (+2 till +8 °C [+36 °F till +46 °F]) odlingsmedium med tillsats av 2% AB-serum) till Cell Preparation Bag nr 2.
4. Öppna den låsande peangen bredvid Cell Preparation Bag nr 2. Fyll Cell Preparation Bag nr 2 upp till 600 mL. När lämplig mediumvikt har överförts, stäng den låsande peangen bredvid Cell Preparation Bag nr 2 för att avbryta vätskeflödet.
5. Använd värmeförseglaren för att försegla slangen och lämna minst 15 cm av slangen på Cell Preparation Bag nr 2 för ytterligare anslutningar. Koppla bort Medium Bag 2%.
6. Använd värmeförseglaren för att ansluta den tomma uppsamlingspåsen för plasma nr 1 till Cell Preparation Bag nr 2.
7. Vik alla lösa delar på påsen eller slangarna nedåt. Placera de två påsarna på ett säkert sätt i centrifugbehållaren.
8. Balansera den laddade behållaren med en lämplig vägd behållare. Det är viktigt att centrifugen är korrekt balanserad.
9. Centrifugera cellerna vid $300 \times g$ (utan broms) under 10 minuter vid +4 °C till +8 °C (+39 °F till +46 °F).
10. Placera Cell Preparation Bag nr 2 på plasmaextraktorn. Öppna den låsande peangen bredvid Cell Preparation Bag nr 2. Ta bort supernatanten helt och var försiktig så att inte cellpelletten rubbas. Stäng den låsande peangen bredvid Cell Preparation Bag nr 2 för att avbryta vätskeflödet.
11. Använd värmeförseglaren för att försegla slangen och lämna minst 15 cm av slangen på Cell Preparation Bag nr 2 för ytterligare anslutningar. Koppla bort Wash Waste Bag nr 1.
12. Resuspendera cellpelletten i den kvarvarande volymen efter borttagande av supernatanten.

13. Anslut en provtagningskopplingen till Cell Preparation Bag nr 2 och desinficera septumet. Använd en lämplig steril spruta och nål för att avlägsna 7,425 mL från flaskan med CliniMACS IFN-gamma Catchmatrix reagens. En 10 mL spruta räcker för ta upp innehållet i en reagensflaska. Sprutan ska vara utrustad med en nål i storleken 20 gauge.
14. Håll Cell Preparation Bag nr 2 med båda händerna och blanda innehållet noggrant med en varsam roterande rörelse.
15. Använd injektionsporten på provtagningskopplingen och injicera hela reagensvolymen i Cell Preparation Bag nr 2. Var försiktig så att du inte punkterar påsen.
16. Resuspendera cellerna och inkubera dem under 5 minuter på is. Registrera inkubationstiden.

Kontrollprov (ostimulerat)

1. Överför cellerna till ett 15 mL förslutningsbart rör.
2. Tillsätt kallt (+2 °C till +8 °C [+36 °F till +46 °F]) odlingsmedium med 2% AB-serum upp till 15 mL.
3. Centrifugera cellerna vid 300×g (utan broms) under 10 minuter vid +4 °C till +8 °C (+39 °F till +46 °F) och ta försiktigt bort supernatanten helt.
4. Resuspendera cellpelleten i 100 µL kallt (+2 °C till +8 °C [+36 °F till +46 °F]) odlingsmedium med tillsats av 2% AB-serum.
5. Tillsätt de återstående 75 µL av CliniMACS IFN-gamma Catchmatrix Reagent och inkubera suspensionen under 5 minuter på is.

Utsöndringsfas

Målprov

1. Ta de fyra förfyllda transferpåsar (inklusive den märkta Cell Preparation Bag nr 3) innehållande 125 mL varmt (+37 °C [+99 °F]) odlingsmedium med tillsats av 10% AB-serum.
2. Använd den sterila slanganslutningen och anslut Cell Preparation Bag nr 2 till den beredda Medium Bag 10% (innehållande förvämt (+37 °C [+99 °F]) odlingsmedium med tillsats av 10% AB-serum).
3. Tillsätt 500 mL förvämt odlingsmedium till cellprovet i Cell Preparation Bag nr 2. Starta omedelbart räkna inkubationstiden på 45 minuter.
4. Distribuera 125 mL av den cellsuspension som bildats i var och en av de fyra transferpåsar genom seriell anslutning av transferpåsar till Cell Preparation Bag nr 2 med den sterila slanganslutningen. Kontrollera skalan på vågen visuellt och överför lämplig vikt av cellsuspensionen. Denna procedur resulterar i totalt 250 g cellsuspension i var och en av de fyra transferpåsar. Efter överföring, försegla slangen för att koppla bort transferpåsar med hjälp av värmeförseglaren.

5. Inkubera cellerna vid +37 °C (+99 °F) under de kvarvarande 45 minuterna med kontinuerlig långsam rotation (max. 50 rpm) tills inkubationstiden är slut. Registrera inkubationstiden.
6. Ta ett transferset för plasma och säkerställ att klämman är i låst position. Sätt in spiken på transferset för plasma i en port på buffertpåsen.
7. Efter 45 minuter ansluter du buffertpåsen till Cell Preparation Bag nr 3 med den sterila slanganslutningen. Tillsätt kall (+2 °C till +8 °C [+36 °F till +46 °F]) buffert till var och en av de fyra transferpåsar (minst en volym, dvs. 250 mL vardera) genom seriell anslutning av transferpåsar till buffertpåsen. Kyl ned cellerna genom att placera påsarna på is under 10 minuter.
8. Använd den sterila slanganslutningen och anslut en Wash Waste Bag (Wash Waste Bag nr 2 till 5) till var och en av de fyra transferpåsar.
9. Centrifugera cellerna vid 300×g (utan broms) under 10 minuter vid +4 °C (+39 °F). Använd plasmaextraktorn och ta bort supernatanten helt från alla påsar.
10. Använd värmeförseglaren och försegla slangen på varje påse. Koppla bort Wash Waste Bag.
11. Ta ett transferset för plasma och säkerställ att klämman är i låst position. Sätt in spiken på transferset för plasma i en port på en buffertpåse.
12. Använd den sterila slanganslutningen och anslut buffertpåsen till Cell Preparation Bag nr 3.
13. Skjut klämman på transferset för plasma till öppet läge och fyll Cell Preparation Bag nr 3 med 200 mL buffert.
14. När lämplig buffertvikt har överförts, skjut klämman på transferset för plasma till stängt läge för att avbryta vätskeflödet.
15. Använd värmeförseglaren, försegla slangen och lämna minst 15 cm av slangen på Cell Preparation Bag nr 3. Koppla bort buffertpåsen.
16. Använd den sterila slanganslutningen och anslut en av de övriga tre transferpåsar som innehåller cellerna till Cell Preparation Bag nr 3 och rekombinera båda suspensionerna.

VIKTIGT

Det delade provet måste rekombineras i Cell Preparation Bag nr 3 före centrifugering.

17. Upprepa denna procedur tills cellsuspensionerna från alla fyra transferpåsar är rekombinerade i Cell Preparation Bag nr 3.
18. Efter att cellerna har rekombinerats, ansluts buffertpåsen till Cell Preparation Bag nr 3 med den sterila slanganslutningen.
19. Skjut klämman på transferset för plasma till öppet läge. Fyll Cell Preparation Bag med buffert upp till 500 mL.
20. När lämplig buffertvikt har överförts, skjut klämman på transferset för plasma till stängt läge för att avbryta vätskeflödet. Stäng den låsande peangen bredvid Cell Preparation Bag nr 3.

21. Använd värmeförseglaren, försegla slangen mellan de båda klämmorna och lämna minst 15 cm av slangen på Cell Preparation Bag nr 3 för ytterligare anslutningar. Koppla bort buffertpåsen.
22. Använd den sterila slanganslutningen och anslut den tomma uppsamlingspåsen för tvätt nr 6 till Cell Preparation Bag nr 3.
23. Vik alla lösa delar på Cell Preparation Bag nr 3 eller slangar nedåt. Placera de två påsarna på ett säkert sätt i centrifugbehållaren.
24. Balansera den laddade behållaren med en lämplig vägd behållare. Det är viktigt att centrifugen är korrekt balanserad.
25. Centrifugera cellerna vid 300×g (utan broms) under 10 minuter vid +4 °C (+39 °F).

Kontrollprov (ostimulerat)

1. Tillsätt varmt (+37 °C [+99 °F]) odlingsmedium med tillsats av 10% AB-serum för att späda provet till maximalt 1×10^6 celler/mL, dvs. en total volym på 10 mL måste användas för 1×10^9 celler.
2. Inkubera cellerna i ett slutet rör under 45 minuter vid +37 °C (+99 °F) under långsam kontinuerlig rotation med MACSmix Tube Rotator (max. 50 rpm).
3. Efter 45 minuter fyller du röret med kall (+4 °C [+39 °F]) buffert och placerar röret på is under 5–10 minuter.
4. Centrifugera cellerna vid 300×g (utan broms) under 10 minuter vid +4 °C till +8 °C (+39 °F till +46 °F).

Magnetisk märkning med CliniMACS IFN-gamma Enrichment Reagent

Registrera lotnummer och utgångsdatum för CliniMACS IFN-gamma Enrichment Reagent.

Målprov

1. Efter centrifugeringssteget tar du försiktigt bort supernatanten med plasmaextraktorn, enligt beskrivningen ovan och resuspenderar den kvarvarande volymen. Stäng den låsande peangen bredvid Cell Preparation Bag nr 3 efter borttagandet.
2. Använd värmeförseglaren för att försegla slangen och lämna minst 15 cm av slangen på Cell Preparation Bag nr 3 för ytterligare anslutningar. Koppla bort Wash Waste Bag nr 6.
3. Anslut en provtagningskopplingen till Cell Preparation Bag nr 3 och desinficera septumet. Använd en lämplig steril spruta och nål för att avlägsna 7,425 mL från flaskan med CliniMACS IFN-gamma Enrichment Reagent. En 10 mL spruta räcker för ta upp innehållet i en reagensflaska. Sprutan ska vara utrustad med en nål i storleken 20 gauge.

4. Använd injektionsporten på provtagningskopplingen och injicera reagenset i Cell Preparation Bag nr 3. Var försiktig så att du inte punkterar påsen. Starta omedelbart att räkna inkubationstiden på 15 minuter. Registrera starttiden för inkubationen.
5. Håll Cell Preparation Bag med båda händerna och blanda innehållet noggrant med en varsam roterande rörelse.
6. Inkubera cellerna under 15 minuter på is. Registrera stopptiden för inkubationen.
7. Använd den sterila slanganslutningen och anslut buffertpåsen till Cell Preparation Bag nr 3.
8. Öppna den låsande peangen bredvid Cell Preparation Bag nr 3. Skjut klämman på transferset för plasma till öppet läge. Fyll Cell Preparation Bag nr 3 upp till 500 mL med kall (+2 °C till +8 °C [+36 °F till +46 °F]) buffert.
9. När lämplig buffertvikt har överförts, skjut klämman på transferset för plasma till stängt läge. Stäng den låsande peangen bredvid Cell Preparation Bag nr 3. Använd värmeförseglaren och försegla slangen mellan de båda klämmorna. Koppla bort buffertpåsen.
10. Använd den sterila slanganslutningen och anslut den tomma uppsamlingspåsen för tvätt nr 7 till Cell Preparation Bag nr 3.
11. Vik alla lösa delar på påsen eller slangarna nedåt. Placera de två påsarna på ett säkert sätt i centrifugbehållaren.
12. Balansera den laddade behållaren med en lämplig vägd behållare. Det är viktigt att centrifugen är korrekt balanserad.
13. Centrifugera vid 300×g (utan broms) under 10 minuter vid +4 °C (+39 °F).
14. Ta försiktigt bort supernatanten enligt beskrivning ovan och resuspendera cellerna i 100 mL kall (+2 °C till +8 °C [+36 °F till +46 °F]) buffert.
15. Desinficera septumet på provtagningskopplingen. Sätt in en nål med en lämplig spruta i provtagningskopplingen på Cell Preparation Bag och ta ut en volym på 0,5 mL märkt produkt. Var försiktig så att du inte punkterar påsen. Överför provet till ett provrör. Märk provet URSPRUNGLIGT MÅLPROV (ska inkludera patient-ID).

VIKTIGT

Säkerställ att cellerna är noggrant blandade innan du tar provet. För ett representativt prov, använd en spruta med en kapacitet på minst 5 mL.

16. Förvara cellprovet kallt (+2 °C till +8 °C [+36 °F till +46 °F]) för cellanalys.

Kontrollprov (ostimulerat)

1. Ta bort supernatanten försiktigt efter centrifugering.
2. Resuspendera cellerna i 100 µL kall buffert (+2 °C till +8 °C [+36 °F till +46 °F]).
3. Tillsätt 75 µL av kvarvarande CliniMACS IFN-gamma Enrichment Reagent.
4. Inkubera cellerna under 15 minuter på is.

5. Fyll kärlet med kall buffert (+2 °C till +8 °C [+36 °F till +46 °F]) och centrifugera vid 300×g (utan broms) under 10 minuter vid +4 °C (+39 °F).
6. Ta försiktigt bort supernatanten och resuspendera cellerna i 1 mL kall (+2 °C till +8 °C [+36 °F till +46 °F]) buffert.
7. Ta upp ett litet prov (cirka 100 µL) av cellsuspensionen och överför det till ett rör märkt som fraktion av URSPRUGNLIGT KONTROLLPROV före separation. Förvara kallt fram till analys.

Magnetisk separation

Målprov

Den magnetiska separationen av målprovet utförs med CliniMACS Plus Instrument. Efter separationsproceduren ska kontrollprovet bearbetas enligt beskrivningen nedan.

Kontrollprov (ostimulerat)

1. Förbered två MS Columns genom att skölja dem med 500 µL kall (+2 °C till +8 °C [+36 °F till +46 °F]) buffert och kasta avfallsmaterialet.
2. Placera den första kolonnen i det magnetiska fältet på MiniMACS Separator.
3. Passera cellerna genom ett förseparationsfilter för att ta bort klumpar.
4. Applicera cellsuspension på kolonnen.
5. Samla in det totala avfallsmaterialet (innehållande den icke-märkta cellfraktionen). Tvätta kolonnen genom att tillsätta 500 µL kall buffert till kolonnen. Utför totalt tre tvättsteg genom att successivt tillsätta 500 µL buffert till kolonnen när kolonnbehållaren är tom.
6. Ta bort kolonnen från separatorn, placera den andra kolonnen i separatorn och placera den första kolonnen ovanpå den andra.
7. Pipettera 1 mL kall buffert på den första kolonnen. Spola omedelbart ut fraktionen med de magnetiskt märkta cellerna genom att använda kolven, som medföljer kolonnen, direkt på den andra kolonnen.
8. Samla in de icke-märkta cellerna som passerar igenom och tvätta kolonnen med 500 µL kall buffert. Utför totalt tre tvättsteg genom att successivt tillsätta 500 µL buffert till kolonnen när kolonnbehållaren är tom.
9. Ta bort den andra kolonnen från separatorn och placera kolonnen på ett lämpligt uppsamlingsrör märkt som positiv fraktion.
10. Pipettera 0,5 mL kall buffert på kolonnen. Skölja omedelbart ut fraktionen med de magnetiskt märkta cellerna genom att använda kolven som medföljer kolonnen.
11. Förvara målcellsfraktionen kallt till analysen.

6.17.2 STEG 2: Val av separationsprogram

- ▶ **Val av separationsprogram ENRICHMENT 3.2**

Se avsnitt 7.2.4 på sidan 136.

6.17.3 STEG 3: Installation av CliniMACS-slangset

- ▶ **CliniMACS Tubing Set och CliniMACS Tubing Set LS**

Se avsnitt 7.3.1 på sidan 148.

6.17.4 STEG 4: CliniMACS Plus-separation

- ▶ **Separationsprocedur**
- ▶ **Koppla bort påsar och registrera processkod**
- ▶ **Ta bort slangset och stäng av**
- ▶ **Analys av celler**

Se avsnitt 7.4.3 på sidan 190.

7 Detaljerad information om STEG 1–4

7.1 STEG 1: Cellberedning och magnetisk märkning

I detta kapitel finns detaljerad information om de procedurer som krävs för cellseparation med CliniMACS Plus-systemet.

7.1.1 Första åtgärder som krävs

För de material som krävs för en särskild applikation, se det applikationsspecifika avsnittet (se avsnitt 5.2 på sidan 37).

Beredning av CliniMACS PBS/EDTA Buffer

Tillsätt av HSA till CliniMACS PBS/EDTA Buffer till en slutlig koncentration på 0,5% (v/v)

Beredning av påsar

Se det applikationsspecifika avsnittet för information om vilka påsar som behövs:

- **Cell Preparation Bag:** Sätt in en provtagningskoppling (eller likvärdig) i porten på utsidan av Cell Preparation Bag. Placera en låsande peang på slangen nära påsen och stäng den låsande peangen. Väg den tomma Cell Preparation Bag med den låsande peangen placerad nära påsen och slangen hängande på bordet bredvid vågen. Registrera vikten.

VIKTIGT

Eftersom slangens längd kan variera under beredningsproceduren ska du var noggrann när du fastställer vikten på Cell Preparation Bag. För en exakt avläsning ska du säkerställa att den låsande peangen alltid är placerad nära påsen och ligger på vågen och att resten av slangen ligger på bordet bredvid vågen.

- **Cell Collection Bag:**
 - CliniMACS Tubing Set/CliniMACS Tubing Set LS: Sätt in en Luer/Spike Interconnector (eller likvärdig) i porten på utsidan av Cell Collection Bag. Placera en peang på slangen nära påsen och stäng den låsande peangen. Väg den tomma Cell Collection Bag med den låsande peangen placerad nära påsen och slangen hängande på bordet bredvid vågen. Registrera vikten.
 - CliniMACS Depletion Tubing Set: En Cell Collection Bag är redan ansluten till slangsetet. Sätt in en Luer/Spike Interconnector (eller likvärdig) i porten på utsidan av Cell Collection Bag. Placera en peang på slangen nära påsen och stäng den låsande peangen. Väg den tomma cellinsamlingspåsen med den låsande peangen placerad nära påsen och slangen hängande på bordet bredvid vågen. Registrera vikten.

7.1.2 Magnetisk märkning av celler

I följande avsnitt beskrivs den rekommenderade proceduren i påse för beredning av den cellprodukten med den sterila slanganslutningen.

- Operatören måste var bekant med drift och användning av den sterila slanganslutningen.
- Säkerställ "att all utrustning finns till hands innan du påbörjar cellmärknings- och separationsproceduren.

VIKTIGT

- *All hantering av påsar ska ske i en steril miljö (t.ex. i laminärt flödesskåp) med aseptiska tekniker. Anslutning av slangen med den sterila slanganslutningen kan utföras utanför det laminära flödesskåpet.*
- *Utför provberedning och cellseparation vid de temperaturförhållanden som definieras i det applikationsspecifika avsnittet. Högre eller lägre omgivningstemperatur kan leda till lägre renhet och ge färre antal målceller.*

I korthet utförs den magnetiska märkningen av cellprodukten i följande steg:

1. analys av cellulär startprodukt
2. överföring av cellulär startprodukt till Cell Preparation Bag
3. spädning av den cellulära startprodukten
4. centrifugering
5. endast för CliniMACS Plus Anti-Biotin-systemet och CliniMACS Plus TCRα/β-Biotin-systemet: märkning av cellerna (inkubation med den primära antikroppen/CliniMACS TCRα/β-biotin) och borttagande av överskott av konjugat (1:a tvätt)
6. volymkontroll
7. endast för CliniMACS Plus CD3 och CD3/CD19-systemet: inkubation med kliniskt immunglobulin
8. magnetisk märkning av cellerna (inkubation med CliniMACS-reagens)
9. borttagande av överskott av reagens
10. volymkontroll för cellseparation

Analys av cellulär startprodukt

Fastställ följande parametrar innan beredning av den cellulära startprodukten påbörjas:

- totalt antal leukocyter
- procentandel celler som ska märkas
- total antal leukocyter som ska märkas
- viabilitet

Säkerställ att arbetet sker inom applikationsspecifikationen.

Kontrollera parametrarna igen efter märkningsproceduren. Detta är nödvändigt för laddningsprogrammen i olika stadier (staged-loading programs) (ENRICHMENT 1.1/DEPLETION 2.1/DEPLETION 3.1) eftersom följande tre provparametrar måste anges i programmet under inställningen av CliniMACS Plus Instrument innan slangsetet ansluts till instrumentet:

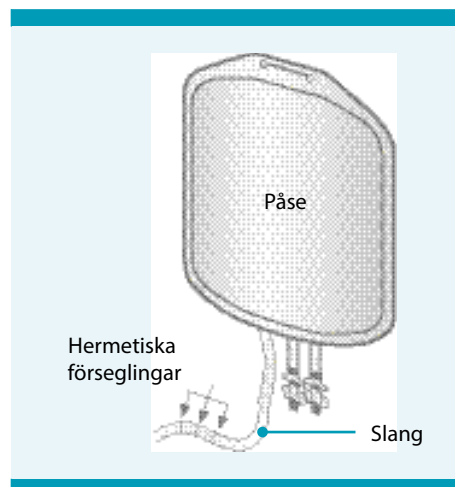
- koncentration leukocyter per mL
- procentandel celler som ska märkas
- cellprovets slutliga volym (provladdningsvolym)

Andra tester kan krävas beroende på avsedd användning av cellerna (t.ex. antal T-celler, fenotyp). Registrera alla data.

Överföring av cellulär startprodukt till Cell Preparation Bag

1. Registrera datum och starttid innan du börjar bereda den cellulära startprodukten.
2. Fastställ volymen på den cellulära startprodukten genom att uppskatta att 1 mL av den cellulära startprodukten motsvarar 1 g ($1 \text{ g} \triangleq 1 \text{ mL}$).
3. Håll påsen med den cellulära startprodukten med båda händerna och blanda innehållet noggrant med en varsam roterande rörelse.
4. Använd den sterila slanganslutningen och anslut Cell Preparation Bag till påsen med den ursprungliga cellulära startprodukten.
5. Öppna den låsande peangen för att överföra den cellulära startprodukten till Cell Preparation Bag. Använd en slangskalare för att ta bort kvarvarande blod från slangen. Stäng den låsande peangen på slangen så nära påsen som möjligt.

6. Försegla slangen och separera påsarna, lämna minst 15 cm av slangen på Cell Preparation Bag för ytterligare anslutningar (se Figur 7.1). Använd en värmeförseglare för att skapa tre närliggande förseglingar på slangen. Kontrollera att förseglingarna är korrekta. Avskilj vid den centrala förseglingen. Spara påsen med den ursprungliga leukaferesen/cellulära startpåsen tills separationen och den slutliga analysen av alla celler är avslutad.



Figur 7.1: Försegla en påse.

7. Desinficera septumet på provtagningskopplingen för att ta ett prov. Blanda innehållet i påsen. Sätt in en nål med en lämplig spruta i provtagningskopplingen på Cell Preparation Bag och ta ut en volym på 0,5 mL. Överför provet till ett provrör. Märk röret med LEUKAFERES/CELLULÄR STARTPRODUKT (detta ska inkludera patient-ID) och spara det för cellanalys.

VIKTIGT

Säkerställ att den cellulära startprodukten är noggrant blandad innan du tar provet. För ett representativt prov, använd en spruta med en kapacitet på minst 5 mL.

8. Tarera vågen. Lägg den fyllda Cell Preparation Bag på vågen, låt slangen ligga på bordet. Registrera vikten.
9. Fastställ vikten på den cellulära startprodukten genom att dra vikten på den tomma Cell Preparation Bag från vikten på Cell Preparation Bag fylld med cellulär startprodukt. Registrera den beräknade vikten.

$$\text{Vikt på cellulär startprodukt (g)} = \text{Vikt på fylld Cell Preparation Bag (g)} - \text{Vikt på tom Cell Preparation Bag (g)}$$

Spädning av cellulär startprodukt

Se det applikationsspecifika avsnittet för information om den spädningskvot som krävs.

Den cellulära startprodukten måste spädas med CliniMACS PBS/EDTA Buffer (med tillsats av HSA till en slutlig koncentration på 0,5% [v/v]) före magnetisk märkning. Beräkna vikten på den buffert som ska tillsättas med hjälp av en av följande ekvationer (1 eller 2) beroende på applikation och registrera den.

$$(1) \text{ vikt på den buffert som ska tillsättas (g)} = 600 \text{ g} - \text{Vikt på cellulär startprodukt (g)}$$

$$(2) \text{ vikt på den buffert som ska tillsättas (g)} = \text{Vikt på cellulär startprodukt (g)} \times 2$$

1. Ta ett transferset för plasma och säkerställ att klämman är i låst position. Sätt in spiken på transferset för plasma i en port på buffertpåsen.
2. Använd den sterila slanganslutningen och anslut buffertpåsen till Cell Preparation Bag. Häng buffertpåsen på en påshängare.
3. Placera Cell Preparation Bag på vågen och tarera vågen.
4. Öppna den låsande peangen bredvid Cell Preparation Bag. Skjut klämman på transferset för plasma till öppet läge. Kontrollera skalan på vågen visuellt och överför den beräknade vikten på bufferten till Cell Preparation Bag.
5. När lämplig buffertvikt har överförts, skjut klämman på transferset för plasma till stängt läge för att avbryta vätskeflödet. Stäng den låsande peangen på slangen så nära påsen som möjligt.
6. Använd värmeförseglaren för att försegla slangen mellan klämman och den låsande peangen och lämna minst 15 cm av slangen på Cell Preparation Bag för ytterligare anslutningar. Koppla bort buffertpåsen.
7. Håll Cell Preparation Bag med båda händerna och blanda innehållet noggrant med en varsam roterande rörelse. Undvik intensiv blandning av cellerna.
8. Tarera vågen och väg den fyllda Cell Preparation Bag. Registrera vikten.
9. Fastställ vikten på den spädda cellulära startprodukten genom att dra vikten på den tomma Cell Preparation Bag från vikten på den fyllda Cell Preparation Bag. Registrera den beräknade vikten.

$$\text{Vikt på spädd cellulär startprodukt (g)} = \text{Vikt på fylld Cell Preparation Bag (g)} - \text{Vikt på tom Cell Preparation Bag (g)}$$

Centrifugering

VARNING

Risk för kontamination. Om påsarna inte är lämpliga för cellberedning eller inte är korrekt placerade i centrifugbehållaren finns en risk för kontamination på grund av skada på påsen. Använd lämpliga påsar, vik alla lösa delar på påsar eller slangar nedåt, var försiktig så att du inte förstör påsen och placera påsarna på ett säkert sätt i centrifugbehållaren.

FÖRSIKTIGHET

Risk för lägre cellseparationsprestanda. Om påsarna inte är korrekt placerade i centrifugbehållaren finns en risk för cellförlust under borttagande av supernatanten. Vik alla lösa delar på påsar eller slangar nedåt och placera påsarna på ett säkert sätt i centrifugbehållaren.

1. Använd den sterila slanganslutningen och anslut den tomma uppsamlingspåsen för plasma till Cell Preparation Bag.
2. Vik alla lösa delar på Cell Preparation Bag eller slangarna nedåt. Placera de två påsarna på ett säkert sätt i centrifugbehållaren.

3. Balansera den laddade behållaren med en lämplig vägd behållare. Det är viktigt att centrifugen är korrekt balanserad.
4. Centrifugera cellerna enligt de förhållanden som definierats i det applikationsspecifika avsnittet. Registrera centrifugeringsförhållanden.
5. Ta ut påsarna ur centrifugen och var försiktig så att inte cellpelleten rubbas. Ladda Cell Preparation Bag på plasmaextraktorn och den anslutna på uppsamlingspåsen på bordsvågen.

Volymkontroll

Vid magnetisk märkning av celler varierar cellproduktens optimala vikt beroende på applikationen. Se märkningsvolym i det applikationsspecifika avsnittet.

Beroende på applikationen kan det vara nödvändigt att antingen bara ta bort en viss mängd av supernatanten för att nå märkningsvolymen (skraddarsytt borttagande av supernatant) eller att ta bort supernatanten helt och tillsätta buffert för att nå märkningsvolymen (komplett borttagande av supernatanten). Se det applikationsspecifika avsnittet för vilka alternativ som finns och fortsatt i enlighet därmed.

VIKTIGT

- *Använd plasmaextraktorn, bibehåll konstant kontroll av extraktorns frikopplings-handtag och säkerställ att den låsande peangen bredvid Cell Preparation Bag är öppen innan du börjar överföringen. Släpp frikopplingshandtaget långsamt.*
- *Var försiktig så att du inte förlorar några celler under borttagandet.*

Skraddarsytt borttagande av supernatant

Beräkna vikten på den supernatant som ska tas bort och justera provet till märkningsvolymen med hjälp av följande ekvation:

$$\text{Vikt på supernatant som ska tas bort (g)} = \text{Vikt på cellprodukt efter tvätt (g)} - \text{Märkningsvolym (g)}$$

Registrera vikten på den supernatant som ska tas bort.

1. Placera den tomma uppsamlingspåsen för plasma eller uppsamlingspåsen för tvätt nr 1 på vågen och tarera vågen.
2. Öppna den låsande peangen bredvid Cell Preparation Bag. Kontrollera skalan på vågen visuellt och ta bort supernatanten med plasmaextraktorn. Tryck försiktigt ut överskott av supernatant tills den beräknade "vikten på supernatant som ska tas bort" nås.
3. När lämplig vikt på supernatanten har tagits bort, stäng den låsande peangen bredvid Cell Preparation Bag för att avbryta vätskeflödet. Registrera vikten på den supernatant som tagits bort.

4. Använd värmeförseglaren, försegla slangen och lämna minst 15 cm av slangen på Cell Preparation Bag för ytterligare anslutningar. Koppla bort Plasma Waste Bag eller Wash Waste Bag nr 1.
 5. Resuspendera cellerna i Cell Preparation Bag försiktigt. Undvik intensiv blandning av cellerna. Säkerställ att alla celler är resuspenderade.
 6. Tarera vågen och väg den fyllda Cell Preparation Bag. Registrera vikten.
 7. Fastställ vikten på cellprodukten efter volymkontroll genom att dra vikten på den tomma Cell Preparation Bag från vikten på den fyllda Cell Preparation Bag. Registrera den beräknade vikten.
- $$\begin{array}{rcccl} \text{Vikt på cellprodukt} & & \text{Vikt på fylld Cell} & & \text{Vikt på tom Cell} \\ \text{efter volymkontroll (g)} & = & \text{Preparation} & - & \text{Preparation} \\ & & \text{Bag (g)} & & \text{Bag (g)} \end{array}$$
8. Spara uppsamlingspåsen för plasma eller uppsamlingspåsen för tvätt till den slutliga separationen och den slutliga analysen av alla celler är avslutad.

Komplett borttagande av supernatant

Ta bort supernatanten helt och var försiktig så att du inte resuspenderar cellpelletten när du tar bort supernatanten. När supernatanten har tagits bort, stäng den låsande peangen bredvid Cell Preparation Bag för att avbryta vätskeflödet. Använd värmeförseglaren, försegla slangen och lämna minst 15 cm av slangen på Cell Preparation Bag för ytterligare anslutningar. Koppla bort Plasma Waste Bag. Resuspendera pelleten försiktigt.

Justera vikten på Cell Preparation Bag genom att tillsätta buffert. Beräkna målvikten på Cell Preparation Bag (CPB) fylld med spädd cellprodukt med hjälp av följande ekvation:

$$\begin{array}{rcccl} \text{Målvikt på CPB fylld med} & & \text{Märkningsvolym (g)} & + & \text{Vikt på tom} \\ \text{tvättad cellprodukt (g)} & = & & & \text{CPB (g)} \end{array}$$

1. Sätt in spiken på ett transferset för plasma i en port på en buffertpåse. Kontrollera att klämman på transferset för plasma är i stängt läge.
2. Använd den sterila slanganslutningen och anslut buffertpåsen till Cell Preparation Bag. Häng buffertpåsen på en påhängare.
3. Tarera vågen. Placera Cell Preparation Bag med cellpelletten på vågen.
4. Öppna den låsande peangen bredvid Cell Preparation Bag. Skjut klämman på transferset för plasma till öppet läge. Fyll Cell Preparation Bag med buffert tills beräknad "Målvikt för Cell Preparation Bag fylld med tvättad cellprodukt" nås. Skjut klämman på transferset för plasma till stängt läge för att avbryta vätskeflödet. Stäng den låsande peangen bredvid Cell Preparation Bag.
5. Använd värmeförseglaren, försegla slangen och lämna minst 15 cm av slangen på Cell Preparation Bag för ytterligare anslutningar. Koppla bort buffertpåsen.
6. Resuspendera cellerna i Cell Preparation Bag försiktigt. Undvik intensiv blandning av cellerna. Säkerställ att alla celler är resuspenderade.
7. Tarera vågen och väg den fyllda Cell Preparation Bag. Registrera vikten.

8. Fastställ vikten på cellprodukten efter volymkontroll genom att dra vikten på den tomma Cell Preparation Bag från vikten på den fyllda Cell Preparation Bag. Registrera den beräknade vikten.

$$\begin{array}{rcl} \text{Vikt på cellprodukt} & & \text{Vikt på fylld Cell} \\ \text{efter volymkontroll (g)} & = & \text{Preparation} \\ & & \text{Bag (g)} \end{array} \quad - \quad \begin{array}{r} \text{Vikt på tom Cell} \\ \text{Preparation} \\ \text{Bag (g)} \end{array}$$

9. Spara uppsamlingspåsen för plasma tills separationen och den slutliga analysen av alla celler är avslutad.

Märkning av celler (endast för CliniMACS Plus Anti-Biotin-systemet och CliniMACS Plus TCRα/β-Biotin-systemet)

Inkubation med CliniMACS TCRα/β-biotin

Flaskan med CliniMACS TCRα/β-biotin är bruksfärdig och räcker till den applikation som beskrivs nedan. Konjugatet är inte avsett för parental administrering.

Förvara konjugatet vid +2 °C till +8 °C (+36 °F till +46 °F). Får INTE frysas. Konjugatet måste användas kallt direkt från kylskåpet. Värm INTE upp det före användning. Konjugatets lotnummer och utgångsdatum är tryckta på flaskans etikett. Använd INTE konjugatet efter utgångsdatum.

1. Registrera lotnummer och utgångsdatum för CliniMACS TCRα/β-biotin.
2. Desinficera septumet på provtagningskopplingen. Använd en lämplig steril spruta och nål för att dra upp hela volymen från en flaska (7,5 mL). En 10 mL spruta räcker för att dra upp innehållet i en flaska. Sprutan ska vara utrustad med en nål i storleken 20 gauge.
3. Använd injektionsporten på provtagningskopplingen och injicera hela volymen av konjugatet i Cell Preparation Bag (alternativt överför innehållet i Cell Preparation Bag till en ny transferpåse för att säkerställa hög depletionseffekt). Starta omedelbart inkubationstiden på 30 minuter.
4. Håll Cell Preparation Bag med båda händerna och blanda innehållet noggrant med en varsam roterande rörelse. Registrera starttiden för inkubationen.
5. Placera Cell Preparation Bag plant på en orbital rotator, ställ in en hastighet på cirka 25 rpm och säkerställ att påsen inte är skrynklig eller böjd. Inkubera påsen under totalt 30 minuter vid kontrollerad rumstemperatur (+19 °C till +25 °C [+66 °F till +77 °F]). Registrera stopptiden för inkubationen.

