Miltenyi Biotec

CliniMACS® Plus Applications

Korisnički priručnik



Komponente sustava CliniMACS System, uključujući reagense, komplete cijevi, instrumente i pufer PBS/EDTA Buffer, osmišljene su, proizvedene i ispitane prema sustavu kvalitete certificiranom u skladu s normom ISO 13485. U EU-u komponente sustava CliniMACS dostupne su kao medicinski proizvod s oznakom CE za njihovu namjenu, osim ako nije drugačije naznačeno. U SAD-u sustav reagensa CliniMACS CD34 Reagent System, uključujući sustav CliniMACS Plus Instrument, CliniMACS CD34 Reagent, CliniMACS Tubing Set TS i CliniMACS Tubing Set LS, kao i CliniMACS PBS/EDTA Buffer, odobreni su od strane američke Agencije za hranu i lijekove (FDA) kao instrument za humanitarnu primjenu (engl. Humanitarian Use Instrument (HUD)), prema odobrenju američkog saveznog zakona za upotrebu u liječenju pacijenata s akutnom mijeloičnom leukemijom (AML) u prvoj potpunoj remisiji. Nije dokazana učinkovitost ovog uređaja za tu indikaciju. Drugi proizvodi iz linije proizvoda CliniMACS dostupni za upotrebu samo u sklopu primjene novog lijeka koji se ispituje (Investigational New Drug, IND), izuzeća za proizvod koji se ispituje (Investigational device Exemption, IDE) ili uz odobrenje američke Agencije za hranu i lijekove (FDA). U Australiji su sljedeće komponente sustava CliniMACS Plus uključene u Australian Register of Therapeutic Goods (ARTG) te su stoga odobrene za isporuku: sustav CliniMACS Plus Instrument, reagens CliniMACS CD34 Reagent, komplet cijevi CliniMACS Tubing Set, komplet cijevi CliniMACS Tubing Set LS, komplet cijevi CliniMACS Depletion Tubing Set i pufer CliniMACS PBS/EDTA Buffer. U Australiji se mogu upotrebljavati samo oni proizvodi koji su uključeni u ARTG.

Osim ako nije drugačije navedeno, proizvodi i usluge tvrtke Miltenyi Biotec predviđeni su samo za upotrebu u istraživanju, a ne za terapijske ili dijagnostičke svrhe.

Autorska prava © 2023 Miltenyi Biotec i/ili njihove podružnice. Sva prava pridržana.

Niti jedan dio ovog dokumenta ne smije se reproducirati, pohranjivati u sustavu za pretraživanje, prenositi, objavljivati ili distribuirati u bilo kojem obliku ili na bilo koji način, elektronički, mehanički, fotokopiranjem, snimanjem na mikrofilm, presnimavanjem ili na drugi način, bez prethodnog pismenog odobrenja tvrtke Miltenyi Biotec; međutim bez obzira na prethodno navedeno, vlasnici sustava CliniMACS Plus mogu izrađivati kopije samo za svrhe obuke osoblja za upotrebu i servisiranje uređaja unutar njihove tvrtke ili organizacije.

CliniMACS, MACS, MACSmix, logotip tvrtke Miltenyi Biotec i MiniMACS su registrirani zaštitni znakovi ili zaštitni znakovi tvrtke Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG i/ili njihovih podružnica u raznim zemljama širom svijeta. Svi ostali zaštitni znakovi navedeni u ovom dokumentu vlasništvo su njihovih odgovarajućih vlasnika i rabe se samo za potrebe identifikacije.

CliniMACS® Plus Applications

Korisnički priručnik

Verzija softvera 2.4x

Izdano: 11-2023
210-003-238/01

MD CE 0123

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

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

www.miltenyibiotec.com

Ključne informacije

Ovaj korisnički priručnik pruža informacije za korištenje aplikacija CliniMACS Plus. Upute, upozorenja, mjere opreza i druge važne informacije za korištenje instrumenta CliniMACS Plus Instrument navedene su u korisničkom priručniku za CliniMACS Plus Instrument.

⚠ UPOZORENJE

Sustavom CliniMACS Plus smiju rukovati samo rukovatelji koji su prošli obuku. Prije stavljanja sustava u rad pažljivo trebate pročitati i razumjeti informacije o sigurnosti, upozorenja, mjere opreza i upute za pravilan rad za CliniMACS Plus Instrument navedene u uputama za korištenje sustava CliniMACS Plus (uključujući, bez ograničenja, informacije o sigurnosti u korisničkom priručniku za CliniMACS Plus Instrument i poglavlju 3 „Upozorenja i mjere opreza" na stranici 27 u ovom korisničkom priručniku, te u svim preporukama vezanim uz sigurnost koje je izdala tvrtka Miltenyi Biotec). Osobitu pozornost obratite na sva upozorenja prikazana na instrumentu ili priložena uz potrošne materijale, pribor, dodatne materijale i opremu. Rukovatelj se mora pridržavati svih informacija o sigurnosti, upozorenja, mjera opreza i uputa cijelo vrijeme tijekom rada instrumenta, uz potvrdu da su poštivane sve informacije o sigurnosti, upozorenja, mjere opreza i upute. Nepridržavanje informacija o sigurnosti, upozorenja, mjera opreza i naputaka koji se nalaze u ovim uputama za korištenje za posljedicu bi moglo imati kvar instrumenta, materijalnu štetu, gubitak ciljnih stanica, ozljede i/ili smrt ljudi.

Sadržaj

1	**Uvod**	**11**
1.1	Opće informacije	11
1.2	Označavanje stanica s CliniMACS reagensom	12
1.3	Magnetsko razdvajanje stanica visokog gradijenta	13
1.4	Strategije razdvajanja	13
1.4.1	Strategija obogaćivanja	14
1.4.2	Strategija iscrpljivanja	15
2	**Pojmovnik**	**19**
2.1	Grafički opis	19
2.2	Rječnik simbola	19
2.3	Rječnik pojmova	20
3	**Upozorenja i mjere opreza**	**27**
3.1	Vezano uz proces	27
3.2	CliniMACS Reagensi i biotin konjugati	28
3.3	Rukovanje biološki opasnim materijalima	29
3.4	Početni stanični proizvod	30
4	**CliniMACS Plus sustav**	**31**
4.1	CliniMACS Plus Instrument	31
4.2	CliniMACS Reagensi i biotin konjugati	31
4.3	CliniMACS Komplet cijevi	31
4.4	CliniMACS PBS/EDTA Buffer	31
4.5	CliniMACS pribor	32
4.6	Potrebni dodatni materijali	32
4.7	Potrebna oprema	33
5	**Pregled primjena**	**35**
5.1	Četiri KORAKA do ciljnih stanica	35
5.2	Tablica za pregled	37

6	**Pregled KORAKA 1 – 4 specifičan za primjenu**	**41**
6.1	Obogaćivanje stanica pozitivnih na CD34	41
6.1.1	KORAK 1: Priprema stanica i magnetsko označavanje	41
6.1.2	KORAK 2: Odabir programa razdvajanja	43
6.1.3	KORAK 3: Instalacija kompleta cijevi CliniMACS	44
6.1.4	KORAK 4: CliniMACS Plus separacija	44
6.2	Obogaćivanje stanica pozitivnih na CD14	44
6.2.1	KORAK 1: Priprema stanica i magnetsko označavanje	44
6.2.2	KORAK 2: Odabir programa razdvajanja	47
6.2.3	KORAK 3: Instalacija kompleta cijevi CliniMACS	47
6.2.4	KORAK 4: CliniMACS Plus separacija	47
6.3	Obogaćivanje/iscrpljivanje CliniMACS Anti-Biotin Reagent	48
6.3.1	KORAK 1: Priprema stanica i magnetsko označavanje	48
6.3.2	KORAK 2: Odabir programa razdvajanja	52
6.3.3	KORAK 3: Instalacija kompleta cijevi CliniMACS	52
6.3.4	KORAK 4: CliniMACS Plus separacija	52
6.4	Obogaćivanje stanica pozitivnih na CD56	53
6.4.1	KORAK 1: Priprema stanica i magnetsko označavanje	53
6.4.2	KORAK 2: Odabir programa razdvajanja	56
6.4.3	KORAK 3: Instalacija kompleta cijevi CliniMACS	56
6.4.4	KORAK 4: CliniMACS Plus separacija	56
6.5	Iscrpljivanje stanica pozitivnih na CD3	57
6.5.1	KORAK 1: Priprema stanica i magnetsko označavanje	57
6.5.2	KORAK 2: Odabir programa razdvajanja	61
6.5.3	KORAK 3: Instalacija kompleta cijevi CliniMACS	61
6.5.4	KORAK 4: CliniMACS Plus separacija	61
6.6	Iscrpljivanje stanica pozitivnih na CD19	62
6.6.1	KORAK 1: Priprema stanica i magnetsko označavanje	62
6.6.2	KORAK 2: Odabir programa razdvajanja	64
6.6.3	KORAK 3: Instalacija kompleta cijevi CliniMACS	64
6.6.4	KORAK 4: CliniMACS Plus separacija	64
6.7	Iscrpljivanje stanica pozitivnih na CD3 i stanica pozitivnih na CD19	65
6.7.1	KORAK 1: Priprema stanica i magnetsko označavanje	65
6.7.2	KORAK 2: Odabir programa razdvajanja	68

6.7.3	KORAK 3: Instalacija kompleta cijevi CliniMACS	68
6.7.4	KORAK 4: CliniMACS Plus separacija	68
6.8	Obogaćivanje/iscrpljivanje stanica pozitivnih na CD8	69
6.8.1	KORAK 1: Priprema stanica i magnetsko označavanje	69
6.8.2	KORAK 2: Odabir programa razdvajanja	72
6.8.3	KORAK 3: Instalacija kompleta cijevi CliniMACS	72
6.8.4	KORAK 4: CliniMACS Plus separacija	73
6.9	Obogaćivanje/iscrpljivanje stanica pozitivnih na CD25	73
6.9.1	KORAK 1: Priprema stanica i magnetsko označavanje	73
6.9.2	KORAK 2: Odabir programa razdvajanja	78
6.9.3	KORAK 3: Instalacija kompleta cijevi CliniMACS	78
6.9.4	KORAK 4: CliniMACS Plus separacija	78
6.10	Obogaćivanje/iscrpljivanje stanica pozitivnih na CD4	79
6.10.1	KORAK 1: Priprema stanica i magnetsko označavanje	79
6.10.2	KORAK 2: Odabir programa razdvajanja	83
6.10.3	KORAK 3: Instalacija kompleta cijevi CliniMACS	83
6.10.4	KORAK 4: CliniMACS Plus separacija	83
6.11	Iscrpljivanje stanica pozitivnih na CD4 i stanica pozitivnih na CD8	84
6.11.1	KORAK 1: Priprema stanica i magnetsko označavanje	84
6.11.2	KORAK 2: Odabir programa razdvajanja	87
6.11.3	KORAK 3: Instalacija kompleta cijevi CliniMACS	88
6.11.4	KORAK 4: CliniMACS Plus separacija	88
6.12	Obogaćivanje stanica pozitivnih na CD1c (BDCA-1) – Dio 1: Iscrpljivanje stanica pozitivnih na CD19 i označavanje stanica pozitivnih na CD1c (BDCA-1)	89
6.12.1	KORAK 1: Priprema stanica i magnetsko označavanje	89
6.12.2	KORAK 2: Odabir programa razdvajanja	91
6.12.3	KORAK 3: Instalacija kompleta cijevi CliniMACS	91
6.12.4	KORAK 4: CliniMACS Plus separacija	92
6.13	Obogaćivanje stanica pozitivnih na CD1c (BDCA-1) – Dio 2: Flexible Labeling System	92
6.13.1	KORAK 1: Priprema stanica i magnetsko označavanje	92
6.13.2	KORAK 2: Odabir programa razdvajanja	94
6.13.3	KORAK 3: Instalacija kompleta cijevi CliniMACS	94

6.13.4 KORAK 4: CliniMACS Plus separacija 94
6.14 Obogaćivanje stanica pozitivnih na CD304 (BDCA-4) 95
6.14.1 KORAK 1: Priprema stanica i magnetsko označavanje 95
6.14.2 KORAK 2: Odabir programa razdvajanja 97
6.14.3 KORAK 3: Instalacija kompleta cijevi CliniMACS 97
6.14.4 KORAK 4: CliniMACS Plus separacija 98
6.15 Iscrpljivanje stanica pozitivnih na TCRα/β 98
6.15.1 KORAK 1: Priprema stanica i magnetsko označavanje 98
6.15.2 KORAK 2: Odabir programa razdvajanja 101
6.15.3 KORAK 3: Instalacija kompleta cijevi CliniMACS 101
6.15.4 KORAK 4: CliniMACS Plus separacija 101
6.16 Iscrpljivanje stanica pozitivnih na CD45RA 102
6.16.1 KORAK 1: Priprema stanica i magnetsko označavanje 102
6.16.2 KORAK 2: Odabir programa razdvajanja 104
6.16.3 KORAK 3: Instalacija kompleta cijevi CliniMACS 105
6.16.4 KORAK 4: CliniMACS Plus separacija 105
6.17 Obogaćivanje ljudskih stanica koje izlučuju IFN-gamma s CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma) 105
6.17.1 KORAK 1: Priprema stanica i magnetsko označavanje 105
6.17.2 KORAK 2: Odabir programa razdvajanja 118
6.17.3 KORAK 3: Instalacija kompleta cijevi CliniMACS 118
6.17.4 KORAK 4: CliniMACS Plus separacija 118

7 Detaljno objašnjenje KORAKA 1 – 4 119

7.1 KORAK 1: Priprema stanica i magnetsko označavanje 119
7.1.1 Prve potrebne radnje 119
7.1.2 Magnetsko označavanje stanica 121
7.2 KORAK 2: Odabir programa razdvajanja 134
7.2.1 Uključivanje sustava CliniMACS Plus Instrument 134
7.2.2 CD34 SELECTION 1/2 134
7.2.3 ENRICHMENT 1.1 136
7.2.4 ENRICHMENT 3.2 141
7.2.5 DEPLETION 2.1 143
7.2.6 DEPLETION 3.1 148