Inkubation den primära antikroppen (biotinylerad antikropp från annan tillverkare)

1. Resuspendera cellpelleten och märk cellerna med primär biotinylerad antikropp vid den tid och titer som rekommenderas av tillverkaren av antikroppen. Säkerställ att alla celler är resuspenderade. (Den primära antikroppen ska användas vid dess optimala titer, dvs. optimal färgningsintensitet och utan bakgrundsfärgning. Följ bruksanvisningen från tillverkaren av den primära antikroppen.)
2. Inkubera Cell Preparation Bag på en orbital skakare vid 25 rpm. Följ bruksanvisningen från tillverkaren av den primära antikroppen.

Ta bort överskott av konjugat (1:a tvätt) (endast för CliniMACS Plus Anti-Biotin-systemet och CliniMACS Plus TCRα/β-Biotin-systemet)

Späd cellprodukten med buffert till en total vikt på 600 g. Beräkna vikten på buffert som ska tillsättas med följande ekvation och registrera den.

$$\text{Vikt på buffert som ska tillsättas (g)} = 600 \text{ g} - \text{Vikt på märkt cellprodukt (g)}$$

1. Späd cellprodukten genom att följa de steg som beskrivs i "Spädning av cellulär startprodukt" (steg 1–8) till en total vikt på 600 g.
2. Fastställ vikten på cellprodukten efter borttagande av överskott av konjugat (1:a tvätt) genom att dra vikten på den tomma Cell Preparation Bag från vikten på den fyllda Cell Preparation Bag. Registrera den beräknade vikten.

$$\text{Vikt på cellprodukt efter borttagande av överskott av konjugat (1:a tvätt) (g)} = \text{Vikt på fylld Cell Preparation Bag (g)} - \text{Vikt på tom Cell Preparation Bag (g)}$$

3. Använd den sterila slanganslutningen och anslut den tomma uppsamlingspåsen för tvätt till Cell Preparation Bag.
4. Vik alla lösa delar på Cell Preparation Bag eller slangarna nedåt. Placera de två påsarna på ett säkert sätt i centrifugbehållaren.
5. Balansera den laddade behållaren med en lämplig vägd behållare. Det är viktigt att centrifugen är korrekt balanserad.
6. Centrifugera cellerna enligt de förhållanden som definierats i det applikationsspecifika avsnittet.
7. Ta ut påsarna ur centrifugen och var försiktig så att inte cellpelleten resuspenderas. Ladda Cell Preparation Bag på plasmaextraktorn och den anslutna uppsamlingspåsen på bordsvågen.
8. Se det applikationsspecifika avsnittet för information om det antal tvättar som krävs.
9. Justera vikten på cellsuspensionen enligt beskrivningen i avsnittet "Volymkontroll" till cirka 190 g för magnetisk märkning av celler med CliniMACS Anti-Biotin Reagent.

Inkubation med kliniskt immunglobulin (endast för CliniMACS Plus CD3 eller CD3/CD19-systemet)

VIKTIGT

Observera att humant IgG inte är en komponent i CliniMACS-systemet. Använd endast farmaceutiskt humant IgG som är godkänt i ditt land. Läs noga igenom bipacksedeln till den humana IgG som används, framför allt avsnittet avseende överkänslighetsreaktioner och risken för infektion som humant IgG som en blodprodukt medför för alla patienter. Alla risker som uppkommer av dessa material måste utvärderas av användaren.

Desinficera septumet på provtagningskopplingen på Cell Preparation Bag. Använd en lämplig steril spruta och nål för att tillsätta 1,5 mg humant IgG per mL cellprodukt (t.ex. 1,6 mL Gamunex 10% för 95 mL cellprodukt). Blanda innehållet noggrant. Inkubera under 5 minuter vid kontrollerad rumstemperatur och en varsam roterande rörelse (t.ex. 25 rpm på orbital rotator).

Magnetisk märkning av celler: inkubation med CliniMACS-reagens

Flaskorna med CliniMACS-reagens är bruksfärdiga och räcker till den applikation som beskrivs nedan. Reagenserna är inte avsedda för parental administrering.

Förvara reagenserna vid +2 °C till +8 °C (+36 °F till +46 °F). Får INTE frysas. Reagenserna måste användas kallt direkt från kylskåpet. Värm INTE upp det före användning. Reagensernas lotnummer och utgångsdatum är tryckta på flaskans etikett. Använd INTE reagenserna efter utgångsdatum.

1. Registrera lotnummer och utgångsdatum för CliniMACS-reagens(er).
2. Desinficera septumet på provtagningskopplingen. Använd en lämplig steril spruta och nål för att dra upp hela volymen från a) en flaska eller b) två reagensflaskor (7,5 mL vardera). En 10 mL spruta räcker för att dra upp hela innehållet i en flaska och en 20 mL spruta räcker för att dra upp innehållet från två reagensflaskor. Sprutan ska vara utrustad med en nål i storleken 20 gauge.
3. Använd injektionsporten på provtagningskopplingen och injicera hela volymen av reagenset i Cell Preparation Bag (alternativt överför innehållet i Cell Preparation Bag vid depletionsapplikationer till en ny transferpåse för att säkerställa hög depletionseffekt). Inkubationstiden startar vid denna tidpunkt.
4. Håll Cell Preparation Bag med båda händerna och blanda innehållet noggrant med en varsam roterande rörelse.
5. Placera Cell Preparation Bag plant på en orbital rotator, ställ in en hastighet på cirka 25 rpm och säkerställ att påsen inte är skrynklig eller böjd. Inkubera påsen under de förhållanden och den tid som anges i det applikationsspecifika avsnittet.

Borttagande av överskott av reagens

Tvätt av cellerna krävs för att ta bort obundet reagens efter avslutad inkubation. Se det applikationsspecifika avsnittet för information om det antal tvättar som krävs.

1. Sätt in spiken på ett transferset för plasma i en port på en buffertpåse som innehåller minst 500 mL buffert. Kontrollera att klämman på transferset för plasma är i stängt läge.
2. Använd den sterila slanganslutningen och anslut buffertpåsen till Cell Preparation Bag. Häng buffertpåsen på en påhängare.
3. Placera Cell Preparation Bag på vågen och tarera vågen.
4. Öppna den låsande peangen bredvid Cell Preparation Bag. Skjut klämman på transferset för plasma till öppet läge. Fyll Cell Preparation Bag med buffert till 600 mL. Skjut klämman på transferset för plasma till stängt läge för att avbryta vätskeflödet. Stäng den låsande peangen bredvid Cell Preparation Bag. Registrera vikten på den fyllda Cell Preparation Bag.
5. Försegla slangen mellan de båda klämmorna och lämna minst 15 cm av slangen på Cell Preparation Bag för ytterligare anslutningar. Koppla bort buffertpåsen.
6. Håll Cell Preparation Bag med båda händerna och blanda innehållet noggrant med en varsam roterande rörelse.
7. Använd den sterila slanganslutningen och anslut den tomma uppsamlingspåsen för tvätt till Cell Preparation Bag.
8. Vik alla lösa delar på påsarna eller slangarna nedåt. Överför Cell Preparation Bag och Wash Waste Bag på ett säkert sätt till centrifugeringsbehållaren.
9. Centrifugera cellerna under de förhållanden och den tid som anges i det applikationsspecifika avsnittet.
10. Var försiktig så att inte cellpelleten rubbas och ta bort påsarna från centrifugen.
11. Häng försiktigt upp Cell Preparation Bag på plasmaextraktorn.
12. Placera Wash Waste Bag på vågen och tarera vågen.
13. Öppna den låsande peangen bredvid Cell Preparation Bag. Använd plasmaextraktorn och ta bort så mycket supernatant som möjligt från Cell Preparation Bag. Stäng den låsande peangen bredvid Cell Preparation Bag för att avbryta vätskeflödet.
14. Använd värmeförseglaren, försegla slangen och lämna minst 15 cm av slangen på Cell Preparation Bag för ytterligare anslutningar. Koppla bort Wash Waste Bag
15. Spara uppsamlingspåsen för tvätt tills separationen och den slutliga analysen av alla celler är avslutad.
16. Resuspendera cellpelleten i Cell Preparation Bag. Undvik intensiv blandning av cellerna. Säkerställ att alla celler är resuspenderade.

17. Om fler tvättar krävs (t.ex. för anrikning av CD34-positiva celler), upprepa steg 1–16.
18. Tarera vågen och väg den fyllda Cell Preparation Bag. Registrera vikten.
19. Fastställ vikten på cellprodukten efter tvätt genom att dra vikten på den tomma Cell Preparation Bag från vikten på den fyllda Cell Preparation Bag. Registrera den beräknade vikten.

$$\begin{array}{lcl} \text{Vikt på cellprodukt} & & \text{Vikt på fylld Cell} \\ \text{efter tvätt (g)} & = & \text{Preparation Bag (g)} \\ & & - \text{Vikt på tom Cell} \\ & & \text{Preparation Bag (g)} \end{array}$$

20. Justera provladdningsvolym: Beräkna vikten på den buffert som krävs för att justera vikten på cellsuspensionen till lämplig provladdningsvolym enligt applikationen med hjälp av följande ekvation. För laddning av märkta och tvättade celler i slangsetet rekommenderas en maximal cellkoncentration på $0,4 \times 10^9$ celler per mL.

$$\begin{array}{lcl} \text{Vikt på buffert} & & \text{Provladdningsvolym} \\ \text{som ska} & = & \text{(enligt applikation)} \\ \text{tillsättas (g)} & & - \text{Vikt på cellprodukt} \\ & & \text{efter tvätt (g)} \end{array}$$

21. Använd den sterila slanganslutningen och anslut buffertpåsen till Cell Preparation Bag. Häng buffertpåsen på en påhängare.
22. Placera Cell Preparation Bag på vågen och tarera vågen.
23. Öppna den låsande peangen bredvid Cell Preparation Bag. Skjut klämman på transferset för plasma till öppet läge. Kontrollera skalan på vågen visuellt och överför den beräknade vikten på bufferten till Cell Preparation Bag.
24. När lämplig buffertvikt har överförts, skjut klämman på transferset för plasma till stängt läge för att avbryta vätskeflödet. Stäng den låsande peangen bredvid Cell Preparation Bag.
25. Använd värmeförseglaren och försegla slangen mellan de båda klämmorna. Koppla bort buffertpåsen.
26. Resuspendera cellpelleten i Cell Preparation Bag. Undvik intensiv blandning av cellerna. Säkerställ att alla celler är resuspenderade.
27. Desinficera septumet på provtagningskopplingen. Sätt in en nål med en lämplig spruta i provtagningskopplingen på Cell Preparation Bag och ta ut en volym på 0,5 mL märkt produkt. Överför provet till ett provrör. Märk röret med ORIGINAL (detta ska inkludera patient-ID) och spara det för analys.
28. Tarera vågen och väg den fyllda Cell Preparation Bag. Registrera vikten.
29. Fastställ vikten på cellprodukten efter tillsats av buffert (provladdningsvolym) genom att dra vikten på den tomma Cell Preparation Bag från vikten på den fyllda Cell Preparation Bag. Registrera den beräknade vikten.

$$\begin{array}{lcl} \text{Vikt på cellprodukt efter} & & \text{Vikt på fylld Cell} \\ \text{tillsats av buffert (g)} & = & \text{Preparation Bag (g)} \\ & & - \text{Vikt på tom Cell} \\ & & \text{Preparation Bag (g)} \end{array}$$

► Gå till STEG 2

Anslut INTE Cell Preparation Bag till slangsetet förrän du får information om att göra det på instrumentets display.

7.2 STEG 2: Val av separationsprogram

7.2.1 Slå på CliniMACS Plus Instrument

Slå på CliniMACS Plus Instrument med ON/OFF-knappen på instrumentets bakpanel. Registrera starttiden för instrumentkörningen.

I fönstret visas huvudskärmen i avsnittet "Installation" i användarhandboken för CliniMACS Plus Instrument.

Om du vill fortsätta till programmenyn, tryck på ENT.

7.2.2 CD34 SELECTION 1/2

VIKTIGT

- *CD34 SELECTION 1 får endast användas i kombination med CliniMACS Tubing Set (REF 161-01), medan CD34 SELECTION 2 endast får användas i kombination med CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01). Kontrollera slanginställningen noggrant före installation.*
- *Uppmaningar och diagram på skärmen som fungerar som procedurguider kommer att visas i visningsfönstret. Utför och kontrollera varje steg enligt användarhandboken innan du går vidare till nästa steg. Om du vill korrigera ett misstag under datainmatningen tryck på knappen "Undo" (ångra) (se avsnittet "Beskrivning" i användarhandboken för CliniMACS Plus Instrument).*

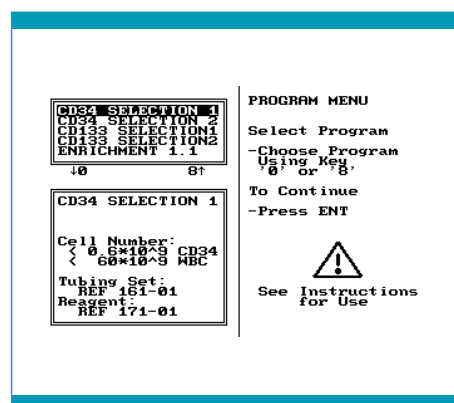
Val av separationsprogram CD34 SELECTION 1/2

I fönstret indikeras Skärm 7.1.

Beroende på applikation väljer du CD34 SELECTION 1 eller CD34 SELECTION 2.

Välj separationsprogram genom att markera programmets namn med den svarta fältet. Flytta fältet upp och ned med knapparna 0 och 8.

Om du vill fortsätta med det markerade programmet, tryck på ENT.



Skärm 7.1: Val av separationsprogram

Bekräftelse

I fönstret indikeras Skärm 7.2.

Om du vill bekräfta separationsprogrammet och fortsätta, tryck på **ENT**.

Om inte, tryck på **◀** för att återgå till föregående steg för att ändra valet.

Materialkontroll

I fönstret indikeras Skärm 7.3.

CD34 SELECTION 1 och CD34 SELECTION 2 är optimerade för anrikning av CD34-positiva celler.

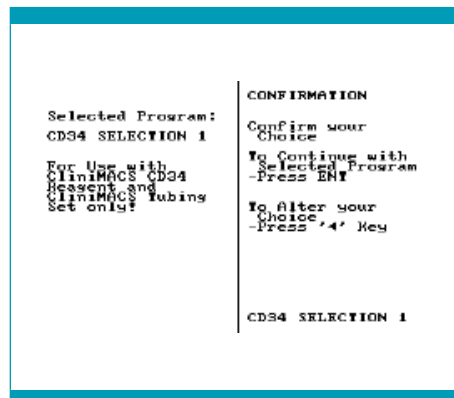
För att bekräfta att lämpligt slangset är tillgängligt och att rätt reagens har använts för cellmärkning, ange respektive katalognummer (REF) i frågerutan. Instrumentets programvara kontrollerar om materialen kan användas i kombination med det valda programmet.

1. Ange katalognummer för det slangset som ska användas för automatiserad cellseparation. Om du vill bekräfta och fortsätta, tryck på **ENT**.
2. Ange katalognummer för det reagens som har använts för cellmärkning. Om du vill bekräfta och fortsätta, tryck på **ENT**.

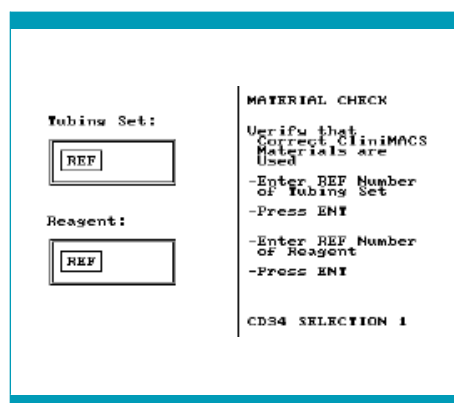
Om katalognumret för ett slangset eller ett reagens som inte har specificerats för det valda separationsprogrammet har angetts visas ett meddelande. Tryck på **ENT** för att bekräfta och ange korrekt katalognummer. Om det nummer som anges fortfarande är felaktigt kommer meddelandet att visas en andra gång. Efter att du har tryckt på **ENT** återgår programmet till programmenyn (se Skärm 7.1).

VIKTIGT

- *CD34 SELECTION 1 får endast användas i kombination med CliniMACS Tubing Set (REF 161-01), medan CD34 SELECTION 2 endast får användas i kombination med CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01). Kontrollera slanginställningen noggrant före installation.*
- *Om du vill korrigera ett misstag under datainmatningen, tryck på knappen "Undo" (ångra) (se avsnittet "Beskrivning" i användarhandboken för CliniMACS Plus Instrument).*



Skärm 7.2: Bekräftelse



Skärm 7.3: Materialkontroll

Om materialkontrollen lyckades fortsätter programmet automatiskt med anvisningarna för att installera slangsetet.

► **Gå till STEG 3**

7.2.3 ENRICHMENT 1.1

VIKTIGT

- Separationsprogrammet *ENRICHMENT 1.1* får endast användas med *CliniMACS Tubing Set (REF 161-01)*.
- Uppmaningar och diagram på skärmen som fungerar som procedurguider kommer att visas i visningsfönstret. Utför och kontrollera varje steg enligt användarhandboken innan du går vidare till nästa steg. Om du vill korrigera ett misstag under datainmatningen, tryck på knappen "Undo" (ångra) (se avsnittet "Beskrivning" i användarhandboken för *CliniMACS Plus Instrument*).

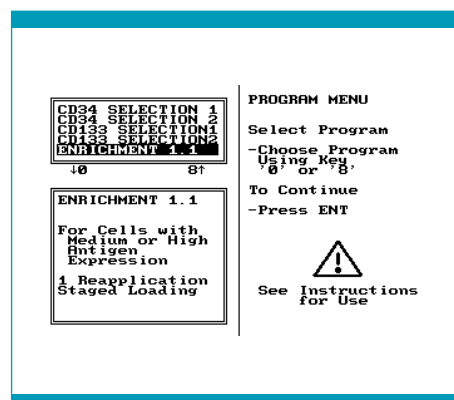
Val av separationsprogram ENRICHMENT 1.1

I fönstret indikeras Skärm 7.4.

Välj ENRICHMENT 1.1.

Välj separationsprogram genom att markera programmets namn med den svarta fältet. Flytta fältet upp och ned med knapparna 0 och 8.

Om du vill fortsätta med det markerade programmet, tryck på ENT.



Skärm 7.4: Val av separationsprogram

Val av slangset

I fönstret indikeras Skärm 7.5.

Bekräfta att korrekt program har valts. Om inte, tryck på ◀ för att återgå till föregående steg för att ändra valet.

Välj slangset genom att markera det i rutan högst upp till vänster med det svarta fältet. Flytta fältet upp och ned med knapparna 0 och 8.

Fönstret under indikerar relevanta data som kapacitet och katalognummer för det valda slangsetet.

Om du vill fortsätta med den valda kombinationen av separationsprogram och slangset, tryck på ENT.

Bekräftelse

I fönstret indikeras Skärm 7.6.

Om du vill bekräfta kombinationen av separationsprogram och slangset och fortsätta, tryck på ENT.

Om inte, tryck på ◀ för att återgå till föregående steg för att ändra valet.

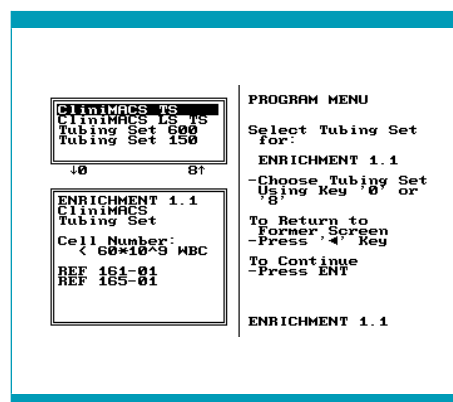
Materialkontroll

I fönstret indikeras Skärm 7.7.

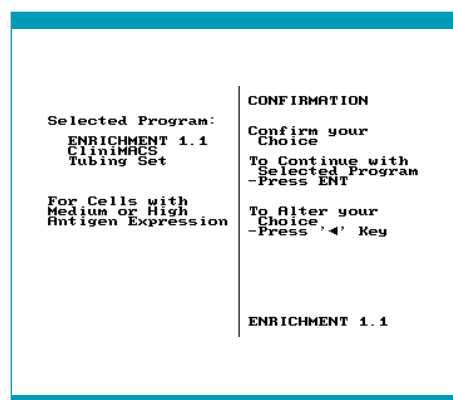
Frågan om katalognummer (REF) för slangsetet fungerar som en säkerhetskontroll för att säkerställa att det valda slangsetet kan användas med det valda programmet.

Ange katalognummer för det valda slangsetet och tryck ENT för att fortsätta.

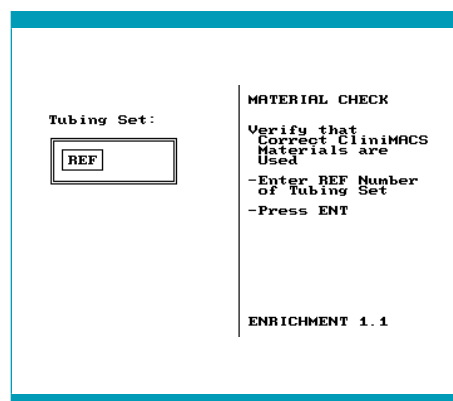
Om ett katalognummer som inte finns har angetts visas ett meddelande. Bekräfta genom att trycka på ENT och ange korrekt katalognummer. Om det angivna numret fortfarande är felaktigt visas meddelandet en andra gång. Efter att du har tryckt på ENT återgår programmet till programmenyn (se Skärm 7.4).



Skärm 7.5: Val av slangset



Skärm 7.6: Bekräftelse



Skärm 7.7: Materialkontroll

Inmatning av provparameter

Om materialkontrollen lyckades fortsätter programmet automatiskt att efterfråga de provparametrar som är nödvändiga för att justera separationen för varje individuellt prov och med att ge operatören viktig information om den buffert och de påsvolymer som krävs.

I fönstret indikeras Skärm 7.8.

1. Börja med att ange provets WBC-koncentration. Det tillåtna intervallet visas i rutan längst ned till vänster. Tryck på ◀ för att korrigera en felaktig inmatning.

Bekräfta att det värde som angetts speglar provets värde. I annat fall kanske inte provbearbetningen blir optimal. Om du vill fortsätta med nästa inmatning, tryck på ENT.

Skärm 7.8: Inmatning av provparameter

VIKTIGT

Alla provparametrar som krävs avser provet efter cellmärkning och tvättprocedur. Det tillåtna intervallet som visas i rutan längst ned till vänster tar alltid hänsyn till föregående inmatning. Efter varje inmatning beräknar och justerar programmet det accepterade området för nästa fråga.

⚠ FÖRSIKTIGHET

Om felaktiga parametrar anges kan det leda till icke-optimal provbearbetning och öka risken för förlust av målceller. Om du anger värden för WBC-koncentration och/eller procentandel märkta celler som är lägre än det faktiska provvärdet kan det leda till cellförlust på grund av att systemet är överbelastat. Om du anger en lägre provvolym kan det leda till cellförlust på grund av överbelastning eller till och med ofullständig provbearbetning. Om specifikationen för någon av dessa parametrar är för hög kommer detta att leda till en ökad bearbetningstid och större volym på mållcellsfraktionen. Säkerställ alltid att du anger rätt parametrar.

2. Ange procentandel märkta celler. Bekräfta att det värde som angetts speglar provets värde. I annat fall kanske inte provbearbetningen blir optimal (se "Viktigt"). Om du vill fortsätta med nästa inmatning, tryck på ENT.
3. Ange cellprovets slutliga volym. Bekräfta att det värde som angetts speglar provets värde. I annat fall kanske inte provbearbetningen blir optimal (se "Viktigt").

Om du vill fortsätta, tryck på ENT.

Beräkning

CliniMACS Plus programvara beräknar det totala antalet märkta celler för att kontrollera om separationskapaciteten är tillräcklig.

Resultatet visas på en av två möjliga skärmar:

- Resultatet av beräkningen visas på en skärm som liknar Skärm 7.9. Säkerställ att det beräknade antalet märkta celler är korrekt.

Om du vill fortsätta, tryck på **ENT**.

Det går inte att korrigera data. Tryck på ◀ för att återgå till den föregående skärmen för korrigering.

- Om det beräknade antalet märkta celler överskrider separationskapaciteten i CliniMACS Plus-systemet visas en skärm som liknar Skärm 7.10. Säkerställ att korrekta provparametrar har angetts och att det beräknade antalet celler är korrekt. Tryck på ◀ för att återgå till den tidigare Skärm 7.8 och korrigera provparametrarna.

Om du vill förhindra överbelastning av systemet, dela provet och fastställ volymen för varje del. Tryck på ◀ för att återgå till föregående Skärm 7.8. Ange provparametrarna för den första alikvoten av provet och fortsätt med separationen av denna del. Efter att separationen är avslutad, starta en andra separation med den andra alikvoten med ett nytt slangset.

Om du vill fortsätta, tryck på **ENT**.

Skärm 7.9: Beräkning

Skärm 7.10: Beräkning: Cellantalet överskrider separationskapacitet

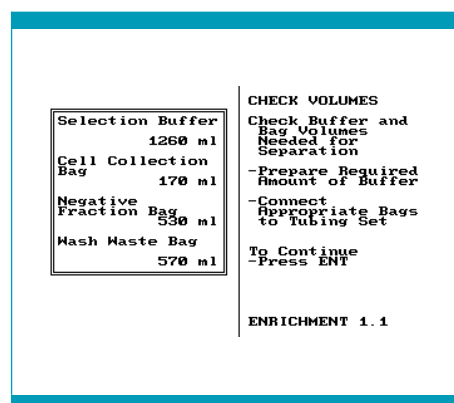
Volyminformation

Från det totala antalet märkta celler (se avsnitt "Beräkning") beräknar programvaran antalet separationsstadier, den mängd buffert som krävs för hela separationen och den vätskevolym som kommer att samlas in i Negative Fraction Bag, uppsamlingspåsen för buffert och Cell Collection Bag.

Följande är standardvärden:

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

Om ett av de beräknade värdena överstiger dessa standardvärden visas Skärm 7.11 för att informera om den mängd vätska som kommer att krävas och ackumuleras under separationsprocessen. Byt ut påsarna som levererades med slangsetet (kapacitet cirka 500 mL) mot alternativa påsar med lämplig storlek, om byte är nödvändigt. De påsar som ursprungligen är anslutna till slangsetet är anslutna med luer-anslutningar. Påsar som ersätter originalpåsarna ska ha luer-anslutning av hontyp. Standardpåsar kan anslutas med en Luer/Spike Interconnector.



Skärm 7.11: Kontrollera volymer

1. Bekräfta att den mängd buffert som krävs är tillgänglig. Anslut inte mer än tre liter buffert på en påshängare.

OBS

Risk för skada på instrumentet. Överbelastning av påshängarna kan skada instrumentet. Bärkapaciteten hos en enskild påshängare är 3 kg. Överbelasta inte påshängarna.

2. Öppna brickan med slangsetet under sterila förhållanden och byt vid behov ut originalpåsarna mot större påsar. Säkerställ obehindrat flöde till dessa påsar.
3. Anslut en Cell Collection Bag i tillräcklig storlek till den lediga luer-anslutningen. Om det inte anges på Skärm 7.11 är den maximala elueringsvolymen för målcellsfraktionen 150 mL. Säkerställ att obehindrat flöde till Cell Collection Bag är möjligt.

VIKTIGT

- Säkerställ att den mängd buffert som krävs är tillgänglig och att volymen för de påsar som anges på Skärm 7.11 är tillräcklig. I annat fall kan separationens prestanda försämrats.
 - Alla modifieringar av CliniMACS-slangset ska utföras under sterila förhållanden, t.ex. i laminärt flödesskåp.
 - Observera för ytterligare analys eller cellbearbetning att de volymer som anges på Skärm 7.11 inte är exakta volymer utan volymer inom säkerhetskraven.
4. Kontrollera kolonnernas luer-lock-anslutningar. Luer-lock måste var ordentligt åtdragna.

Om du vill fortsätta, tryck på ENT.

Programmet fortsätter automatiskt med anvisningarna för att installera slangsetet på instrumentet.

► Gå till STEG 3

7.2.4 ENRICHMENT 3.2

VIKTIGT

- Separationsprogrammet ENRICHMENT 3.2 får endast användas med CliniMACS Tubing Set (REF 161-01).
- Uppmaningar och diagram på skärmen som fungerar som procedurguider kommer att visas i visningsfönstret. Utför och kontrollera varje steg enligt användarhandboken innan du går vidare till nästa steg. Om du vill korrigera ett misstag under datainmatningen, tryck på knappen "Undo" (ångra) (se avsnittet "Beskrivning" i användarhandboken för CliniMACS Plus Instrument).

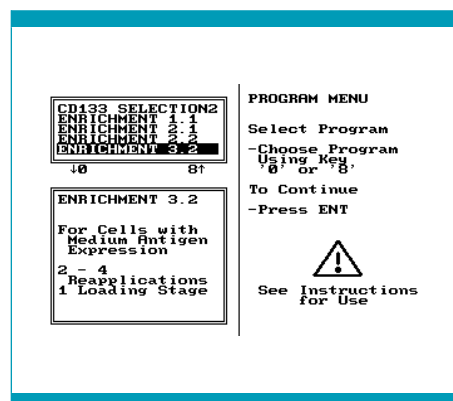
Val av separationsprogram ENRICHMENT 3.2

I fönstret indikeras Skärm 7.12.

Välj ENRICHMENT 3.2.

Välj separationsprogram genom att markera programmets namn med den svarta fältet. Flytta fältet upp och ned med knapparna 0 och 8.

Om du vill fortsätta med det markerade programmet, tryck på ENT.



Skärm 7.12: Val av separationsprogram

Val av slangset

I fönstret indikeras Skärm 7.13.

Bekräfta att rätt program har valts. Om inte, tryck på ◀ för att återgå till föregående steg för att ändra valet.

Välj slangset genom att markera det i rutan högst upp till vänster med det svarta fältet. Flytta fältet upp och ned med knapparna 0 och 8.

Fönstret under indikerar relevanta data som kapacitet och katalognummer för det valda slangsetet.

Om du vill fortsätta med den valda kombinationen av separationsprogram och slangset, tryck på ENT.

Bekräftelse

I fönstret indikeras Skärm 7.14.

Om du vill bekräfta kombinationen av separationsprogram och slangset och fortsätta, tryck på ENT.

Om inte, tryck på ◀ för att återgå till föregående steg för att ändra valet.

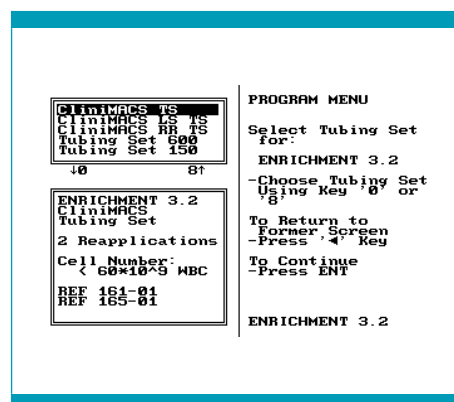
Materialkontroll

I fönstret indikeras Skärm 7.15.

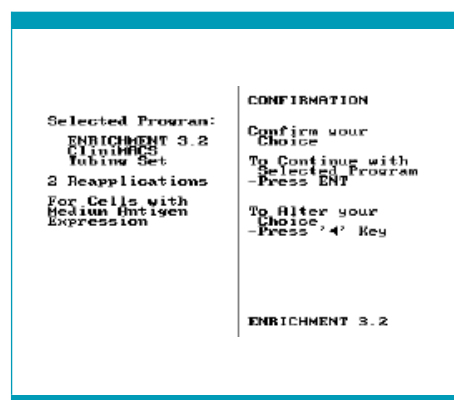
Frågan om katalognummer (REF) för slangsetet fungerar som en säkerhetskontroll för att säkerställa att det valda slangsetet kan användas med det valda programmet.

Ange katalognummer för det valda slangsetet och tryck ENT för att fortsätta.

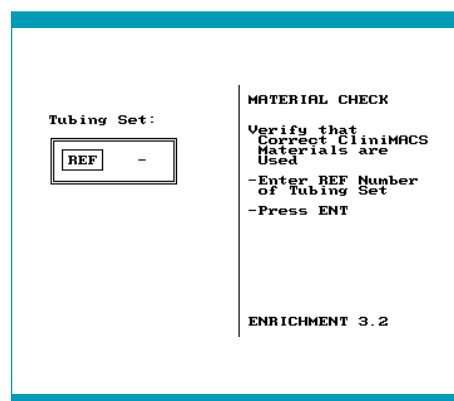
Om ett katalognummer som inte finns har angetts visas ett meddelande.



Skärm 7.13: Val av slangset



Skärm 7.14: Bekräftelse



Skärm 7.15: Materialkontroll

Bekräfta genom att trycka på **ENT** och ange korrekt katalognummer. Om det angivna numret fortfarande är felaktigt visas meddelandet en andra gång. Efter att du har tryckt på **ENT** återgår programmet till programmenyn (se Skärm 7.12).

Om materialkontrollen lyckades fortsätter programmet automatiskt med anvisningarna för att installera slangsetet.

► Gå till STEG 3

7.2.5 DEPLETION 2.1

VIKTIGT

- Separationsprogrammet *DEPLETION 2.1* får bara användas med *CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01)*.
- Uppmaningar och diagram på skärmen som fungerar som procedurguider kommer att visas i visningsfönstret. Utför och kontrollera varje steg enligt användarhandboken innan du går vidare till nästa steg. Om du vill korrigera ett misstag under datainmatningen, tryck på knappen "Undo" (ångra) (se avsnittet "Beskrivning" i användarhandboken för *CliniMACS Plus Instrument*).

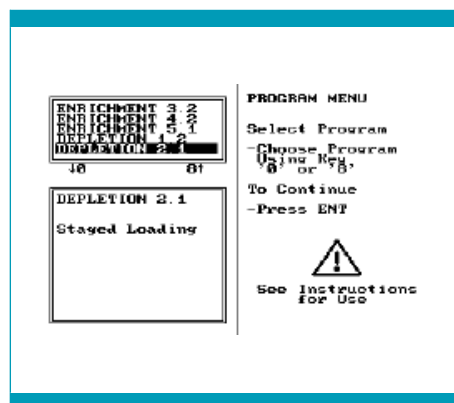
Val av separationsprogram DEPLETION 2.1

I fönstret indikeras Skärm 7.16.

Välj DEPLETION 2.1.

Välj separationsprogram genom att markera programmets namn med den svarta fältet. Flytta fältet upp och ned med knapparna 0 och 8.

Om du vill fortsätta med det markerade programmet, tryck på **ENT**.



Skärm 7.16: Val av separationsprogram

Val av slangset

I fönstret indikeras Skärm 7.17.

Bekräfta att korrekt program har valts.

Om inte, tryck på ◀ för att återgå till föregående steg för att ändra valet.

Välj slangset genom att markera det i rutan högst upp till vänster med det svarta fältet. Flytta fältet upp och ned med knapparna 0 och 8.

Fönstret under indikerar relevanta data som kapacitet och katalognummer för det valda slangsetet.

Om du vill fortsätta med den valda kombinationen av separationsprogram och slangset, tryck på ENT.

Bekräftelse

I fönstret indikeras Skärm 7.18.

Om du vill bekräfta kombinationen av separationsprogram och slangset och fortsätta, tryck på ENT.

Om inte, tryck på ◀ för att återgå till föregående steg för att ändra valet.