7.3 KORAK 3: Instalacija kompleta cijevi CliniMACS 153
7.3.1 CliniMACS Tubing Set i CliniMACS Tubing Set LS 153
7.3.2 Alternativna Instalacija kompleta cijevi CliniMACS 168
7.3.3 CliniMACS Depletion Tubing Set 173
7.4 KORAK 4: CliniMACS Plus separacija 188
7.4.1 CD34 SELECTION 1/2 188
7.4.2 ENRICHMENT 1.1 192
7.4.3 ENRICHMENT 3.2 196
7.4.4 DEPLETION 2.1 200
7.4.5 DEPLETION 3.1 204

8 Rješavanje problema 209

8.1 Miltenyi Biotec Technical Support 209
8.2 Priprema proizvoda leukafereze 209
8.3 CliniMACS Plus Instrument i CliniMACS Komplet cijevi 210
8.3.1 Poruke o pogrešci 210
8.3.2 Postavljanje i priprema kompleta cijevi 210
8.4 Automatizirano razdvajanje stanica 211
8.4.1 Poruke s upozorenjima 211
8.4.2 Neočekivani događaji: svi programi razdvajanja 212
8.4.3 Neočekivani događaji: samo programi obogaćivanja 214
8.4.4 Neočekivani događaji: CD34 SELECTION 1/2 214
8.4.5 Neočekivani događaji: ENRICHMENT 1.1 215
8.4.6 Neočekivani događaji: ENRICHMENT 3.2 216
8.4.7 Hitni program (treba upotrijebiti samo s programima obogaćivanja) 217
8.4.8 Neočekivani događaji: DEPLETION 2.1 218
8.4.9 Neočekivani događaji: DEPLETION 3.1 218
8.5 Učinkovitost razdvajanja stanica 221
8.5.1 Neočekivani događaji: samo programi obogaćivanja 221
8.5.2 Neočekivani događaji: CD34 SELECTION 1/2 i ENRICHMENT 1.1 222
8.5.3 Neočekivani događaji: CD34 SELECTION 1/2 223
8.5.4 Neočekivani događaji: ENRICHMENT 1.1 223
8.5.5 Neočekivani događaji: DEPLETION 2.1 i DEPLETION 3.1 224

9 Pravne napomene 225

9.1 Ograničeno jamstvo 225

9.2 Zaštitni znakovi 226

1 Uvod

1.1 Opće informacije

Sustav CliniMACS Plus pruža komplet alata koji omogućuju visokokvalitetno standardizirano razdvajanje stanica za terapijske primjene.

Sustav CliniMACS Plus se temelji na tehnologiji magnetskog razdvajanja stanica (MACS® Tehnologija) koju je razvila tvrtka Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG. Tvrtka Miltenyi Biotec je ove proizvode učinila dostupnima za kliničke primjene u skladu sa zahtjevima europskih regulatornih normi.

CliniMACS reagensi i biotin konjugati namijenjeni su samo za *in vitro* korištenje i nisu namijenjeni za terapijsko korištenje ili za izravno ubrizgavanje u pacijente.

CliniMACS reagensi u kombinaciji sa sustavom CliniMACS Plus namijenjeni su za razdvajanje ljudskih stanica.

Tvrtka Miltenyi Biotec kao proizvođač sustava CliniMACS Plus ne daje nikakve preporuke u vezi s upotrebom razdvojenih stanica za terapijske svrhe i ne postavlja nikakve zahtjeve u vezi s kliničkom koristi.

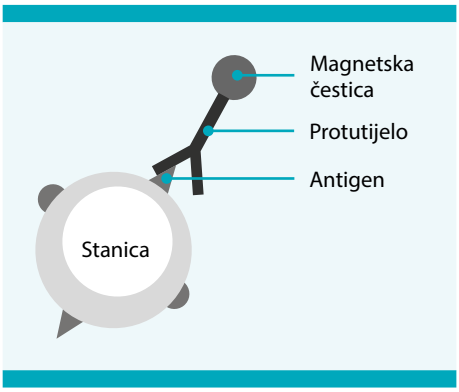
Za proizvodnju i upotrebu ciljnih stanica kod ljudi potrebno je pridržavati se nacionalnih zakona i uredba, npr. Direktive EU-a 2004/23/EZ (ljudska tkiva i stanice) ili Direktive 2002/98/EZ (ljudska krv i krvne komponente). Stoga je svaka klinička primjena ciljnih stanica isključiva odgovornost korisnika sustava CliniMACS Plus.

Ograničeno jamstvo
Ako se sustav CliniMACS Plus koristi na način koji nije izričito opisan u ovom priručniku, sva će jamstva biti nevažeća.

VAŽNO
Prije upotrebe sustava CliniMACS Plus ili bilo koje komponente izvan Europskog ekonomskog područja mora se potvrditi regulatorno odobrenje sustava CliniMACS Plus ili bilo koje komponente sustava CliniMACS u državi korisnika.

1.2 Označavanje stanica s CliniMACS reagensom

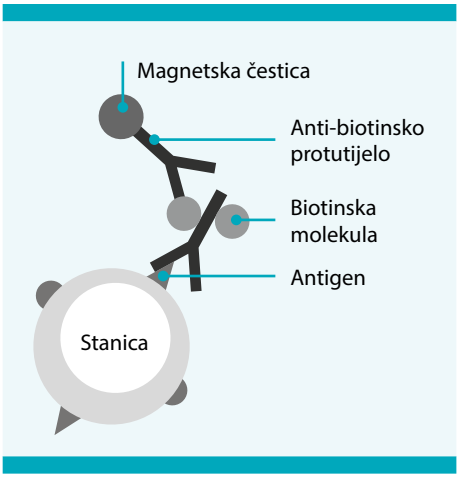
Magnetsko sortiranje stanica MACS (Magnetic Cell Sorting) dokazano je i učinkovito sredstvo za razdvajanje mnogih vrsta stanica, u istraživačkim laboratorijima kao i u kliničkim primjenama. Mješavine stanica razdvajaju se u magnetskom polju uz primjenu imunomagnetske oznake specifične za vrstu stanica od interesa, npr. ljudskih CD34 pozitivnih hematopoetskih progenitorskih stanica iz heterogenih hematoloških staničnih populacija.



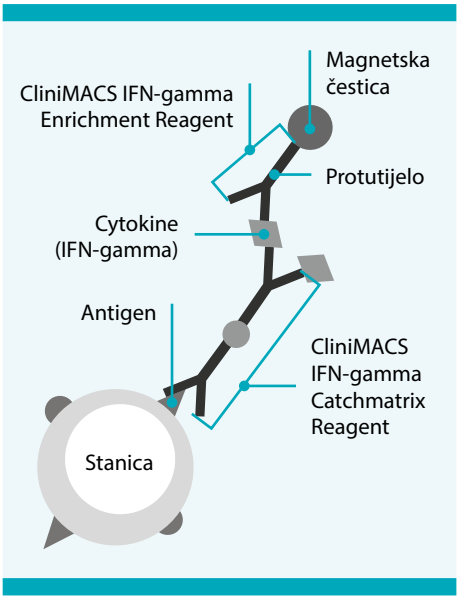
Slika 1.1: Magnetsko označavanje stanica

Korištenjem sustava CliniMACS Plus stanice mogu biti magnetski označene na tri različita načina:

- Direktno u postupku označavanja u jednom koraku s protutijelima specifičnim za antigen konjugiranim sa super-paramagnetskim željezo-dekstranovim zrncima (vidjeti Slika 1.1).
- Indirektno u postupku označavanja u dva koraka koji se naziva Flexible Labeling System. U prvom se koraku stanice označavaju s protutijelima specifičnim za antigen konjugiranim biotinom. U drugom se koraku ta protutijela označavaju s protutijelima specifičnim za biotin konjugiranim sa super-paramagnetskim željezo-dekstranovim zrncima (vidjeti Slika 1.2).
- Indirektno u postupku označavanja od dva koraka koji se naziva CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma). Stanice se najprije *in vitro* restimuliraju kako bi se izlučio citokin (npr. IFN-gamma). U prvom se koraku označavanja restimulirane stanice označavaju hibridnom molekulom koja se sastoji od protutijela specifičnog za leukocite i protutijela specifičnog za citokin koje se naziva CliniMACS IFN-gamma Catchmatrix Reagent. Stanice se potom inkubiraju kako bi se omogućilo izlučivanje citokina koji catchmatrix „hvata" na površini stanica. Nakon toga, u drugom koraku označavanja stanice koje izlučuju citokin označavaju se s protutijelima specifičnim za citokin konjugiranim sa super-paramagnetskim željezo-dekstranovim zrncima (CliniMACS IFN-gamma Enrichment Reagent), (vidjeti Slika 1.3).



Slika 1.2: Flexible Labeling System



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

1.3 Magnetsko razdvajanje stanica visokog gradijenta

Magnetski označena stanična suspenzija puni se na CliniMACS Plus Instrument pripremljen s kompletom cijevi. Ova se magnetska jedinica za razdvajanje stanica visokog gradijenta sastoji od specifično razvijenog snažnog trajnog magneta i kolone za razdvajanje s feromagnetskom matricom.

Polje visokog gradijenta omogućuje stvaranje jakih magnetskih sila i brzu demagnetizaciju. Kada se male feromagnetske strukture poput matrice kolone stave unutar magnetskog polja, one prekidaju homogenost polja. To za posljedicu ima stvaranje visokih magnetskih gradijenata. U njihovoj neposrednoj okolini feromagnetske strukture stvaraju magnetske sile 10.000 puta jače od konvencionalnih geometrija. Polje visokog gradijenta privlači označene stanice matrici i učinkovito ih zadržava. Nakon uklanjanja kolone iz magneta brza demagnetizacija matrice kolone omogućuje otpuštanje zadržanih stanica.

1.4 Strategije razdvajanja

Sustav CliniMACS Plus stavlja korisniku na raspolaganje različite programe razdvajanja. Programi razdvajanja općenito se mogu podijeliti u strategije obogaćivanja (CD34 SELECTION 1 i 2, ENRICHMENT 1.1 i ENRICHMENT 3.2) i strategije iscrpljivanja (DEPLETION 2.1 i DEPLETION 3.1).

Obogaćivanje magnetski označenih stanica

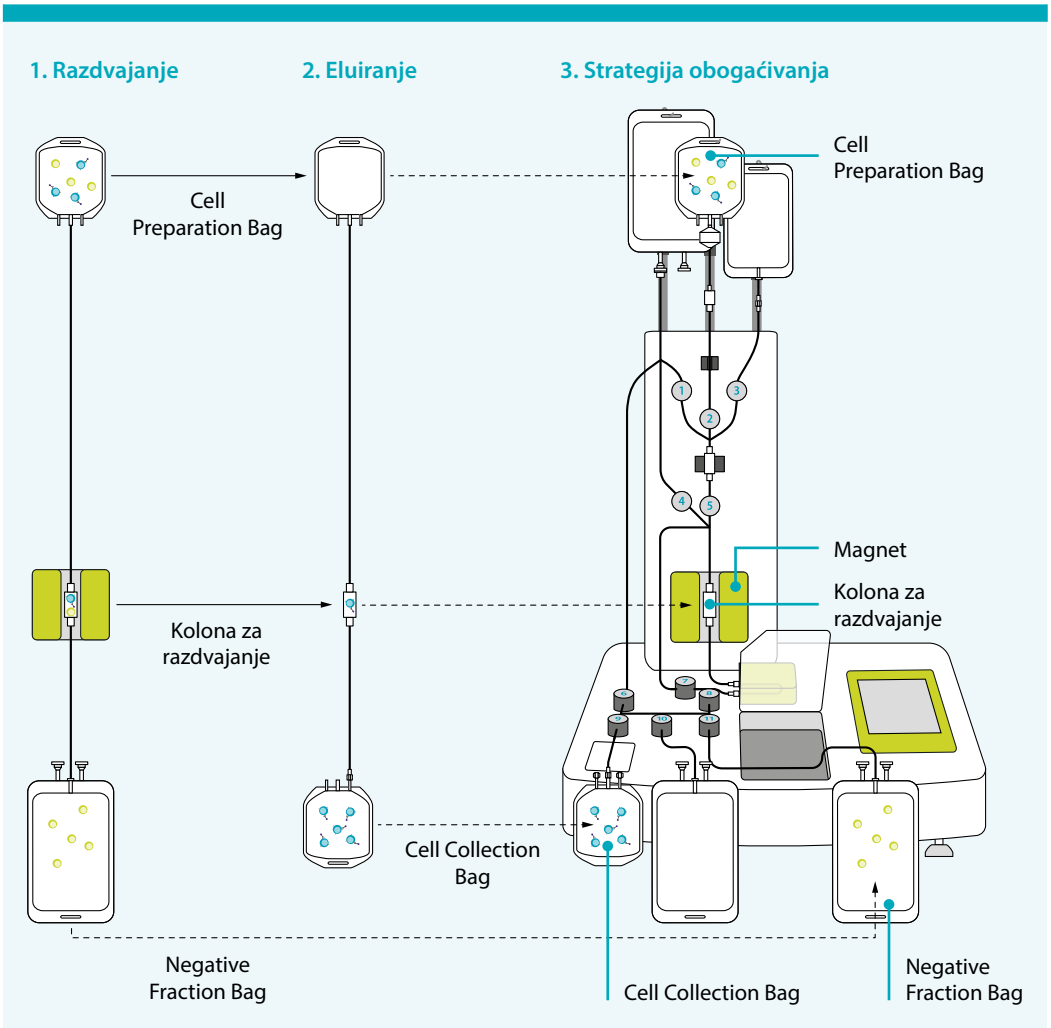
Pri odabiru strategije obogaćivanja magnetski označene stanice (primarno označene s CliniMACS reagensom) zadržavaju se u koloni za razdvajanje, a neoznačene stanice prolaze dalje. Označene stanice (ciljne stanice) prikupljaju se u vrećicu Cell Collection Bag, a neoznačene stanice (neciljne stanice) u vrećicu Negative Fraction Bag (vidjeti Slika 1.4).