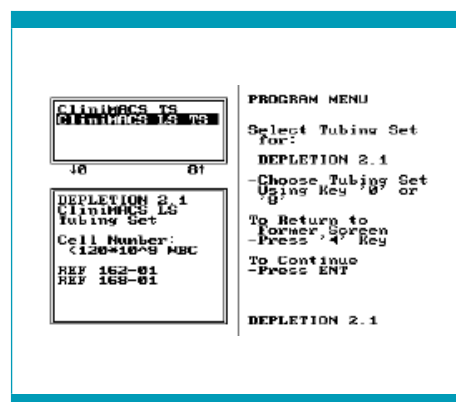
Materialkontroll

I fönstret indikeras Skärm 7.19.

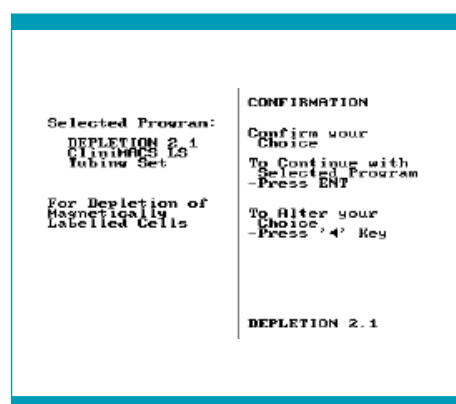
Frågan om katalognummer (REF) för slangsetet fungerar som en säkerhetskontroll för att säkerställa att det slangset operatören har valt kan användas.

Ange katalognummer för det valda slangsetet och tryck ENT för att fortsätta.

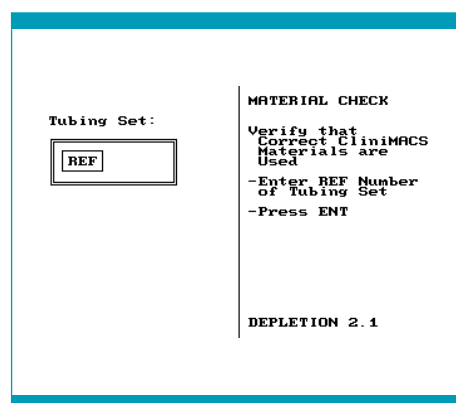
Om ett katalognummer som inte finns har angetts visas ett meddelande.



Skärm 7.17: Val av slangset



Skärm 7.18: Bekräftelse



Skärm 7.19: Materialkontroll

Bekräfta genom att trycka på **ENT** och ange korrekt katalognummer. Om det angivna numret fortfarande är felaktigt visas meddelandet en andra gång. Efter att du har tryckt på **ENT** återgår programmet till programmenyn (se Skärm 7.16).

Inmatning av provparameter

Om materialkontrollen lyckades fortsätter programmet automatiskt att efterfråga de provparametrar som är nödvändiga för att justera separationen för varje individuellt prov och med att ge operatören viktig information om den buffert och de påsvolymer som krävs.

I fönstret indikeras Skärm 7.20.

1. Börja med att ange provets WBC-koncentration. Det tillåtna intervallet visas i rutan längst ned till vänster. Tryck på **◀** för att korrigera en felaktig inmatning.

Bekräfta att det värde som angetts speglar provets värde. I annat fall kanske inte provbearbetningen blir optimal.

VIKTIGT

Alla provparametrar som krävs avser provet efter cellmärkning och tvättprocedur. Det tillåtna intervallet som visas i rutan längst ned till vänster tar alltid hänsyn till föregående inmatning. Efter varje inmatning beräknar och justerar programmet det accepterade området för nästa fråga.

Skärm 7.20: Inmatning av provparameter

⚠ FÖRSIKTIGHET

Om felaktiga parametrar anges kan det leda till icke-optimal provbearbetning och öka risken för förlust av målceller. Om du anger värden för WBC-koncentration och/eller procentandel märkta celler som är lägre än det faktiska provvärdet kan det leda till cellförlust på grund av att systemet är överbelastat. Om du anger en lägre provvolym kan det leda till cellförlust på grund av överbelastning eller till och med ofullständig provbearbetning. Om specifikationen för någon av dessa parametrar är för hög kommer detta att leda till en ökad bearbetningstid och större volym på målcellsfraktionen. Säkerställ alltid att du anger rätt parametrar.

Om du vill fortsätta med nästa inmatning, tryck på **ENT**.

2. Ange procentandel märkta celler. Bekräfta att det värde som angetts speglar provets värde. I annat fall kanske inte provbearbetningen blir optimal (se "Viktigt").

Om du vill fortsätta med nästa inmatning, tryck på **ENT**.

3. Ange cellprovets slutliga volym. Bekräfta att det värde som angetts speglar provets värde. I annat fall kanske inte provbearbetningen blir optimal (se "Viktigt").

Om du vill fortsätta, tryck på **ENT**.

Beräkning

CliniMACS Plus programvara beräknar det totala antalet märkta celler för att kontrollera om separationskapaciteten är tillräcklig.

Resultatet visas på en av två möjliga skärmar:

- Resultatet av beräkningen visas på en skärm som liknar Skärm 7.21. Säkerställ att det beräknade antalet märkta celler är korrekt.

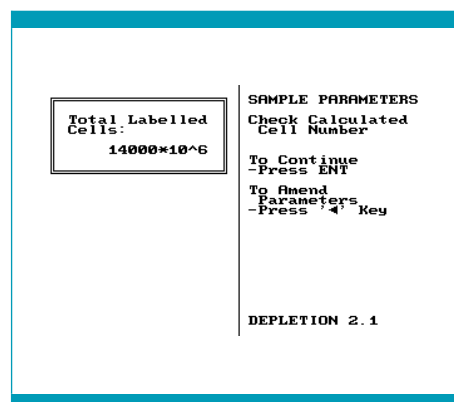
Om du vill fortsätta, tryck på **ENT**.

Det går inte att korrigera data. Tryck på ◀ för att återgå till den föregående skärmen för korrigering.

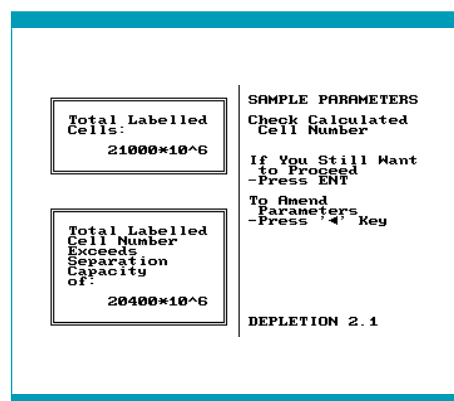
- Om det beräknade antalet märkta celler överskrider separationskapaciteten i CliniMACS Plus-systemet visas en skärm som liknar Skärm 7.22. Säkerställ att korrekta provparametrar har angetts och att det beräknade antalet celler är korrekt. Tryck på ◀ för att åtgå till den tidigare skärmen för att korrigera provparametrarna.

Om du vill förhindra överbelastning av systemet, dela provet och fastställ volymen för varje del. Tryck på ◀ för att återgå till föregående Skärm 7.20. Ange provparametrarna för den första alikvoten av provet och fortsätt med separationen av denna del. Efter att separationen är avslutad, starta en andra separation med den andra alikvoten med ett nytt slangset.

Om du vill fortsätta, tryck på **ENT**.



Skärm 7.21: Beräkning



Skärm 7.22: Beräkning: Cellantalet överskrider separationskapaciteten

Volyminformation

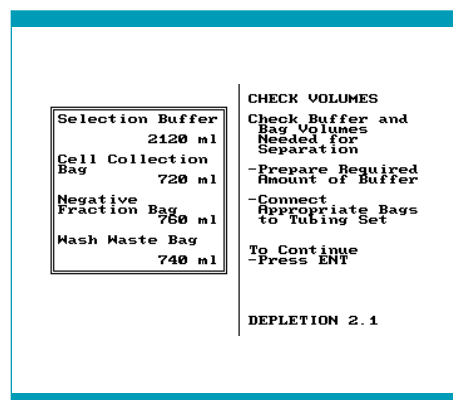
Från det totala antalet märkta celler (se avsnitt "Beräkning") beräknar programvaran antalet separationsstadier, den mängd buffert som krävs för hela separationen och den vätskevolym som kommer att samlas in i Negative Fraction Bag, uppsamlingspåsen för buffert och Cell Collection Bag.

Följande är standardvärden:

- CliniMACS PBS/EDTA Buffer 1 000 mL
- Negative Fraction Bag 500 mL

- Buffer Waste Bag 500 mL
- Cell Collection Bag 150 mL

Om ett av de beräknade värdena överstiger dessa standardvärden visas Skärm 7.23 för att informera om den mängd vätska som kommer att krävas och ackumuleras under separationsprocessen. Byt ut påsarna som levererades med slangsetet (kapacitet cirka 500 mL) mot alternativa påsar med lämplig storlek, om byte är nödvändigt. De påsar som ursprungligen är anslutna till slangsetet är anslutna med luer-anslutningar. Påsar som ersätter originalpåsarna ska ha luer-anslutning av hontyp. Standardpåsar kan anslutas med en Luer/Spike Interconnector.



Skärm 7.23: Kontrollera volymer

1. Bekräfta att den mängd buffert som krävs är tillgänglig. Anslut inte mer än tre liter buffert på en påshängare.

OBS

Risk för skada på instrumentet. Överbelastning av påshängarna kan skada instrumentet. Bärkapaciteten hos en enskild påshängare är 3 kg. Överbelasta inte påshängarna.

2. Öppna brickan med slangsetet under sterila förhållanden och byt vid behov ut originalpåsarna mot större påsar. Säkerställ obehindrat flöde till dessa påsar.
3. Anslut en Cell Collection Bag i tillräcklig storlek till den lediga luer-anslutningen. Om det inte anges på Skärm 7.23 är den maximala elueringsvolymen för målcellsfraktionen 150 mL. Säkerställ att obehindrat flöde till Cell Collection Bag är möjligt.

VIKTIGT

- *Säkerställ att den mängd buffert som krävs är tillgänglig och att volymen för de påsar som anges på Skärm 7.23 är tillräcklig. I annat fall kan separationens prestanda försämrats.*
 - *Alla modifieringar av CliniMACS-slangset ska utföras under sterila förhållanden, t.ex. i laminärt flödesskåp.*
 - *Observera för ytterligare analys eller cellbearbetning att de volymer som anges på Skärm 7.23 inte är exakta volymer utan volymer inom säkerhetskraven.*
4. Kontrollera kolonnernas luer-lock-anslutningar. Luer-lock måste var ordentligt åtdragna.

Om du vill fortsätta, tryck på ENT.

Programmet fortsätter automatiskt med anvisningarna för att installera slangsetet på instrumentet.

► Gå till STEG 3

7.2.6 DEPLETION 3.1

VIKTIGT

- Separationsprogrammet **ENRICHMENT 3.1** får endast användas med *CliniMACS Tubing Set (REF 261-01)*.
- Uppmaningar och diagram på skärmen som fungerar som procedurguider kommer att visas i visningsfönstret. Utför och kontrollera varje steg enligt användarhandboken innan du går vidare till nästa steg. Om du vill korrigera ett misstag under datainmatningen, tryck på knappen "Undo" (ångra) (se avsnittet "Beskrivning" i användarhandboken för CliniMACS Plus Instrument).

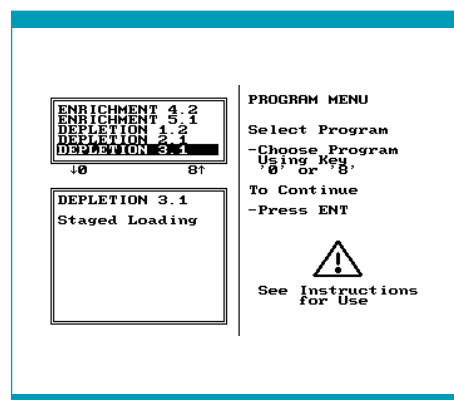
Val av separationsprogram DEPLETION 3.1

I fönstret indikeras Skärm 7.24.

Välj DEPLETION 3.1.

Välj separationsprogram genom att markera programmets namn med den svarta fältet. Flytta fältet upp och ned med knapparna 0 och 8.

Om du vill fortsätta med det markerade programmet, tryck på ENT.



Skärm 7.24: Val av separationsprogram

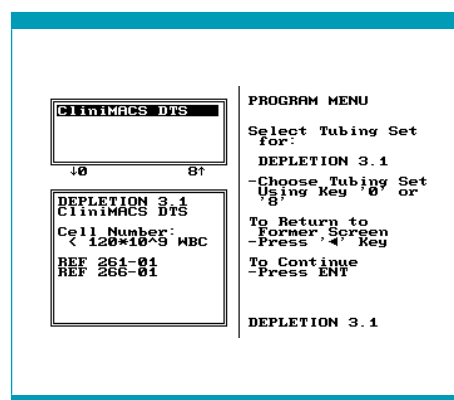
Val av slangset

I fönstret indikeras Skärm 7.25.

Bekräfta att korrekt program har valts. Om inte, tryck på ◀ för att återgå till föregående steg för att ändra valet.

Välj slangset genom att markera det i rutan högst upp till vänster med det svarta fältet. Flytta fältet upp och ned med knapparna 0 och 8.

Fönstret under indikerar relevanta data som kapacitet och katalognummer för det valda slangsetet.



Skärm 7.25: Val av slangset

Om du vill fortsätta med den valda kombinationen av separationsprogram och slangset, tryck på **ENT**.

Bekräftelse

I fönstret indikeras Skärm 7.26.

Om du vill bekräfta kombinationen av separationsprogram och slangset och fortsätta, tryck på **ENT**.

Om inte, tryck på ◀ för att återgå till föregående steg för att ändra valet.

Materialkontroll

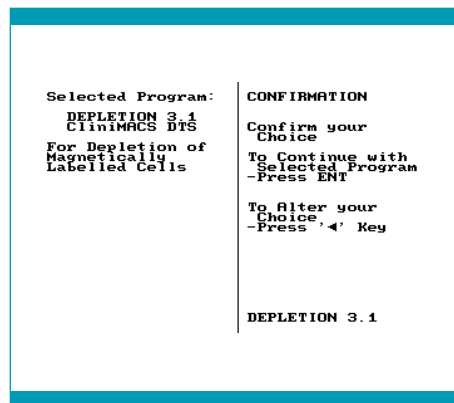
I fönstret indikeras Skärm 7.27.

Frågan om katalognummer (REF) för slangsetet fungerar som en säkerhetskontroll för att säkerställa att det slangset operatören har valt kan användas.

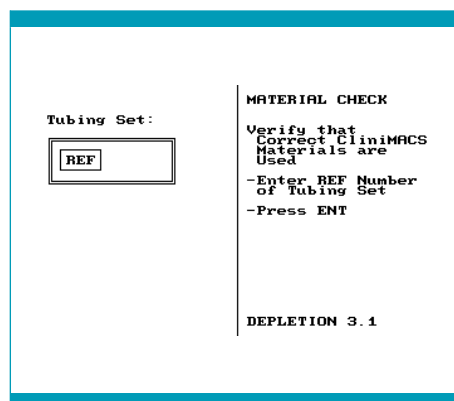
Ange katalognummer för det valda slangsetet och tryck **ENT** för att fortsätta.

Om ett katalognummer som inte finns har angetts visas ett meddelande.

Bekräfta genom att trycka på **ENT** och ange korrekt katalognummer. Om det angivna numret fortfarande är felaktigt visas meddelandet en andra gång. Efter att du har tryckt på **ENT** återgår programmet till programmenyn (se Skärm 7.25).



Skärm 7.26: Bekräftelse



Skärm 7.27: Materialkontroll

Inmatning av provparameter

Om materialkontrollen lyckades fortsätter programmet automatiskt med att efterfråga vissa provparametrar som är nödvändiga för att justera separationen för varje individuellt prov och med att ge operatören viktig information för den buffert och de påsvolymer som krävs.

I fönstret indikeras Skärm 7.28.

1. Börja med att ange provets WBC-koncentration. Det tillåtna intervallet visas i rutan längst ned till vänster. Tryck på ◀ för att korrigera en felaktig inmatning.

Bekräfta att det värde som angetts speglar provets värde. I annat fall kanske inte provbearbetningen blir optimal.

VIKTIGT

Alla provparametrar som krävs avser provet efter cellmärkning och tvättprocedur. Det tillåtna intervallet som visas i rutan längst ned till vänster tar alltid hänsyn till föregående inmatning. Efter varje inmatning beräknar och justerar programmet det accepterade området för nästa fråga.

⚠ FÖRSIKTIGHET

Om felaktiga parametrar anges kan det leda till icke-optimal provbearbetning och öka risken för förlust av målceller. Om du anger värden för WBC-koncentration och/eller procentandel märkta celler som är lägre än det faktiska provvärdet kan det leda till cellförlust på grund av att systemet är överbelastat. Om du anger en lägre provvolym kan det leda till cellförlust på grund av överbelastning eller till och med ofullständig provbearbetning. Om specifikationen för någon av dessa parametrar är för hög kommer detta att leda till en ökad bearbetningstid och större volym på mållcellsfraktionen. Säkerställ alltid att du anger rätt parametrar.

Om du vill fortsätta med nästa inmatning, tryck på ENT.

2. Ange procentandel märkta celler. Bekräfta att det värde som angetts speglar provets värde. I annat fall kanske inte provbearbetningen blir optimal (se "Viktigt").

Om du vill fortsätta med nästa inmatning, tryck på ENT.

3. Ange cellprovets slutliga volym. Bekräfta att det värde som angetts speglar provets värde. I annat fall kanske inte provbearbetningen blir optimal (se "Viktigt").

Om du vill fortsätta, tryck på ENT.

The screenshot shows a terminal-style interface with a title bar at the top. On the left, there are three input fields: 'WBC Concentration *10^6/ml', 'Percentage of Labelled Cells %', and 'Sample Loading Volume ml'. Below these is a box containing 'min: 20' and 'max: 400'. On the right, under the heading 'SAMPLE PARAMETERS', there are instructions: 'Enter Sample Parameters', 'For each Parameter -Enter Sample Data within the Range Indicated in the Window Below', and '-Press ENT'. At the bottom right, it says 'DEPLETION 3.1'.

Skärm 7.28: Inmatning av provparameter

Beräkning

CliniMACS Plus programvara beräknar det totala antalet märkta celler för att kontrollera om separationskapaciteten är tillräcklig.

Resultatet visas på en av två möjliga skärmar:

- Resultatet av beräkningen visas på en skärm som liknar Skärm 7.29. Säkerställ att det beräknade antalet märkta celler är korrekt.

Om du vill fortsätta, tryck på ENT.

Det går inte att korrigera data. Tryck på ◀ för att återgå till den föregående skärmen för korrigering.

- Om det beräknade antalet märkta celler överskrider separationskapaciteten i CliniMACS Plus-systemet visas en skärm som liknar Skärm 7.30. Säkerställ att korrekta provparametrar har angetts och att det beräknade antalet celler är korrekt. Tryck på ◀ för att åtgå till den tidigare skärmen för att korrigera provparametrarna.

Om du vill förhindra överbelastning av systemet, dela provet och fastställ volymen för varje del. Tryck på ◀ för att återgå till föregående Skärm 7.28. Ange provparametrarna för den första alikvoten av provet och fortsätt med separationen av denna del. Efter att separationen är avslutad, starta en andra separation med den andra alikvoten med ett nytt slangset.

Om du vill fortsätta, tryck på ENT.

Skärm 7.29: Val av slangset

Skärm 7.30: Beräkning: Cellantalet överskrider separationskapacitet

Volyminformation

Från det totala antalet märkta celler (se avsnitt "Beräkning") beräknar programvaran antalet separationsstadier, den mängd buffert som krävs för hela depletionen och den vätskevolym som kommer att samlas in i Cell Collection Bag, Non-Target Cell Bag och Reapplication Bag.

VIKTIGT

- *Negative Fraction Bag motsvarar Non-Target Cell Bag.*
- *Priming Waste Bag motsvarar Reapplication Bag.*

Om ett av de beräknade värdena överstiger dessa standardvärden visas en skärm som liknar Skärm 7.31 för att informera om den mängd vätska som kommer att krävas och ackumuleras under separationsprocessen. Byt ut påsarna som levererades med slangsetet mot alternativa påsar med lämplig storlek, om byte är nödvändigt. De påsar som ursprungligen är anslutna till slangsetet är anslutna med luer-anslutningar. Påsar som ersätter originalpåsarna ska han luer-anslutning av hontyp. Standardpåsar kan anslutas med en Luer/Spike Interconnector.

<table border="1"> <tr> <td>Selection Buffer</td><td>2000 ml</td></tr> <tr> <td>Cell Collection Bag</td><td>1200 ml</td></tr> <tr> <td>Negative Fraction Bag</td><td>1000 ml</td></tr> <tr> <td>Wash Waste Bag</td><td>600 ml</td></tr> <tr> <td>Priming Waste Bag</td><td>1000 ml</td></tr> </table>		Selection Buffer	2000 ml	Cell Collection Bag	1200 ml	Negative Fraction Bag	1000 ml	Wash Waste Bag	600 ml	Priming Waste Bag	1000 ml
Selection Buffer	2000 ml										
Cell Collection Bag	1200 ml										
Negative Fraction Bag	1000 ml										
Wash Waste Bag	600 ml										
Priming Waste Bag	1000 ml										
CHECK VOLUMES Check Buffer and Bag Volumes Needed for Separation -Prepare Required Amount of Buffer -Connect Appropriate Bags to Tubing Set To Continue -Press ENT											
DEPLETION 3.1											

Skärm 7.31: Kontrollera volymer

1. Bekräfta att den mängd buffert som krävs är tillgänglig. Anslut inte mer än tre liter buffert på en påshängare.

OBS

Risk för skada på instrumentet. Överbelastning av påshängarna kan skada instrumentet. Bärkapaciteten hos en enskild påshängare är 3 kg. Överbelasta inte påshängarna.

2. Öppna brickan med slangsetet under sterila förhållanden och byt vid behov ut originalpåsarna mot större påsar. Säkerställ obehindrat flöde till dessa påsar.
3. Om byte är nödvändigt, byt ut Cell Collection Bag på slangsetet med en transferpåse med tillräcklig storlek. Fastställ vikten på den nya, tomma Cell Collection Bag och registrera den. Säkerställ att obehindrat flöde till Cell Collection Bag är möjligt. Anslut alternativt ytterligare en 600 mL transferpåse till den första Cell Collection Bag, t.ex. genom att använda ett transferset för plasma.

VIKTIGT

- *Säkerställ att den mängd buffert som krävs är tillgänglig och att volymen för de påsar som anges på Skärm 7.31 är tillräcklig. I annat fall kan separationens prestanda försämrats.*
 - *Alla modifieringar av CliniMACS-slangset ska utföras under sterila förhållanden, t.ex. i laminärt flödesskåp.*
 - *Observera för ytterligare analys eller cellbearbetning att de volymer som anges på Skärm 7.31 inte är exakta volymer utan volymer inom säkerhetskraven.*
4. Kontrollera kolonnernas luer-lock-anslutningar. Luer-lock måste var ordentligt åtdragna.

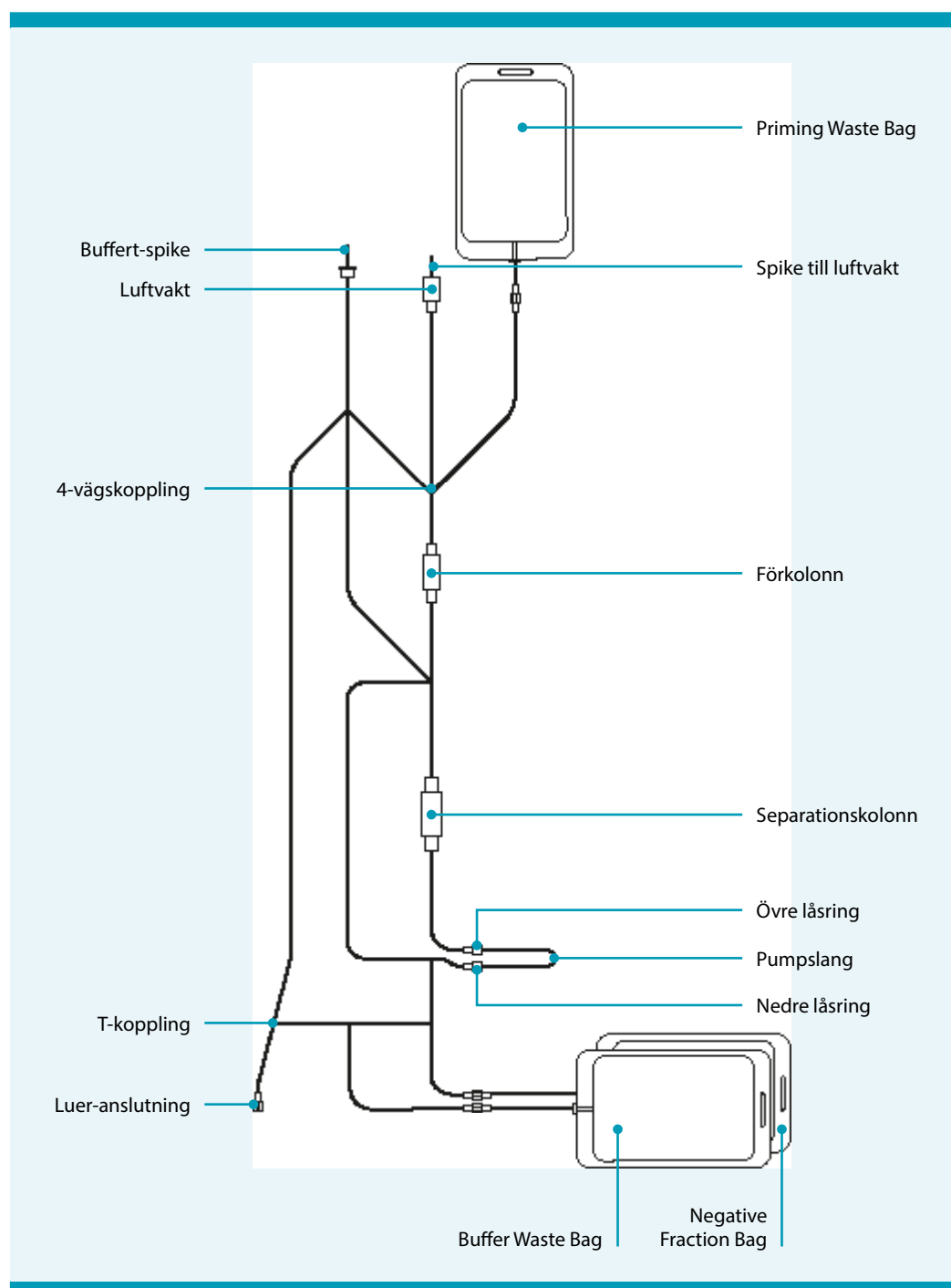
Om du vill fortsätta, tryck på ENT.

Programmet fortsätter automatiskt med anvisningarna för att installera slangsetet på instrumentet.

► Gå till STEG 3

7.3 STEG 3: Installation av CliniMACS-slangset

7.3.1 CliniMACS Tubing Set och CliniMACS Tubing Set LS



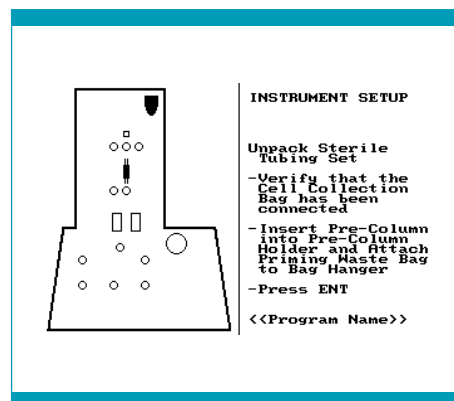
Figur 7.2: Allmän konstruktion av ett CliniMACS Tubing Set (t.ex. CliniMACS Tubing Set)

Förberedelse för installation av slangset

I fönstret indikeras Skärm 7.32.

Anvisningen visas till höger och ett diagram som motsvarar anvisningen visas till vänster på skärmen. De blinkande funktionerna på skärmen indikerar områden att vara uppmärksam på.

CliniMACS Tubing Set och CliniMACS Tubing Set LS levereras i förseglade, steriliserade förpackningar. Varje slangset innehåller förmonterade slangar och kolonner för en cellseparation (se Figur 7.2). När förpackningen är intakt är flödesvägen steril.



Skärm 7.32: Packa upp slangset

VARNING

Risk för kontamination. En skadad förpackning indikerar att slangsetet kanske inte är sterilt och därför får det inte användas. Inspektera förpackningen noggrant för skador, hål och sprickor. Använd endast slangsetet om förpackningen är oskadad och förseglad.

Notera: CliniMACS Plus Instrument visar det valda programnamnet, t.ex. CD34 SELECTION 1, på den nedre raden på instrumentskärmen. Vid alla steg under installationen av slangsetet kan du trycka på knappen "Undo" (ångra) (se avsnittet "Beskrivning" i användarhandboken för CliniMACS Plus Instrument) för att återgå till föregående steg.

1. Registrera lotnummer och utgångsdatum för slangsetet.

Packa upp det sterila slangsetet under sterila förhållanden (t.ex. i laminärt flödesskåp). Ta bort klämman som använts för förpackning av CliniMACS Tubing Set LS innan du använder slangsetet. Klämman är märkt med "Remove before assembly to CliniMACS Plus Instrument" (ta bort före montering på CliniMACS Plus Instrument).

2. Kontrollera luer-lock-anslutningar till påsar. Luer-lock måste var ordentligt åtdragna.

Anslut Cell Collection Bag

1. Registrera vikten på den tomma Cell Collection Bag.
2. I en aseptisk miljö, ta bort locken och anslut den sterila Cell Collection Bag utrustad med en Luer/Spike Interconnector till slangsetet innan slangsetet laddas i CliniMACS Plus Instrument. Säkerställ att originalslangen på Cell Collection Bag antingen är försedd med en klämma eller förseglad.

Om mer än en Cell Collection Bag krävs för en separation, anslut påsarna med ett transferset för plasma. Kontrollera att alla anslutningar är hårt åtdragna.

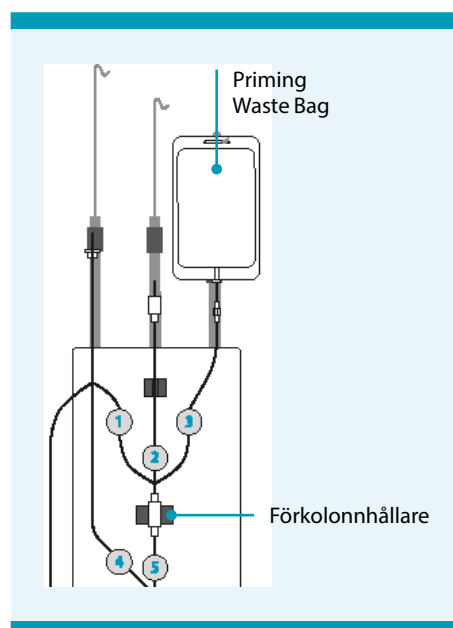
3. Säkerställ att obehindrat flöde till Cell Collection Bag är möjligt.
4. Fortsätt med installationen av slangsetet antingen med den procedur som beskrivs nedan eller "Alternativ installation av CliniMACS-slangset".

Anslut uppsamlingspåsen för priming och sätt in förkolonn

I fönstret indikeras Skärm 7.32.

1. Anslut uppsamlingspåsen för priming till höger påhängaren på instrumentet (se Figur 7.3).
2. Justera höjden på påhängaren. Hög eller sänk påhängaren för att anpassa höjden efter storleken på Priming Waste Bag. Säkerställ att den är placerad tillräckligt högt för att förhindra allvarlig böjning av slangen som kan förhindra flödet och att den är tillräckligt lågt för att förhindra att slangar eller anslutningar sträcks.
3. Placera förkolonnen i hållaren (se Figur 7.3).

Fortsätt genom att trycka på ENT.



Figur 7.3: Anslut uppsamlingspåsen för priming till påhängare

Sätt in separationskolonn och ladda ventil nr 5

I fönstret indikeras Skärm 7.33.

Ventilerna som visas i svart på skärmen kommer att öppnas automatiskt för att underlätta slanginsättning.

1. Sätt in separationskolonnen i hållaren för separationskolonn (se Figur 7.4).

VARNING

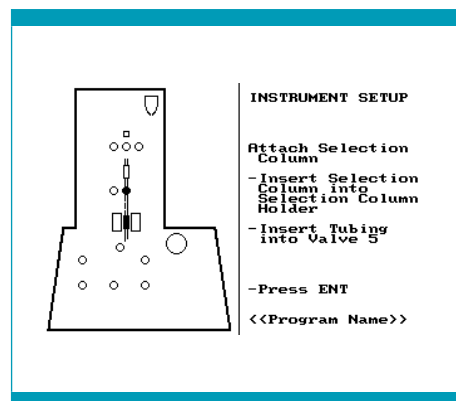
Risikoförskada. Om separationskolonnen sätts in eller tas ut när magnetenheten är påslagen finns en risk för personskada. Sätt bara in eller ta ut separationskolonnen när magnetenheten är avstängd.

2. Ladda slangen i ventil nr 5.

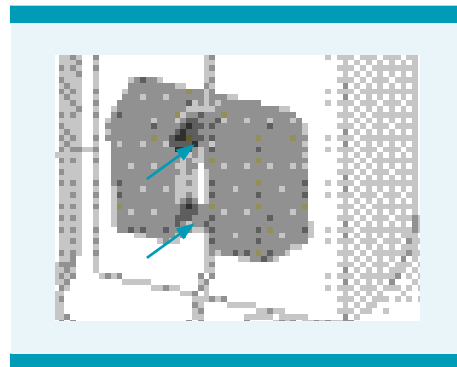
VIKTIGT

- *I takt med att varje steg utförs, kontrollera alla slangar och anslutningar för veck eller allvarliga böjningar som kan förhindra flödet av vätska genom slangen. Kontrollera alla ventiler för att säkerställa att slangen sitter tätt.*
- *Sätt bara in slangsetet i öppna ventiler (när knappen är intryckt). Slangen passar inte om den sätts in i en stängd ventil.*
- *Om slangen måste justeras efter att en ventil har stängts, dra i inte slangen utan att trycka på ventilknappen för att öppna ventilen (se Figur 7.5).*

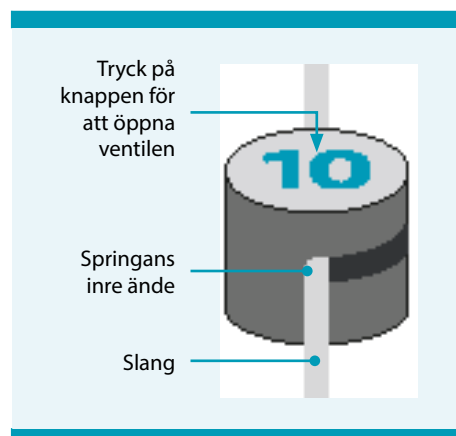
Fortsätt genom att trycka på ENT.



Skärm 7.33: Sätt in separationskolonnen och ladda ventil nr 5



Figur 7.4: Separationskolonn i hållare för separationskolonn



Figur 7.5: Korrekt insatt slang

Ladda ventil nr 1, 2, 3 och 4

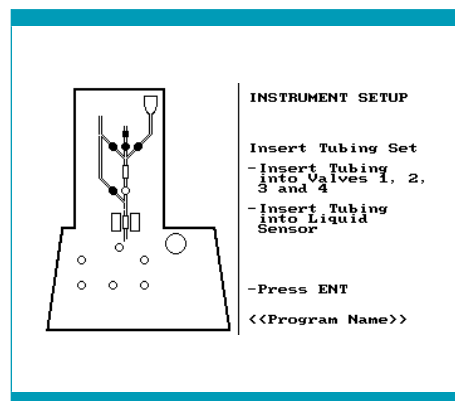
I fönstret indikeras Skärm 7.34.