Iscrpljivanje magnetski označenih stanica

MACS tehnologija također je vrlo učinkovita za iscrpljivanje specifičnih staničnih populacija. Neželjene se stanice specifično označavaju sa super-paramagnetskim česticama i razdvajaju od ciljnih stanica nakon prolaska kroz magnetsku kolonu visokog gradijenta. Za razliku od strategije obogaćivanja, neoznačene stanice (ciljne stanice) prikupljaju se u vrećicu Cell Collection Bag, a označene stanice (neciljne stanice) prikupljaju se u vrećicu Negative Fraction Bag (vidjeti Slika 1.5) ili u vrećicu Non-Target Cell Bag (vidjeti Slika 1.6 i Slika 1.7).

1.4.1 Strategija obogaćivanja

Obogaćivanje stanica uz primjenu kompleta cijevi CliniMACS Tubing Set ili CliniMACS Tubing Set LS

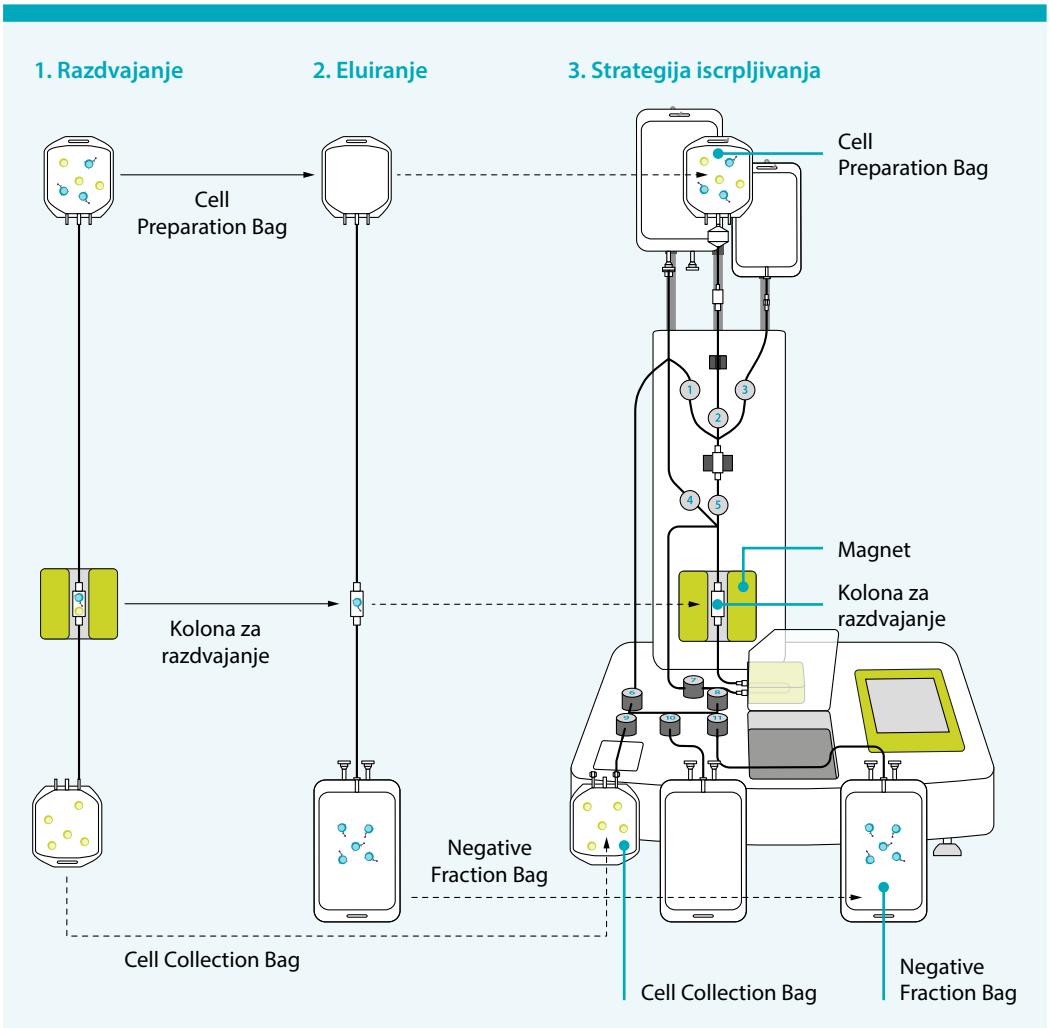


Slika 1.4: Strategija programa obogaćivanja uz primjenu kompleta cijevi CliniMACS Tubing Set ili CliniMACS Tubing Set LS

1. Magnet je u otvorenom položaju „ON". Magnetski označene stanice zadržavaju se u koloni za razdvajanje, dok druge neoznačene stanice (neciljne stanice) prolaze kroz kolonu i prikupljaju se u vrećicu Negative Fraction Bag.
2. Magnet je u otvorenom položaju „OFF". Magnetski označene stanice (ciljne stanice) oslobađaju se iz kolone za razdvajanje i prikupljaju se u vrećicu Cell Collection Bag.
3. Program obogaćivanja zadržava magnetski označene stanice u koloni za razdvajanje, dok neoznačene stanice (neciljne stanice) prolaze kroz kolonu i prikupljaju se u vrećicu Negative Fraction Bag. Kada se magnet pomakne u zatvoreni položaj „OFF", magnetski označene stanice (ciljne stanice) otpuštaju se iz kolone i prikupljaju u vrećicu Cell Collection Bag. **Napomena:** ciljana frakcija stanica uvijek se prikuplja u vrećicu Cell Collection Bag.

1.4.2 Strategija iscrpljivanja

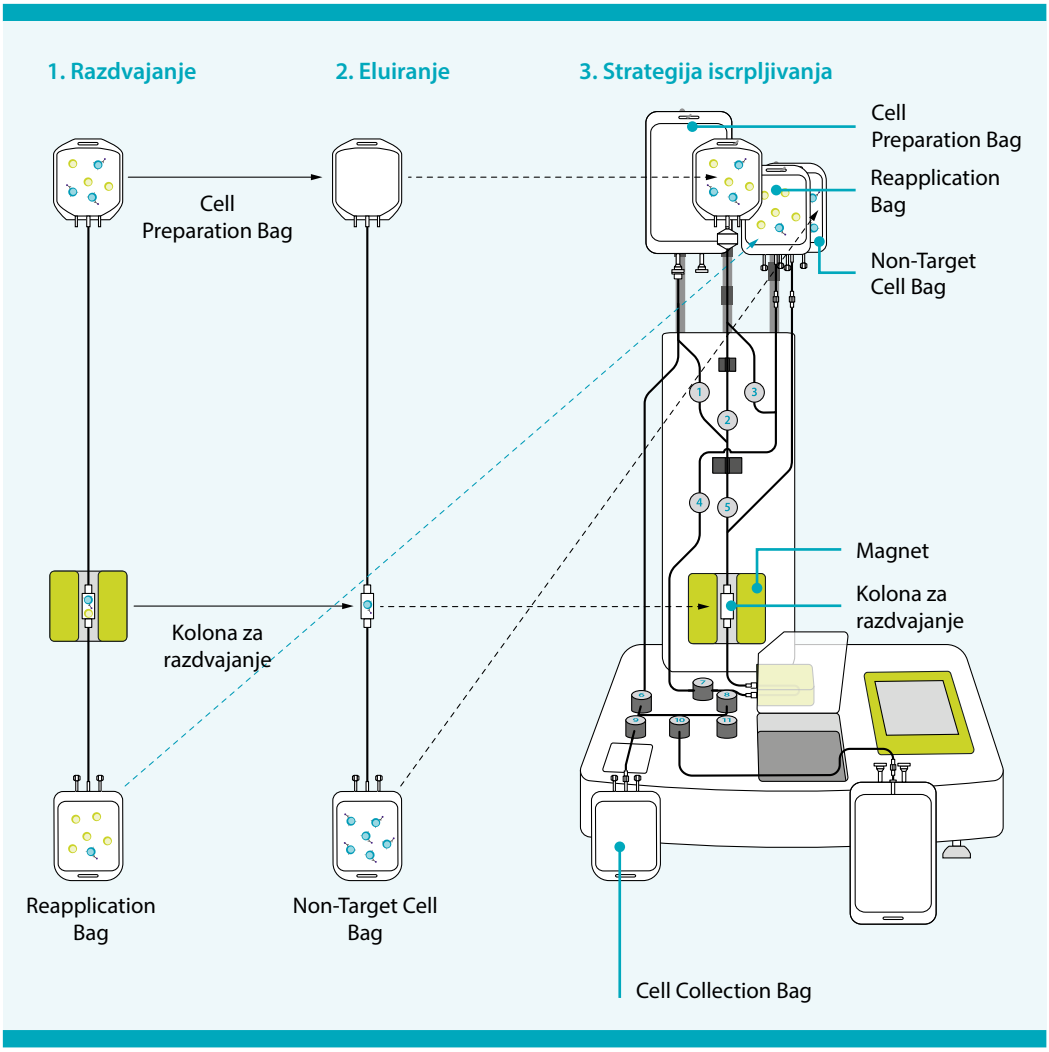
Iscrpljivanje stanica uz primjenu kompleta cijevi CliniMACS Tubing Set LS: DEPLETION 2.1



Slika 1.5: Strategija programa iscrpljivanja DEPLETION 2.1 uz primjenu kompleta cijevi CliniMACS Tubing Set LS

1. Magnet je u otvorenom položaju „ON". Magnetski označene stanice zadržavaju se u koloni za razdvajanje, dok druge neoznačene stanice (ciljne stanice) prolaze kroz kolonu i prikupljaju se u vrećicu Cell Collection Bag.
2. Magnet je u otvorenom položaju „OFF". Magnetski označene stanice (neciljne stanice) oslobađaju se iz kolone za razdvajanje i prikupljaju se u vrećicu Negative Fraction Bag.
3. Program iscrpljivanja (DEPLETION 2.1) zadržava magnetski označene stanice u koloni za razdvajanje, neoznačene stanice (ciljne stanice) prolaze kroz kolonu i prikupljaju se u vrećicu Cell Collection Bag. Kada se magnet pomakne u zatvoreni položaj „OFF", magnetski označene stanice (neciljne stanice) otpuštaju se iz kolone i prikupljaju u vrećicu Negative Fraction Bag. **Napomena:** ciljana frakcija stanica uvijek se prikuplja u vrećicu Cell Collection Bag.

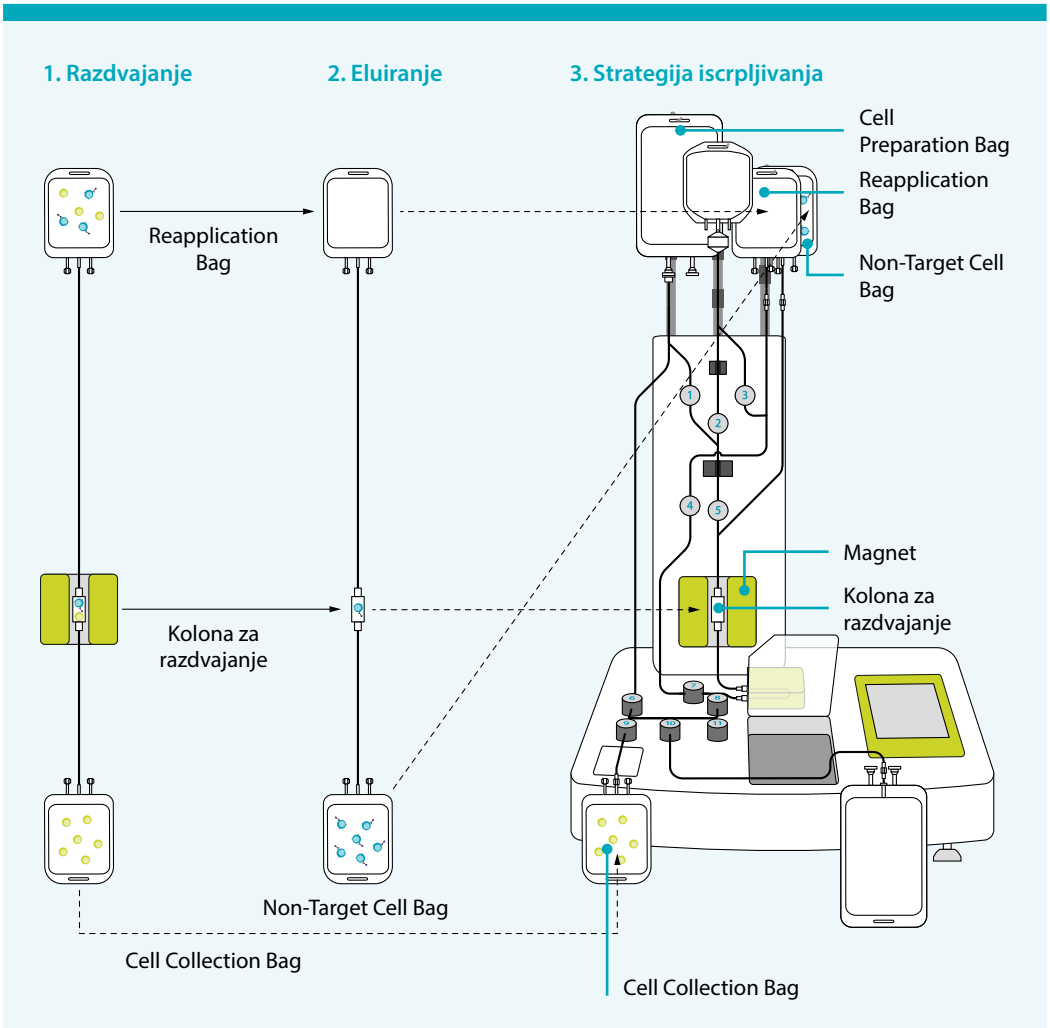
Iscrpljivanje stanica uz primjenu kompleta cijevi CliniMACS Depletion Tubing Set: DEPLETION 3.1 (dio 1: Staged Cell Loading [Bulk Loading Stage])



Slika 1.6: Strategija programa iscrpljivanja DEPLETION 3.1 uz primjenu kompleta cijevi CliniMACS Depletion Tubing Set (dio 1)

1. Staged Cell Loading (Bulk Loading Stage): magnet je u otvorenom položaju „ON". Magnetski označene stanice zadržavaju se u koloni za razdvajanje, dok druge neoznačene stanice (ciljne stanice) prolaze kroz kolonu i prikupljaju se u vrećicu Reapplication Bag.
2. Magnet je u otvorenom položaju „OFF". Magnetski označene stanice (neciljne stanice) otpuštaju se iz kolone za razdvajanje i prikupljaju se u vrećicu Non-Target Cell Bag.
3. Program iscrpljivanja (DEPLETION 3.1) zadržava magnetski označene stanice u koloni za razdvajanje, neoznačene stanice (ciljne stanice) prolaze kroz kolonu i prikupljaju se u vrećicu Reapplication Bag kako bi se ponovno napunile u kolonu za razdvajanje u drugom osjetljivom iscrpljivanju (vidjeti Slika 1.7). Kada se magnet pomakne u zatvoreni položaj „OFF", magnetski označene stanice (neciljne stanice) otpuštaju se iz kolone i prikupljaju u vrećicu Non-Target Cell Bag.

Iscrpljivanje stanica uz primjenu kompleta cijevi CliniMACS Depletion Tubing Set: DEPLETION 3.1 (dio 2: Sensitive Sample Loading [Sensitive Loading Stage])



Slika 1.7: Strategija programa iscrpljivanja DEPLETION 3.1 uz primjenu kompleta cijevi CliniMACS Depletion Tubing Set (dio 2)

4. Sensitive Sample Loading (Sensitive Loading Stage): magnet je u otvorenom položaju „ON". Stanice iz vrećice Reapplication Bag ponovno se pune u kolonu za razdvajanje. Nekoliko preostalih magnetski označenih stanica zadržava se u koloni za razdvajanje, dok neoznačene stanice (ciljne stanice) prolaze kroz kolonu i prikupljaju se u vrećicu Cell Collection Bag.
5. Magnet je u otvorenom položaju „OFF". Magnetski označene stanice (neciljne stanice) otpuštaju se iz kolone za razdvajanje i prikupljaju se u vrećicu Non-Target Cell Bag.
6. Na kraju razdvajanja označene stanice (neciljne stanice) su u vrećici Non-Target Cell Bag, a neoznačene stanice (ciljne stanice) u vrećici Cell Collection Bag. **Napomena:** ciljana frakcija stanica uvijek se prikuplja u vrećicu Cell Collection Bag.

2 Pojmovnik

2.1 Grafički opis

Na sljedećem su dijagramu opisane ploče koje se upotrebljavaju u ovom korisničkom priručniku radi informiranja korisnika o potencijalnim rizicima u slučaju nepridržavanja navedenih upozorenja i mjera opreza. Razina opasnosti klasificira opasnost na način opisan u nastavku. Razina, vrsta i izvor opasnosti kao i potencijalne posljedice, zabrane i mjere navedeni su u nastavku. Sličice na lijevoj strani označavaju rizik.

⚠ UPOZORENJE

Označava opasnu situaciju koja bi, ako se ne izbjegava, za posljedicu mogla imati smrt ili ozbiljnu ozljedu.

⚠ OPREZ

Označava opasnu situaciju koja bi, ako se ne izbjegava, za posljedicu mogla imati malu ili srednje tešku ozljedu.

OBAVIJEST

Označava informacije koje se smatraju važnim, ali koje nisu povezane s opasnostima (npr. poruke povezane s oštećivanjem materijalnih stvari).

VAŽNO

Objašnjava korisniku važne prakse ili informacije koje nisu povezane s osobnom ozljedom niti materijalnom štetom.

2.2 Rječnik simbola

Pregled simbola koji se upotrebljavaju za sustav CliniMACS Plus možete pronaći u korisničkom priručniku za CliniMACS Plus Instrument. Rječnik simbola objašnjava simbole upotrijebljene u korisničkim priručnicima te za označavanje proizvoda CliniMACS.

2.3 Rječnik pojmova

Afereza	Metoda prikupljanja krvi kojom se uzima puna krv iz koje se željena komponenta odabire i zadržava, a ostatak krvi se vraća davatelju.
Anti-biotinsko protutijelo	Ovo protutijelo prepoznaje stanice koje su prethodno označene s odgovarajućim biotiniliranim protutijelom ili ligandom.
BDCA	Antigen dendritičnih stanica krvi (engl. Blood Dendritic Cell Antigen)
Buffer Waste Bag	Vrećica za otpad za prikupljanje pufera tijekom razdvajanja stanica uz primjenu CliniMACS Plus Instrument.
CD14 antigen	CD14 antigen je glikoprotein stanične membrane veličine 53 – 55 kD, izražen na monocitima. CD14 antigen poznat je kao receptor za kompleks molekule LPS i proteina koji vežu LPS (engl. LPS binding protein, LBP).
CD19 antigen	CD19 antigen kritična je molekula za prijenos signala koja regulira razvoj, aktivaciju i diferencijaciju B limfocita. Kao marker loze B-stanica, CD19 je izražen od rane faze pro-B-stanica do limfoblastične faze B-stanica, ali izraženost se regulira naniže nakon sazrijevanja B-stanica u plazma stanice. CD19 antigen nadalje je izražen na većini malignih B-stanica i podskupu folikularnih dendritičnih stanica.
CD1c (BDCA-1) antigen	CD1c je dio klastera gena CD1 za koje se smatra da su povezani s MHC. CD1 geni klasterirani su unutar regije 170.000 bp ljudskih kromosoma 1q23.1. Proteini kodirani u njima (CD1a-e) izraženi su kao heterodimeri sastavljeni od teškog lanca CD1 nekovalentno uparenog s ß2-mikroglobulinom. CD1c uključen je u prezentaciju mikrobnih glikolipida ili lipopeptidnih antigena do T limfocita. U ljudskoj perifernoj krvi CD1c (BDCA-1) izražen je na mijeloidnim dendritičnim stanicama tipa 1 (MDC1) te na podskupu B limfocita. Mogu se pronaći u limfnom čvoru, pokrovnim zonama i germinativnim centrima, u marginalnoj zoni slezene i fetalnoj i odrasloj ljudskoj perifernoj krvi.
CD25 antigen	CD25 antigen, interleukin-2 receptorski alfa lanac (IL-2Rα) niskog afiniteta izražen je na aktiviranim T- i B-stanicama, NK stanicama i monocitima te na regulatornim CD4 pozitivnim stanicama. Antigen CD25 ima tri epitopne regije A, B i C. Protutijelo reagensa CliniMACS CD25 Reagent prepoznaje epitop A molekule CD25.

CD3 antigen	CD3 antigen prisutan je na zrelim ljudskim T-stanicama, timocitima i podskupu NK stanica. Povezan je s receptorom T-stanica (TCR) i odgovoran je za prijenos signala TCR. CD3 antigen kompleks je pet invarijantnih lanaca: γ, δ, ε, ζ i η. CD3 protutijelo prepoznaje sve T-stanice, tj. reagira sa 70 – 80% limfocita i 65 – 85% timocita iz ljudske periferne krvi. Epitop prepoznat od strane protutijela nalazi se na ε-lancu CD3 kompleksa.
CD304 (BDCA-4) antigen	CD304 (BDCA-4) antigen je glikoprotein površine stanice veličine 130 – 140 kDa, izražen isključivo u svježoj krvi i koštanoj srži na plazmacitoidnim dendritičnim stanicama.
CD34 antigen	CD34 antigen visoko je glikozilirani integralni membranski protein tipa 1 veličine 115 kDa i nepoznate funkcije, izražen na 1% do 4% normalnih stanica koštane srži i manje od 0,2% normalnih leukocita periferne krvi, na podskupovima stromalnih stanica koštane srži te na malom endotelu krvnih žila različitih tkiva.
CD4 antigen	CD4 antigen izražen je na većini timocita i približno dvije trećine perifernih krvnih T-stanica; također je izražen na monocitima i makrofagima. CD4 pomoćna je molekula u prepoznavanju stranih antigena povezanih s MHC klase II. Pored toga, CD4 je receptor za HIV-1.
CD45RA antigen	CD45RA antigen izražen je na naivnim CD4 i CD8 pozitivnim T-stanicama kao i na podskupovima B-stanica, NK stanica i monocita. To je izoforma uobičajenog leukocitnog antigena CD45, transmembranske proteinske tirozin fosfataze.
CD56 antigen	CD56 antigen član je NCAM obitelji (obitelj Neural Cell Adhesion Molecule) koji je izražen unutar hematopoetskog sustava na NK, NKT stanicama.
CD8 antigen	CD8 antigen je dimer povezan s disulfidom koji postoji ili kao CD8 α homodimer ili kao CD8 α/β heterodimer. CD8 jako je izražen na CD8 pozitivnim T-stanicama i timocitima te na podskupu NK stanica i CD8 pozitivnim γ/δ T-stanicama. CD8 djeluje kao koreceptor s MHC klase I-ograničenih T-staničnih receptora u prepoznavanju antigena.
Cell Preparation Bag	Vrećica u koju se prenosi stanični proizvod i u kojoj se provodi magnetsko označavanje i ispiranje stanica
Cell Collection Bag	Vrećica u koju se prikupljaju pročišćene ciljne stanice nakon razdvajanja

CliniMACS Anti-Biotin Reagent	Reagens za magnetsko označavanje stanica primarno označenih biotiniliranim protutijelima ili ligandima.
CliniMACS CD14 Reagent	Reagens za magnetsko označavanje stanica s izražavanjem CD14 antigena
CliniMACS CD19 Reagent	Reagens za magnetsko označavanje stanica s izražavanjem CD19 antigena
CliniMACS CD1c Biotin (BDCA-1)	Biotinilirano protutijelo za označavanje ljudskih stanica s izražavanjem CD1c (BDCA-1) antigena prije magnetskog označavanja s CliniMACS Anti-Biotin Reagent.
CliniMACS CD25 Reagent	Reagens za magnetsko označavanje stanica s izražavanjem CD25 antigena
CliniMACS CD3 Reagent	Reagens za magnetsko označavanje stanica s izražavanjem CD3 antigena
CliniMACS CD304 (BDCA-4) Reagent	Reagens za magnetsko označavanje stanica s izražavanjem CD304 (BDCA-4) antigena
CliniMACS CD34 Reagent	Reagens za magnetsko označavanje stanica s izražavanjem CD34 antigena
CliniMACS CD4 Reagent	Reagens za magnetsko označavanje stanica s izražavanjem CD4 antigena
CliniMACS CD45RA Reagent	Reagens za magnetsko označavanje stanica s izražavanjem CD45RA antigena
CliniMACS CD56 Reagent	Reagens za magnetsko označavanje stanica s izražavanjem CD56 antigena
CliniMACS CD8 Reagent	Reagens za magnetsko označavanje stanica s izražavanjem CD8 antigena
CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma)	Kombinacija reagensa koja se sastoji od CliniMACS IFN-gamma Catchmatrix Reagent i CliniMACS IFN-gamma Enrichment Reagent. Sa sustavom CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma) stanice koje izlučuju IFN-gamma mogu se obogatiti nakon *in vitro* restimulacije.
CliniMACS Depletion Tubing Set	Komplet cijevi, priključaka, kolona i vrećica s pomoću kojeg se obrađuje magnetski označena suspenzija stanica i u kojem se odvija magnetsko razdvajanje stanica, posebno osmišljen za specifične potrebe iscrpljivanja

CliniMACS IFN-gamma Enrichment Reagent	Komponenta sustava CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma) za magnetsko označavanje IFN-gamma vezanog na CliniMACS IFN-gamma Catchmatrix Reagent na stanicama koje izlučuju IFN-gamma
CliniMACS IFN-gamma of Catchmatrix Reagent	Komponenta sustava CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma) za površinsko označavanje leukocita s protutijelima specifičnim za IFN-gamma
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	Pufer se upotrebljava za pripremu i razdvajanje stanica pomoću sustava CliniMACS Plus: PBS (fiziološka otopina puferirana fosfatom), dopunjena s 1 mM EDTA, pH 7,2. Prije upotrebe puferu CliniMACS PBS/EDTA Buffer se mora dodati HSA farmaceutskog stupnja u konačnoj koncentraciji od 0,5% (težine po volumenu, tj. 5 g HSA po litri pufera).
CliniMACS Plus Instrument	Instrument za magnetsko razdvajanje stanica koji se temelji na MACS Tehnologiji
CliniMACS TCRα/β-Biotin	Biotinilirano protutijelo za označavanje ljudskih stanica s izražavanjem TCRα/β antigena prije magnetskog označavanja s CliniMACS Anti-Biotin Reagent.
CliniMACS Tubing Set, CliniMACS Tubing Set LS	Komplet cijevi, priključaka, kolona i vrećica s pomoću kojeg se obrađuje magnetsko označena suspenzija stanica i u kojem se odvija magnetsko razdvajanje stanica
Držač kolone za odabir	Pogledajte držač kolone za razdvajanje.
Držač kolone za razdvajanje	Oblikovane vodilice u kućištu magneta koje drže kolonu za razdvajanje na mjestu
Držač predkolone	Držač postavljen na CliniMACS Plus Instrument koji drži predkolonu na mjestu
EDTA	Etilen-diamin-tetra-octena kiselina
Ekstraktor plazme	Uređaj koji se upotrebljava za ekstrakciju tekućine iz vrećice Cell Preparation Bag nakon ispiranja stanica
Filtar predsustava	Filtarski uređaj od 40 µm između vrećice Cell Preparation Bag i predkolone koji se upotrebljava za hvatanje zbijenih stanica i ostataka stanica
× g	Umnožavanja ubrzanja zbog gravitacije
HSA	Humani serumski albumin