1. Ladda slangen i ventil nr 4. Kontrollera att slangen är säkert placerad i ventilöppningen (se Figur 7.5). Var särskilt uppmärksam på områden mellan ventil nr 4 och 5 (se Figur 7.6) och håll 4-vägskopplingen upprätt.
2. Sätt in slangen i ventil nr 1.
3. Placera 4-vägskopplingen precis nedanför ventil nr 2. Var särskilt uppmärksam på området nedanför ventil nr 2.
4. Sätt in slangen i ventil nr 2 och 3.
5. Montera slangen mellan ventil nr 2 och luftvakten i vätskesensorn. Kontrollera att slangen är korrekt placerad i sensorkopplingen.

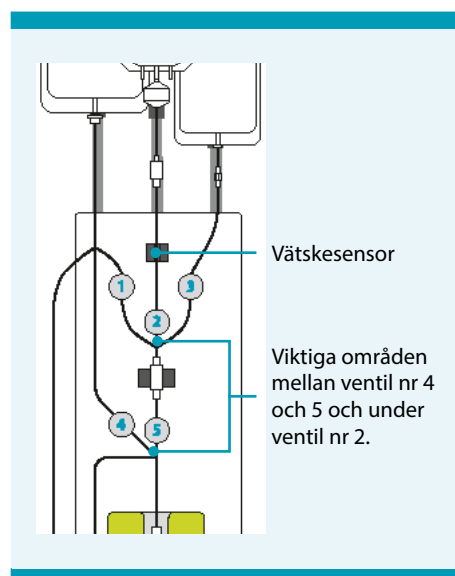
VIKTIGT

För att säkerställa korrekt drift måste både vätskesensorn och slangen som sätts in vara torr. Inspektera båda noggrant. Om det finns vätska, torka området med en mjuk, luddfri duk.

Fortsätt genom att trycka på ENT.



Skärm 7.34: Ladda ventil nr 1, 2, 3, 4 och vätskesensor



Figur 7.6: Slangar i ventil

Ladda pumpslang

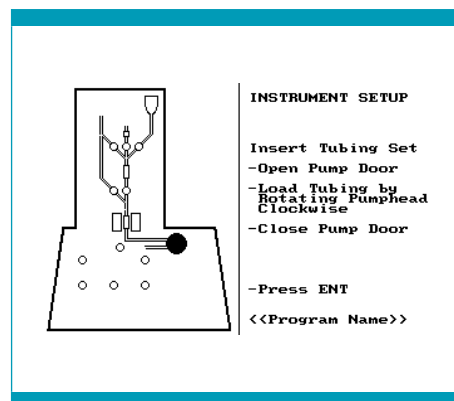
I fönstret indikeras Skärm 7.35.

1. Öppna pumpdörren genom att lyfta i den vänstra kanten.
2. Sätt in den övre låsringen på pumpslangen i låsringens skåra på pumphöljet (se Figur 7.7).
3. Roter pumprullen medurs tills slangen går mellan de båda uppsättningarna av slangstyrstift och slangen sitter tätt runt pumprullen. Säkerställ att slangen inte kläms i slutet av styrstiften. Om justering av slangen i pumpen är nödvändig kan du ta bort slangen genom att lyfta den nedre änden och vrida pumprullen moturs.
4. Sätt in den lägre låsringen på pumpslangen i låsringens skåra på pumphöljet.
5. Roter pumprullen medurs och moturs för att säkerställa att pumprullen rör sig fritt.
6. Stäng pumpdörren.

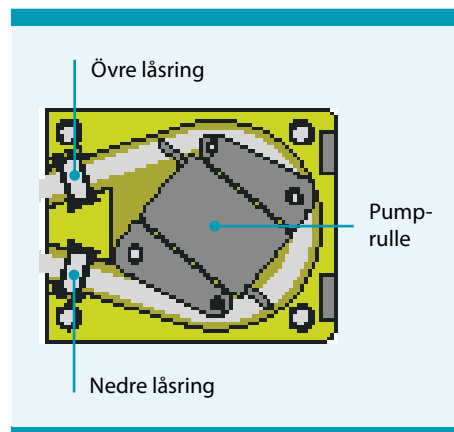
VIKTIGT

Under cellseparationsprogrammet kommer pumpen omedelbart att stanna om pumphöljet öppnas. Om det lämnas öppet under mer än 600 sekunder kommer instrumentet att avbryta den aktuella körningen.

Fortsätt genom att trycka på ENT.



Skärm 7.35: Ladda pumpslang



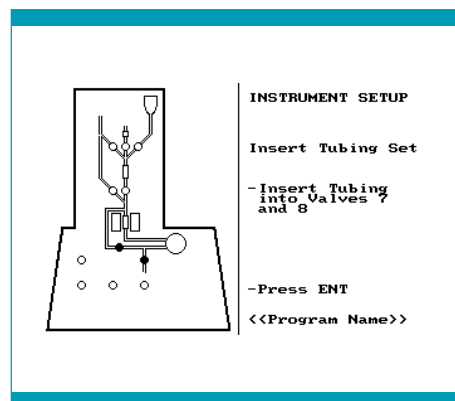
Figur 7.7: Ladda pumpslang

Ladda ventil nr 7 och 8

I fönstret indikeras Skärm 7.36.

1. Ladda slangen i ventil nr 7.
2. Ladda slangen i ventil nr 8.

Fortsätt genom att trycka på **ENT**.



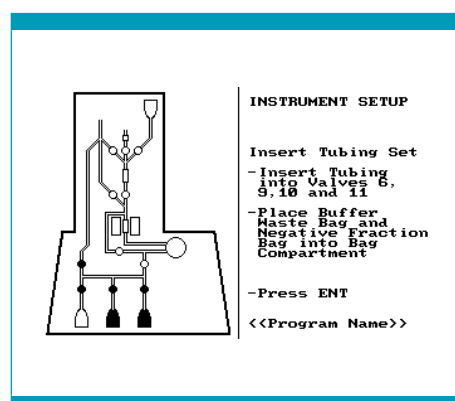
Skärm 7.36: Ladda ventil nr 7 och 8

Ladda ventil nr 6, 9, 10 och 11

I fönstret indikeras Skärm 7.37.

1. Ladda slangen i ventil nr 6, 9, 10 och 11.
2. Placera Negative Fraction Bag och uppsamlingspåsen för buffert i påsfacket. Säkerställ att slangarna inte är komprimerade under påsfackets lock.

Fortsätt genom att trycka på **ENT**.



Skärm 7.37: Ladda ventil nr 6, 9, 10 och 11

Kontrollera alla slangar och anslutningar igen

I fönstret indikeras Skärm 7.38.

Kontrollera alla slangar och anslutningar igen innan du påbörjar cellseparationen.

Notera: Kontrollera alla ventiler för korrekt slanginsättning. Kontrollera att slangens är enhetligt fördelad och att det inte finns några veck eller sträckta områden på slangens. Var särskilt uppmärksam på förkolonnområdet samt området mellan pumpen och ventil nr 7 och 8 (se Figur 7.8) och mellan ventil nr 4 och 5 (se Figur 7.6). Om slangens måste justeras efter att en ventil har stängts, dra i inte slangens utan att trycka på ventilknappen för att öppna ventilen. Om slangens har justerats är det absolut nödvändigt att trycka ordentligt på motsvarande ventil två gånger.

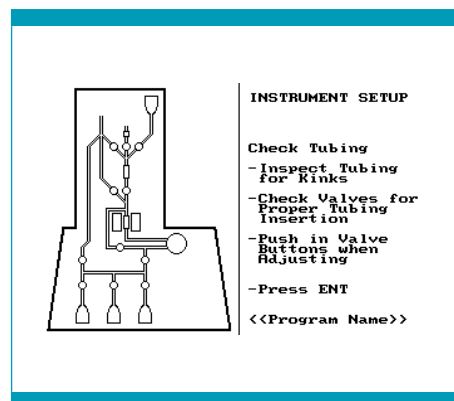
Fortsätt genom att trycka på ENT.

Placering av ventiler

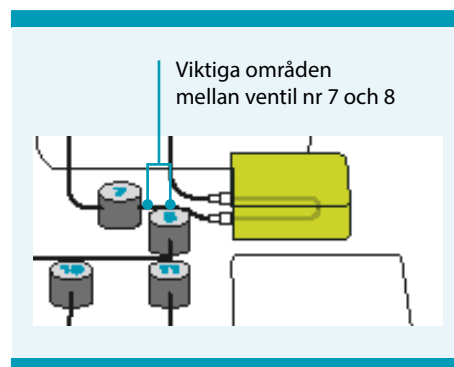
I fönstret indikeras Skärm 7.39.

För att säkerställa korrekt inpassning av slangens i ventilerna kommer instrumentet att använda alla ventiler i tur och ordning, två gånger. Titta och lyssna för att säkerställa att alla ventiler fungerar korrekt. Om några ventiler inte fungerar korrekt, se kapitel 8 "Felsökning" på sidan 203. Du kan upprepa detta steg genom att trycka på ◀ följt av ENT (se avsnittet "Beskrivning" i användarhandboken för CliniMACS Plus Instrument).

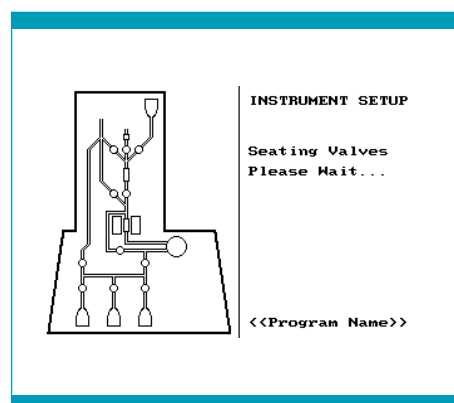
Magnetkopplingsdonet kommer också att testas under denna kontrollsekvens.



Skärm 7.38: Kontrollera alla slangar och anslutningar igen



Figur 7.8: Slangar i ventil



Skärm 7.39: Placering av ventiler

Anslut CliniMACS PBS/EDTA Buffer

I fönstret indikeras Skärm 7.40.

Den ordinerade bufferten separation med CliniMACS Plus är CliniMACS PBS/EDTA Buffer med tillsats av HSA till en slutlig koncentration på 0,5% (v/v)

1. Använd aseptiska tekniker, ta bort locket från buffertspiken på slangsetet (se Figur 7.2 på sidan 148) och anslut den till buffertpåsen. Säkerställ att septumet är punkterat för fritt flöde av vätska. Kläm försiktigt på påsen för att säkerställa att spiken har penetrerat påsen.

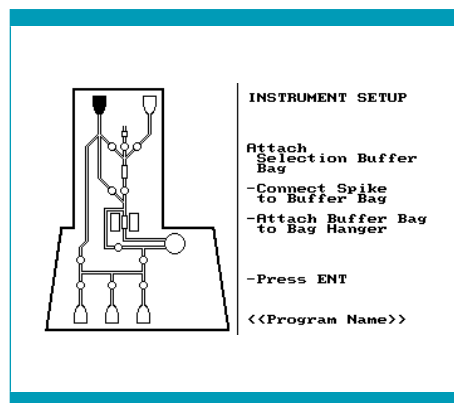
Om mer än en liter buffert krävs för en separation, anslut två buffertpåsar med ett transferset för plasma.

2. Anslut en buffertpåse till buffertpåskroken på påshängaren (se Figur 7.9).
3. Justera höjden på buffertpåshängaren. Höj eller sänk påshängaren för att anpassa höjden efter storleken på buffertpåsen. Säkerställ att den är placerad tillräckligt högt för att förhindra allvarlig böjning av slangen som kan förhindra flödet och att den är tillräckligt lågt för att förhindra att slangar eller anslutningar sträcks.

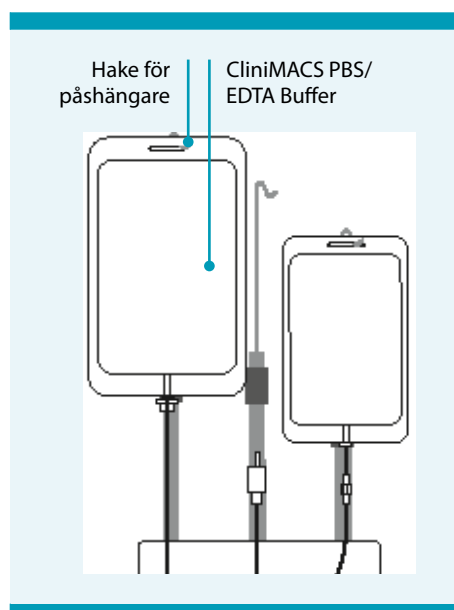
OBS

Risk för skada på instrumentet. Överbelastning av påshängarna kan skada instrumentet. Bärkapaciteten hos en enskild påshängare är 3 kg. Överbelasta inte påshängarna.

Fortsätt genom att trycka på **ENT**.



Skärm 7.40: Anslut buffertpåse



Figur 7.9: Anslut buffertpåse

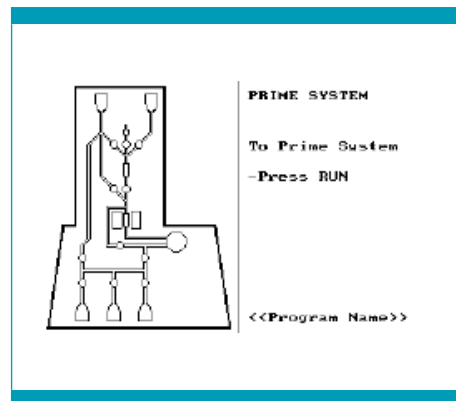
Starta priming

I fönstret indikeras Skärm 7.41.

Starta primingen genom att trycka på **RUN** (kör).

I fönstret indikeras Skärm 7.42.

Under primingfasen fylls slangsetet med buffert. Bufferten kommer att cirkulera genom slangsetet vilket inkluderar både förkolonnen och separationskolonnen. Primingavfall samlas in i uppsamlingspåsen för priming och uppsamlingspåsen för buffert (se Figur 7.2 på sidan 148). Primingcyklerna fortsätter och upprepar en serie steg. Primingfasen tar cirka 1 minut. Primingstatus kommer att uppdateras på displayen.



Skärm 7.41: Starta priming

Kontroll under priming

Under primingfasen ska alla slangar, kopplingar, ventiler och kolonner kontrolleras för läckage eller förekomst av veck som kan blockera vätskeflödet.

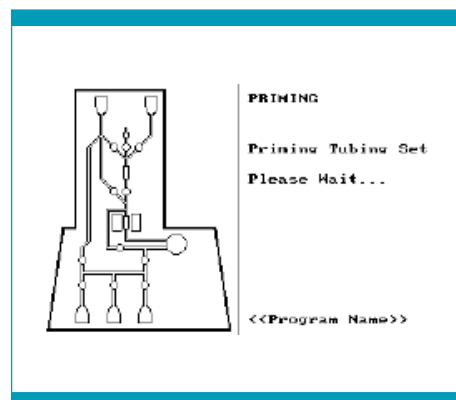
Om läckage eller funktionsfel observeras, tryck på **STOP** för att avsluta körningen.

Operatören har 600 sekunder på sig att lösa problemet.

Återuppta processen genom att trycka på **RUN**.

Efter 600 sekunder avbryts separationen. Om operatören inte kan lösa problemet eller om slangsetet är defekt, ta bort slangsetet och byt ut det mot ett nytt.

Notera: När primingen har startat är det inte möjligt att återgå till instrumentinställningen.



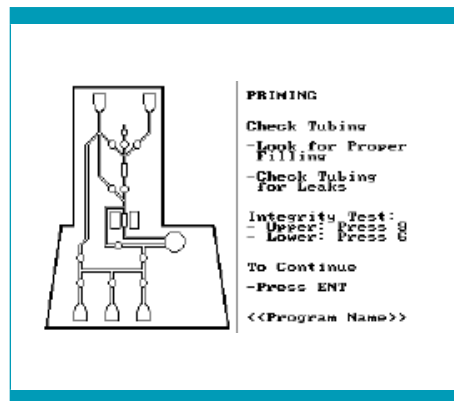
Skärm 7.42: Priming pågår

Slutlig kontroll av alla slangar och anslutningar

I fönstret indikeras Skärm 7.43.

Kontrollera följande innan du fortsätter med programmet:

- vätska i alla delar av slangsetet (förutom i förfilter)
- inget överskott av luft i slangsetet
- vätska i uppsamlingspåsen för priming och uppsamlingspåsen för buffert
- ingen vätska i Negative Fraction Bag eller i Cell Collection Bag



Skärm 7.43: Slutlig kontroll av slang

Tryck inte på ENT ännu.

Integritetstest

För ytterligare säkerhet måste ett integritetstest utföras för att testa slangsetet för läckage. Testsekvensen består av två automatiska subsekvenser som innebär att både de övre och nedre delarna av slangsetet trycksätts och observeras separat.

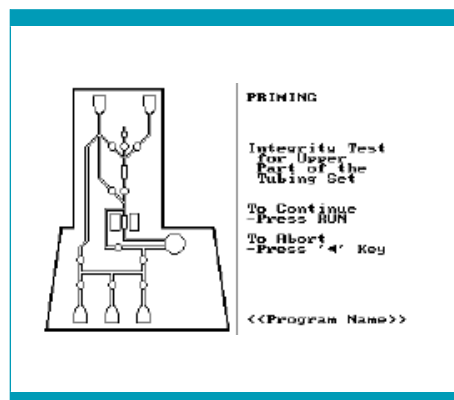
Integritetstest för den övre delen av slangsetet

1. När operatören utför "Slutlig kontroll av alla slangar och anslutningar" visas Skärm 7.43 i fönstret.
2. Efter att "Slutlig kontroll av alla slangar och anslutningar" är avslutat, fortsätt med integritetstestet. **Tryck inte på ENT.**
3. Utför integritetstestet för den övre delen genom att trycka på 9.

I fönstret indikeras Skärm 7.44.

4. Start testsekvensen genom att trycka på RUN.

Återgå till Skärm 7.43 genom att trycka på ◀.



Skärm 7.44: Starta integritetstest för övre del

5. När du har tryckt på **RUN** startar instrumentet den automatiska testsekvensen för slangsetets övre del.

I fönstret indikeras Skärm 7.45.

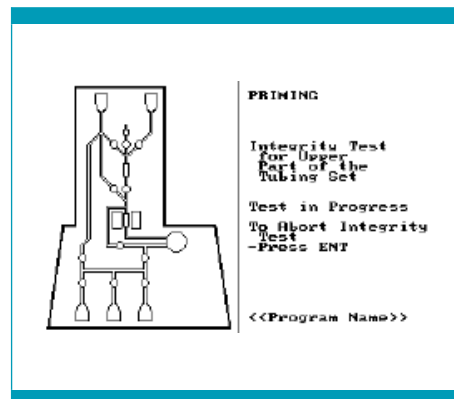
Övertryck kommer att skapas och kvarstå i två minuter. Under den här tiden ska operatören kontrollera alla anslutningar ovanför den övre pumpslanganslutningen.

Vid varje punkt kan du avsluta testsekvensen genom att trycka på **ENT**.

6. Efter två minuter försvinner trycket automatisk och i fönstret visas Skärm 7.43.

Kontrollera om det har uppkommit något läckage under testsekvensen. Om läckage har observerats vid någon anslutning av slangsetet måste slangsetet tas bort och bytas ut mot ett nytt. Kontakta Miltenyi Biotec Technical Support för anvisningar om hur returnerar det defekta slangsetet.

7. Om inget läckage observeras, fortsatt med integritetstestet av den nedre delen av slangsetet.



Skärm 7.45: Integritetstest för övre del pågår

Integritetstest för den nedre delen av slangsetet

I fönstret indikeras Skärm 7.46.

1. Utför integritetstestet för den nedre delen genom att trycka på **6**.

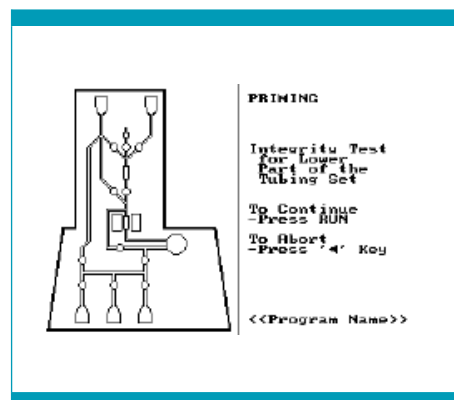
Tryck inte på **ENT**.

I fönstret indikeras Skärm 7.46.

2. Starta testsekvensen genom att trycka på **RUN**.

Återgå till Skärm 7.43 genom att trycka på **◀**.

3. När du har tryckt på **RUN** startar instrumentet den automatiserade testsekvensen för slangsetets nedre del.



Skärm 7.46: Starta integritetstest för nedre del

I fönstret indikeras Skärm 7.47.

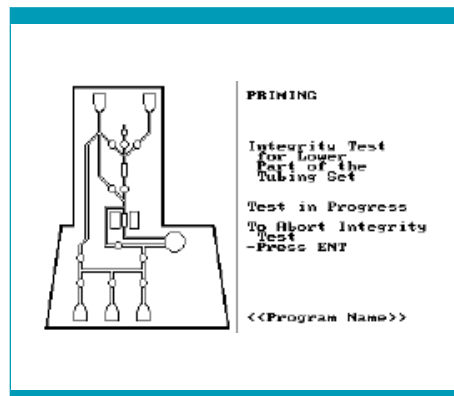
Övertryck kommer att skapas och kvarstå under 30 sekunder. Under den här tiden ska operatören kontrollera den nedre pumpslanganslutningen och T-kopplingarna mellan ventil 6, 8, 9, 10 och 11.

Vid varje punkt kan du avsluta testsekvensen genom att trycka på **ENT**.

4. Efter 30 sekunder försvinner trycket automatisk och i fönstret visas Skärm 7.43.

Kontrollera om det har uppkommit något läckage under testsekvensen. Om läckage har observerats vid någon anslutning av slangsetet måste slangsetet tas bort och bytas ut till ett nytt. Kontakta Miltenyi Biotec Technical Support för anvisningar om hur returnerar det defekta slangsetet.

5. Om inget läckage observeras kan operatören nu fortsätta med nästa steg genom att trycka på **ENT**.



Skärm 7.47: Integritetstest för nedre del pågår

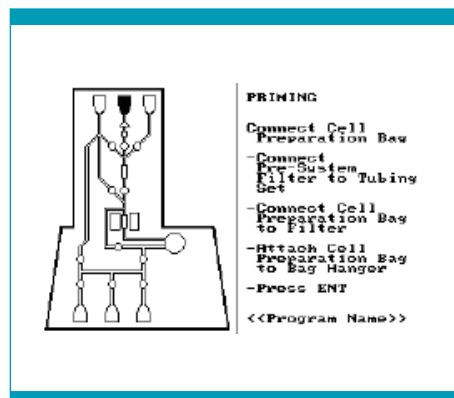
Anslut Cell Preparation Bag

I fönstret indikeras Skärm 7.48.

Anslut Cell Preparation Bag som innehåller den märkta cellprodukten:

1. Ta bort locket från luftvaktens spike på slangsetet (se Figur 7.2).
2. Ta bort locket på den trubbiga änden på förfilter (se Figur 7.10). Sätt in spiken ordentligt i förfilter.
3. Ta bort locket från spiken på förfilter.
4. Spike förfilter i en oanvänd port på Cell Preparation Bag och säkerställ att septumet är punkterat för fritt flöde av vätska. Kläm försiktigt på påsen för att säkerställa att spiken har penetrerat påsen.
5. Kontrollera noggrant anslutningen mellan förfilter och slangsetet för att bekräfta att anslutningen är säker.
6. Häng Cell Preparation Bag på den mittersta påhängaren.
7. Justera påhängaren för Cell Preparation Bag för att hålla Cell Preparation Bag i upprätt läge.

Fortsätt genom att trycka på **ENT**.



Skärm 7.48: Anslut Cell Preparation Bag

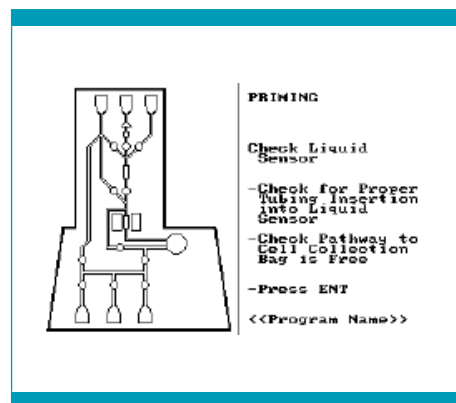
Slutlig kontroll av vätskesensorn

I fönstret indikeras Skärm 7.49.

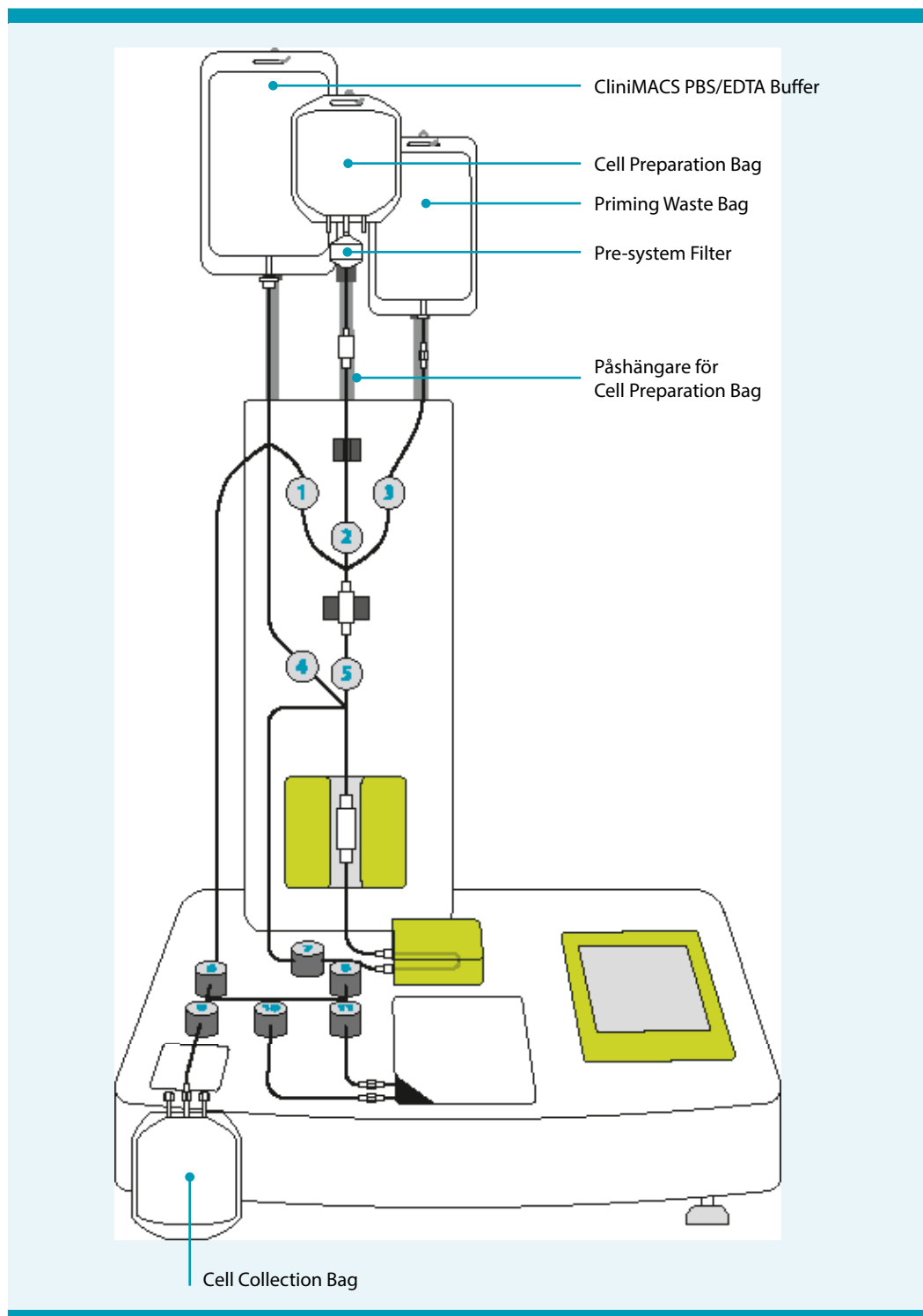
1. Kontrollera vätskesensorns slang. Säkerställ att slangen är korrekt insatt, att den är fri från extern vätska och inte har lossnat under laddningsproceduren.
2. Bekräfta att ett obehindrat flöde till Cell Collection Bag är möjligt (t.ex. öppen klämma nedanför ventil 9).

Fortsätt genom att trycka på **ENT**.

► **Gå till STEG 4**



Skärm 7.49: Slutlig kontroll av vätskesensorn



Figur 7.10: CliniMACS Plus Instrument med CliniMACS Tubing Set, CliniMACS PBS/EDTA Buffer, Cell Preparation Bag och Cell Collection Bag

7.3.2 Alternativ installation av CliniMACS-slangset

Anvisningarna i STEG 3 och skärmarna på CliniMACS Plus Instrument beskriver installationen av CliniMACS-slangset under sterila förhållanden (renrum).

CliniMACS Plus-systemet är i sig ett slutet system som inte nödvändigtvis måste användas i ett renrum. Om det används utanför ett renrum måste dock installationsproceduren för slangsetet anpassas för att säkerställa att steriliteten för cellseparationen garanteras.

Steriliteten för cellseparationen kan påverkas under anslutning av Cell Collection Bag, CliniMACS PBS/EDTA Buffer, förfilter och Cell Preparation Bag. För att säkerställa att systemet förbli sterilt måste dessa komponenter anslutas till slangsetet under sterila förhållanden (t.ex. i laminärt flödesskåp). När komponenterna ansluts till slangsetet för installation på CliniMACS Plus Instrument måste ordningen på instrumentets anvisningar och anvisningarna STEG 3 ändras och ytterligare åtgärder vidtas.

Vid användning av CliniMACS Plus Instrument utanför ett renrum ska du följa de ytterligare anvisningarna nedan som ändrar anvisningarna i STEG 3.

Förberedelse för installation av slangset

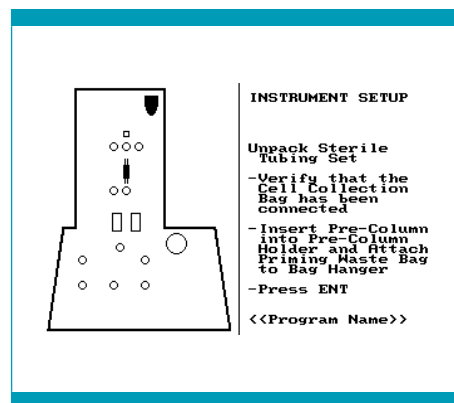
I fönstret indikeras Skärm 7.50.

Enligt beskrivning måste Cell Collection Bag, CliniMACS PBS/EDTA Buffer, förfilter och Cell Preparation Bag anslutas till slangsetet innan slangsetet installeras på instrumentet under sterila förhållanden.

Packa upp slangsetet under sterila förhållanden och anslut följande komponenter under sterila förhållanden:

► Anslut Cell Collection BagC

Se sidan 150.



Skärm 7.50: Packa upp slangset

Anslutning av CliniMACS PBS/EDTA Buffer

VIKTIGT

Innan CliniMACS PBS/EDTA Buffer ansluts till slangsetet ska du klämma ihop slangen nedanför buffertspiken med en peang för att förhindra att buffert flödar in i slangen före installation (se klämma 1, Figur 7.11 på sidan 167).

Använd aseptiska tekniker för att ta bort locket från buffertspiken på slangsetet och anslut den till buffertpåsen. Säkerställ att septumet är punkterat för fritt flöde av vätska. Kläm försiktigt på påsen för att säkerställa att spiken har penetrerat påsen.

Anslutning av förfilter

Ta bort locket på luftvaktens spike. Ta bort locket från den nedre öppningen på förfilter.

Sätt in spiken ordentligt i förfilter. Ta INTE bort det övre locket på förfilter. Stäng klämman precis nedanför luftvakten med en peang (se klämma 2, Figur 7.11 på sidan 167). Detta förhindrar att den beredda cellsuspensionen i Cell Preparation Bag når förfilter och slangset.

Anslutning av Cell Preparation Bag

Anslut Cell Preparation Bag innehållande de magnetiskt märkta och tvättade cellerna till slangsetet. Spike Cell Preparation Bag med förfilter och säkerställ att septumet är punkterat för fritt flöde av vätska. Kläm försiktigt på påsen för att säkerställa att spiken har penetrerat påsen.

Installation på CliniMACS Plus Instrument

Häng buffertpåsen på den vänstra påhängaren, Cell Preparation Bag på den mellersta påhängaren och Priming Waste Bag på den högra påhängaren på instrumentet.

Fortsätt genom att trycka på ENT.

► Anslut uppsamlingspåsen för priming och sätt in förkolonn

Se sidan 150.

► Sätt in separationskolonn och ladda ventil nr 5

Se sidan 151.

► Ladda ventil nr 1, 2, 3 och 4

Se sidan 152.

► Ladda pumpslang

Se sidan 153.

► **Ladda ventil nr 7 och 8**

Se sidan 154.

► **Ladda ventil nr 6, 9, 10 och 11**

Se sidan 154.

► **Kontrollera alla slangar och anslutningar igen**

Se sidan 155.

► **Placering av ventiler**

Se sidan 155.

Anslut CliniMACS PBS/EDTA Buffer

I fönstret indikeras Skärm 7.51.

1. Buffertpåsen anslöts under "Förberedelse för installation av slangset". Därför kanske endast höjden på buffertpåsens hängare behöver justeras. Hög eller sänk påshängaren för att rymma storleken på buffertpåsen och säkerställ att höjden är tillräcklig för att förhindra slangen från allvarlig böjning som kan förhindra vätskeflödet och tillräckligt lågt för att förhindra sträckning av slangen eller anslutningar.
2. Ta bort den låsande peangen från slangen precis nedanför buffertspiken.

Fortsätt genom att trycka på **ENT**.

► **Starta priming**

Se sidan 157.

► **Kontroll under priming**

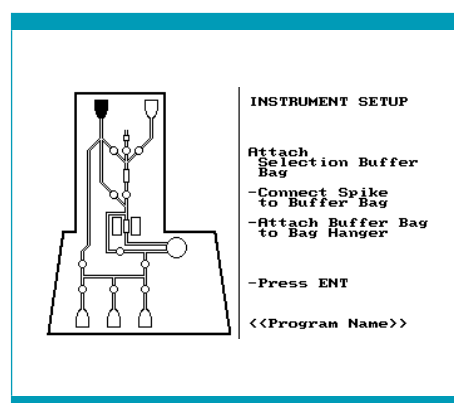
Se sidan 157.

► **Slutlig kontroll av alla slangar och anslutningar**

Se sidan 158.

► **Integritetstest**

Se sidan 158.



Skärm 7.51: Anslut buffertpåse

Anslut Cell Preparation Bag (och förfilter)

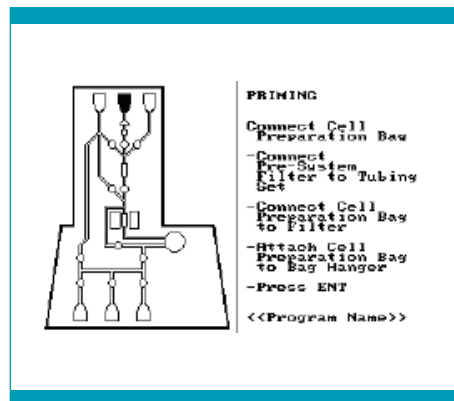
I fönstret indikeras Skärm 7.52.

1. Cell Preparation Bag och förfilter anslöts under "Förberedelse för installation av slangset".
2. Ta bort den låsande peangen nedanför luftvakten.

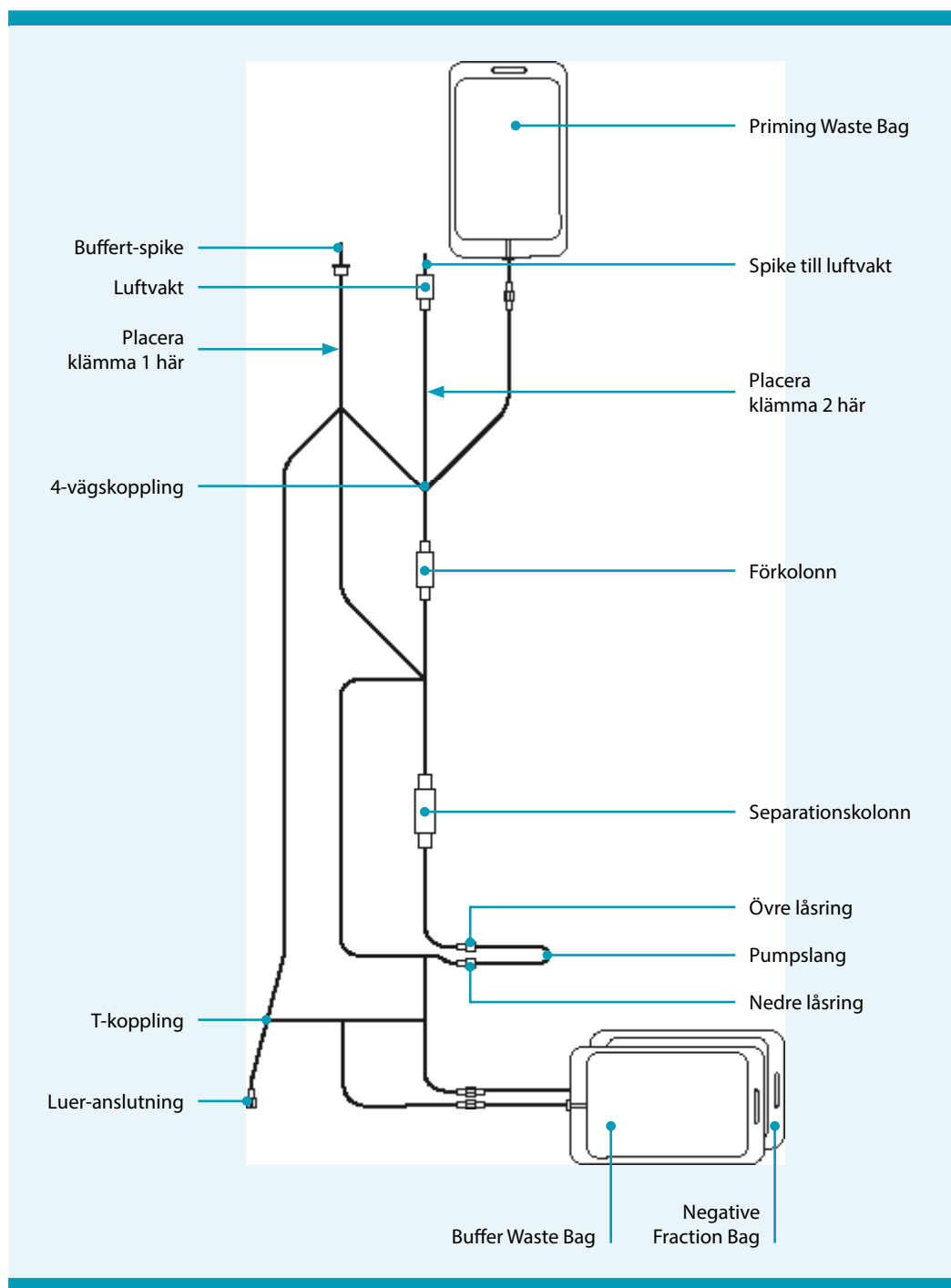
Fortsätt genom att trycka på **ENT**.

► Slutlig kontroll av vätskesensorn

Se sidan 161.

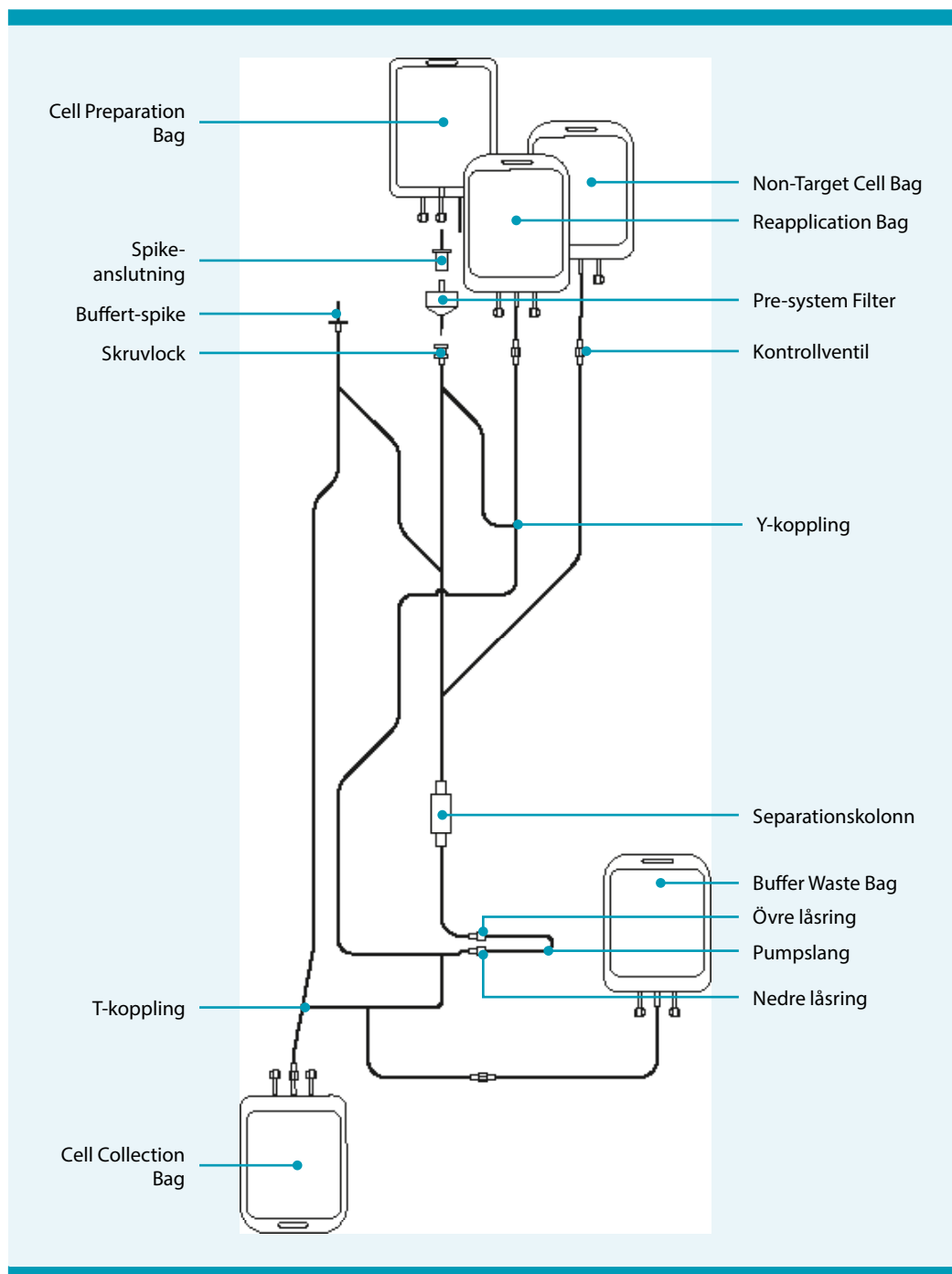


Skärm 7.52: Anslut Cell Preparation Bag



Figur 7.11: Allmän konstruktion av ett CliniMACS Tubing Set (t.ex. CliniMACS Tubing Set) med klämsposition 1 och 2

7.3.3 CliniMACS Depletion slangset



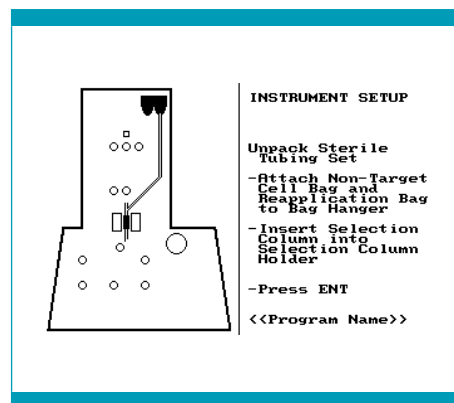
Figur 7.12: Allmän konstruktion av ett CliniMACS Depletion Tubing Set

Förberedelse för installation av slangset

I fönstret indikeras Skärm 7.53.

Anvisningen visas till höger och ett diagram som motsvarar anvisningen visas till vänster. De blinkande funktionerna på skärmen indikerar områden att vara uppmärksam på.

CliniMACS Depletion Tubing Set levereras i en förseglad, steriliserad förpackning. Varje slangset innehåller förmonterade slangar, kolonn och påsar för en cellseparation (se Figur 7.12). När förpackningen är intakt är flödesvägen steril.



Skärm 7.53: Packa upp slangset

Notera: CliniMACS Plus Instrument visar det valda programnamnet, t.ex. DEPLETION 3.1, på den nedre raden. Vid alla steg under installationen av slangsetet kan du trycka på knappen "Undo" (ångra) (se avsnittet "Beskrivning" i användarhandboken för CliniMACS Plus Instrument) för att återgå till föregående steg.

1. Registrera lotnummer och utgångsdatum för slangsetet.

Packa upp det sterila slangsetet under sterila förhållanden (t.ex. i laminärt flödesskåp). Ta bort klämman som använts för förpackning innan du använder slangsetet. Klämman är märkt med "Remove before assembly to CliniMACS Plus Instrument" (ta bort före montering på CliniMACS Plus Instrument).

2. Kontrollera luer-lock-anslutningar till påsar. Luer-lock måste var ordentligt åtdragna.

Cell Collection Bag

CliniMACS Depletion Tubing Set levereras med en ansluten Cell Collection Bag. Registrera vikten på den tomma Cell Collection Bag. Om mer än en celBuffer Waste Bag gör en separation, anslut påsarna med ett transferset för plasma. Kontrollera att alla anslutningar är hårt åtdragna. Registrera vikten på den/de tomma Cell Preparation Bag(s).

Anslut Non-Target Cell Bag, Reapplication Bag och sätt in separationskolonnen

1. Anslut Non-Target Cell Bag och Reapplication Bag till höger påhängare på instrumentet (se Figur 7.13).
2. Justera höjden på påhängaren. Hög eller sänk påhängaren för att anpassa höjden efter storleken på Non-Target Cell Bag och Reapplication Bag. Säkerställ att de är placerade tillräckligt högt för att förhindra allvarlig böjning av slangen som kan förhindra flödet och att den är tillräckligt lågt för att förhindra att slangar eller anslutningar sträcks.

OBS

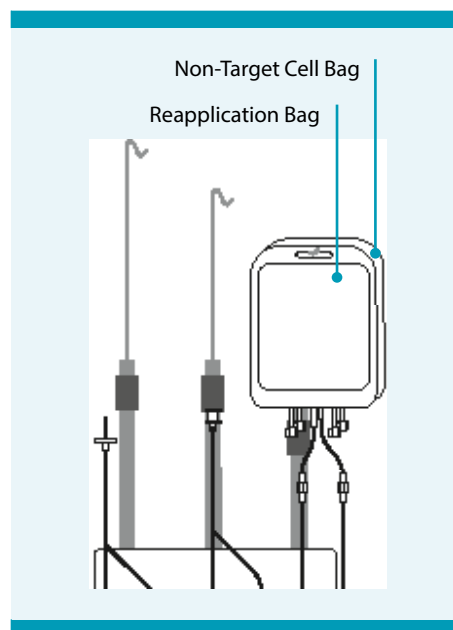
Risk för skada på instrumentet. Överbelastning av påhängarna kan skada instrumentet. Bärkapaciteten hos en enskild påhängare är 3 kg. Överbelasta inte påhängarna.

3. Sätt in separationskolonnen i hållaren för separationskolonn (se Figur 7.14).

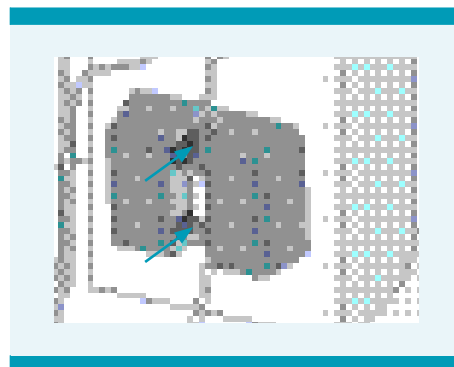
⚠ VARNING

Risikförskada. Om separationskolonnen sätts in eller tas ut när magnetenheten är påslagen finns en risk för personskada. Sätt bara in eller ta ut separationskolonnen när magnetenheten är avstängd.

Fortsätt genom att trycka på ENT.



Figur 7.13: Anslut Non-Target Cell Bag och Reapplication Bag



Figur 7.14: Separationskolonn i hållare för separationskolonn

Ladda ventil nr 1, 2, 3, 4 och 5

I fönstret indikeras Skärm 7.54.

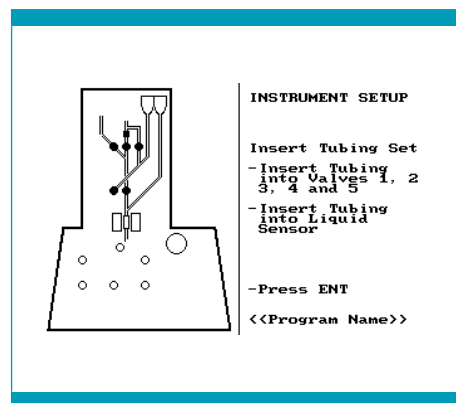
Ventilerna som visas på skärmen kommer att öppnas automatiskt.

1. Ladda slangen i ventil nr 1, 2, 3, 4 och 5.
2. Sätt in slangen ovanför ventil nr 2 i vätskesensorn (se Figur 7.15).

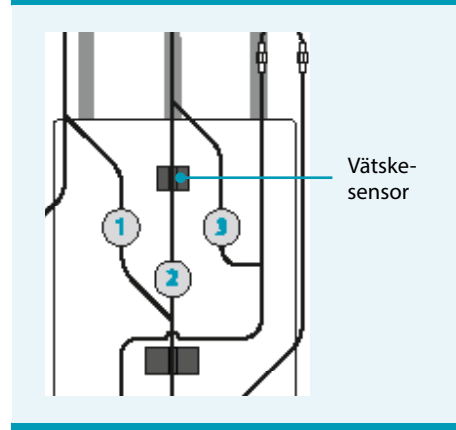
VIKTIGT

- För att säkerställa korrekt drift måste både vätskesensorn och slangen som sätts in vara torr. Inspektera båda noggrant. Om det finns vätska, torka området med en mjuk, luddfri duk.
- I takt med att varje steg utförs, kontrollera alla slangar och anslutningar för veck eller allvarliga böjningar som kan förhindra flödet av vätska genom slangen. Kontrollera alla ventiler för att säkerställa att slangen sitter tätt.
- Sätt bara in slangsetet i öppna ventiler (när knappen är intryckt). Slangen passar inte om den sätts in i en stängd ventil.
- Om slangen måste justeras efter att en ventil har stängts, dra i inte slangen utan att trycka på ventilknappen för att öppna ventilen (se Figur 7.16)

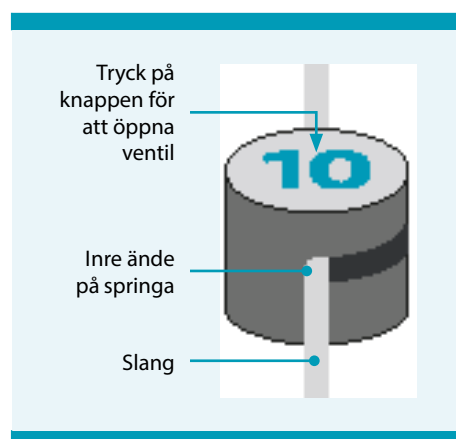
Fortsätt genom att trycka på ENT.



Skärm 7.54: Ladda ventil nr 1, 2, 3, 4 och 5



Figur 7.15: Slangar i ventil



Figur 7.16: Korrekt insatt slang

Ladda pumpslang

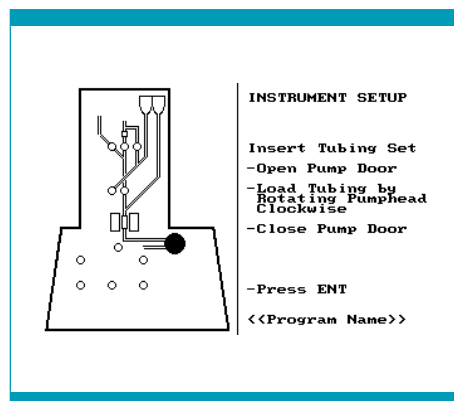
I fönstret indikeras Skärm 7.55.

1. Öppna pumpdörren genom att lyfta i den vänstra kanten.
2. Sätt in den övre låsringen på pumpslangen i låsringens skåra på pumphöljet (se Figur 7.17).
3. Roterar pumprullen medurs tills slangen går mellan de båda uppsättningarna av slangstyrstift och slangen sitter tätt runt pumprullen. Säkerställ att slangen inte kläms i slutet av styrstiften. (om justering av slangen i pumpen är nödvändig kan du ta bort slangen genom att lyfta den nedre änden och vrida pumprullen moturs.)
4. Sätt in den lägre låsringen på pumpslangen i låsringens skåra på pumphöljet.
5. Upprepa rotationen medurs på pumprullen för att säkerställa att pumprullen rör sig fritt.
6. Stäng pumpdörren.

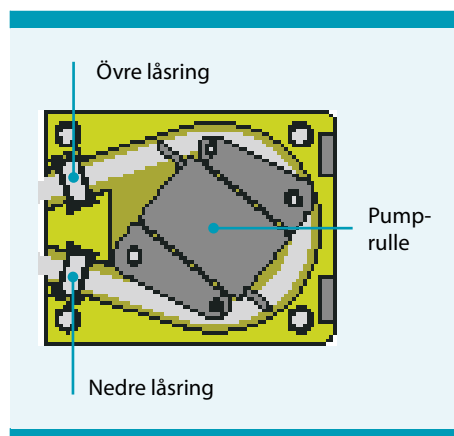
VIKTIGT

Under cellseparationen kommer pumpen omedelbart att stanna om pumphöljet öppnas. Om det lämnas öppet under mer än 600 sekunder kommer instrumentet att avbryta den aktuella körningen.

Fortsätt genom att trycka på **ENT**.



Skärm 7.55: Ladda pumpslang



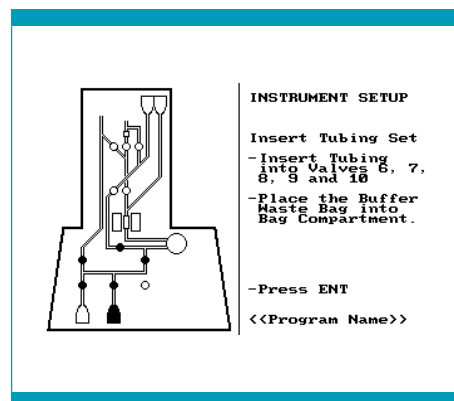
Figur 7.17: Ladda pumpslang

Ladda ventil nr 6, 7, 8, 9 och 10

I fönstret indikeras Skärm 7.56.

1. Ladda slangen i ventil nr 6, 7, 8, 9 och 10. Säkerställ att slangen är säkert placerad i ventilöppningen.
2. Placera Buffer Waste Bag i påsfacket. Säkerställ att slangarna inte är komprimerade under påsfackets lock.
3. Säkerställ att obehindrat flöde till Cell Collection Bag är möjligt.

Fortsätt genom att trycka på **ENT**.



Skärm 7.56: Ladda ventil nr 6, 7, 8, 9 och 10

Kontrollera alla slangar och anslutningar igen

I fönstret indikeras Skärm 7.57.

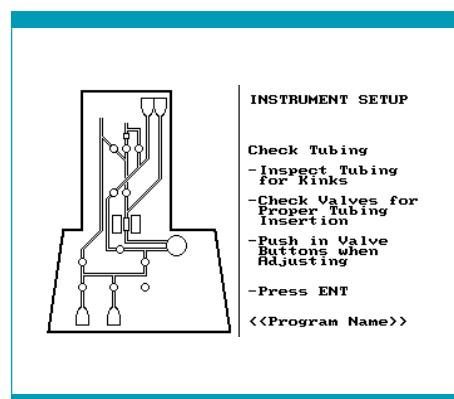
1. Börja med ventil nr 1 och säkerställa att slangen sitter fast ordentligt och är korrekt placerade i varje ventil.

Inspektera i varje ventil på nytt! Säkerställ att slangen går in och ut i varje ventil genom förstoringen vid den inre änden av springan (se Figur 7.16).

2. Kontrollera att slangen inte är veckad eller vriden.

Notera: Om slangen måste justeras efter att en ventil har stängts, dra i inte slangen utan att trycka på ventilknappen för att öppna ventilen.

Fortsätt genom att trycka på **ENT**.



Skärm 7.57: Kontrollera alla slangar och anslutningar igen

Placering av ventiler

I fönstret indikeras Skärm 7.58.

För att säkerställa korrekt passning av slangen i ventilerna kommer instrumentet att använda alla ventiler i ordning, två gånger. Titta och lyssna för att säkerställa att alla ventiler fungerar korrekt. Om några ventiler inte fungerar korrekt, se kapitel 8 "Felsökning" på sidan 203. Du kan upprepa detta steg genom att trycka på ◀ följt av ENT (se avsnittet "Beskrivning" i användarhandboken för CliniMACS Plus Instrument).

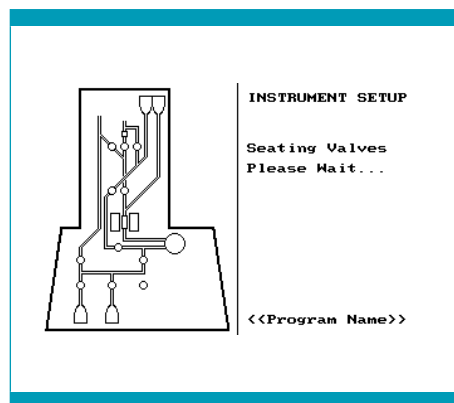
Magnetkopplingsdonet kommer också att testas under denna kontrollsekvens.

Anslut CliniMACS PBS/EDTA Buffer

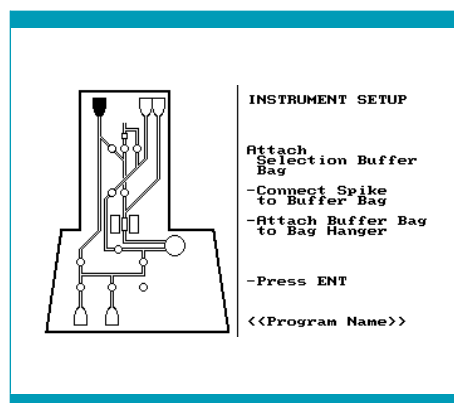
I fönstret indikeras Skärm 7.59.

Den ordinerade bufferten för CliniMACS Plus Separations är CliniMACS PBS/EDTA Buffer med tillsats av HSA till en slutlig koncentration på 0,5% (v/v)

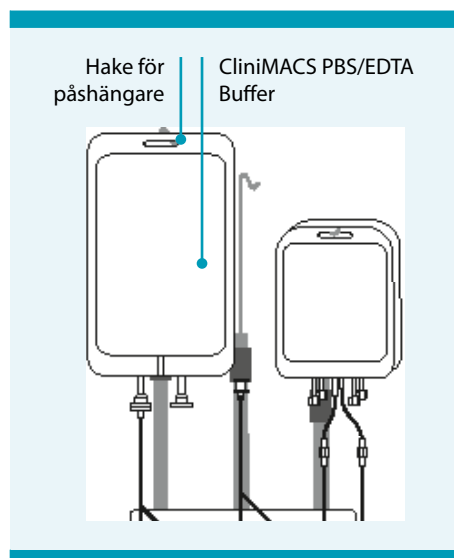
1. Använd aseptiska tekniker för att ta bort locket från buffertspiken (se Figur 7.12 på sidan 168) på slangsetet och anslut den till buffertpåsen. Säkerställ att septumet är punkterat för fritt flöde av vätska. Kläm försiktigt på påsen för att säkerställa att spiken har penetrerat påsen utan externt läckage.
2. Anslut en buffertpåse till buffertpåskroken på påshängaren (se Figur 7.18).
3. Justera höjden på buffertpåshängaren. Höj eller sänk påshängaren för att anpassa höjden efter storleken på buffertpåsen. Säkerställ att den är placerad tillräckligt högt för att förhindra allvarlig böjning av slangen som kan förhindra flödet och att den är tillräckligt lågt för att förhindra att slangar eller anslutningar sträcks.



Skärm 7.58: Placering av ventiler



Skärm 7.59: Anslut buffertpåse



Figur 7.18: Anslut buffertpåse

VIKTIGT

På grund av flera gravimetriska priming- och sköljningssteg är det viktigt att buffertpåsen är placerad så högt som möjligt, så säkerställ att den är högre än Reapplication Bag och Non-Target Cell Bag (se Figur 7.20 på sidan 179).

Fortsätt genom att trycka på **ENT**.

Starta priming

I fönstret indikeras Skärm 7.60.

Starta primingen genom att trycka på **RUN (kör)**.

I fönstret indikeras Skärm 7.61.

Under primingfasen fylls slangsetet med Clini-MACS PBS/EDTA Buffer. Bufferten kommer att cirkulera genom slangsetet inklusive separationskolonnen. Primingvätska samlas in i uppsamlingspåsen för buffert, Reapplication Bag och Non-Target Cell Bag medan Cell Collection Bag förblir tom (se Figur 7.12 på sidan 168). Primingcyklerna fortsätter och upprepar en serie steg.

Primingfasen tar cirka 2,5 minuter. Primingstatus kommer att uppdateras på displayen.

Kontroll under priming

Under primingfasen ska alla slangar, kopplingar, ventiler och separationskolonnen kontrolleras för läckage eller förekomst av veck som kan blockera vätskeflödet.

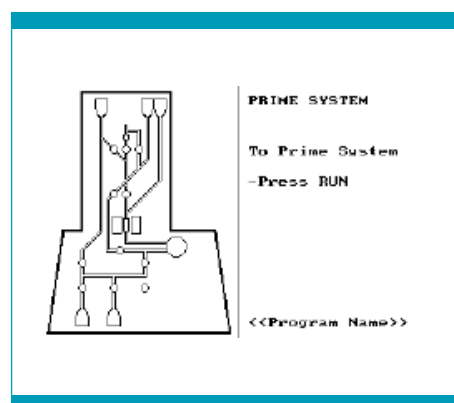
Om läckage eller funktionsfel observeras, tryck på **STOP** för att avsluta körningen.

Operatören har 600 sekunder på sig att lösa problemet.

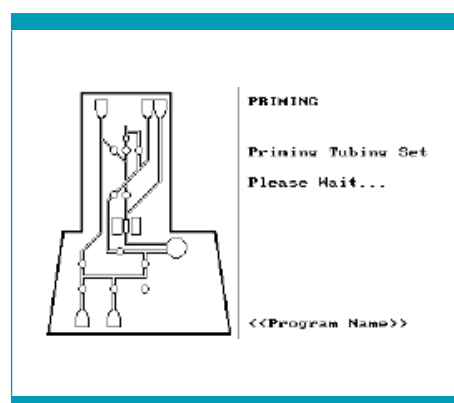
Återuppta processen genom att trycka på **RUN**.

Efter 600 sekunder avbryts separationen. Om operatören inte kan lösa problemet eller om slangsetet är defekt, ta bort slangsetet och byt ut det mot ett nytt.

Notera: När primingen har startat är det inte möjligt att återgå till instrumentinställningen.



Skärm 7.60: Starta priming



Skärm 7.61: Priming pågår

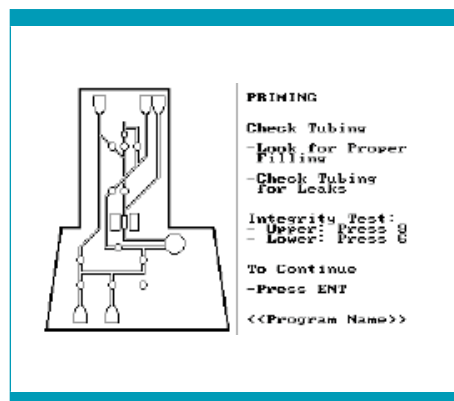
Slutlig kontroll av alla slangar och anslutningar

I fönstret indikeras Skärm 7.62.

Kontrollera följande före körningen:

- vätska i alla delar av slangsetet förutom i slangens ovanför ventil nr 2 och 3
- inget överskott av luft i slangsetet
- vätska i Reapplication Bag, Buffer Waste Bag och Non-Target Cell Bag
- ingen vätska i Cell Collection Bag

Tryck inte på ENT ännu.



Skärm 7.62: Slutlig kontroll av slangar och anslutningar

Integritetstest

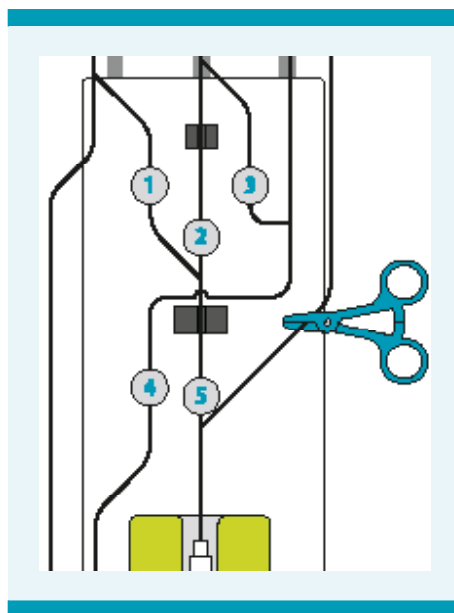
För ytterligare säkerhet måste ett integritetstest utföras för att testa slangsetet för läckage. Testsekvensen består av två automatiserade sekvenser som innebär att både de övre och nedre delarna av slangsetet övertrycksätts och observeras separat.

⚠ FÖRSIKTIGHET

Risk för processfördröjning. Om klämman nedanför Non-Target Cell Bag inte har tagits bort efter avslutat integritetstest, kunde icke-målceller (märkta) inte tas bort från separationskolonn under eluering. Ytterligare kvarhållning av icke-målceller blir omöjlig. Separationsproceduren måste upprepas. Ta bort klämman efter avslutat integritetstest.

VIKTIGT

Integritetstestet kommer bara att fungera på rätt sätt om slangens har en klämma nedanför Non-Target Cell Bag. Sätt en klämma på slangens nedanför Non-Target Cell Bag innan du startar integritetstestet. Ta bort klämman efter att integritetstestet är avslutat.



Figur 7.19: Förberedelse för integritetstest

Integritetstest för den övre delen av slangsetet

1. När operatören utför "Slutlig kontroll av alla slangar och anslutningar" visas Skärm 7.63 i fönstret.
2. Efter att du utfört "Slutlig kontroll av alla slangar och anslutningar" **tryck** inte på **ENT**.
3. För att komma till integritetstestet för den övre delen, tryck på **9**.

I fönstret indikeras Skärm 7.64.

VIKTIGT

Placera en klämma på slangen nedanför kontrollventilen på Non-Target Cell Bag.

4. Start testsekvensen genom att trycka på **RUN**.

Återgå till Skärm 7.63 genom att trycka på **◀**.

5. När du har tryckt på **RUN** startar instrumentet den automatiska testsekvensen för slangsetets övre del.

I fönstret indikeras Skärm 7.65.

Övertryck kommer att skapas och kvarstå i två minuter. Under den här tiden ska operatören kontrollera alla anslutningar ovanför den övre pumpslanganslutningen.

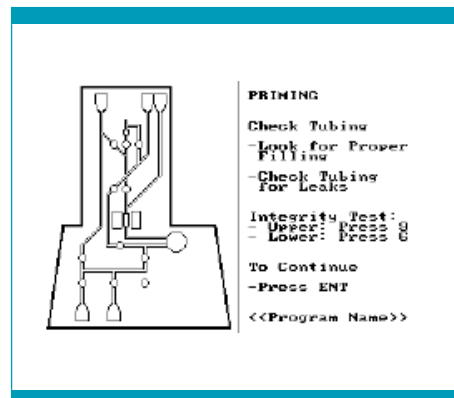
Vid varje punkt kan du avsluta testsekvensen genom att trycka på **ENT**.

6. Efter två minuter försvinner trycket automatisk och i fönstret visas Skärm 7.63.

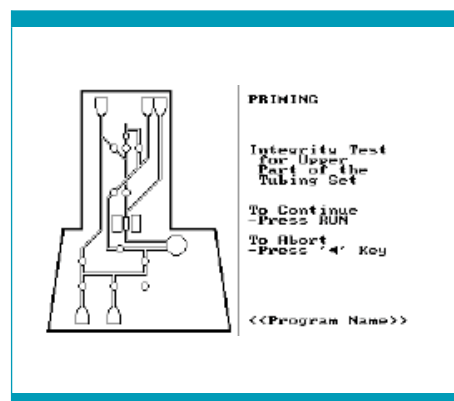
Kontrollera om det har uppkommit något läckage under testsekvensen. Om läckage har observerats vid någon anslutning av slangsetet måste slangsetet tas bort och bytas ut mot ett nytt.

Kontakta Miltenyi Biotec Technical Support för anvisningar om hur returnerar det defekta slangsetet.

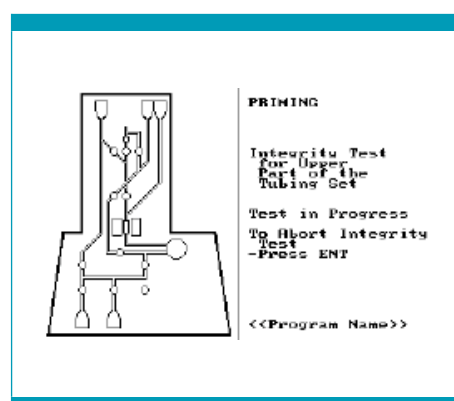
7. Om inget läckage observeras, fortsätt med integritetstestet av den nedre delen av slangsetet.



Skärm 7.63: Starta integritetstest för övre del



Skärm 7.64: Starta integritetstest för övre del



Skärm 7.65: Starta integritetstest för övre del

Integritetstest för den nedre delen av slangsetet

I fönstret indikeras Skärm 7.63.

1. För att komma till integritetstestet, tryck på 6.

Tryck inte på ENT.

I fönstret indikeras Skärm 7.66.

2. Start testsekvensen genom att trycka på **RUN**.

Återgå till Skärm 7.63 genom att trycka på ◀.

3. När du har tryckt på **RUN** startar instrumentet den automatiserade testsekvensen för slangsetets nedre del.

I fönstret indikeras Skärm 7.67.