Hematopoetske progenitorske stanice	Progenitorske stanice limfoidnog, mijeloidnog i eritroidnog podrijetla
Humani serumski albumin	HSA farmaceutskog stupnja, odobren u državi u kojoj se korisnik nalazi, potreban je kao dodatak puferu kada se upotrebljava s CliniMACS Plus sustavom.
IgG	Imunoglobulin G
Kolona za odabir	Pogledajte kolonu za razdvajanje.
Kolona za razdvajanje	Kolona u kojoj se razdvajaju magnetski označene stanice kada su izložene magnetskom polju
Komplet za prijenos plazme	Komplet za prijenos s dvije igle za probijanje (šiljka) za plazmu ili tekućine
Leukafereza	Afereza koja prikuplja leukocite
Luer priključak	Vijčani spoj, dio kompleta cijevi
Luer/Spike Interconnector	Komplet za prijenos s iglom za probijanje (šiljkom) i adapterom štrcaljke (ženski luer priključak) za plazmu ili tekućine
MDC	Mijeloidne dendritične stanice
Magnetsko protutijelo	Super-paramagnetski označeno protutijelo
Monoklonalna protutijela	Pojedinačna vrsta protutijela koja se usmjerava na određen epitop (antigen, antigensku odrednicu) i proizvodi od jednog klona B-stanica ili jedne linije stanica hibridoma koje se stvaraju fuzijom limfocitnih stanica sa stanicama mijeloma. Neke stanice mijeloma prirodno sintetiziraju pojedinačna protutijela.
Negative Fraction Bag	Vrećica kompleta cijevi CliniMACS Tubing Set i CliniMACS Tubing Set LS koja sadrži neciljanu frakciju stanica
Non-Target Cell Bag	Vrećica kompleta cijevi CliniMACS Depletion Tubing Set koja sadrži neciljanu frakciju stanica
o/min.	Okretaji u minuti
Odjeljak za vrećicu	Odjeljak sustava CliniMACS Plus Instrument u kojem se nalaze vrećica Negative Fraction Bag i vrećica Buffer Waste Bag
Orbitalni rotator	Uređaj koji se upotrebljava za miješanje staničnog proizvoda tijekom reakcije s CliniMACS reagensima

Označavanje	Reakcija stanica s reagensom za magnetsko označavanje, npr. reagens CliniMACS CD34 Reagent sa stanicama pozitivnim na CD34
PBMC	Mononuklearna stanica periferne krvi
Peristaltička pumpa	Pumpa za cijevi koja se koristi u sustavu CliniMACS Plus Instrument za upravljanje brzinom protoka tekućine u kompletu cijevi
Plasma Waste Bag	Vrećica za otpad za prikupljanje viška plazme prije postupka označavanja
Postupak u vrećici	Sterilna obrada i prijenos stanica u zatvorenom okruženju vrećica za prijenos
Početni stanični proizvod	Proizvod koji sadrži stanice i koji se upotrebljava kao početni materijal za proces CliniMACS Plus separacije, primjerice prikupljanje leukafereze, PBMC ili koštanu srž
Predkolona	Prva kolona u kompletu cijevi CliniMACS Tubing Set i kompletu cijevi CliniMACS Tubing Set LS, služi kao filtar za hvatanje stanica koje imaju nespecifične interakcije s matricom kolone
Priming Waste Bag	Vrećica u kojoj se prikuplja pufer iz koraka pripreme
Priprema	Korak prije razdvajanja stanica u kojem se pufer ispire kroz komplet cijevi
Program razdvajanja	Softverski program osmišljen za obogaćivanje ili iscrpljivanje podskupova magnetski označenih stanica iz mješovite populacije stanica. Odaberite iz izbornika programa razdvajanja ovisno o namjeravanom razdvajanju.
Prsten za zadržavanje	Dio kompleta cijevi koji omogućuje da cijev pumpe ostane na svom predviđenom mjestu
Pufer za odabir	Pogledajte CliniMACS PBS/EDTA Buffer.
Reagens za razdvajanje	Reagens za magnetsko označavanje stanica, npr. reagens CliniMACS CD34 Reagent
Reapplication Bag	Vrećica kompleta cijevi CliniMACS Depletion Tubing Set u kojoj se neoznačene stanice prikupljaju privremeno tijekom razdvajanja. Neoznačene stanice iz vrećice Reapplication Bag dvaput se primjenjuju na kolonu za razdvajanje kako bi se osigurala visoka čistoća ciljnih stanica.

Senzor tekućine	Komponenta sustava CliniMACS Plus Instrument koja detektira tekućinu u cijevima
Sigurnosna sklopka pumpe	Senzor koji sprječava rad pumpe kada su vrata pumpe otvorena
Spojnica za mjesto uzorkovanja	Priključak za ubrizgavanje, npr. za uklanjanje uzoraka ili dodavanje CliniMACS reagensa u vrećicu Cell Preparation Bag
T komad (priključak)	Komad u obliku slova T na kompletu cijevi gdje se sastaju tri cijevi
TCRα/β antigen	TCRα/β je heterodimer receptora T-stanica koji se sastoji od 2 lanca transmembranskog glikoproteina, α i β. Oba su lanca članovi Ig super-obitelji i sastoje se od konstantne i polimorfne varijabilne regije. Varijabilna regija TCRα/β uključena je u prepoznavanje antigenih peptida predstavljenih MHC kompleksom stanica koje predstavljaju antigen. TCRα/β antigen je izražen na većini perifernih krvnih T-stanica.
Uređaj za toplinsko brtvljenje	Uređaj za toplinsko brtvljenje koji se upotrebljava za sterilno zatvaranje PVC cijevi
Vješalica za vrećicu	Držač na sustavu CliniMACS Plus Instrument za postavljanje vrećica Cell Preparation Bag, Non-Target Cell Bag, Priming Waste Bag, Reapplication Bag i vrećice za pufer
Vrećica za prijenos	Vrećica s cijevi i šiljkom na kraju.
WBC	Bijele krvne stanice
Wash Waste Bag	Vrećica za prikupljanje u koju se prikuplja supernatant od ispiranja razdvajanjem od sedimentirane stanične suspenzije nakon koraka centrifugiranja tijekom pripreme uzorka

3 Upozorenja i mjere opreza

U ovom su poglavlju objašnjeni potencijalni rizici povezani s radom CliniMACS Plus sustava. Uvijek je obvezno pridržavati se sigurnosnih uputa koje vrijede na radnom mjestu, pravila, standarda vezanih uz dobre proizvodne prakse, preventivnih mjera vezanih uz zdravlje, sigurnost i sprječavanje nezgoda. Upute za korištenje, npr. upozorenja i mjere opreza, vezane uz rukovanje biološki opasnim materijalima i početnim staničnim proizvodom kao i komponentama sustava CliniMACS Plus potražite u odgovarajućim odjeljcima u uputama za korištenje odgovarajuće komponente. Detaljne upute za korištenje vezane uz CliniMACS Plus Instrument opisane su u korisničkom priručniku za CliniMACS Plus Instrument.

Svaki ozbiljan incident koji se dogodio u vezi sa ovim proizvodom treba prijaviti tvrtki Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG – koristeći dostavljene podatke za kontakt – i nadležno tijelo države članice u kojoj se korisnik ovog proizvoda nalazi.

3.1 Vezano uz proces

⚠ UPOZORENJE

Rizik od neuspješne obrade ili oštećenja instrumenta. Rizik od neuspješne obrade ili oštećenja instrumenta ako postupke provode rukovatelji koji nisu prošli obuku. Sve postupke obrade smiju provoditi samo obučeni rukovatelji. Obuku rukovatelja provest će kvalificirani zastupnik tvrtke Miltenyi Biotec.

⚠ OPREZ

Rizik od smanjenja učinkovitosti procesa. Temperature niže ili više od sobne temperature za posljedicu mogu imati smanjenu vijabilnost, čistoću i niži broj ciljnih stanica. Provedite pripremu uzorka i razdvajanje stanica na sobnoj temperaturi (od +19 do +25 °C [+66 do +77 °F]).

⚠ OPREZ

Sigurnost opreme može biti umanjena. Sigurnost opreme može biti umanjena ako se instrument ne upotrebljava sukladno s uputama proizvođača. Pažljivo trebate pročitati i razumjeti informacije o sigurnosti, upozorenja, mjere opreza i upute za pravilan rad sustava CliniMACS Plus navedene u uputama za korištenje za CliniMACS Plus te u svim preporukama koje se odnose na sigurnost a koje je izdala tvrtka Miltenyi Biotec.

- Za proizvodnju i upotrebu ciljnih stanica kod ljudi potrebno je pridržavati se nacionalnih zakona i uredba, npr. Direktive EU-a 2004/23/EZ (ljudska tkiva i stanice) ili Direktive 2002/98/EZ (ljudska krv i krvne komponente). Stoga je svaka klinička primjena ciljnih stanica isključiva odgovornost korisnika sustava CliniMACS Plus.
- Sa svim se materijalima koji dolaze u dodir s krvlju i krvnim proizvodima mora postupati kao sa zaraznim materijalom. Obavezno se morate pridržavati uredbi za rukovanje zaraznim materijalima.

- Sve cijevi, nastavci, ventili, predkolone i kolona za razdvajanje moraju se temeljito provjeriti tijekom koraka pripreme kako bi se potvrdilo da iz njih nema curenja.

- Sve se vrećice, uključujući one koje se upotrebljavaju u pripremi uzorka, trebaju sačuvati dok se ne dovrši konačna analiza prikupljenih stanica i dok se ne potvrdi uspješno razdvajanje ciljnih stanica.

3.2 CliniMACS Reagensi i biotin konjugati

- Kada se ciljana frakcija stanica unosi infuzijom ili ubrizgava u pacijente, pacijenti mogu primiti tragove mišjih protutijela i željezo-dekstrana.
- Željezo-dekstranova zrnca i/ili mišja protutijela mogu uzrokovati alergijske ili anafilaktičke reakcije kod pacijenata. Trebaju biti dostupni lijekovi i oprema za intenzivnu njegu.
- Razdvajanje stanica uz primjenu CliniMACS reagensa i biotin konjugata smiju provoditi samo obučeni rukovatelji.
- Rukovatelji koji upotrebljavaju CliniMACS reagense i Biotin konjugate trebaju imati iskustvo u razdvajanju stanica od koštane srži ili periferne krvi.
- Neciljne stanice nisu namijenjene za terapijsku uporabu i ne mogu se ponovno unositi infuzijom u pacijente.
- CliniMACS Reagensi i biotin konjugati namijenjeni su samo za *in vitro* korištenje i nisu namijenjeni za terapijsko korištenje ili za izravno ubrizgavanje u pacijente.
- CliniMACS reagensi i biotin konjugati nisu preporučeni za uporabu u pacijenata za koje se zna da su osjetljivi ili postoji sumnja da su osjetljivi na mišje imunoglobuline ili željezo-dekstran.
- Pacijenti mogu razviti ljudska anti-mišja protutijela (HAMA).
- Ne koristiti nakon isteka roka upotrebe na oznaci proizvoda.
- Ne upotrebljavati ako je pakiranje oštećeno. Upotrijebite reagens samo ako je ampula neoštećena i zabrtvljena.

3.3 Rukovanje biološki opasnim materijalima

⚠ UPOZORENJE

Rizik od ozbiljne ozljede ili smrti. Ovisno o upotrijebljenom biološkom materijalu, kontakt može rezultirati teškom tjelesnom ozljedom ili smrću. Uvijek nosite osobnu zaštitnu opremu u skladu s upozorenjima i mjerama opreza, osobito ako se upotrebljava ili ako se upotrebljavao biološki opasan materijal.

- Radi izbjegavanja kontaminacije početnog staničnog proizvoda svi se koraci pripreme moraju provesti pod sterilnim uvjetima uz primjenu aseptičnih tehnika (npr. u laminarnom kabinetu).
- Rukovatelj koji provodi razdvajanje stanica mora proći obuku za pravilnu uporabu opreme te za rukovanje krvnim proizvodima i aspiratima koštane srži.
- Rukovatelj koji provodi razdvajanje stanica mora nositi odgovarajuću zaštitnu opremu (npr. laboratorijsku kutu, rukavice i naočale) kada radi s uzorkom pacijenta i rukuje potencijalno biološki opasnim materijalom.
- Sa svim se krvnim proizvodima mora postupati kao da su potencijalno biološki opasni. S proizvodima leukafereze, krvnim proizvodima, aspiratom koštane srži, prikupljenim stanicama, upotrijebljenim puferom, upotrijebljenim kompletom cijevi i drugim materijalima koji su bili u dodiru s tim tekućinama morate postupati kao s biološki opasnim materijalima u skladu sa standardnim bolničkim zahtjevima ili zahtjevima ustanove.
- CliniMACS Plus Instrument smatra se potencijalno biološki opasnim nakon svakog postupka razdvajanja i mora se očistiti vodenom otopinom s biocidnim deterdžentom (npr. Bacillol® plus ili Meliseptol®, vidjeti i odjeljak „Čišćenje i održavanje" u korisničkom priručniku za CliniMACS Plus Instrument) u skladu sa standardnim bolničkim zahtjevima ili zahtjevima ustanove.
- S materijalima za jednokratnu uporabu mora se postupati kao s biološki opasnim materijalima u skladu sa standardnim bolničkim zahtjevima ili zahtjevima ustanove.

3.4 Početni stanični proizvod

VAŽNO

Označavanje i razdvajanje stanica treba započeti što je moguće prije nakon prikupljanja početnog staničnog proizvoda. Proizvod ne smije biti stariji od 24 sata kada se započinje označavanje i postupak razdvajanja.