Övertryck kommer att skapas och kvarstå under 30 sekunder.

Under den här tiden ska operatören kontrollera den nedre pumpslanganslutningen och T-kopplingarna mellan ventil 6, 8, 9 och 10.

Vid varje punkt kan du avsluta testsekvensen genom att trycka på **ENT**.

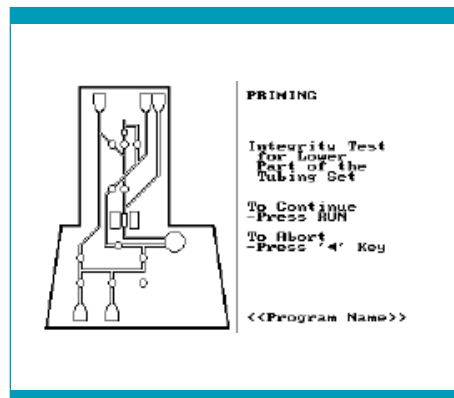
4. Efter 30 sekunder försvinner trycket automatisk och i fönstret visas Skärm 7.63.

Operatören måste kontrollera om det har uppkommit något läckage under testsekvensen. Om läckage har observerats vid någon anslutning av slangsetet måste slangsetet tas bort och bytas ut till ett nytt.

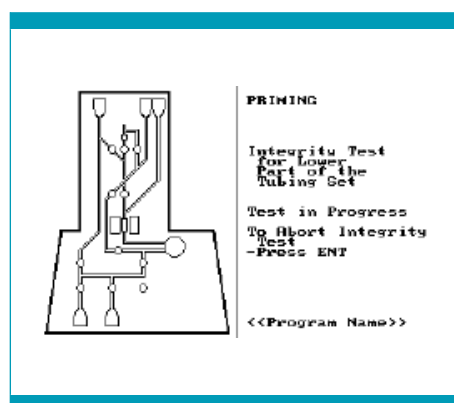
Kontakta Miltenyi Biotec Technical Support för anvisningar om hur returnerar det defekta slangsetet.

5. **Öppna vägen till Non-Target Cell Bag genom att ta bort klämman nedanför kontrollventilen.**

6. Om inga läckage observeras kan operatören nu fortsätta med nästa steg genom att trycka på **ENT**.



Skärm 7.66: Starta integritetstest för nedre del



Skärm 7.67: Integritetstest för nedre del pågår

Anslut Cell Preparation Bag

I fönstret indikeras Skärm 7.68.

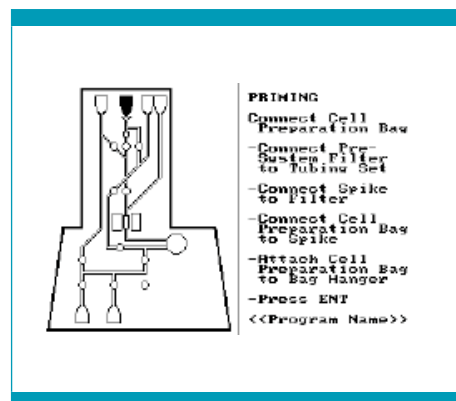
Anslut Cell Preparation Bag (innehållande de magnetiskt märkta och tvättade cellerna) till slangsetet:

1. Ta bort skruvlocket (se Figur 7.12 på sidan 168) från slangsetet.
2. Ta bort locket från spiken på förfilter. Sätt in spiken på förfilter ordentligt i slangsetet och säkerställa att septumet är punkterat.
3. Ta bort locken från förfilter och den trubbiga änden på spike-anslutningen och koppla ihop dem.
4. Ta bort det andra locket från spike-anslutningen och anslut spiken till Cell Preparation Bag och säkerställ att septumet är punkterat för fritt flöde av vätska. Kläm försiktigt på påsen för att säkerställa att spiken har penetrerat påsen.
5. Kontrollera anslutningen mellan Cell Preparation Bag, spike-anslutning, förfilter och slangset för att bekräfta att anslutningen är säker.
6. Häng Cell Preparation Bag på påhängaren (se Figur 7.21).
7. Kontrollera att påsar och slangar som är anslutna till påhängaren varken är sträckta eller böjda.

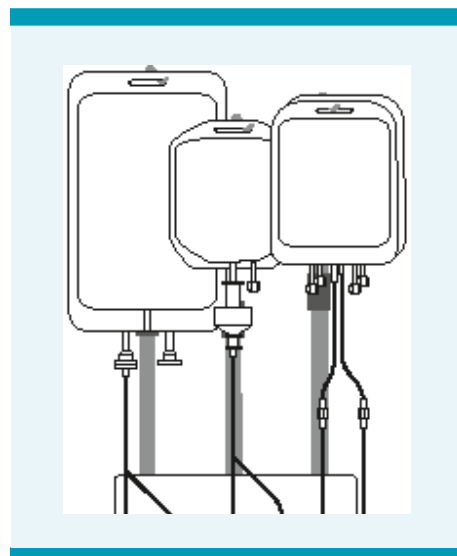
På grund av gravimetriska priming- och sköljningssteg under den automatiserade separationen är det mycket viktigt att påsarna är i rätt nivå. För att säkerställa hela provtagningsprocessen är det även viktigt att placera Reapplication och Non-Target Cell Bag högre än Cell Preparation Bag (se Figur 7.20):

- **Hösta position:** buffertpåse
- **Mellanposition:** Reapplication och Non-Target Cell Bag
- **Lägsta position:** Cell Preparation Bag

Fortsätt genom att trycka på ENT.



Skärm 7.68: Anslut Cell Preparation Bag



Figur 7.20: Påsar i rätt nivå

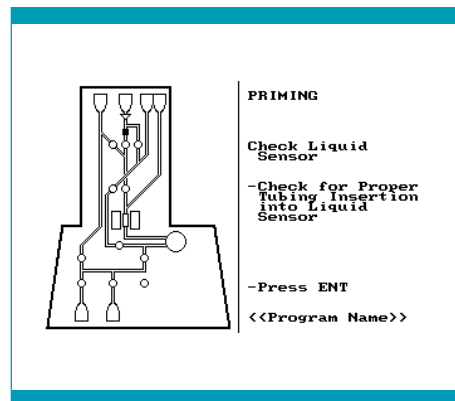
Slutlig kontroll av vätskesensorn

I fönstret indikeras Skärm 7.69.

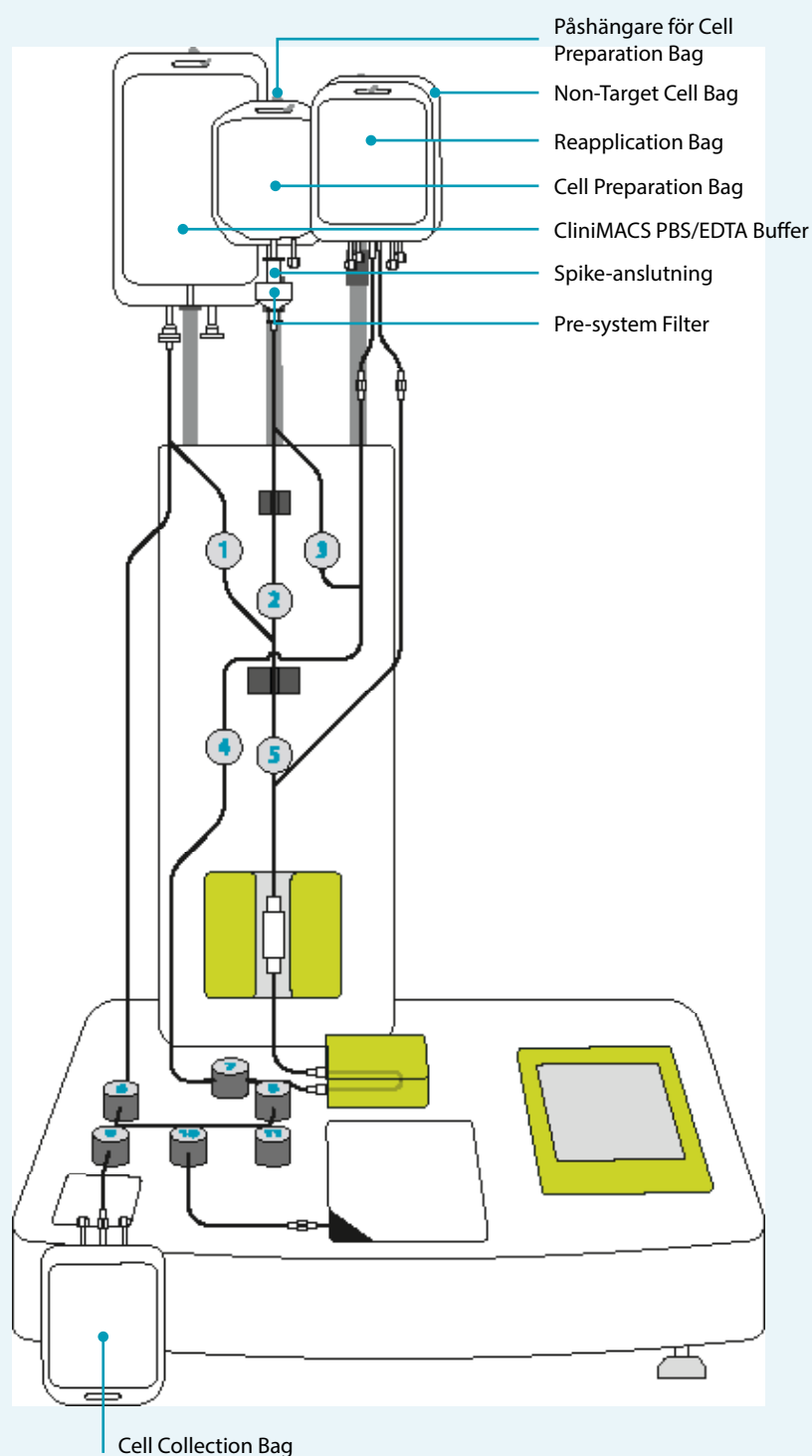
1. Kontrollera vätskesensorns slang. Säkerställ att slangen är korrekt insatt, att den är fri från extern vätska och inte har lossnat under laddningsproceduren.
2. Kontrollera att obehindrat vätskeflöde är möjligt till varje påse.

Fortsätt genom att trycka på **ENT**.

► **Gå till STEG 4**



Skärm 7.69: Slutlig kontroll av vätskesensorn



Figur 7.21: CliniMACS Plus Instrument med CliniMACS Depletion Tubing Set, CliniMACS PBS/EDTA Buffer, Cell Preparation Bag och Cell Collection Bag

7.4 STEG 4: CliniMACS Plus-separation

7.4.1 CD34 SELECTION 1/2

När den slutliga kontrollen är avslutad är CliniMACS Plus Instrument redo att påbörja separationen. I fönstret indikeras Skärm 7.70.

Fortsätt genom att trycka på **RUN**.

När du har tryckt på **RUN** kommer instrumentet automatiskt att utföra den valda separationsprocessen.

Vid varje del av processen visas en skärm som liknar Skärm 7.71 för att visa status på separationsproceduren.

Magnetpositionsindikatorn visas som två svarta rutor bredvid separationskolonnen när magneten är "ON", dvs. den har flyttats till framsidan för att magnetisera separationskolonnen. Om magnetpositionsindikatorn är transparent (t.ex. Skärm 7.70) är magneten "OFF", dvs. den har flyttats till instrumentets baksida. När magneten har dragits tillbaka är separationskolonnen utanför det magnetiska fältet och inte längre magnetiserad.

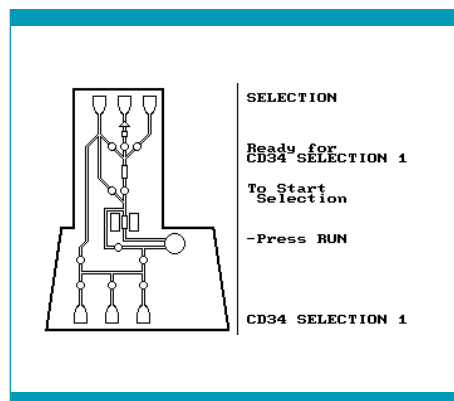
Notera: Olika programnamn kan visas på skärmen beroende på valt separationsprogram (CD34 SELECTION 1 eller 2).

Separationsprocedur

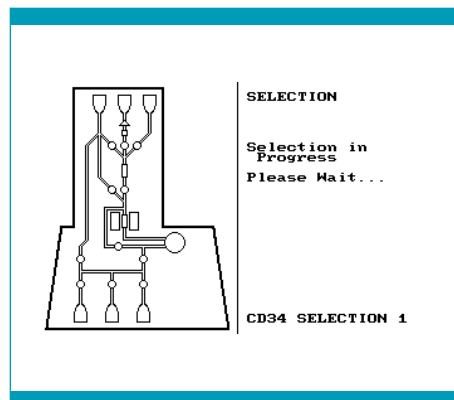
Ladda celler

Separationsproceduren börjar med fyllning av förfilter för att ta bort kvarvarande luft från förfilter.

Därefter påbörjas separationen av de märkta cellerna. Pumpen drar innehållet från Cell Preparation Bag till slangsetet och laddar cellprodukten via förkolonnen på separationskolonnen. De magnetiskt märkta cellerna (målceller) hålls kvar i separationskolonnen, placerad i det magnetiska fältet, medan de icke-märkta cellerna (icke-målseller) passerar igenom och samlas in i Negative Fraction Bag. När Cell Preparation Bag är tom (detekteras automatiskt av vätskesensorn) sköljs förfilter två gånger med buffert.



Skärm 7.70: Starta separation



Skärm 7.71: Separation pågår

Kolonntvätt I

Förkolonnen och separationskolonnen tvättas ordentligt för att ta bort alla icke-märkta celler. Tvättbuffert samlas in i uppsamlingspåsen för buffert. När "kolonntvätt I" påbörjas visas den tid som återstår tills separationsproceduren är avslutad.

VIKTIGT

I början av separationen pumpas buffert uppåt mot Cell Preparation Bag för att fylla förfilter. Knacka försiktigt på sidan av filtret flera gånger för att ta bort eventuella bubblor som kan vara fångade i filtret.

Frisättning av celler I

Magnet flyttas till instrumentets baksida ("OFF"-läge). De kvarhållna cellerna frisätts med hög hastighet, men cellerna blir kvar i en intern slangcykel.

Omladdning av celler I

Magnet flyttas till positionen "ON" igen för att magnetisera separationskolonnen och cellerna appliceras på nytt på separationskolonnen.

Kolonntvätt II

Omladdning av celler följs av ett andra tvättsteg för att bort kvarvarande icke-märkta celler. Även alla slangar sköljs flera gånger.

Frisättning av celler II, omladdning av celler II, kolonntvätt III

Cellerna frisätts och appliceras på separationskolonnen en andra gång för att ta bort eventuella icke-märkta celler som ospecifikt sitter fast på kolonnmatrisen. Därefter tvättas separationskolonnen igen.

Frisättning av celler III, omladdning av celler III, kolonntvätt IV

Separationsprogram CD34 SELECTION 2 inkluderar även ett tredje frisättnings- och återappliceringssteg.

Slutlig eluering av cellerna

Magnet flyttats till läget "OFF" och de magnetiskt märkta cellerna frisätts från separationskolonnen och samlas in i Cell Collection Bag.

Koppla bort påsar och registrera processkod

När körningen är avslutad visas Skärm 7.72 i fönstret.

1. Registrera processkoden.
2. Sätt en klämma på slangen ovanför luer-lockanslutningen som ansluter Cell Collection Bag till slangsetet (se Figur 7.22).

Gör tre hermetiska förseglingar på slangen precis nedanför ventil nr 9. Avskilj försiktigt den mellersta förseglingen för att koppla bort Cell Collection Bag från slangsetet.

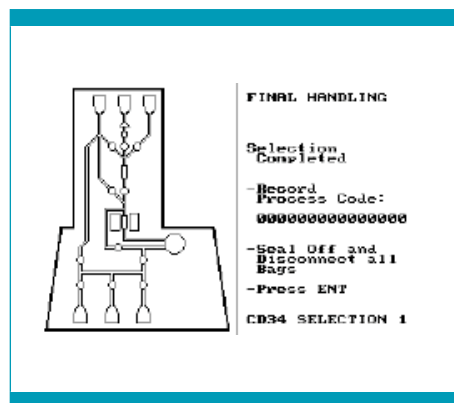
3. Väg den fyllda Cell Collection Bag. Registrera vikten.

Fastställ vikten på målcelsfraktionen genom att dra vikten på den tomma Cell Collection Bag från vikten på Cell Collection Bag som innehåller målcellerna. Registrera vikten.

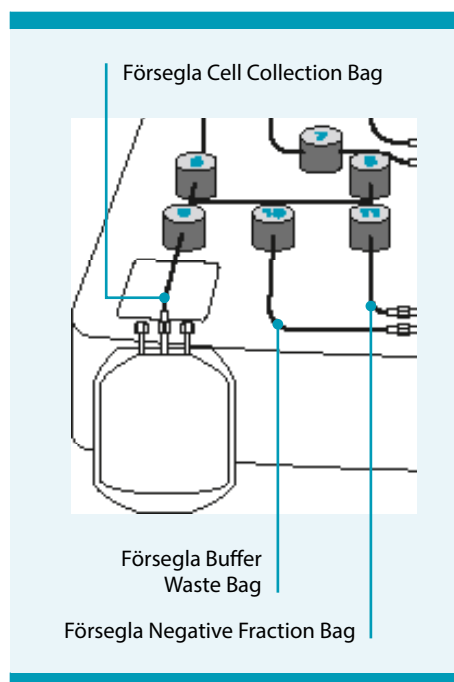
4. Blanda målcelsuspensionen noggrant genom att rotera påsen. Ta en lämplig mängd, t.ex. 0,5 mL och spara för analys.
5. Använd värmeförseglaren, försegla slangen ovanför luer lock på Negative Fraction Bag. Gör tre hermetiska förseglingar på slangen. Avskilj den mittersta förseglingen för att koppla bort Negative Fraction Bag.
6. Koppla bort Buffer Waste Bag på samma sätt.
7. Ta bort Negative Fraction Bag och uppsamlingspåsen för buffert. Spara alla påsar tills den slutliga analysen av alla celler är avslutad.

Målcellerna kan nu bearbetas i enlighet med kliniska protokoll.

Fortsätt genom att trycka på **RUN**.



Skärm 7.72: Koppla bort påsar och registrera processkod

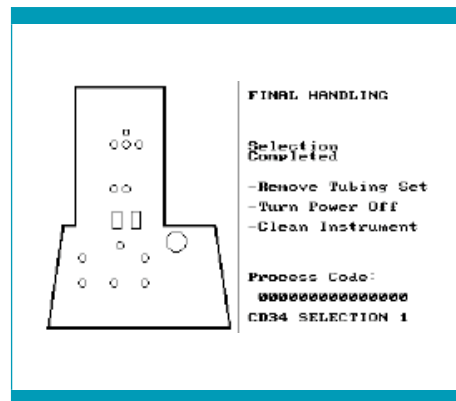


Figur 7.22: Koppla bort påsar

Ta bort slangset och stäng av

I fönstret indikeras Skärm 7.73.

1. Ta bort slangsetet: Börja med ventil nr 6, 9, 10 och 11 och arbeta uppåt, ta bort slangens från vätskesensorn och från ventilerna genom att trycka på ventilerna. Ta bort kolonnerna från kolonnhållarna. Kassera slangsetet som biologiskt riskmaterial enligt vanliga sjukhusprocedurer.
2. Stäng av CliniMACS Plus Instrument.
3. Rengör instrumentet enligt rengöringsanvisningarna, se avsnittet "Rengöring och desinfektion" i användarhandboken för CliniMACS Plus Instrument. Följ standardprocedurerna för behandling av infektiöst material.



Skärm 7.73: Ta bort slangset och stäng av

Analys av celler

VIKTIGT

CliniMACS PBS/EDTA Buffer behöver inte tas bort före administrering av de separerade målcellerna om volymen inte överskrider 100 mL per transplantat vid lämpliga infusionshastigheter. Patientens njurstatus och effekter på blodelektrolyter måste beaktas. Särskilt hos barn måste infusionshastigheterna justeras i enlighet härmed.

- *Om volymen på måcellsfraktionen överstiger 100 mL måste den minskas på lämpligt sätt, t.ex. genom centrifugering eller buffertbyte, till en infusionslösning som är godkänd i användarens namn.*

FÖRSIKTIGHET

Risk för nedsatt kvalitet på målceller. Målcellerna måste analyseras och bekräftas uppfylla användarkraven, i annat fall kan dess lämplighet för klinisk användning försämrats. Undersök målcellerna avseende kvalitet och kvantitet enligt deras avsedda användning.

Detta måste inkludera följande parametrar:

- totalt antal leukocyter
- viabilitet och totalt antal målceller
- renhet och återhämtning av målceller

Även totalt antal leukocyter och viabilitet på den cellfraktion som inte är målet bör fastställas. Listan är ett exempel och andra tester ska inkluderas baserat på avsedd användning och kliniska protokoll. Registrera analysdata.

7.4.2 ENRICHMENT 1.1

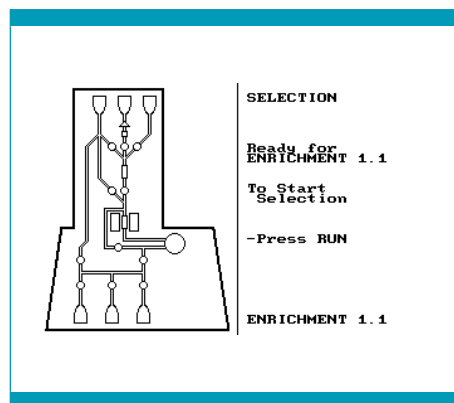
När den slutliga kontrollen är avslutad är CliniMACS Plus Instrument redo att påbörja separationen. I fönstret indikeras Skärm 7.74.

Fortsätt genom att trycka på **RUN**.

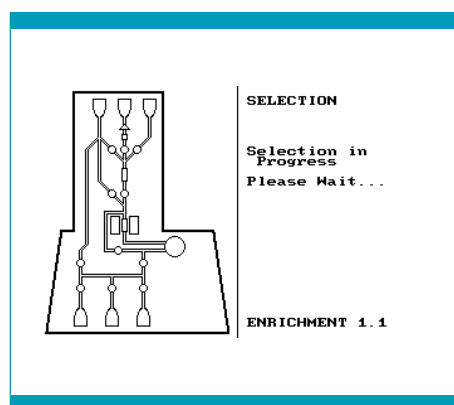
När du har tryckt på **RUN** kommer instrumentet automatiskt att utföra den valda separationsprocessen.

Vid varje del av processen visas en skärm som liknar Skärm 7.75 för att visa status på separationsproceduren.

Magnetpositionsindikatorn visas som två svarta rutor bredvid separationskolonnen när magneten är "ON", dvs. den har flyttats till framsidan för att magnetisera separationskolonnen. Om magnetpositionsindikatorn är transparent (t.ex. Skärm 7.74) är magneten "OFF", dvs. den har flyttats till instrumentets baksida. När magneten har dragits tillbaka är separationskolonnen utanför det magnetiska fältet och inte magnetiserad.



Skärm 7.74: Starta separation



Skärm 7.75: Separation pågår

Separationsprocedur

Ladda celler

Separationsproceduren börjar med fyllning av förfilter för att ta bort kvarvarande luft från förfilter. Därefter påbörjas separationen av de märkta cellerna. Pumpen drar innehållet från Cell Preparation Bag till slangsetet och laddar cellprodukten via förkolonnen på separationskolonnen. De magnetiskt märkta cellerna (målceller) hålls kvar i separationskolonnen, placerad i det magnetiska fältet, medan de icke-märkta cellerna (icke-målsceller) passerar igenom och samlas in i Negative Fraction Bag.

VIKTIGT

I början av separationen pumpas buffert uppåt mot Cell Preparation Bag för att fylla förfilter. Knacka försiktigt på sidan av filtret flera gånger för att ta bort eventuella bubblor som kan vara fångade i filtret.

Notera:

- Om antalet magnetiskt märkta celler (beräknas av CliniMACS Plus programvara) överstiger bindningskapaciteten hos separationskolonnen laddar och separerar separationsprogram automatisk cellprovet i lämpliga delar ("staged loading").
- Laddningen upphör när kapaciteten i separationskolonnen har uppnåtts och separationsprogrammet kommer att gå vidare till nästa steg i separationen. Efter att det sista steget (slutlig eluering av celler) är avslutat kommer nästa del av provet att laddas och bearbetas på kolonnen.

Kolonntvätt I

Förkolonnen och separationskolonnen tvättas ordentligt för att ta bort alla icke-märkta celler. Tvättbuffert samlas in i uppsamlingspåsen för buffert.

Frisättning av celler

Magnet flyttas till instrumentets baksida ("OFF"-läge). De kvarhållna cellerna frisätts med hög hastighet, men blir kvar i en intern slangcykel.

Omladdning av celler

Magnet flyttas till positionen "ON" igen för att magnetisera separationskolonnen och cellerna appliceras på nytt på separationskolonnen.

Kolonntvätt II

Omladdning av celler följs av en andra kolonntvätt för att ta bort kvarvarande icke-märkta celler. Även slangarna sköljs flera gånger.

Slutlig eluering av cellerna

Magneten flyttas till läget "OFF" och de magnetiskt märkta cellerna frisätts från separationskolonnen och samlas in i Cell Collection Bag.

Koppla bort påsar och registrera processkod

När körningen är avslutad visas Skärm 7.76 i fönstret.

1. Registrera processkoden.
2. Sätt en klämma på slangen ovanför luer-lockanslutningen som ansluter Cell Collection Bag till slangsetet (se Figur 7.23).

Gör tre hermetiska förseglingar på slangen precis nedanför ventil nr 9. Avskilj försiktigt den mellersta förseglingen för att koppla bort Cell Collection Bag från slangsetet.

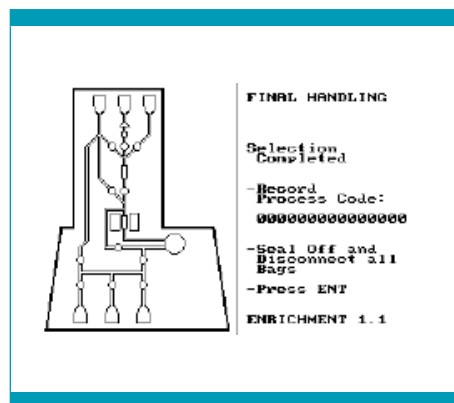
3. Väg den fyllda Cell Collection Bag. Registrera vikten.

Fastställ vikten på måncellsfraktionen genom att dra vikten på den tomma Cell Collection Bag från vikten på Cell Collection Bag som innehåller måncellerna. Registrera vikten.

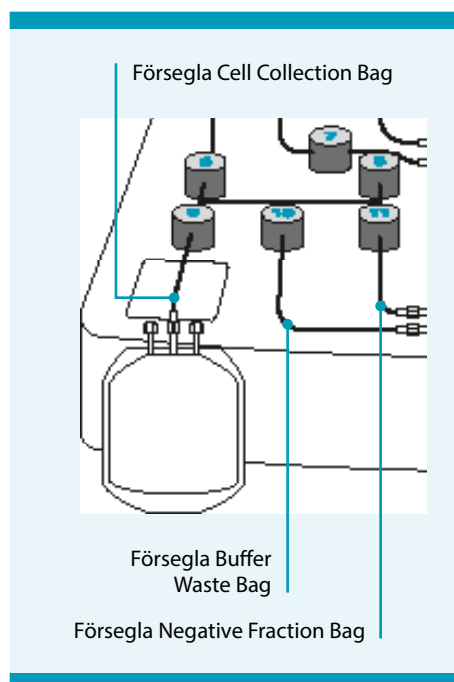
4. Blanda måncellssuspensionen noggrant genom att rotera påsen. Ta en lämplig mängd, t.ex. 0,5 mL och spara för analys.
5. Använd värmeförseglaren, försegla slangen ovanför luer lock på Negative Fraction Bag. Gör tre hermetiska förseglingar på slangen. Avskilj den mittersta förseglingen för att koppla bort Negative Fraction Bag.
6. Koppla bort Buffer Waste Bag på samma sätt.
7. Ta bort Negative Fraction Bag och uppsamlingspåsen för buffert. Spara alla påsar tills den slutliga analysen av alla celler är avslutad.

Måncellerna kan nu bearbetas i enlighet med kliniska protokoll.

Fortsätt genom att trycka på **ENT**.



Skärm 7.76: Koppla bort påsar och registrera processkod

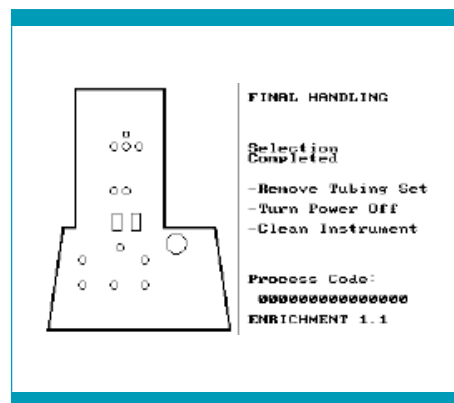


Figur 7.23: Koppla bort påsar

Ta bort slangset och stäng av

I fönstret indikeras Skärm 7.77.

1. Ta bort slangsetet: Börja med ventil nr 6, 9, 10 och 11 och arbeta uppåt, ta bort slang-en från vätskesensorn och från ventilerna genom att trycka på ventilerna. Ta bort kolonnerna från kolonnhållarna. Kassera slangsetet som biologiskt riskmaterial enligt vanliga sjukhusprocedurer.
2. Stäng av CliniMACS Plus Instrument.
3. Rengör instrumentet enligt rengöringsanvisningarna, se avsnittet "Rengöring och desinfektion" i användarhandboken för CliniMACS Plus Instrument. Följ standard-procedureerna för behandling av infektiöst material.



Skärm 7.77: Ta bort slangset och stäng av

Analys av celler

VIKTIGT

- *CliniMACS PBS/EDTA Buffer behöver inte tas bort före administrering av de separerade målcellerna om volymen inte överskrider 100 mL per transplantat vid lämpliga infusionshastigheter. Patientens njurstatus och effekter på blodelektrolyter måste beaktas. Särskilt hos barn måste infusionshastigheterna justeras i enlighet härmed.*
- *Om volymen på målcellsfraktionen överstiger 100 mL måste den minskas på lämpligt sätt, t.ex. genom centrifugering eller buffertbyte, till en infusionslösning som är godkänd i användarens namn.*

FÖRSIKTIGHET

Risk för nedsatt kvalitet på målceller. Målcellerna måste analyseras och bekräftas uppfylla användarkraven, i annat fall kan dess lämplighet för klinisk användning försämrats. Undersök målcellerna avseende kvalitet och kvantitet enligt deras avsedda användning.

Detta måste inkludera följande parametrar:

- totalt antal leukocyter
- viabilitet och totalt antal målceller
- renhet (depletionseffekt) och återhämtning av målceller

Även totalt antal leukocyter och viabilitet på den cellfraktion som inte är målet bör fastställas. Listan är ett exempel och andra tester ska inkluderas baserat på avsedd användning och kliniska protokoll. Registrera analysdata.

7.4.3 ENRICHMENT 3.2

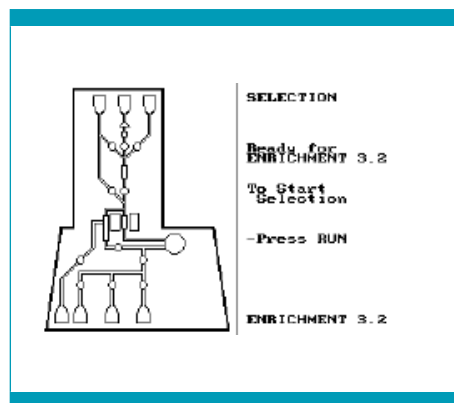
När den slutliga kontrollen är avslutad är CliniMACS Plus Instrument redo att påbörja separationen. I fönstret indikeras Skärm 7.78.

Fortsätt genom att trycka på **RUN**.

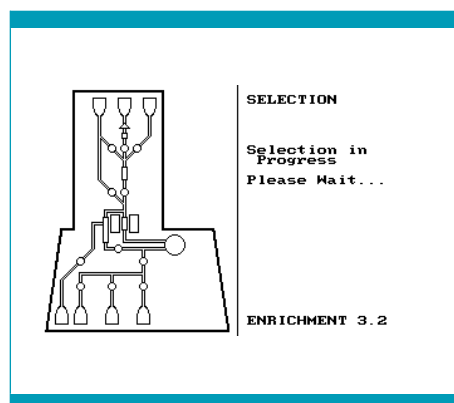
När du har tryckt på **RUN** kommer instrumentet automatiskt att utföra den valda separationsprocessen.

Vid varje del av processen visas en skärm som liknar Skärm 7.79 för att visa status på separationsproceduren.

Magnetpositionsindikatorn visas som två svarta rutor bredvid separationskolonnen när magneten är "ON", dvs. den har flyttats till framsidan för att magnetisera separationskolonnen. Om magnetpositionsindikatorn är transparent (t.ex. Skärm 7.78) är magneten "OFF", dvs. den har flyttats till instrumentets baksida. När magneten har dragits tillbaka är separationskolonnen utanför det magnetiska fältet och inte magnetiserad.



Skärm 7.78: Starta separation



Skärm 7.79: Separation pågår

Separationsprocedur

Ladda celler

Separationsproceduren börjar med fyllning av Pre-system Filter för att ta bort kvarvarande luft från förfilter. Därefter påbörjas separationen av de märkta cellerna. Pumpen drar innehållet från Cell Preparation Bag till slangsetet och laddar cellprodukten via förkolonnen på separationskolonnen. De magnetiskt märkta cellerna (målceller) hålls kvar i separationskolonnen, placerad i det magnetiska fältet, medan de icke-märkta cellerna (icke-målseller) passerar igenom och samlas in i Negative Fraction Bag. När Cell Preparation Bag är tom (detekteras automatiskt av vätskesensorn) sköljs förfilter två gånger med buffert.

VIKTIGT

I början av separationen pumpas buffert uppåt mot Cell Preparation Bag för att fylla förfilter. Knacka försiktigt på sidan av filtret flera gånger för att ta bort eventuella bubblor som kan vara fångade i filtret.

Kolonntvätt I

Förkolonnen och separationskolonnen tvättas ordentligt för att ta bort alla icke-märkta celler. Tvättbuffert samlas in i uppsamlingspåsen för buffert.

Frisättning av celler I

Magnet flyttas till instrumentets baksida ("OFF"-läge). De kvarhållna cellerna frisätts med hög hastighet, men cellerna blir kvar i en intern slangcykel.

Omladdning av celler I

Magnet flyttas till positionen "ON" igen för att magnetisera separationskolonnen och cellerna appliceras på nytt på separationskolonnen.

Kolonntvätt II

Omladdning av celler följs av ett andra tvättsteg för att bort kvarvarande icke-märkta celler. Även alla slangar sköljs flera gånger.

Frisättning av celler II, omladdning av celler II, kolonntvätt III

Cellerna frisätts och appliceras på separationskolonnen en andra gång för att ta bort eventuella icke-märkta celler som ospecifikt sitter fast på kolonnmatrisen. Därefter tvättas separationskolonnen igen.

Slutlig eluering av celler

Magneten flyttas till läget "OFF" och de magnetiskt märkta cellerna (målceller) frisätts och samlas in i Cell Collection Bag.

Koppla bort påsar och registrera processkod

När körningen är avslutad visas Skärm 7.80 i fönstret.

1. Registrera processkoden.
2. Sätt en klämma på slangen ovanför luer-lockanslutningen som ansluter Cell Collection Bag till slangsetet (se Figur 7.24).

Gör tre hermetiska förseglingar på slangen precis nedanför ventil nr 9. Avskilj försiktigt den mellersta förseglingen för att koppla bort Cell Collection Bag från slangsetet.

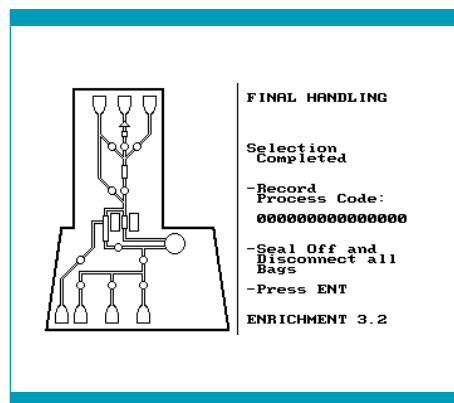
3. Väg den fyllda Cell Collection Bag. Registrera vikten.

Fastställ vikten på målcellsfraktionen genom att dra vikten på den tomma Cell Collection Bag från vikten på Cell Collection Bag som innehåller målcellerna. Registrera vikten.

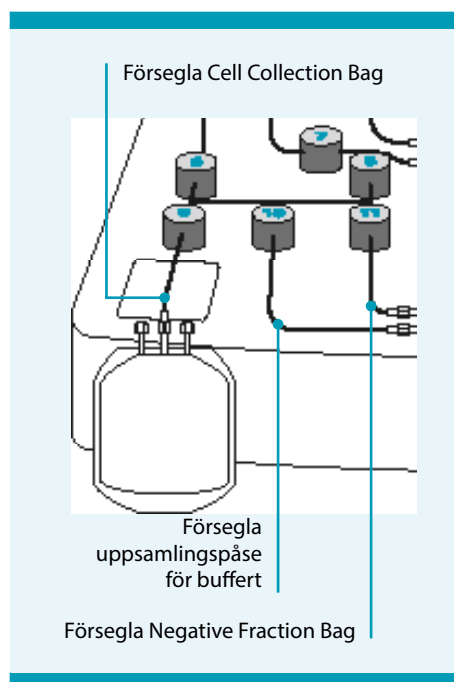
4. Blanda målcellssuspensionen noggrant genom att rotera påsen. Ta en lämplig mängd, t.ex. 0,5 mL och spara för analys.
5. Använd värmeförseglaren, försegla slangen ovanför luer lock på Negative Fraction Bag. Gör tre hermetiska förseglingar på slangen. Avskilj den mittersta förseglingen för att koppla bort Negative Fraction Bag.
6. Koppla bort Buffer Waste Bag på samma sätt.
7. Ta bort Negative Fraction Bag och Buffer Waste Bag. Spara alla påsar tills den slutliga analysen av alla celler är avslutad.

Målcellerna kan nu bearbetas i enlighet med kliniska protokoll.

Fortsätt genom att trycka på **ENT**.



Skärm 7.80: Koppla bort påsar och registrera processkod

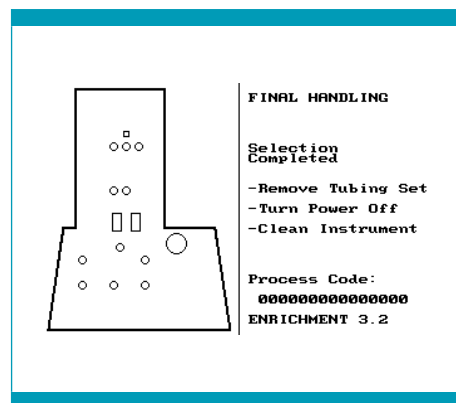


Figur 7.24: Koppla bort påsar

Ta bort slangset och stäng av

I fönstret indikeras Skärm 7.81.

1. Ta bort slangsetet: Börja med ventil nr 6, 9, 10 och 11 och arbeta uppåt, ta bort slang-en från vätskesensorn och från ventilerna genom att trycka på ventilerna. Ta bort kolonnerna från kolonnhållarna. Kassera slangsetet som biologiskt riskmaterial enligt vanliga sjukhusprocedurer.
2. Stäng av CliniMACS Plus Instrument.
3. Rengör instrumentet enligt rengöringsanvisningarna, se avsnittet "Rengöring och desinfektion" i användarhandboken för CliniMACS Plus Instrument. Följ standard-procedureerna för behandling av infektiöst material.



Skärm 7.81: Ta bort slangset och stäng av

Analys av celler

VIKTIGT

- *CliniMACS PBS/EDTA Buffer behöver inte tas bort före administrering av de separerade målcellerna om volymen inte överskrider 100 mL per transplantat vid lämpliga infusionshastigheter. Patientens njurstatus och effekter på blodelektrolyter måste beaktas. Särskilt hos barn måste infusionshastigheterna justeras i enlighet härmed.*
- *Om volymen på mållcellsfraktionen överstiger 100 mL måste den minskas på lämpligt sätt, t.ex. genom centrifugering eller buffertbyte, till en infusionslösning som är godkänd i användarens namn.*

FÖRSIKTIGHET

Risk för nedsatt kvalitet på målceller. Målcellerna måste analyseras och bekräftas uppfylla användarkraven, i annat fall kan dess lämplighet för klinisk användning försämrats. Undersök målcellerna avseende kvalitet och kvantitet enligt deras avsedda användning.

Detta måste inkludera följande parametrar:

- totalt antal leukocyter
- viabilitet och totalt antal målceller
- renhet och återhämtning av målceller

Även totalt antal leukocyter och viabilitet på den cellfraktion som inte är målet bör fastställas. Listan är ett exempel och andra tester ska inkluderas baserat på avsedd användning och kliniska protokoll. Registrera analysdata.

7.4.4 DEPLETION 2.1

När den slutliga kontrollen är avslutad är ClineMACS Plus Instrument redo att påbörja separationen. I fönstret indikeras Skärm 7.82.

Fortsätt genom att trycka på **RUN**.

När du har tryckt på **RUN** kommer instrumentet automatiskt att utföra den valda separationsprocessen.

Vid varje del av processen visas en skärm som liknar Skärm 7.83 för att visa status på separationsproceduren.

Magnetpositionsindikatorn visas som två svarta rutor bredvid separationskolonnen när magneten är "ON", dvs. den har flyttats till framsidan för att magnetisera separationskolonnen. Om magnetpositionsindikatorn är transparent (t.ex. Skärm 7.82) är magneten "OFF", dvs. den har flyttats till instrumentets baksida. När magneten har dragits tillbaka är separationskolonnen utanför det magnetiska fältet och inte magnetiserad.

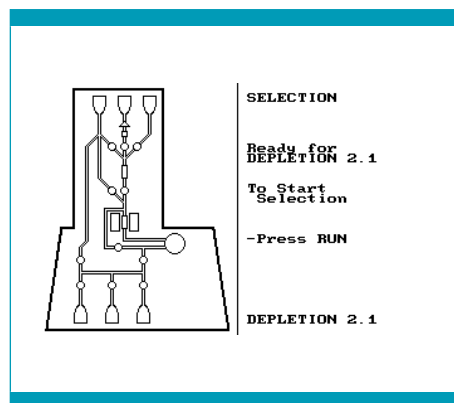
Separationsprocedur

Ladda celler

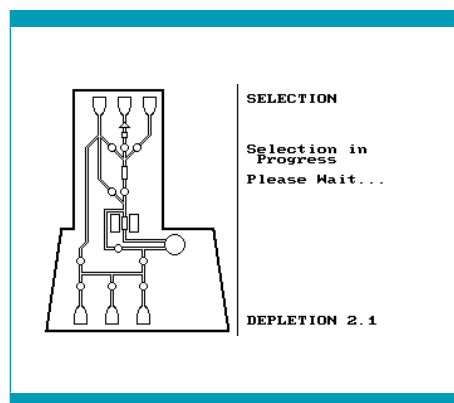
Separationsproceduren börjar med fyllning av förfilter för att avsluta primingen av systemet. Därefter påbörjas separationen av de märkta cellerna. Pumpen drar innehållet i Cell Preparation Bag till slangsetet. De magnetiskt märkta cellerna (målceller) hålls kvar i separationskolonnen, placerad i det magnetiska fältet, medan de icke-märkta cellerna (målceller) passerar igenom och samlas in i Cell Bag.

VIKTIGT

I början av separationen pumpas buffert uppåt mot Cell Preparation Bag för att fylla förfilter. Knacka försiktigt på sidan av filtret flera gånger för att ta bort eventuella bubblor som kan vara fångade i filtret.



Skärm 7.82: Starta separation



Skärm 7.83: Separation pågår

Sköljning av förfilter

Efter att alla cellprover har laddats i slangsetet, skölj förfilter två gånger med buffert för att minska cellförlust i filtret.

Notera:

- Om antalet magnetiskt märkta celler (beräknas av CliniMACS Plus-programvaran) överstiger bindningskapaciteten hos separationskolonnen laddar och separerar separationsprogram automatisk cellprovet i lämpliga delar ("staged loading").
- Laddningen upphör när kapaciteten i separationskolonnen har uppnåtts och separationsprogrammet kommer att gå vidare till nästa steg i separationen. Efter att det sista steget (slutlig eluering av celler) är avslutat kommer nästa del av provet att laddas på kolonnen.

Kolonntvätt

Förkolonnen och separationskolonnen tvättas ordentligt för att ta bort alla icke-märkta celler. Tvättbuffert samlas in i uppsamlingspåsen för buffert.

Slutlig eluering av cellerna

Magneten flyttas till läget "OFF". Först elueras de magnetiskt märkta cellerna till Priming Waste Bag. Först efter att det sista laddningssteget är avslutat kommer alla magnetiskt märkta celler (icke-målceller) att frisättas från separationskolonnen och samlas in i Negative Fraction Bag för att minska överföring av märkta celler till pumpslangen.

Koppla bort påsar och registrera processkod

När körningen är avslutad visas Skärm 7.84 i fönstret.

1. Registrera processkoden.
2. Sätt en klämma på slangen ovanför luer-lockanslutningen som ansluter Cell Collection Bag till slangsetet (se Figur 7.25).

Gör tre hermetiska förseglingar på slangen precis nedanför ventil nr 9. Avskilj försiktigt den mellersta förseglingen för att koppla bort Cell Collection Bag från slangsetet.

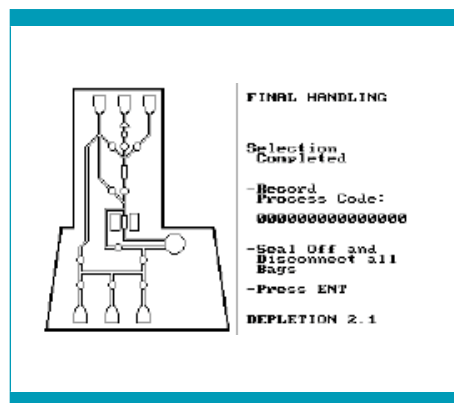
3. Väg den fyllda Cell Collection Bag. Registrera vikten.

Fastställ vikten på måncellsfraktionen genom att dra vikten på den tomma Cell Collection Bag från vikten på Cell Collection Bag som innehåller måncellerna. Registrera vikten.

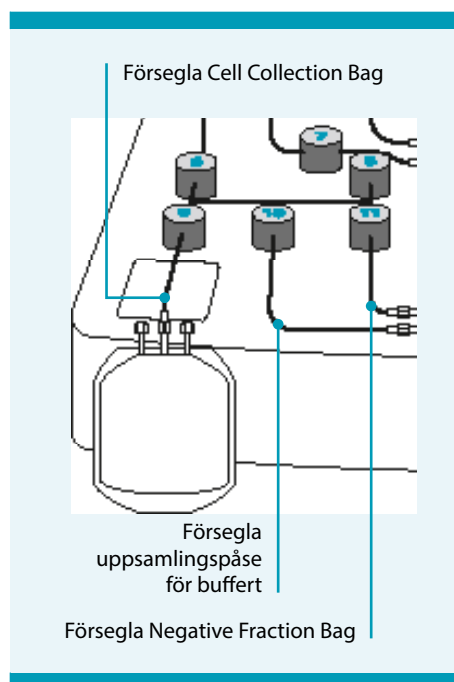
4. Blanda måncellssuspensionen noggrant genom att rotera påsen. Ta en lämplig mängd, t.ex. 0,5 mL och spara för analys.
5. Använd värmeförseglaren, försegla slangen ovanför luer lock på Negative Fraction Bag. Gör tre hermetiska förseglingar på slangen. Avskilj den mittersta förseglingen för att koppla bort Negative Fraction Bag.
6. Koppla bort Buffer Waste Bag på samma sätt.
7. Ta bort Negative Fraction Bag och Buffer Waste Bag. Spara alla påsar tills den slutliga analysen av alla celler är avslutad.

Måncellerna kan nu bearbetas i enlighet med kliniska protokoll.

Fortsätt genom att trycka på **ENT**.



Skärm 7.84: Koppla bort påsar och registrera processkod

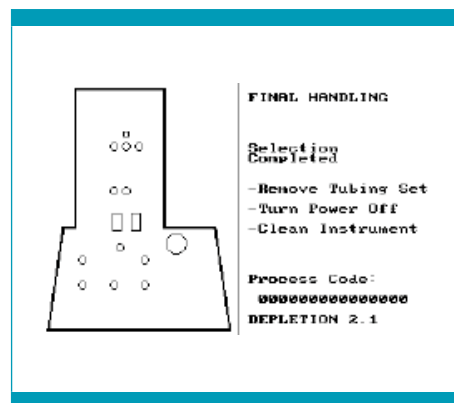


Figur 7.25: Koppla bort påsar

Ta bort slangset och stäng av

I fönstret indikeras Skärm 7.85.

1. Ta bort slangsetet: Börja med ventil nr 6, 9 och 10 och arbeta dig uppåt, ta bort slangen från vätskesensorn och från ventilerna genom att trycka på ventilerna. Ta bort kolonnen från kolonnhållaren. Kasserat slangsetet som biologiskt riskmaterial enligt vanliga sjukhusprocedurer.
2. Stäng av CliniMACS Plus Instrument.
3. Rengör instrumentet enligt rengöringsanvisningarna, se avsnittet "Rengöring och desinfektion" i användarhandboken för CliniMACS Plus Instrument. Följ standardprocedurerna för behandling av infektiöst material.



Skärm 7.85: Ta bort slangset och stäng av

Analys av celler

VIKTIGT

- *CliniMACS PBS/EDTA Buffer behöver inte tas bort före administrering av de separerade målcellerna om volymen inte överskrider 100 mL per transplantat vid lämpliga infusionshastigheter. Patientens njurstatus och effekter på blodelektrolyter måste beaktas. Särskilt hos barn måste infusionshastigheterna justeras i enlighet härmed.*
- *Om volymen på målcellsfraktionen överstiger 100 mL måste den minskas på lämpligt sätt, t.ex. genom centrifugering eller buffertbyte, till en infusionslösning som är godkänd i användarens namn.*

FÖRSIKTIGHET

Risk för nedsatt kvalitet på målceller. Målcellerna måste analyseras och bekräftas uppfylla användarkraven, i annat fall kan dess lämplighet för klinisk användning försämrats. Undersök målcellerna avseende kvalitet och kvantitet enligt deras avsedda användning.

Detta måste inkludera följande parametrar:

- totalt antal leukocyter
- viabilitet och totalt antal målceller
- depletionseffekt

Även totalt antal leukocyter och viabilitet på den cellfraktion som inte är målet bör fastställas. Listan är ett exempel och andra tester ska inkluderas baserat på avsedd användning och kliniska protokoll. Registrera analysdata.

7.4.5 DEPLETION 3.1

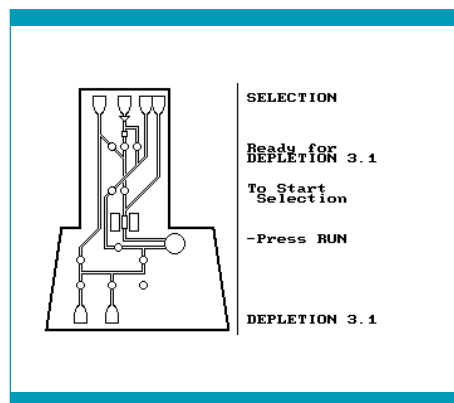
När den slutliga kontrollen är avslutad är CliniMACS Plus Instrument redo att påbörja separationen. I fönstret indikeras Skärm 7.86.

Fortsätt genom att trycka på **RUN**.

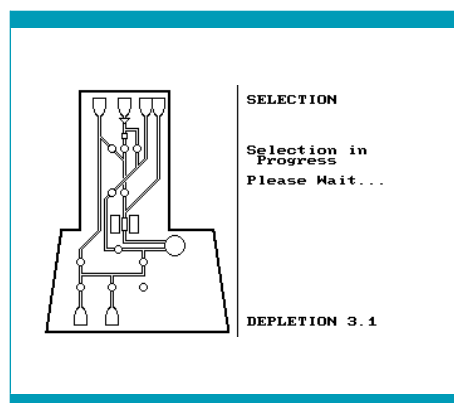
När du har tryckt på **RUN** kommer instrumentet automatiskt att utföra den valda separationsprocessen.

Vid varje del av processen visas en skärm som liknar Skärm 7.87 för att visa status på separationsproceduren.

Magnetpositionsindikatorn visas som två svarta rutor bredvid separationskolonnen när magneten är "ON", dvs. den har flyttats till framsidan för att magnetisera separationskolonnen. Om magnetpositionsindikatorn är transparent (t.ex. Skärm 7.86) är magneten "OFF", dvs. den har flyttats till instrumentets baksida. När magneten har dragits tillbaka är separationskolonnen utanför det magnetiska fältet och inte magnetiserad.



Skärm 7.86: Starta separation



Skärm 7.87: Separation pågår

Separationsprocedur

Depletion 3.1 är ett depletionsprogram i två steg, dvs. cellerna appliceras två gånger på separationskolonnen.

I det första steget depleteras den första volymen laddade celler (Staged Cell Loading [Bulk Loading Stage]). I processens andra steget depleteras de få kvarvarande märkta cellerna (Känslig provladdning [steget Känslig laddning]).

VIKTIGT

I början av separationen pumpas buffert uppåt mot Cell Preparation Bag för att fylla förfilter. Knacka försiktigt på sidan av filtret flera gånger för att ta bort eventuella bubblor som kan vara fångade i filtret.

Notera: Om antalet magnetiskt märkta celler (beräknas av CliniMACS Plus-programvaran) överstiger bindningskapaciteten hos separationskolonnen laddar och separerar separationsprogram automatisk cellprovet i lämpliga delar ("staged loading"). Mellan varje laddningssteg tvättas separationskolonnen för att ta bort alla märkta celler. De märkta cellerna kommer att elueras och hållas kvar i Non-Target Cell Bag. Tvättbufferten samlas in i Reapplication Bag.

Staged cell loading (Bulk Loading Stage)

Separationsproceduren börjar med fyllning av förfilter för att avsluta primingen av systemet. Därefter påbörjas separationen av de märkta cellerna. Pumpen drar innehållet i Cell Preparation Bag till slangsetet. De magnetiskt märkta cellerna (icke-målceller) hålls kvar i separationskolonnen, placerad i det magnetiska fältet, medan de icke-märkta cellerna (målceller) passerar igenom och samlas in i Reapplication Bag.

Känslig provladdning (steget Känslig laddning)

För ytterligare depletion laddas cellerna i Reapplication Bag åter i separationskolonnen vid en lägre hastighet. Medan de få kvarvarande märkta cellerna nu hålls kvar i separationskolonnen flödar de icke-märkta cellerna (målceller) genom det magnetiska fältet och samlas in i Cell Collection Bag.

Sköljning av förfilter och Reapplication Bag

Efter att cellprovet har avslutat både volymdepletion och sensitiv depletion, sköljs förfilter och Reapplication Bag två gånger med buffert för att minska cellförlusten i systemet.

Borttagande av icke-målceller

Magneten flyttas till läget "OFF". De magnetiskt märkta cellerna (icke-målceller) frisätts från separationskolonnen och samlas in i Non-Target Cell Bag efter varje laddningssteg.

Koppla bort påsar och registrera processkod

När körningen är avslutad visas Skärm 7.88 i fönstret.

1. Registrera processkoden.
2. Sätt en klämma på slangen ovanför luer-lockanslutningen som ansluter Cell Collection Bag till slangsetet (se Figur 7.26).

Gör tre hermetiska förseglingar på slangen precis nedanför ventil nr 9. Avskilj försiktigt den mellersta förseglingen för att koppla bort Cell Collection Bag från slangsetet.

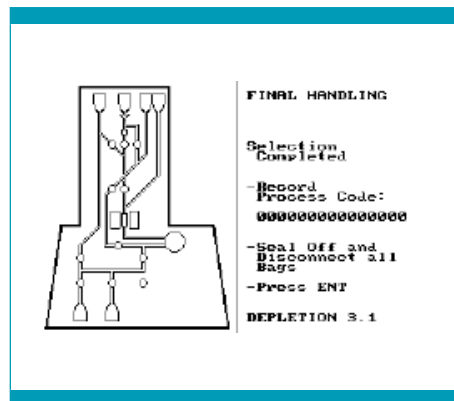
3. Väg den fyllda Cell Collection Bag. Registrera vikten.

Fastställ vikten på mållcellsfraktionen genom att dra vikten på den tomma Cell Collection Bag från vikten på Cell Collection Bag som innehåller mållcellerna. Registrera vikten.

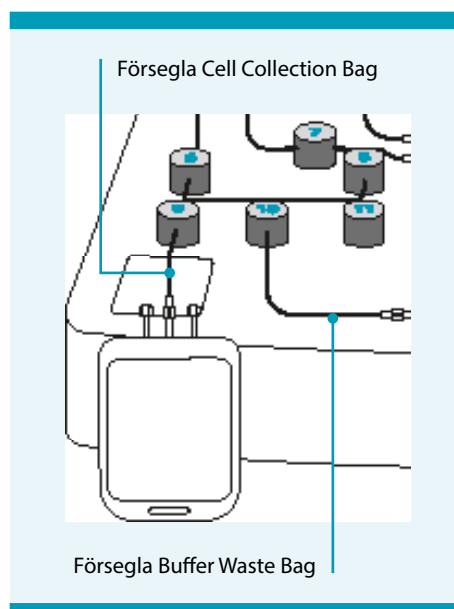
4. Blanda mållcellssuspensionen noggrant genom att rotera påsen. Ta en lämplig mängd, t.ex. 0,5 mL och spara för analys.
5. Använd värmeförseglaren, försegla slangen ovanför luer lock på Buffer Waste Bag. Gör tre hermetiska förseglingar på slangen. Avskilj den mittersta förseglingen för att koppla bort Buffer Waste Bag.
6. Koppla bort Non-Target Cell Bag på samma sätt.
7. Ta bort Non-Target Cell Bag och uppsamlingspåsen för buffert. Spara alla påsar tills den slutliga analysen av alla celler är avslutad.

Mållcellerna kan nu bearbetas i enlighet med kliniska protokoll.

Fortsätt genom att trycka på **ENT**.



Skärm 7.88: Koppla bort påsar och registrera processkod

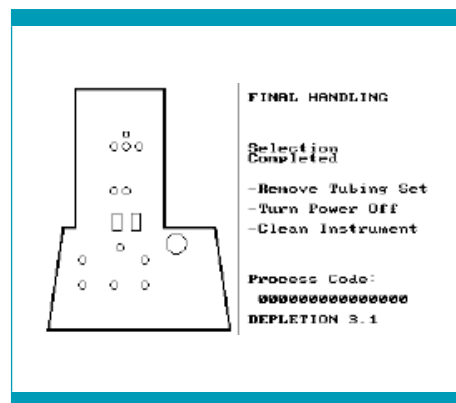


Figur 7.26: Koppla bort påsar

Ta bort slangset och stäng av

I fönstret indikeras Skärm 7.89.

1. Ta bort slangsetet: Börja med ventil nr 6, 9 och 10 och arbeta dig uppåt, ta bort slangen från vätskesensorn och från ventilerna genom att trycka på ventilerna. Ta bort kolonnen från kolonnhållaren. Kassa slangsetet som biologiskt riskmaterial enligt vanliga sjukhusprocedurer.
2. Stäng av CliniMACS Plus Instrument.
3. Rengör instrumentet enligt rengöringsanvisningarna, se avsnittet "Rengöring och desinfektion" i användarhandboken för CliniMACS Plus Instrument. Följ standardprocedurerna för behandling av infektiöst material.



Skärm 7.89: Ta bort slangset och stäng av

Analys av celler

VIKTIGT

- *CliniMACS PBS/EDTA Buffer behöver inte tas bort före administrering av de separerade målcellerna om volymen inte överskrider 100 mL per transplantat vid lämpliga infusionshastigheter. Patientens njurstatus och effekter på blodelektrolyter måste beaktas. Särskilt hos barn måste infusionshastigheterna justeras i enlighet härmed.*
- *Om volymen på målcellsfraktionen överstiger 100 mL måste den minskas på lämpligt sätt, t.ex. genom centrifugering eller buffertbyte, till en infusionslösning som är godkänd i användarens namn.*

FÖRSIKTIGHET

Risk för nedsatt kvalitet på målceller. Målcellerna måste analyseras och bekräftas uppfylla användarkraven, i annat fall kan dess lämplighet för klinisk användning försämrats. Undersök målcellerna avseende kvalitet och kvantitet enligt deras avsedda användning.

Detta måste inkludera följande parametrar:

- totalt antal leukocyter
- viabilitet och totalt antal målceller
- depletionseffekt

Även totalt antal leukocyter och viabilitet på den cellfraktion som inte är målet bör fastställas. Listan är ett exempel och andra tester ska inkluderas baserat på avsedd användning och kliniska protokoll. Registrera analysdata.

8 Felsökning

Detta kapitel är avsett som referens för att ge information om eventuella oväntade händelser som kan uppkomma och för att ge förslag på lämplig korrigerande åtgärd. För information som inte omfattas av detta kapitel, kontakta Miltenyi Biotec Technical Support så snart som möjligt.

Notera: Ordningen i detta kapitel följer den faktiska separationssekvensen.

8.1 Miltenyi Biotec Technical Support

Vid ett funktionsfel på instrumentet eller ett processfel som inte kan korrigeras av operatören (felmeddelanden), kontakta Miltenyi Biotec Technical Support:

☎ +49 2204 8306-3803

✉ technicalsupport@miltenyi.com

Besök www.miltenyibiotec.com för kontaktuppgifter till lokal Miltenyi Biotec Technical Support.

8.2 Beredning av leukaferesprodukten

■ Det prov som mottagits är spätt

Magnetisk märkning bör helst utföras i en spädd leukaferesprodukt. Justera leukaferesprodukten till en slutlig spädning på cirka 1:3. Om det prov som mottagits är spätt mer än 1:3 eller om operatören inte känner till provets exakta plasmakoncentration, tillsätt immunglobulin till provet före tillsats av reagenset (rekommenderad koncentration av immunglobulin i märkningsvolymen: 1,5 mg/mL). Det är viktigt att ha en viss mängd immunglobulin i provet under märkningen för att minimera icke-specifik bindning av reagenset.

■ Antalet målceller i leukaferesprodukten är lågt

Mobiliseringen av stamceller var otillräcklig. Kontrollera analysen av leukaferesprodukten.

■ Dålig viabilitet i leukaferesprodukten

Leukaferesprodukten kanske har aspirerats, förvarats eller transporterats på fel sätt. För att säkerställa en bättre provkvalitet ska beredning och separation av leukaferesprodukten utföras omedelbart efter leukaferes. Förvara leukaferesprodukten vid en leukocytkoncentration som understiger $0,2 \times 10^9$ per mL. Späd leukaferesprodukten vid behov med autolog plasma. Leukaferesprodukten ska inte vara äldre än 24 timmar när märknings- och separationsprocedurens påbörjas. Om leukaferesprodukten exempelvis måste förvaras över natten ska detta ske vid kontrollerad rumstemperatur (+19 °C till +25 °C [+66 °F till +77 °F]).

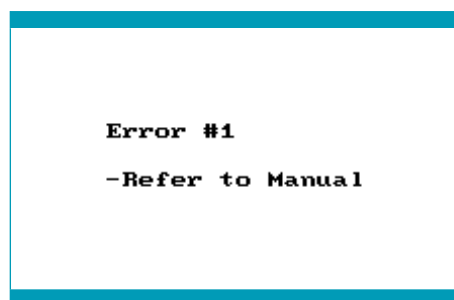
8.3 CliniMACS Plus Instrument och CliniMACS-slangset

8.3.1 Felmeddelanden

Det finns ett antal möjliga funktionsfel som kan uppkomma på instrumentet och i programvaran. Dessa är märkta som sådana och visas på skärmen. De avser interna fel som inte kan korrigeras av operatören. Registrera felnumret och kontakta Miltenyi Biotec Technical Support.

Ett möjligt felmeddelande visas på Skärm 8.1.

Förutom felmeddelanden är funktionsfel som kan korrigeras av operatören märkta med "Varningsmeddelanden" (se avsnitt 8.4.1).



Skärm 8.1: Felmeddelande nr 1

8.3.2 Laddning och priming av slangsetet

■ Ventilerna öppnas inte när operatören instrueras att sätta in slangens i en särskild ventil

Ventilerna är utformade för att fungera korrekt när slangens har satts in. Tryck manuellt på ventilen för att öppna den. Kontrollera ventilen noggrant under ventilrörelsesekvensen. Om ventilen inte trycks ned under ventilrörelsesekvensen, se avsnitt "Ventil trycks inte ned under ventilrörelsesekvensen".

■ Ventil trycks inte ned under ventilrörelsesekvensen

Bekräfta att slangens är korrekt insatt. Kontrollera att ventilerna är noggrant rengjorda. Alla ventiler som har kontaminerats med vätska måste bytas ut. Kontakta Miltenyi Biotec Technical Support.

■ Buffert läcker från slangen under priming

Slangsetet är defekt. Stäng av CliniMACS Plus Instrument och starta priming med ett nytt slangset och tillräckligt med ny buffert.

■ Det finns överskott av luft i slangsetet efter priming

Buffertpåsen är inte tillräckligt punkterad. Använd ett nytt slangset och tillräckligt med ny buffert och starta om CliniMACS Plus-separation. Bekräfta att septumet på buffertpåsen är korrekt punkterat.

■ Öväntad buffertvolym i påsar efter priming Efter priming ska det endast finnas vätska i uppsamlingspåsen för priming och uppsamlingspåsen för buffert

Slangsetet är inte korrekt monterat. Vätska kan läcka bakom ventilerna om slangsetet inte är korrekt installerat eller om ventilerna inte fungerar på rätt sätt. Ta bort slangsetet och byt ut det mot ett nytt. Starta primingproceduren med tillräckligt med ny buffert. Dålig prestanda hos CliniMACS Plus-separation kan bli följden om slangsetet inte är korrekt insatt.

■ Pumpmotorn stannar under priming

Pumpslangen är inte korrekt insatt. Tryck på **STOP** för att avbryta primingen och tryck på "OFF" och därefter på "ON" igen. Sätt en klämma på buffertslangen med en peang under installationsproceduren, korriger pumpslangens position och ta bort den låsande peangen innan primingsekvensen startas.

8.4 Automatisk cellseparation

8.4.1 Varningsmeddelanden

Till skillnad från felmeddelanden (se avsnitt 8.3.1) visas varningsmeddelanden på skärmen när det interna kontrollsystemet på CliniMACS Plus Instrument upptäcker ett funktionsfel som kan korrigeras av operatören. Vanligtvis visas ett varningsmeddelande i kombination med ett ljud ("pip"). Om ett varningsmeddelande visas under CliniMACS Plus-separation, följ anvisningarna på skärmen för att fortsätta med cellseparationen. Generellt visas varningsmeddelanden när du trycker på **STOP**, när pumpdörren är öppen, när pumpen stannar eller när vätskesensorn upptäcker ett fel.

Eftersom olika typer av oväntade händelser kan uppkomma under olika separationsprogram är följande avsnitt uppdelat i olika delar.

8.4.2 Övåntade händelser: Alla separationsprogram

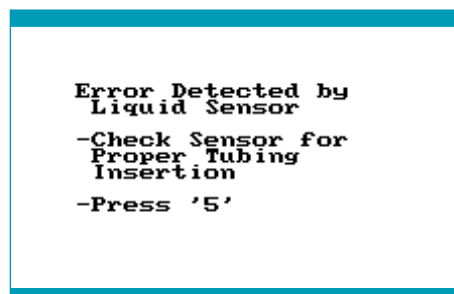
■ Fel upptäckt av vätskesensorn

Varningsmeddelande nr 1 visas under startfasen av celladdningsprocessen om vätskesensorn inte upptäcker vätska i slangen. När förfilter sköljs med buffert före celladdningen måste det finnas vätska i slangen vid denna tidpunkt.

Kontrollera följande punkter:

1. Är slangen korrekt insatt? I vätskesensorn? Om inte, gör det.
2. Är slangen fylld med buffert? Om inte, se punkt 3.
3. Om slangen inte är fylld med buffert, inspektera slangen för veck som blockerar buffertflödet uppåt i förfilter och Cell Preparation Bag. Justera slangsetets position. Höj eller sänkt påhängarna vid behov med påhängarklämmorna. Justera slangens position i ventilerna. Ändra slangens position och öppna ventilerna genom att trycka på knappen manuellt. Kontrollera att slangen inte är veckad, vriden eller spänd.
4. Är Cell Preparation Bag punkterad korrekt? Kontrollera att förfilter-spiken har penetrerat septumet på porten på Cell Preparation Bag.
5. Om slangsetet inte är helt fyllt med buffert: Har buffert-spiken på slangsetet penetrerat buffertpåsen? För korrigering, se "Det finns överskott av luft i slangsetet efter priming" in avsnitt 8.3.2.

Efter den korrigerande åtgärden fortsätter du med den pågående separationen och trycker på 5. Om varningsmeddelande nr 1 visas igen efter att var och en av de möjliga orsaker som anges ovan har uteslutits kan vätskesensorn vara defekt. Kontakta Miltenyi Biotec Technical Support.



Figur 8.1: Varningsmeddelande nr 1

■ Celler flyttar sig till fel del av slangsetet. Vätska läcker förbi ventil(er)

- Slangsetet är inte korrekt insatt. Om en instrumentkörning pågår, tryck på **STOP** och sätt en klämma på slangen med en peang. Justera slangen genom att först trycka ned lämplig ventil. Ta bort den låsande peangen och tryck på **RUN** för att återuppta separationen. Cellseparationen kommer att avbrytas om inte **RUN** trycks ned inom 600 sekunder.
- Ventilerna fungerar inte korrekt. Tryck på **STOP**. Sätt en peang på slangen. Tryck ned ventilen manuellt flera gånger för att lossa den ventil som fastnat. Ta bort den låsande peangen och tryck på **RUN** för att fortsätta. Cellseparationen kommer att avbrytas om inte **RUN** trycks ned inom 600 sekunder. Om användaren inte kan lossa den ventil som fastnat, kontakta Miltenyi Biotec Technical Support.

- Fel programvara har använts. Kontrollera displayen för namn på det program som används. Avsluta körningen genom att trycka på **STOP** och kontakta omedelbart Miltenyi Biotec Technical Support.