- Početni stanični proizvod (npr. proizvod leukafereze) mora se prikupiti u skladu sa standardnim bolničkim postupcima ili postupcima ustanove u standardne vrećice za prikupljanje.
- Spremnik u kojem se nalazi početni stanični proizvod mora se označiti tako da oznaka sadrži identifikaciju pacijenta, vrijeme, datum i mjesto prikupljanja u skladu s postupcima predviđenim za upotrebu s kliničkim protokolom.
- Za transport početni stanični proizvod mora se zapakirati u izolirane spremnike i mora se čuvati na kontroliranoj sobnoj temperaturi (od +19 do +25 °C [+66 do +77 °F]) u skladu sa standardnim bolničkim postupcima ili postupcima ustanove vezanim uz prikupljanje krvi koji su odobreni za upotrebu s kliničkim protokolom. Nemojte ih čuvati u hladnjaku. Koncentracija stanica ne smije premašiti $0,2 \times 10^9$ stanica po mL tijekom transporta.
- Izbjegavajte intenzivno miješanje početnog staničnog materijala.
- Ako se početni stanični proizvod mora pohraniti, npr. tijekom noći, on se mora čuvati na kontroliranoj sobnoj temperaturi (od +19 do +25 °C [+66 do +77 °F]). Tijekom skladištenja koncentracija leukocita nikada ne smije premašiti $0,2 \times 10^9$ stanica po mL.
- Stanice treba čuvati u autolognoj plazmi. Ako je koncentracija stanica veća od $0,2 \times 10^9$ stanica po mL, razrijedite početni stanični proizvod autolognom plazmom.

4 CliniMACS Plus sustav

CliniMACS Plus sustav koji se sastoji od komponenti sustava CliniMACS Plus Instrument, CliniMACS reagensa, kompleta CliniMACS Tubing Set, pufera CliniMACS PBS/EDTA Buffer i drugog pribora mora se upotrebljavati u kombinaciji i predviđen je za *in vitro* razdvajanje određenih ljudskih stanica za kliničke primjene.

VAŽNO
Upute za korištenje, npr. upozorenja i mjere opreza koje se odnose na komponente sustava CliniMACS Plus potražite u uputama za korištenje koje su isporučene za odgovarajuću komponentu.

4.1 CliniMACS Plus Instrument

CliniMACS Plus Instrument elektromehanički je uređaj koji ima trajni magnet, peristaltičku pumpu, stezne ventile, elektroniku i softver.

4.2 CliniMACS Reagensi i biotin konjugati

CliniMACS Reagensi neviskozne su koloidne otopine tamne boje koje sadrže konjugate protutijela specifičnih stanica u puferu. Reagensi se sastoje od protutijela kemijski spojenih sa super-paramagnetskim česticama.

Biotin konjugati CliniMACS bistre su i bezbojne otopine koje sadrže protutijela kovalentno povezana s biotinom u puferu. Protutijela su visoko specifična što omogućuje *in vitro* označavanje rijetkih ciljnih stanica.

4.3 CliniMACS Komplet cijevi

CliniMACS Komplet cijevi je sterilan, jednokratni proizvod osmišljen za korištenje u kombinaciji sa CliniMACS Plus Instrument za *in vitro* obogaćivanje ili iscrpljivanje ljudskih stanica iz heterogenih populacija hematoloških stanica.

4.4 CliniMACS PBS/EDTA Buffer

Pufer CliniMACS PBS/EDTA Buffer tekućina je za pranje i transport za omogućavanje *in vitro* razdvajanja ljudskih stanica.

4.5 CliniMACS pribor

- **komplet za prijenos plazme:**
  komplet za prijenos s dva šiljka za plazmu ili tekućine, Transfer Set Coupler/Coupler (REF 200-073-902) ili jednakovrijedan
- **Luer/Spike Interconnector:**
  komplet za prijenos sa šiljkom i adapter štrcaljke (ženski luer priključak) za plazmu ili tekućine, Luer/Spike Interconnector (REF 200-073-903) ili jednakovrijedan

4.6 Potrebni dodatni materijali

Uz proizvode CliniMACS, za CliniMACS Plus separaciju mogu biti potrebni dodatni materijali:

- **vrećice za staničnu kulturu, plinopropusne:**
  MACS GMP Cell Differentiation Bag – 100 mL (REF 170-076-400) ili jednakovrijedne
- **vrećice za prijenos, prikladne za centrifugiranje:**
  vrećica za prijenos od 150 mL, Terumo ili jednakovrijedna
  vrećica za prijenos od 600 mL, Terumo ili jednakovrijedna
  vrećica za prijenos od 1000 mL, Terumo ili jednakovrijedna
- **spojnica za mjesto uzorkovanja:**
  spojnica za mjesto uzorkovanja, Terumo ili jednakovrijedna
- **filtar predsustava:**
  Blood Transfusion Filter, Haemonetics® ili jednakovrijedan
- **štrcaljke i igle:**
  odgovarajuće štrcaljke (5 mL, 10 mL, 20 mL, 50 mL) i hipodermične igle veličine 20 gauge
- **forceps za zaključavanje**
- **epruvete za uzorke**
- **humani serumski albumin (HSA):**
  Upotrebljavajte samo HSA farmaceutske kakvoće koji je dostupan kao odobreni proizvod u državi korisnika.
- **imunoglobulin kliničkog stupnja G:**
  Upotrebljavajte samo IgG farmaceutske kakvoće koji je dostupan kao odobreni lijek u državi korisnika, npr. u Njemačkoj: Gamunex® 10% ili jednakovrijedan.
- **medij stanične kulture:**
  npr. RPMI 1640 ili jednakovrijedan
- **materijali specifični za primjenu:**
  individualno biotinilirano protutijelo specifično za stanice ili ligand; AB serum ili alternativno autologni serum

4.7 Potrebna oprema

- **neprekidni izvor napajanja:**
  preporučeni neprekidni izvor napajanja: APC Smart-UPS 1500 VA USB i Serial 230 V, proizvođača APC (American Power Conversion) ili jednakovrijedan
- **laminarni kabinet**
- **sterilni priključak cijevi:**
  Terumo Sterile Connection Device (TSCD®) ili jednakovrijedan
- **orbitalni rotator:**
  vibratori platforme, Heidolph Instruments ili jednakovrijedni
- **centrifugiranje:**
  centrifuga, Sorvall ili jednakovrijedna i košare za centrifugiranje s čepovima za zadržavanje aerosola
- **ekstraktor plazme:**
  stalak za razdvajanje plazme, Terumo Equipment ili jednakovrijedan
- **stolna vaga:**
  Laboratory Balance, Mettler Toledo ili jednakovrijedna, kapaciteta 1 kg; rezolucija do 0,1 g
- **uređaj za toplinsko brtvljenje cijevi:**
  Hematron III ručni uređaj za brtvljenje, Baxter ili jednakovrijedan
- **pomagalo za pražnjenje cijevi:**
  pomagalo za pražnjenje cijevi, Baxter ili jednakovrijedno
- **spremnici za biološki opasan otpad**

Dodatna oprema potrebna za CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma):

- posuda za kulturu s 24 odjeljka Corning™ Costar™ 24 plitica za kulturu s 24 odjeljka, Sigma Aldrich ili jednakovrijedna
- MiniMACS™ uređaj za razdvajanje, Miltenyi Biotec (REF 130-042-102)
- MS Columns, Miltenyi Biotec (REF 130-042-201)
- Pre-Separation Filter, Miltenyi Biotec (REF 130-041-407)
- MACSmix™ rotator epruveta, Miltenyi Biotec (REF 130-090-753)

5 Pregled primjena

5.1 Četiri KORAKA do ciljnih stanica

U sljedećem poglavlju možete pronaći pregled za CliniMACS Plus separaciju. CliniMACS Plus separacija provodi se u četiri KORAKA. U prvom se koraku stanice pripremaju i magnetski označavaju. U drugom se koraku odabire odgovarajući program razdvajanja. U trećem se koraku instalira komplet cijevi na CliniMACS Plus Instrument, a u četvrtom se koraku stanice automatski razdvajaju.

Može biti neophodno snimanje procesnih podataka vezanih uz primjenu. Za dodatne se radne listove obratite tehničkoj službi Miltenyi Biotec Technical Support.

Korisnički priručnik za aplikacije CliniMACS Plus sastoji se od različitih opcija za svaki korak (različiti reagensi, kompleti cijevi i programi). Prije pokretanja primjene moraju se odabrati poglavlja specifična za primjenu (poglavlje 6) i detaljno objašnjenje KORAKA 1 – 4 (poglavlje 7) mora se odabrati korištenjem tablice za pregled koja započinje na sljedećoj stranici. U tablici za pregled nalaze se informacije o primjenjivim odjeljcima korisničkog priručnika. Tablica za pregled temelji se na vrsti i broju reagensa, broju stanica, vrsti kompleta cijevi i relevantnom programu razdvajanja koji je potreban za razdvajanje.

KORAK 1: Priprema stanica i magnetsko označavanje

KORAK 1 opisuje pripremu staničnog proizvoda i magnetsko označavanje specifičnih stanica uz izražavanje odgovarajućeg antigena. Slijedite upute iz primjenjivog odjeljka. Nastavite s KORAKOM 2.

KORAK 2: Odabir programa razdvajanja

KORAK 2 opisuje odabir programa razdvajanja za CliniMACS Plus Instrument. Ovisno o vrsti stanica i broju stanica koje treba razdvojiti moraju se odabrati različiti programi. Da biste odredili koji je program primjenjiv, idite na tablicu za pregled na sljedećoj stranici. Pročitajte odgovarajući odjeljak za odabrani program razdvajanja. Slijedite upute navedene u primjenjivom odjeljku. Nastavite s KORAKOM 3.

KORAK 3: Instalacija kompleta cijevi CliniMACS

KORAK 3 objašnjava instalaciju kompleta cijevi na CliniMACS Plus Instrument. Slijedite upute u primjenjivom odjeljku. Nastavite s KORAKOM 4.

KORAK 4: CliniMACS Plus separacija

KORAK 4 opisuje automatiziranu CliniMACS Plus separaciju. CliniMACS Plus Instrument provodi automatizirani postupak razdvajanja stanica (odabran u KORAKU 2). Slijedite upute iz primjenjivog odjeljka.

VAŽNO

U tablici za pregled na sljedećim stranicama naveden je kratak pregled tipičnih primjena za CliniMACS reagense. Kada je neophodno provesti razdvajanje različitog broja ciljnih stanica, pogledajte upute u pregledu specifičnom za primjenu kako biste pronašli informacije o maksimalnom kapacitetu odgovarajuće primjene. Slijedite upute u odjeljcima specifičnim za primjenu i detaljna objašnjenja KORAKA 1 – 4. Pogledajte tablica za pregled.

5.2 Tablica za pregled

Kapacitet primjene	Bočice s reagensom	Komplet cijevi	Program razdvajanja	Odjeljak specifičan za primjenu	Detaljno objašnjenje odjeljaka za KORAKE 1 – 4			
					KORAK 1	KORAK 2	KORAK 3	KORAK 4
Anti-Biotin (REF 173-01) – obogaćivanje								
≤40× 10^9 ukupnog broja stanica	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) – iscrpljivanje (normalna primjena)								
≤ 40 × 10^9 ukupnog broja stanica	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) – iscrpljivanje (opsežna primjena)								
>40 – 80 × 10^9 ukupnog broja stanica	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) – obogaćivanje								
Stanice koje izlučuju IFN od ≤1 × 10^9 ukupnog broja stanica	1 komplet (2 bočice reagensa)	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) – iscrpljivanje - dio 1 od 2								
≤5 × 10^9 stanica pozitivnih na CD19 od ≤40 × 10^9 ukupnog broja stanica (WBC)	1 × CD19 Reagent i 1 × CD1c (BDCA-1)-Biotin	1 × CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01)	DEPLETION 2.1	6.12	7.1	7.2.5	7.3.1	7.4.4
CD1c (BDCA-1)-Biotin (REF 277-01) – obogaćivanje - dio 2 od 2								
≤0,2 × 10^9 stanica pozitivnih na CD1c (BDCA-1) od ≤40 × 10^9 ukupnog broja stanica (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) – iscrpljivanje (normalna primjena)								
≤15 × 10^9 stanica pozitivnih na CD3 od ≤40 × 10^9 ukupnog broja stanica	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) – iscrpljivanje (opsežna primjena)								
>15 – 20 × 10^9 stanica pozitivnih na CD3 od >40 – 80 × 10^9 ukupnog broja stanica	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

Kapacitet primjene	Bočice s reagensom	Komplet cijevi	Program razdvajanja	Odjeljak specifičan za primjenu	Detaljno objašnjenje odjeljaka za KORAKE 1 – 4			
					KORAK 1	KORAK 2	KORAK 3	KORAK 4
CD3 (REF 273-01) – iscrpljivanje (normalna primjena)								
≤15 × 10^9 stanica pozitivnih na CD3 od ≤40 × 10^9 ukupnog broja stanica	1 × CD3 Reagent	1 × CliniMACS Depletion Tubing Set (REF 261-01)	DEPLETION 3.1	6.5	7.1	7.2.6	7.3.3	7.4.5
CD3 (REF 273-01) – iscrpljivanje (opsežna primjena)								
>15 – 30 × 10^9 stanica pozitivnih na CD3 od >40 – 80 × 10^9 ukupnog broja stanica	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) – obogaćivanje								
≤5 × 10^9 stanica pozitivnih na CD4 od ≤40 × 10^9 ukupnog broja stanica	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) – iscrpljivanje								
≤12 × 10^9 stanica pozitivnih na CD4 od ≤40 × 10^9 ukupnog broja stanica	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) – obogaćivanje								
≤4 × 10^9 stanica pozitivnih na CD8 od ≤40 × 10^9 ukupnog broja stanica	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) – iscrpljivanje								
≤4 × 10^9 stanica pozitivnih na CD8 od ≤40 × 10^9 ukupnog broja stanica	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 kombinacija (REF 276-01/REF 275-01) – iscrpljivanje								
≤12 × 10^9 stanica pozitivnih na CD4 i ≤4 × 10^9 stanica pozitivnih na CD8 od ≤40 × 10^9 ukupnog broja stanica	1 × CD4 Reagent i 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