■ Magnet rör sig inte

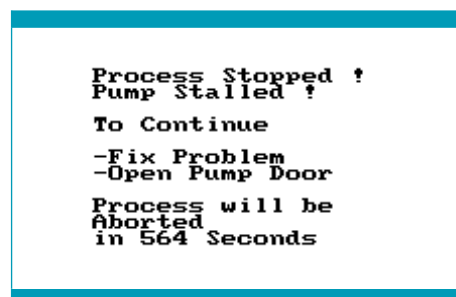
Magnetkopplingsdonet fungerar inte. Ett fel på magnetkopplingsdonet har uppkommit. Ett felmeddelande visas (se avsnitt 8.3.1). Registrera felnumret på felmeddelandet och kontakta Miltenyi Biotec Technical Support.

■ Pumpmotorn stannar under separation

Pumpslangen är inte korrekt insatt och kanske inte kan rotera. I detta fall visas varningsmeddelande nr 2 i fönstret. Operatören har då 600 sekunder på sig för korrigera pumpslangens position.

1. Ta försiktigt bort pumpslangen från pumpen.
2. Kontrollera att pumpslangen inte har skadats av det felaktiga insättandet. Om pumpslangen läcker, sätt en klämma på slangen ovanför och nedan separationskolonnen för att spara de celler som finns kvar på kolonnen och kontakta Miltenyi Biotec Technical Support.
3. Om pumpslangen inte är skadad kan den sättas in i igen i pumphöljet.
4. Tryck på **RUN** för att starta separationen inom 600 sekunder annars kommer separationen att avbrytas.

Om pumpslangen är platt och kollapsad tyder detta på en blockerad kolonn. I detta fall ska du kontakta Miltenyi Biotec Technical Support.



Skärm 8.2: Varningsmeddelande nr 2

■ Provladdningen avbryts inte trots att Cell Preparation Bag och förfilter är tomma

Vätskesensorn fungerar inte på rätt sätt, exempelvis eftersom ytan på slangen i vätskesensorn är fuktig. Tryck på **STOP** för att avbryta separationen. Ta bort slangarna från vätskesensorn. Torka slangen och kontaktområdet med en pappersservett eller absorberande material. Sätt tillbaka slangen i vätskesensorn och tryck på **RUN**. Avbryt inte sekvensen i mer än 600 sekunder annars kommer cellseparationen att avbrytas.

Om det inte går att aktivera vätskesensorn på detta sätt, tryck på **STOP**, därefter på **2** och bekräfta med **ENT** för att hoppa över provladdning och fortsätta separationen.

8.4.3 Övåntade händelser: Endast anrikningsprogrammet

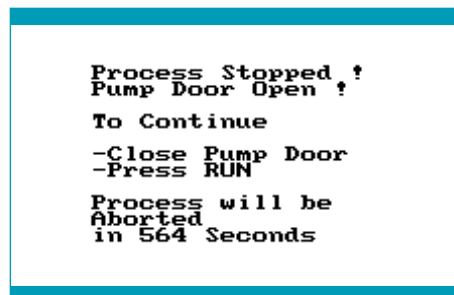
■ Körning avbryts innan cellseparationsprogrammet är avslutat

- Pumpdörr öppen: Av säkerhetsskål avbryts den pågående separationen automatiskt under instrumentkörningen om pumpdörren öppnas. Meddelande nr 5 visas i fönstret.

Stång pumpdörren och tryck på RUN.

Om, som i detta fall, RUN inte trycks ned inom 600 sekunder kommer separationen att avbrytas och cellseparationen kommer inte att avslutas. Återvinn så mycket som möjligt av provet från slangsetet genom att köra AKUTPROGRAMMET.

- Strömbavbrott: Strömbavbrott leder till att CliniMACS Plus-separation avbryts. Cellseparationen kommer inte att avslutas när strömmen återkommer. Återvinn så mycket som möjligt av provet från slangsetet genom att köra AKUTPROGRAMMET.



Skärm 8.3: Varningsmeddelande nr 5

8.4.4 Övåntade händelser: CD34 SELECTION 1/2

■ Laddning avbruten innan hela provet har laddats i kolonnerna

förfiler är blockerat på grund av stora mängder celldebris eller på grund av ofullständig fyllnad av filtret. På grund av fortsatt pumpning har ett vakuum skapats och detta har lett till att bildandet av luftbubblor aktiverar vätskesensorn. Därför har separationsprocessen fortsatt med kolonntvätten innan hela provet kunde laddas. Det är inte möjligt att starta om provladdningen när laddningssekvensen har avbrutits.

Låt CliniMACS Plus Instrument avsluta separationsprogrammet. Avbryt inte den aktuella körningen eftersom det kan leda till onödig cellförlust. Efter att separationsproceduren är avslutad, filtrera det kvarvarande provet med ett 200 µm in-line blodfilter och överför det en ny transferpåse. Utför omedelbart en andra separation med ett nytt slangset och tillräckligt med ny buffert.

■ Pumpslangen har kollapsat och/eller det finns överskott av luft i slangsetet nedanför förkolonnen under cellladdning

Förkolonnen är blockerad på grund av stora mängder celldebris i Cell Preparation Bag. Du måste hoppa över den manuella laddningen av kvarvarande celler och fortsätta separationen med de celler som redan har laddats i systemet.

1. Tryck på **STOP** för att avbryta cellladdningen. Varningsmeddelande nr 3 visas.

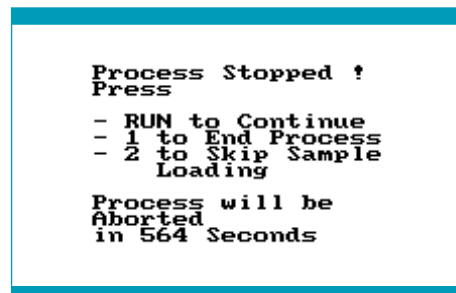
2. Tryck på **2** för att hoppa över cellladdningsprocessen.

Varningsmeddelande nr 4 visas och ger operatören möjlighet att bekräfta eller ändra beslutet eftersom det inte går att ändra beslutet att hoppa över provladdning.

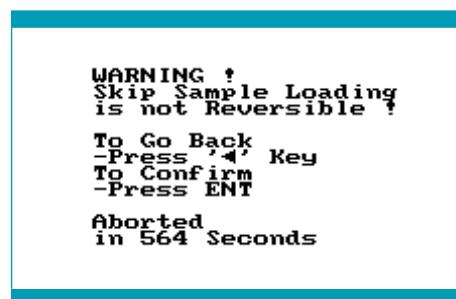
3. Tryck på **ENT** och separationsprogrammet kommer att avbryta provladdningen och fortsätta med kolonntvättar.

Sätt en klämma nedanför förfilter för att förhindra att cellerna läcker ut från Cell Preparation Bag till slangsetet. Efter att separationsproceduren är avslutad, filtrera det kvarvarande provet med ett 200 µm in-line blodfilter och överför det en ny transferpåse.

Utför omedelbart en andra separation med ett nytt slangset och tillräckligt med ny buffert.



Skärm 8.4: Varningsmeddelande nr 3



Skärm 8.5: Varningsmeddelande nr 4

8.4.5 Övåntade händelser: ENRICHMENT 1.1

■ Laddning avbruten innan hela provet har laddats i kolonnerna

förfilter är blockerat på grund av stora mängder celldebris eller på grund av ofullständig fyllnad av filtret. På grund av fortsatt pumpning har ett vakuum skapats och detta har lett till att luftbubblor bildats Dessa har aktiverat vätskesensorn och separationsprocessen har fortsatt direkt med det slutliga steget i provladdningen. En del provet kan finnas kvar i Cell Preparation Bag efter att separationen är avslutad.

Låt CliniMACS Plus Instrument avsluta separationsprogrammet. Avbryt inte den aktuella körningen eftersom det kan leda till onödig cellförlust.

Fastställ det totala antalet celler, procentandel målceller och kvarvarande provladdningsvolym i Cell Preparation Bag och ange faktiska provparametrar under inställning av instrumentet (STEG 2). Efter att separationsproceduren är avslutad, filtrera det kvarvarande provet med ett 200 µm in-line blodfilter och överför det en ny transferpåse. Utför omedelbart en andra separation med ett nytt slangset och tillräckligt med ny buffert.

■ Fel provparametervärden har angetts

Den provladdningsvolym som har angetts var lägre än den faktiska volym i den anslutna Cell Preparation Bag. Det är inte möjligt att starta om provladdningen när den har avbrutits.

Låt CliniMACS Plus Instrument avsluta separationsprogrammet. Avbryt inte den aktuella körningen eftersom det kan leda till onödig cellförlust.

Fastställ det totala antalet celler, procent målceller och kvarvarande provladdningsvolym i Cell Preparation Bag och ange faktiska provparametrar under inställning av instrumentet (STEG 2). Bearbeta kvarvarande prov med ett nytt slangset, ett nytt förfilter och tillräckligt med ny buffert.

■ Pumpmotorn stannar under eluering av målceller i Cell Collection Bag

Den låsande peangen bredvid Cell Collection Bag är inte öppen under elueringssekvensen. Således är vägen till Cell Collection Bag blockerad.

Tryck på **STOP** och öppna den låsande peangen bredvid Cell Collection Bag. Öppna pumpdörren och kontrollera att pumpslangen är korrekt insatt. Stäng pumpdörren och tryck på **RUN** för att starta om elueringssekvensen inom 600 sekunder.

8.4.6 Öväntade händelser: ENRICHMENT 3.2

■ Laddning avbruten innan hela provet har laddats i kolonnerna

förfilter är blockerat på grund av stora mängder celldebris eller på grund av ofullständig fyllnad av filtret. På grund av fortsatt pumpning har ett vakuum skapats och detta har lett till att luftbubblor bildats. Dessa har aktiverat vätskesensorn och separationsprocessen har fortsatt direkt med kolonntvättar innan alla prover har laddats. Det är inte möjligt att starta om provladdningen när laddningssekvensen har avbrutits.

Låt CliniMACS Plus Instrument avsluta separationsprogrammet. Avbryt inte den aktuella körningen eftersom det kan leda till onödig cellförlust.

Efter att separationsproceduren är avslutad, filtrera det kvarvarande provet med ett 200 µm in-line blodfilter och överför det en ny transferpåse. Utför omedelbart en andra separation med ett nytt slangset och tillräckligt med ny buffert.

■ Pumpmotorn stannar under eluering av målceller i Cell Collection Bag

Den låsande peangen bredvid Cell Collection Bag är inte öppen under elueringssekvensen. Således är vägen till Cell Collection Bag blockerad.

Tryck på **STOP** och öppna den låsande peangen bredvid Cell Preparation Bag. Öppna pumpdörren och kontrollera att pumpslangen är korrekt insatt. Stäng pumpdörren och tryck på **RUN** för att starta om elueringssekvensen inom 600 sekunder.

8.4.7 Akutprogram (ska endast användas med anrikningsprogram)

Om, av något skäl, en körning irreversibelt har avslutats innan målcellerna har eluerats från separationskolonnen kan akutprogrammet köras för att eluera cellerna från separationskolonnen. Detta program har utformats så att det endast kan användas med alla anrikningsprogram tillsammans med antingen ett CliniMACS Tubing Set (REF 161-01) eller ett CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01).

Akutprogrammet får inte användas med något depletionsprogram.

Notera: Akutprogrammet kommer att eluera cirka 75 mL vätska. Kontrollera att en lämplig Cell Collection Bag är ansluten till slangsetet.

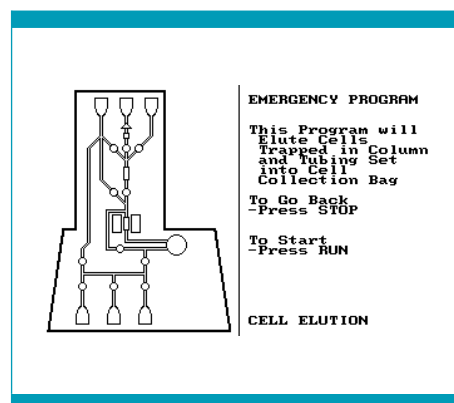
1. Kontrollera att separationskolonnen är magnetiserad genom att stänga av instrumentet, vänta 5 sekunder och slå på instrumentet igen. Magneten kommer att dras tillbaka från den magnetiska separationsenheten (se avsnittet "Beskrivning" i användarhandboken för CliniMACS Plus Instrument). Kontrollera detta genom att hålla ett litet magnetiserbart föremål mot den magnetiska separationsenheten. Om magneten inte har dragits tillbaka, eller om ett strömavbrott pågår, kontakta Miltenyi Biotec Technical Support.
2. Vänta tills huvudskärmen visas i fönstret (se avsnittet "Installation" i användarhandboken för CliniMACS Plus Instrument).

Om du vill hämta akutprogrammet, tryck på 4. I fönstret indikeras Skärm 8.6.

3. Om du vill fortsätta elueringen av fångade celler, tryck på **RUN**.

Notera: Om du vill lämna akutprogrammet utan att starta elueringen av fångade celler, tryck på **STOP**.

4. Överför de eluerade celler som samlats upp i Cell Collection Bag till en ny 600 mL transferpåse. Poola eventuellt de kvarvarande cellerna i Cell Preparation Bag med de celler som eluerats av akutprogrammet. Starta en ny separationsprocedur med ett nytt slangset och tillräckligt med ny buffert.



Skärm 8.6: Akutprogram

8.4.8 Öväntade händelser: DEPLETION 2.1

■ Målceller når inte Cell Collection Bag

Pumpen kan inte ladda produkten från Cell Preparation Bag eftersom klämman bredvid Cell Collection Bag inte är öppen under cellladdningssekvensen. Tryck på **STOP** och öppna klämman bredvid Cell Preparation Bag. Fortsätt depletionsprocessen genom att trycka på **RUN**.

Låt CliniMACS Plus Instrument avsluta separationsprogrammet. Avbryt inte den aktuella körningen eftersom det kan leda till onödig cellförlust. Om en del av produkten är kvar i Cell Preparation Bag efter att depletionsproceduren är avslutad, bearbeta de kvarvarande cellerna med ett nytt slangset, ett nytt förfilter och tillräckligt med ny buffert.

Fastställ det totala antalet celler, procentandel märkta celler och provladdningsvolym och ange faktiska provparametrar under inställning av instrumentet (STEG 2) och starta en ny depletion.

■ Laddning avbruten innan hela provet har laddats i kolonnerna

Luftbubblor i provet och/eller förfilter aktiverade vätskesensorn innan hela provet hade laddats. Avbryt den aktuella körningen och kontrollera totalt cellantal och depletionseffekt hos cellerna i Cell Collection Bag. Bearbeta vid behov kvarvarande prov med ett nytt slangset, ett nytt förfilter och tillräckligt med ny buffert.

Fastställ det totala antalet celler, procent märkta celler och provladdningsvolym och ange faktiska provparametrar under inställning av instrumentet (STEG 2) och starta en ny depletion.

8.4.9 Öväntade händelser: DEPLETION 3.1

■ Laddning avbruten under Staged Cell Loading innan hela provet har laddats i kolonnerna

- förfilter har satts in åt fel håll. Således är droppkammarmfunktionen inte tillgänglig och luftbubblor kan passera vätskesensorn direkt vilket leder till att provladdningen avbryts innan hela provet har applicerats. Instrumentet fortsätter depletionsprocessen genom att omedelbart börja med nästa steg. Det är inte möjligt att starta om provladdningen när den har avbrutits.
- förfilter är blockerat på grund av stora mängder celldebris eller på grund av ofullständig fyllnad av filtret. På grund av fortsatt pumpning har ett vakuum skapats och detta har lett till att luftbubblor bildats. Dessa har aktiverat vätskesensorn och separationsprocessen har fortsatt direkt med det slutliga steget i provladdningen. En del provet kan finnas kvar i Cell Preparation Bag efter att separationen är avslutad.

Avbryt den aktuella körningen och poola innehållet i Reapplication Bag och Cell Preparation Bag. Bearbeta kvarvarande celler med ett nytt slangset, ett nytt förfilter och tillräckligt med ny buffert.

■ Laddning avbruten under känslig provladdning (steget Känslig laddning)

Reapplication Bag hänger lägre än Cell Preparation Bag. Under steget "sensitive loading" är Cell Preparation Bag tom innan volymen är helt laddad i Reapplication Bag. Därför är det möjligt att luftbubblor aktiverar vätskesensorn innan provet är helt laddat från Reapplication Bag efter att depletionsproceduren är avslutad. Det är inte möjligt att starta om provladdningen när den har avbrutits.

Låt CliniMACS Plus Instrument avsluta separationsprogrammet. Avbryt inte den aktuella körningen eftersom det kan leda till onödig cellförlust. Bearbeta kvarvarande prov med ett nytt slangset, förfilter och tillräckligt med ny buffert.

Fastställ det totala antalet celler, procentandel märkta celler och provladdningsvolym och ange faktiska provparametrar under inställning av instrumentet (STEG 2). Beakta det obligatoriska behovet av tre stora påhängare för programmet DEPLETION 3.1 och se installationsanvisningarna för korrekta höjder på påsarna (se avsnitt 7.3.3).

■ Målceller (icke-märkta celler) når inte Reapplication Bag under stegvis cellladdning i bulk (laddningssteg)

Fel slang har satts in i ventil nr 3 (höger gren på slangen till Reapplication Bag insatt istället för vänster [Y-koppling]). Tryck på **STOP** och ta bort den felaktiga slangen från ventil nr. 3. Sätt manuellt in rätt slang (vänster gren på slangen till Reapplication Bag) i ventil 3 enligt beskrivningen i installationsanvisningarna. Tryck på **RUN** för att fortsätta med depletionsproceduren inom 600 sekunder.

Låt CliniMACS Plus Instrument avsluta separationsprogrammet. Avbryt inte den aktuella körningen eftersom det kan leda till onödig cellförlust. Kontrollera depletionseffekt på målfraktionen i Cell Collection Bag. Om depletionseffekten inte är tillräcklig, upprepa depletionsproceduren med ett nytt slangset, ett nytt förfilter och tillräckligt med ny buffert.

Fastställ det totala antalet celler, procentandel märkta celler och provladdningsvolym och ange faktiska provparametervärden under inställning av instrumentet (STEG 2) och starta en ny depletion.

■ Celler flödar till buffertpåsen under gravimetriskt sköljsteg

Buffertpåsen hänger för lågt (lägre än Cell Preparation Bag). Tryck på **STOP** och flytta buffertpåsens hängare till korrekt position. Kontrollera att de tre stora påhängarna är installerade för programmet DEPLETION 3.1 och se installationsanvisningarna för korrekta höjder på påsarna (se avsnitt 7.3.3).

- Om cellerna inte har nått buffertpåsen räcker det att manuellt öppna ventil nr 1 och 2 för ett kort återflödande av celler till Cell Preparation Bag. Efter att buffertpåsen är klar igen, stäng ventil nr 1 och 2 och tryck på **RUN** för att fortsätta med depletionsproceduren inom 600 sekunder.
- Om cellerna redan har nått buffertpåsen, byt ut buffertpåsen och öppna manuellt ventil nr 1 och 2 för en kort spolning av buffertpåsens slang och tryck på **RUN** för att fortsätta med depletionsproceduren inom 600 sekunder. Bearbeta vid behov kvarvarande prov i buffertpåsen (om volymen

överskrider 300 mL, överför först provet till en påse som kan centrifugeras för volymreduktion), använd ett nytt slangset, ett nytt förfilter och tillräckligt med ny buffert.

■ **Pumpmotorn stannar under första eluering av märkta celler till Non-Target Cell Bag**

- Klämman har inte tagits bort efter integritetstestet. Tryck på **STOP** och ta bort klämman. Öppna pumpdörren och kontrollera att pumpslangen är korrekt insatt. Stäng pumpdörren och tryck på **RUN** för att starta om elueringssekvensen inom 600 sekunder.
- Fel slang har satts in i ventil nr 3 (slangen till Non-Target Cell istället för vänster gren [Y-koppling]) på Reapplication Bag. Tryck på **STOP** och ta bort Non-Target Cell Bag från ventil nr. 3. Sätt manuellt in rätt slang (vänster gren på slangen till Reapplication Bag) i ventil 3 enligt beskrivningen i installationsanvisningarna. Tryck på **RUN** för att starta om elueringssekvensen inom 600 sekunder.

8.5 Cellseparationsprestanda

8.5.1 Öväntade händelser: Endast anrikningsprogrammet

■ **Antalet erhålla målceller är lågt**

- Målcellerna var dåligt märkta vid reagenset:
 - Reagensets utgångsdatum har passerat. Kontrollera utgångsdatum. Använd inte reagens efter utgångsdatum.
 - Reagens har inte förvarats på rätt sätt. Kontrollera förvaringstemperatur. Använd inte felaktigt förvarat reagens (se anvisningar för användning av reagenset).
 - Rekommenderad märkningsprocedur har inte beaktats. Se avsnitt en provberedning och separationsprocedur i användarhandboken.
- Celler har förlorats under beredningsstegen.
 - Celler togs bort med supernatanten till uppsamlingspåsen för plasma och Wash Waste Bag på grund av ofullständig sedimentering eller för tidig suspension av cellerna, t.ex. när påsen togs ut från centrifugen. Jämför leukocytinnehåll i icke-märkt cellprodukt och märkt cellprodukt. Kontrollera centrifugeringsinställningarna för korrekt centrifugering. Fastställ cellinnehåll från alla uppsamlingspåsar.
 - Buffert innehöll inte HSA. Tillsätt HSA till buffert med en slutlig koncentration på 0,5% (v/v), (se avsnittet "CliniMACS-material som krävs" för respektive applikation).
 - Centrifugeringsinställningarna var suboptimala. Kontrollera centrifugeringsinställningarna.

- Obalans i centrifugen eller användning av eller asymmetrisk laddning av centrifug.
- Felaktig analys.
 - Provfel uppstod. Kontrollera cellsuspension för celler med klumpar eller sedimenterade celler. Bekräfta att representativa prov har tagits och upprepa analysen.
 - Färgningsfel uppstod. Kontrollera flödescytometrireagens. Upprepa färgning.
 - Felaktiga flödescytometerinställningar. Kontrollera instrumentinställningarna.

■ Låg renhet på målceller.

- Cellprodukten har förvarats på fel sätt. Beredning och separation av cellprodukten ska utföras omedelbart efter leukaferes. Förvara cellprodukten vid en leukocytkoncentration som understiger $0,2 \times 10^9$ per mL. Späd vid behov cellprodukten med autolog plasma. Cellprodukten ska inte vara äldre än 24 timmar när märknings- och separationsprocedurens påbörjas. Om cellprodukten exempelvis måste förvaras över natten ska detta ske vid kontrollerad rumstemperatur (+19 °C till +25 °C [+66 °F till +77 °F]).
- Det magnetiska märkningsprotokollet har inte följts (t.ex. felaktiga volymer under magnetisk märkning). Följ anvisningarna för magnetisk märkning (se STEG 1 i avsnittet för respektive applikation). Fastställ i felsökningssyfte undergrupper av leukocyter (B-celler, T-celler, monocyter, granulocyter samt trombocyter) som kontaminerar målcellsfraktionen och kontakta Miltenyi Biotec Technical Support för råd.
- Ett stort antal granulocyter kontaminerade med startprodukt (suboptimal aferesinställning). Färgade granulocyter binder då CliniMACS-reagens icke-specifikt, vilket kan leda till lägre renhet på målcellerna.
- Funktionsfel på ventil har uppstått. Eluerad målcellsfraktion har kontaminerat delvis av den fraktion som inte är målet eller buffertavfallsfraktionen. Inspektera slangplaceringen i ventilerna för att säkerställa korrekt funktion. Bedöm målcellsinnehållet i den cellfraktion som inte är målet och buffertavfallet. Poola vid behov målfraktionen och den cellfraktion som inte är målet, minska till lämplig volym och upprepa separationen med ett nytt slangset och tillräckligt med ny buffert.

■ Icke-specifikt kvarhållande av döda celler från cellprodukt eller stor icke-specifik cellförlust under proceduren

- Buffert innehåller inte HSA. Tillsätt HSA till buffert med en slutlig koncentration på 0,5% (v/v), (se avsnittet "CliniMACS-material som krävs" för respektive applikation).
- Cellprodukten kan ha förvarats på fel sätt. Beredning och separation av cellprodukten ska utföras omedelbart efter leukaferes. Förvara cellprodukten vid en leukocytkoncentration som understiger $0,2 \times 10^9$ per mL. Späd vid behov leukaferesen med autolog plasma. Cellprodukten ska inte vara äldre

än 24 timmar när märknings- och separationsprocedurens påbörjas. Om cellprodukten exempelvis måste förvaras över natten ska detta ske vid kontrollerad rumstemperatur (+19 °C till +25 °C [+66 °F till +77 °F]).

- Ofullständig provladdning på grund av tilltäppning av separationskolonn, förfilter eller förkolonn. Kontrollera totalt cellantal och depletionseffekt hos kvarvarande celler.

8.5.2 Övåntade händelser: CD34 SELECTION 1/2, ENRICHMENT 1.1

■ Låå renhet på mååcellerna

Elueringen från separationskolonnen var ofullständig.

- Separationsprogram avbröts. Kontrollera displayen för felmeddelande. Fortsätt med avsnitt "Körning avbryts innan cellseparationsprogrammet är avslutat" (se avsnitt 8.4.3 på sidan 208).
- Pumpfel eller ventilfel har uppstått. Hämta celler från slangsetet efter akutprogrammet som beskrivs i avsnitt 8.4.7. Kontrollera volymerna på alla fraktioner. Bedöm mååcellsinnehållet i uppsamlingspåsen för buffert och Negative Fraction Bag.
- Slangen till Cell Collection Bag är blockerad. Kontrollera slangset för stängda klämmor, ocklusioner eller veck.
- Kapacitet hos reagens och/eller slangset har överskridits. Se kapacitetsgräns för relevant applikation.
- Slang är inte korrekt insatt. Kontrollera alla ventiler för korrekt slanginsättning.

8.5.3 Övåntade händelser: CD34 SELECTION 1/2

■ Låå renhet på mååcellerna

Icke-mååceller har håållits kvar.

- Dålig mobilisering av mååceller. Mycket lågt antal mååceller har uppkommit. Därför kan ett lågt antal kontaminerade icke-mååceller (t.ex. granulocyter, monocyter, trombocyter) leda till läååå renhet.
- Måååden plasma eller immunglobuliner var otillräååålig under magnetisk märkning. Fölå anvisningarna för magnetisk märkning (se STEG 1 i avsnittet för respektive applikation).

Om en slutliga koncentration på cirka 30% autolog plasma i provet under magnetisk märkning inte kan garanteras, tillsätt immunglobulin till provet. En slutlig koncentration på 1,5 mg/mL rekommenderas för effektiv blockering av icke-specifik reagensbindning under magnetisk märkning.

8.5.4 Övåntade händelser: ENRICHMENT 1.1

■ Antalet erhålla målceller är lågt

Felaktig inmatning av provparameter. Jämför parameterinmatning med analysresultat.

8.5.5 Övåntade händelser: DEPLETION 2.1 och DEPLETION 3.1

■ Depletionseffekten är låg

Om depletionseffekten är otillräcklig, bearbeta kvarvarande prov med ett nytt slangset och tillräckligt med ny buffert. En ny märkning av de celler som ska depleteras ska övervägas. Fastställ antalet celler och procentandel celler som ska depleteras och ange faktiska provparametrar under inställning av instrumentet (STEG 2). Om synliga klumpar uppstår kan det vara till hjälp att filtrera cellerna för en ny körning. Beakta att celler kan gå förlorade på grund av klumpar och ytterligare filtrering.

- Kapacitet hos reagens och/eller slangset har överskridits. Se kapacitetsgräns för relevant applikation.
- Felaktigt fastställande av celler som ska märkas av reagenset.
- Felaktig inmatning av provparameter. Jämför parameterinmatning med analysresultat.
- Minskad viabilitet hos cellerna. Döda celler kan binda icke-specifikt till separationskolonnen och därmed minska märkningskapaciteten hos kolonnen och eventuellt leda till nedsatt depletionseffekt. Säkerställ bättre kvalitet på cellprodukten och bearbeta produkten så färsk möjligt. Produkter som förvarats i mer än 24 timmar ska inte användas. Om förvaring är nödvändig ska cellprodukten förvaras vid rumstemperatur (+19 °C till +25 °C [+66 °F till +77 °F]). Cellkoncentrationen ska inte överstiga $0,2 \times 10^9$ / mL. Späd vid behov cellprodukten med autolog plasma för att uppnå optimal cellkoncentration.

9 Juridisk information

9.5.1 Begränsad garanti

Förutom vad som anges i en specifik garanti, som kan medfölja denna produkt från eller om inte annat överenskommits skriftligen av en vederbörligen utsedd representant för Miltenyi Biotec, ska Miltenyi Biotecs garanti för någon produkt som är inköpt direkt från Miltenyi Biotec vara föremål för de försäljningsvillkor som du har fått av respektive försäljningsorganisation för Miltenyi Biotec. De tillämpliga försäljningsvillkoren kan variera från land till land och region till region. Dessa villkor kan erhållas på begäran eller finns på www.miltenyibiotec.com. Inget i detta dokument ska tolkas som att utgöra en ytterligare garanti.

För produkter som köpts från tredjepartsdetaljist eller återförsäljare (t.ex. inköpt från en behörig lokal Miltenyi Biotec serviceleverantör) kan andra villkor gälla.

För att fastställa vilken garanti som medföljde din produkt, se följesedel, faktura, kvitto eller annan försäljningsdokumentation. Vissa komponenter i en produktkombination som du har köpt kan ha kortare garanti än den som anges på följesedel, faktura, kvitto eller annan försäljningsdokumentation (t.ex. gods som är föremål för hållbarhet och åldrande).

Miltenyi Biotecs garanti för denna produkt omfattar endast produktproblem orsakade av defekter i material eller arbete vid normal användning. Den omfattar inte produktproblem som orsakats av annat, inklusive men inte begränsat till produktproblem på grund av användning av produkten på ett annat sätt än vad som specifikt anges i denna användarhandbok, t.ex. olämplig eller felaktig användning, felaktig montering eller installation av en operatör eller en tredje del, rimligt slitage, försumlig eller felaktig drift, hantering, förvaring, service eller underhåll, bristande efterlevnad av driftanvisningarna, obehörig modifiering av någon del av produkten eller användning av olämpliga förbrukningsmaterial, tillbehör eller arbetsmaterial.

Miltenyi Biotecs garanti omfattar inte produkter sålda i BEFINTLIGT SKICK eller förbrukningsmaterial. Inget i detta dokument ska tolkas som att utgöra en ytterligare garanti.

Miltenyi Biotec måste omedelbart informeras vid anspråk under sådan garanti. Om ett material eller tillverkningsfel uppkommer inom garantiperioden kommer Miltenyi Biotec att vidta lämpliga åtgärder för att återställa instrumentet till fullständig användbarhet.

Skadebegränsning: Miltenyi Biotec ska inte hållas ansvarigt för oförutsedda skador eller följskador för brott mot någon uttalad eller underförstådd garanti eller villkor avseende denna produkt.

Vissa länders/staters lagstiftning medger inte undantag eller begränsningar av oförutsedda skador eller följdskador, vilket innebär att ovan angivna begränsningar eller undantag kanske inte gäller dig. Denna garanti ger dig specifika juridiska rättigheter och du kan ha andra rättigheter som kan variera från stat till stat eller jurisdiktion till jurisdiktion.

9.5.2 Varumärken

CliniMACS, MACS, MACSmix, Miltenyi Biotec-logotypen och MiniMACS är registrerade varumärken som ägs av Miltenyi Biotec och/eller dess dotterbolag i olika länder världen runt. Alla andra varumärken som nämns i detta dokument tillhör respektive ägare och används endast för identifieringsändamål.



Miltenyi Biotec

Tyskland/Österrike

Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG
Friedrich-Ebert-Straße 68
51429 Bergisch Gladbach
Tyskland
☎ +49 2204 8306-0
✉ +49 2204 85197
✉ macsde@miltenyi.com

USA/Kanada

Miltenyi Biotec Inc.
2303 Lindbergh Street
Auburn, CA 95602
USA
☎ 800 FÖR MACS
☎ +1 866 811 4466
✉ +1 877 591 1060
✉ macsus@miltenyi.com

Australien

Miltenyi Biotec
Australia Pty. Ltd.
Unit 11, 2 Eden Park Drive
Macquarie Park NSW 2113
Australien
☎ +61 2 8877 7400
✉ +61 2 9889 5044
✉ macsau@miltenyi.com

Benelux

Miltenyi Biotec B.V.
Dellaertweg 9C
2316 WZ Leiden
Nederländerna
✉ macsnl@miltenyi.com
Kundtjänst Nederländerna
☎ 0800 4020120
✉ 0800 4020100
Kundtjänst Belgien
☎ 0800 94016
✉ 0800 99626
Kundtjänst Luxemburg
☎ 800 24971
✉ 800 24984

Frankrike

Miltenyi Biotec SAS
10 rue Mercœur
75011 Paris
Frankrike
☎ +33 1 56 98 16 16
✉ macsfr@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

Italien

Miltenyi Biotec S.r.l.
Via Paolo Nanni Costa, 30
40133 Bologna
Italien
☎ +39 051 6 460 411
✉ +39 051 6 460 499
✉ macsit@miltenyi.com

Japan

Miltenyi Biotec K.K.
NEX-Eitai Building 5F
16-10 Fuyuki, Koto-ku
Tokyo 135-0041
Japan
☎ +81 3 5646 8910
✉ +81 3 5646 8911
✉ macsjp@miltenyi.com

Kina

Miltenyi Biotec Technology &
Trading (Shanghai) Co., Ltd.
Room A401, 4/F
No. 1077, Zhangheng Road
Pudong New Area
201203 Shanghai
Folkrepubliken Kina
☎ +86 21 6235 1005-0
✉ +86 21 6235 0953
✉ macscn@miltenyi.com.cn

Norden och Baltikum

Miltenyi Biotec Norden AB
Medicon Village
Scheeletorget 1
223 81 Lund
Sverige
✉ macsse@miltenyi.com
Kundtjänst Sverige
☎ 0200 111 800
✉ +46 280 72 99
Kundtjänst Danmark
☎ 80 20 30 10
✉ +46 46 280 72 99
Kundtjänst Norge, Finland, Island och Baltikum
☎ +46 46 280 72 80
✉ +46 46 280 72 99

Schweiz

Miltenyi Biotec Swiss AG
Gibelinstrasse 27
4500 Solothurn
Schweiz
☎ +41 32 623 08 47
✉ +49 2204 85197
✉ macsch@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

Spanien

Miltenyi Biotec S.L.
C/Luis Buñuel 2
Ciudad de la Imagen
28223 Pozuelo de Alarcón (Madrid)
Spanien
☎ +34 91 512 12 90
✉ +34 91 512 12 91
✉ macses@miltenyi.com

Storbritannien

Miltenyi Biotec Ltd.
Almac House, Church Lane
Bisley, Surrey GU24 9DR
Storbritannien
☎ +44 1483 799 800
✉ +44 1483 799 811
✉ macsuk@miltenyi.com

Syd Korea

Miltenyi Biotec Korea Co., Ltd.
Donggeuk 7F
562 Nonhyeon-ro
Gangnam-gu
Seoul 06136
Sydkorea
☎ +82 2 555 1988
✉ +82 2 555 8890
✉ macskr@miltenyi.com

🌐 www.miltenyibiotec.com

Miltenyi Biotec tillhandahåller produkter och tjänster över hela världen. Besök www.miltenyibiotec.com/local för att hitta närmaste Miltenyi Biotec-kontor.

CliniMACS, MACS, MACSmix, Miltenyi Biotec-logotypen och MiniMACS är registrerade varumärken eller varumärken som tillhör Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG och/eller dess dotterbolag i olika länder världen runt. Upphovsrätt © 2023 Miltenyi Biotec och/eller dess dotterbolag. Med ensamrätt.