Kapacitet primjene	Bočice s reagensom	Komplet cijevi	Program razdvajanja	Odjeljak specifičan za primjenu	Detaljno objašnjenje odjeljaka za KORAKE 1 – 4			
					KORAK 1	KORAK 2	KORAK 3	KORAK 4
CD14 (REF 272-01) – obogaćivanje								
≤4 × 10^9 stanica pozitivnih na CD14 od ≤20 × 10^9 ukupnog broja stanica	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) – iscrpljivanje								
≤5 × 10^9 stanica pozitivnih na CD19 od ≤40 × 10^9 ukupnog broja stanica	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
CD3/CD19 kombinacija (REF 273-01/REF 179-01) – iscrpljivanje								
≤15 × 10^9 stanica pozitivnih na CD3 i ≤5 × 10^9 stanica pozitivnih na CD19 od ≤40 × 10^9 ukupnog broja stanica	1 × CD3 Reagent i 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) – obogaćivanje								
≤0,6 × 10^9 stanica pozitivnih na CD25 od ≤40 × 10^9 ukupnog broja stanica (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) – obogaćivanje								
≤0,6 × 10^9 pozitivnih stanica s visoko izraženim CD25 od ≤40 × 10^9 ukupnog broja stanica (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) – iscrpljivanje (normalna primjena)								
≤6 × 10^9 stanica pozitivnih na CD25 od ≤40 × 10^9 ukupnog broja stanica (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) – iscrpljivanje (opsežna primjena)								
>6 – 12 × 10^9 stanica pozitivnih na CD25 od >40 – 80 × 10^9 ukupnog broja stanica (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

Kapacitet primjene	Bočice s reagensom	Komplet cijevi	Program razdvajanja	Odjeljak specifičan za primjenu	Detaljno objašnjenje odjeljaka za KORAKE 1 – 4			
					KORAK 1	KORAK 2	KORAK 3	KORAK 4
CD34 (REF 171-01) – obogaćivanje (normalna primjena)								
≤0,6 × 10^9 stanica pozitivnih na CD34 od ≤60 × 10^9 ukupnog broja stanica	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) – obogaćivanje (opsežna primjena)								
>0,6 – 1,2 × 10^9 stanica pozitivnih na CD34 od >60-120 × 10^9 ukupnog broja stanica	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) – iscrpljivanje								
≤20 × 10^9 stanica pozitivnih na CD45RA od ≤50 × 10^9 ukupnog broja stanica	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
CD56 (REF 271-01) – obogaćivanje								
≤5 × 10^9 stanica pozitivnih na CD56 od ≤40 × 10^9 ukupnog broja stanica	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) – obogaćivanje								
≤0,2 × 10^9 stanica pozitivnih na CD304 (BDCA-4) od ≤40 × 10^9 ukupnog broja stanica	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) – iscrpljivanje								
≤24 × 10^9 stanica pozitivnih na TCRα/β od ≤60 × 10^9 ukupnog broja stanica	1 × TCRα/β-Biotin i 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

Tablica 5.1: Pregled dostupnih primjena s odgovarajućim kompletima cijevi i programima razdvajanja

6 Pregled KORAKA 1 – 4 specifičan za primjenu

6.1 Obogaćivanje stanica pozitivnih na CD34

CliniMACS Plus CD34 System uključujući CliniMACS Plus Instrument, CliniMACS CD34 Reagent, CliniMACS Tubing Set ili CliniMACS Tubing Set LS i CliniMACS PBS/EDTA Buffer namijenjen je *in vitro* obogaćivanju ljudskih CD34 pozitivnih hematopoetskih progenitorskih stanica iz heterogenih hematoloških staničnih populacija.

6.1.1 KORAK 1: Priprema stanica i magnetsko označavanje

Prve potrebne radnje

Kapacitet primjene

- Normalna primjena: do 0,6 × 10^9 stanica pozitivnih na CD34 od do 60 × 10^9 ukupnog broja stanica (WBC)
- Opsežna primjena: veći od 0,6 × 10^9 i do 1,2 × 10^9 stanica pozitivnih na CD34 od do 120 × 10^9 ukupnog broja stanica (WBC)

⚠ OPREZ

Rizik od nezadovoljavajuće učinkovitosti razdvajanja označenih stanica. Ako su specifikacije primjene premašene, postoji rizik od nezadovoljavajućeg specifičnog označavanja. Upotrijebite potrebnu količinu stanica i reagensa kako je opisano za odgovarajuću primjenu.

Potrebni CliniMACS materijali

Materijal	Kataloški broj	Količina	Program razdvajanja
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1	–
CliniMACS CD34 Reagent	171-01	• 1 bočica (obična) • 2 bočice (velike)	–
CliniMACS Tubing Set	161-01	1 komplet cijevi	CD34 SELECTION 1
CliniMACS Tubing Set LS	162-01	1 komplet cijevi	CD34 SELECTION 2
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	3 × 1000 mL vrećice[1]	–

1 Prije uporabe puferu CliniMACS PBS/EDTA Buffer dodajte HSA do konačne koncentracije od 0,5% (m/v).

Tablica 6.1: CliniMACS materijali potrebni za obogaćivanje stanica pozitivnih na CD34

Potrebni dodatni materijali

- **Cell Preparation Bag:**
  jedna vrećica za prijenos od 600 mL, prikladna za centrifugiranje kao i jedna spojnica za mjesto uzorkovanja i dva kompleta za prijenos plazme, za uporabu tijekom postupka pripreme stanica
- **Plasma Waste Bag i Wash Waste Bags:**
  tri vrećice za prijenos od 600 mL, prikladne za centrifugiranje
- **Cell Collection Bag:**
  jedna vrećica za prijenos od 150 mL u kombinaciji s priključkom Luer/Spike Interconnector za spajanje vrećice Cell Collection Bag na komplet cijevi
- jedan filtar predsustava
- forceps za zaključavanje
- odgovarajuće štrcaljke (različitih veličina) i hipodermične igle veličine 20 gauge
- humani serumski albumin (HSA) koji treba dodati u pufer CliniMACS PBS/EDTA Buffer do konačne koncentracije od 0,5% (m/v)
- epruvete za uzorke

▶ Priprema vrećica

Odredite težinu prazne vrećice Cell Collection Bag i vrećice Cell Preparation Bag na način opisan u odjeljku 7.1.1 na stranici 119.

Magnetsko označavanje stanica

Pogledajte odjeljak 7.1 „KORAK 1: Priprema stanica i magnetsko označavanje" na stranici 119 za detaljan opis sljedećih koraka.

▶ Analiza početnog staničnog proizvoda

▶ Prijenos početnog staničnog proizvoda u vrećicu Cell Preparation Bag

Ako je težina staničnog početnog produkta veća od 200 g, ali je broj stanica manji od 120×10^9 ukupnih stanica i $1{,}2\times10^9$ CD34 pozitivnih stanica, centrifugirajte uzorak kako biste smanjili volumen na najviše 200 g, a zatim nastavite sa sljedećim koracima.

▶ Razrjeđivanje početnog staničnog proizvoda

Dodajte pufer: težina pufera koji treba dodati = težina početnog staničnog proizvoda × 2

▶ Centrifugiranje

Centrifugirajte na 200 × g, bez kočnice, tijekom 15 minuta, na sobnoj temperaturi (sobna temperatura: od +19 do +25 °C [+66 do +77 °F]).

▶ Prilagodba volumena: volumen označavanja 95 g (±5 g) (normalna primjena) ili 190 g (±5 g) (opsežna primjena)

1. Uklonite supernatant da prilagodite uzorak koristeći se sljedećom jednadžbom: težina supernatanta koju treba ukloniti = težina razrijeđenog staničnog proizvoda – volumen označavanja
2. Resuspendirajte stanični pelet.

▶ Inkubacija s CliniMACS CD34 Reagent

1. Dodajte 1 ili 2 bočice CliniMACS CD34 Reagent (vidjeti Tablica 6.1). Lagano izmiješajte sadržaj.
2. Inkubirajte na orbitalnom rotatoru (25 o/min.) tijekom 30 minuta na sobnoj temperaturi.

▶ Uklanjanje viška reagensa

1. Napunite vrećicu Cell Preparation Bag puferom.
2. Centrifugirajte (200 × g, bez kočnice, tijekom 15 minuta, na sobnoj temperaturi).
3. Uklonite supernatant koliko je god moguće. **Napomena:** uklonite najmanje 500 g supernatanta. Ako se ukloni manje supernatanta od navedenih vrijednosti, preporučuju se ukupno tri koraka ispiranja (umjesto samo dva). U suprotnom uklanjanje nevezanog reagensa može biti nedostatno.
4. Resuspendirajte stanični pelet.

5 Napunite vrećicu Cell Preparation Bag puferom.

6. Centrifugirajte (200 × g, bez kočnice, tijekom 15 minuta, na sobnoj temperaturi).
7. Uklonite supernatant koliko je god moguće.
8. Resuspendirajte stanični pelet.
9. Podesite volumen umetanja uzorka na 150 g (normalna primjena) ili 275 g (opsežna primjena).

Napomena: uzmite uzorak nakon uklanjanja viška reagensa za kasniju analizu (opcionalno).

6.1.2 KORAK 2: Odabir programa razdvajanja

▶ Uključivanje sustava CliniMACS Plus Instrument

▶ Odabir programa razdvajanja CD34 SELECTION 1/2

(koristeći 1 bočicu: CD34 SELECTION 1 ili koristeći 2 bočice: CD34 SELECTION 2)

Vidjeti odjeljak 7.2.2 na stranici 134.

6.1.3 KORAK 3: Instalacija kompleta cijevi CliniMACS

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

Vidjeti odjeljak 7.3.1 na stranici 153.

6.1.4 KORAK 4: CliniMACS Plus separacija

- **Postupak razdvajanja**
- **Odspajanje vrećica i bilježenje procesnog koda**
- **Uklanjanje kompleta cijevi i isključivanje**
- **Analiza stanica**

Vidjeti odjeljak 7.4.1 na stranici 188.

6.2 Obogaćivanje stanica pozitivnih na CD14

CliniMACS Plus CD14 System uključujući CliniMACS Plus Instrument, CliniMACS CD14 Reagent, CliniMACS Tubing Set i CliniMACS PBS/EDTA Buffer namijenjen je *in vitro* obogaćivanju ljudskih stanica pozitivnih na CD14 iz heterogenih hematoloških staničnih populacija.

6.2.1 KORAK 1: Priprema stanica i magnetsko označavanje

Prve potrebne radnje

Kapacitet primjene

Do 4×10^9 stanica pozitivnih na CD14 od do 20×10^9 ukupnog broja stanica (WBC)

⚠ OPREZ

Rizik od nezadovoljavajuće učinkovitosti razdvajanja označenih stanica. Ako su specifikacije primjene premašene, postoji rizik od nezadovoljavajućeg specifičnog označavanja. Upotrijebite potrebnu količinu stanica i reagensa kako je opisano za odgovarajuću primjenu.

Potrebni CliniMACS materijali

Materijal	Kataloški broj	Količina
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS CD14 Reagent	272-01	1 bočica
CliniMACS Tubing Set	161-01	1 komplet cijevi
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	3 × 1000 mL vrećice[1]

1 Vidjeti Tablica 6.3 i Tablica 6.4. Prije uporabe puferu CliniMACS PBS/EDTA Buffer dodajte HSA do konačne koncentracije od 0,5% (m/v).

Tablica 6.2: CliniMACS materijali potrebni za obogaćivanje stanica pozitivnih na CD14

Potrebni dodatni materijali

- **Cell Preparation Bag:**
  jedna vrećica za prijenos od 600 mL, prikladna za centrifugiranje kao i jedna spojnica za mjesto uzorkovanja i jedan komplet za prijenos plazme, za uporabu tijekom postupka pripreme stanica
- **Plasma Waste Bag i Wash Waste Bag:**
  dvije vrećice za prijenos od 600 mL, prikladne za centrifugiranje
- **Cell Collection Bag:**
  jedna vrećica za prijenos od 150 mL ili jedna vrećica za prijenos od 600 mL u kombinaciji s priključkom Luer/Spike Interconnector za spajanje vrećice Cell Collection Bag na komplet cijevi (vidjeti Tablica 6.4)
- **Ako je potrebna zamjena vrećice Negative Fraction Bag i vrećice Buffer Waste Bag:**
  dvije vrećice za prijenos od 1000 mL u kombinaciji s dva priključka Luer/Spike Interconnector za spajanje vrećica na komplet cijevi (vidjeti Tablica 6.4)
- **Ako je za razdvajanje potrebno više od jedne litre pufera:**
  jedan komplet za prijenos plazme za spajanje vrećica za pufer (vidjeti Tablica 6.4)
- jedan filtar predsustava
- forceps za zaključavanje
- odgovarajuće štrcaljke (različitih veličina) i hipodermične igle veličine 20 gauge

Pregled potrebnih materijala

Priprema stanica	
Ukupan broj stanica (WBC)	$\leq 20 \times 10^9$
Označene stanice	$\leq 4 \times 10^9$
Broj bočica reagensa	1–2
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 mL
Komplet za prijenos plazme	1

Tablica 6.3: Materijal potreban za pripremu stanica pozitivnih na CD14

Razdvajanje		
Označene stanice	≤2×10^9	>2–4×10^9
Negative Fraction Bag	–	Zamijenite originalne vrećice kompleta cijevi s vrećicama za prijenos od 1000 mL
Buffer Waste Bag	–	
Priming Waste Bag	–	–
Cell Collection Bag	150 mL	600 mL
Luer/Spike Interconnector	1	3
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 mL	2000 mL
Komplet za prijenos plazme	–	1

Tablica 6.4: Materijal potreban za obogaćivanje stanica pozitivnih na CD14

▶ Priprema vrećica

Odredite težinu prazne vrećice Cell Collection Bag i vrećice Cell Preparation Bag na način opisan u odjeljku 7.1.1 na stranici 119.

Magnetsko označavanje stanica

Pogledajte odjeljak 7.1 „KORAK 1: Priprema stanica i magnetsko označavanje" na stranici 119 za detaljan opis sljedećih koraka.

▶ Analiza početnog staničnog proizvoda

▶ Prijenos početnog staničnog proizvoda u vrećicu Cell Preparation Bag

▶ Razrjeđivanje početnog staničnog proizvoda

Dodajte pufer: težina pufera koji treba dodati = 600 g – težina početnog staničnog proizvoda

▶ Centrifugiranje

Centrifugirajte na 300 × g, bez kočnice, tijekom 15 minuta, na sobnoj temperaturi (sobna temperatura: od +19 do +25 °C [+66 do +77 °F]).

▶ Prilagodba volumena: volumen označavanja 50 g (±5 g)

1. Uklonite supernatant da prilagodite uzorak koristeći se sljedećom jednadžbom: težina supernatanta koju treba ukloniti = težina razrijeđenog početnog staničnog proizvoda – volumen označavanja
2. Resuspendirajte stanični pelet.

▶ Inkubacija s CliniMACS CD14 Reagent

1. Dodajte 1 bočicu CliniMACS CD14 Reagent. Lagano izmiješajte sadržaj.
2. Inkubirajte na orbitalnom rotatoru (25 o/min.) tijekom 15 minuta na sobnoj temperaturi.

▶ **Uklanjanje viška reagensa**

1. Napunite vrećicu Cell Preparation Bag puferom.
2. Centrifugirajte (300 × g, bez kočnice, tijekom 15 minuta, na sobnoj temperaturi).
3. Uklonite supernatant koliko je god moguće. **Napomena:** uklonite najmanje 500 g supernatanta. Ako se supernatant ukloni u količini manjoj od 500 g, preporučuju se ukupno dva koraka ispiranja (umjesto samo jednog). U suprotnom uklanjanje nevezanog reagensa može biti nedostatno.
4. Resuspendirajte stanični pelet.
5. Podesite volumen umetanja uzorka na 100 g.

Napomena: uzmite uzorak nakon uklanjanja viška reagensa za kasniju analizu (opcionalno).

6.2.2 KORAK 2: Odabir programa razdvajanja

▶ **Uključivanje sustava CliniMACS Plus Instrument**

▶ **Odabir programa razdvajanja ENRICHMENT 1.1**

▶ **Unos parametara uzorka**

Vidjeti odjeljak 7.2.3 na stranici 136.

6.2.3 KORAK 3: Instalacija kompleta cijevi CliniMACS

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

Vidjeti odjeljak 7.3.1 na stranici 153.

6.2.4 KORAK 4: CliniMACS Plus separacija

▶ **Postupak razdvajanja**

▶ **Odspajanje vrećica i bilježenje procesnog koda**

▶ **Uklanjanje kompleta cijevi i isključivanje**

▶ **Analiza stanica**

Vidjeti odjeljak 7.4.2 na stranici 192.

6.3 Obogaćivanje/iscrpljivanje CliniMACS Anti-Biotin Reagent

CliniMACS Plus Anti-Biotin System uključujući CliniMACS Plus Instrument, CliniMACS Anti-Biotin Reagent, CliniMACS Tubing Set ili CliniMACS Tubing Set LS i CliniMACS PBS/EDTA Buffer namijenjen je *in vitro* obogaćivanju ili iscrpljivanju ljudskih stanica koje su prethodno označene s biotiniliranim protutijelima.

6.3.1 KORAK 1: Priprema stanica i magnetsko označavanje

Prve potrebne radnje

Kapacitet primjene

- **Obogaćivanje:** do 40×10^9 ukupnog broja stanica (WBC)
- **Iscrpljivanje:**
  Normalna primjena: do 40×10^9 ukupnog broja stanica (WBC)
  Opsežna primjena: veći od 40×10^9 i do 80×10^9 ukupnog broja stanica (WBC)

⚠ OPREZ

Rizik od nezadovoljavajuće učinkovitosti razdvajanja označenih stanica. Ako su specifikacije primjene premašene, postoji rizik od nezadovoljavajućeg specifičnog označavanja. Upotrijebite potrebnu količinu stanica i reagensa kako je opisano za odgovarajuću primjenu.

Potrebni CliniMACS materijali

Materijal	Kataloški broj	Količina	Program razdvajanja
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1	–
CliniMACS Anti-Biotin Reagent	173-01	• 1 bočica (obična) • 2 bočice (velike)	–
CliniMACS Tubing Set	161-01	1 komplet cijevi	ENRICHMENT 1.1
CliniMACS Tubing Set LS	162-01	1 komplet cijevi	DEPLETION 2.1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	• 3 × 1000 mL vrećice[1] (obične) • 4 × 1000 mL vrećice[1] (velike)	–

1 Količina pufera varira ovisno o odabranom programu razdvajanja i broju označenih stanica (vidjeti Tablica 6.6 do Tablica 6.9). Prije uporabe puferu CliniMACS PBS/EDTA Buffer dodajte HSA do konačne koncentracije od 0,5% (m/v).

Tablica 6.5: CliniMACS materijali potrebni za obogaćivanje/iscrpljivanje s CliniMACS Anti-Biotin Reagent

Potrebni dodatni materijali

- **Cell Preparation Bag:**
  jedna do dvije vrećice za prijenos od 600 mL, prikladne za centrifugiranje kao i jedna spojnica za mjesto uzorkovanja i dva kompleta za prijenos plazme, za uporabu tijekom postupka pripreme stanica
- **Plasma Waste Bag i Wash Waste Bag:**
  dvije vrećice za prijenos od 600 mL, prikladne za centrifugiranje
- **Cell Collection Bag:**
  jedna vrećica za prijenos od 600 mL ili jedna vrećica za prijenos od 1000 mL u kombinaciji s priključkom Luer/Spike Interconnector za spajanje vrećice Cell Collection Bag na komplet cijevi (vidjeti Tablica 6.7 i Tablica 6.9)
- **Ako je potrebna zamjena vrećice Negative Fraction Bag, vrećice Buffer Waste Bag i/ili vrećice Priming Waste Bag:**
  dvije do tri vrećice za prijenos od 1000 mL u kombinaciji s dva priključka Luer/Spike Interconnector za spajanje vrećica na komplet cijevi (vidjeti Tablica 6.7 i Tablica 6.9). Zamijenite vrećicu Priming Waste Bag koristeći sterilan priključak cijevi.
- **Ako je za razdvajanje potrebno više od jedne litre pufera:**
  jedan do dva kompleta za prijenos plazme za spajanje vrećica za pufer (vidjeti Tablica 6.7 i Tablica 6.9)
- jedan filtar predsustava
- forceps za zaključavanje
- odgovarajuće štrcaljke (različitih veličina) i hipodermične igle veličine 20 gauge
- humani serumski albumin (HSA) koji treba dodati u pufer CliniMACS PBS/EDTA Buffer do konačne koncentracije od 0,5% (m/v)
- epruvete za uzorke
- individualno biotinilirano protutijelo specifično za stanice ili ligand

Pregled materijala

Priprema stanica (ENRICHMENT 1.1)	
Ukupan broj stanica (WBC)	$\leq 40 \times 10^9$
Broj bočica reagensa	1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	2000 mL
Komplet za prijenos plazme	2

Tablica 6.6: Materijali potrebni za pripremu stanica (ENRICHMENT 1.1)

Razdvajanje (ENRICHMENT 1.1)		
Označene stanice	$\leq 2 \times 10^9$	$>2 – 5 \times 10^9$
Negative Fraction Bag	–	Zamijenite originalne vrećice kompleta cijevi s vrećicama za prijenos od 1000 mL
Buffer Waste Bag	–	
Priming Waste Bag	–	–
Cell Collection Bag	600 mL	600 mL
Luer/Spike Interconnector	1	3
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 mL	2000 mL
Komplet za prijenos plazme	–	1

Tablica 6.7: Materijali potrebni za obogaćivanje (ENRICHMENT 1.1)

Priprema stanica (DEPLETION 2.1)		
Ukupan broj stanica (WBC)	$\leq 40 \times 10^9$	$>40 – 80 \times 10^9$
Broj bočica reagensa	1	2
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	2000 mL	2000 mL
Komplet za prijenos plazme	2	2

Tablica 6.8: Materijali potrebni za pripremu stanica (DEPLETION 2.1)

Razdvajanje (DEPLETION 2.1)			
Označene stanice	$<5 \times 10^9$	$5 – 13 \times 10^9$	$>13 – 20 \times 10^9$
Negative Fraction Bag	–	Zamijenite originalne vrećice kompleta cijevi s vrećicama za prijenos od 1000 mL	Zamijenite originalne vrećice kompleta cijevi s vrećicama za prijenos od 1000 mL
Buffer Waste Bag	–		
Priming Waste Bag	–	–	
Cell Collection Bag	600 mL	1000 mL	1000 mL
Luer/Spike Interconnector	1	3	4
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 mL	2000 mL	3000 mL
Komplet za prijenos plazme	–	1	2

Tablica 6.9: Materijali potrebni za iscrpljivanje (DEPLETION 2.1)

▶ Priprema vrećica

Odredite težinu prazne vrećice Cell Collection Bag i vrećice Cell Preparation Bag na način opisan u odjeljku 7.1.1 na stranici 119.

Magnetsko označavanje stanica

Pogledajte odjeljak 7.1 „KORAK 1: Priprema stanica i magnetsko označavanje" na stranici 119 za detaljan opis sljedećih koraka.

▶ Analiza početnog staničnog proizvoda

▶ Prijenos početnog staničnog proizvoda u vrećicu Cell Preparation Bag

Razrjeđivanje početnog staničnog proizvoda

Dodajte pufer: težina pufera koji treba dodati = težina početnog staničnog proizvoda × 2

Centrifugiranje

1. Centrifugirajte na 300 × g, bez kočnice, tijekom 15 minuta, na sobnoj temperaturi (sobna temperatura: od +19 do +25 °C [+66 do +77 °F]).
2. Uklonite supernatant kako biste prilagodili volumen za primarno označavanje protutijela kako je preporučio proizvođač primarnog protutijela.
3. Resuspendirajte stanični pelet.

Označavanje stanica: inkubacija s primarnim protutijelom

Pridržavajte se uputa za korištenje koje je isporučio proizvođač primarnog protutijela.

Uklanjanje viška konjugata (1. ispiranje)

1. Dodajte pufer: težina pufera koji treba dodati = 600 g – težina staničnog proizvoda
2. Centrifugirajte na 300 × g, bez kočnice, tijekom 15 minuta, na sobnoj temperaturi (sobna temperatura: od +19 do +25 °C [+66 do +77 °F]).

Prilagodba volumena: volumen označavanja 95 g (±5 g) (normalna primjena) ili 190 g (±5 g) (opsežna primjena)

1. Uklonite supernatant da prilagodite uzorak koristeći se sljedećom jednadžbom: težina supernatanta koju treba ukloniti = težina razrijeđenog staničnog proizvoda – volumen označavanja
   Napomena: uklonite najmanje 500 g supernatanta. Ako se supernatant ukloni u količini manjoj od 500 g, preporučuju se ukupno dva koraka ispiranja (umjesto samo jednog). U suprotnom uklanjanje nevezanog reagensa može biti nedostatno.
2. Resuspendirajte stanični pelet.

Magnetsko označavanje stanica: inkubacija s CliniMACS Anti-Biotin Reagent

1. Dodajte 1 ili 2 bočice CliniMACS Anti-Biotin Reagent (vidjeti Tablica 6.6 i Tablica 6.8). Lagano izmiješajte sadržaj.
2. Inkubirajte na orbitalnom rotatoru (25 o/min.) tijekom 30 minuta na sobnoj temperaturi.

- **Uklanjanje viška reagensa (2. ispiranje)**

1. Napunite vrećicu Cell Preparation Bag puferom.
2. Centrifugirajte (300 × g, bez kočnice, tijekom 15 minuta, na sobnoj temperaturi).
3. Uklonite supernatant koliko je god moguće. **Napomena:** uklonite najmanje 500 g supernatanta. Ako se ukloni manje supernatanta od gore navedene vrijednosti, preporučuju se ukupno dva koraka ispiranja (umjesto samo jednog). U suprotnom uklanjanje nevezanog reagensa može biti nedostatno.
4. Resuspendirajte stanični pelet.
5. Podesite volumen umetanja uzorka na 100 g (normalna primjena) ili 200 g (opsežna primjena).

Napomena: uzmite uzorak nakon uklanjanja viška reagensa za kasniju analizu (opcionalno).

6.3.2 KORAK 2: Odabir programa razdvajanja

- **Uključivanje sustava CliniMACS Plus Instrument**
- **Odabir programa razdvajanja ENRICHMENT 1.1 ili DEPLETION 2.1**
- **Unos parametara uzorka**

Vidjeti odjeljak 7.2.3 na stranici 136 ili 7.2.5 na stranici 143.

6.3.3 KORAK 3: Instalacija kompleta cijevi CliniMACS

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

Vidjeti odjeljak 7.3.1 na stranici 153.

6.3.4 KORAK 4: CliniMACS Plus separacija

- **Postupak razdvajanja**
- **Odspajanje vrećica i bilježenje procesnog koda**
- **Uklanjanje kompleta cijevi i isključivanje**
- **Analiza stanica**

Vidjeti odjeljak 7.4.2 na stranici 192 i 7.4.4 na stranici 200.

6.4 Obogaćivanje stanica pozitivnih na CD56

CliniMACS Plus CD56 System uključujući CliniMACS Plus Instrument, CliniMACS CD56 Reagent, CliniMACS Tubing Set i CliniMACS PBS/EDTA Buffer namijenjen je *in vitro* obogaćivanju ljudskih stanica pozitivnih na CD56 iz heterogenih hematoloških staničnih populacija.

6.4.1 KORAK 1: Priprema stanica i magnetsko označavanje

Prve potrebne radnje

Kapacitet primjene

Do 5×10^9 stanica pozitivnih na CD56 od do 40×10^9 ukupnog broja stanica (WBC)

⚠ OPREZ

Rizik od nezadovoljavajuće učinkovitosti razdvajanja označenih stanica. Ako su specifikacije primjene premašene, postoji rizik od nezadovoljavajućeg specifičnog označavanja. Upotrijebite potrebnu količinu stanica i reagensa kako je opisano za odgovarajuću primjenu.

Potrebni CliniMACS materijali

Materijal	Kataloški broj	Količina
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS CD56 Reagent	271-01	1 bočica
CliniMACS Tubing Set	161-01	1 komplet cijevi
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	3 × 1000 mL vrećice[1]

1 Vidjeti Tablica 6.11 i Tablica 6.12. Prije uporabe puferu CliniMACS PBS/EDTA Buffer dodajte HSA do konačne koncentracije od 0,5% (m/v).

Tablica 6.10: CliniMACS materijali potrebni za obogaćivanje stanica pozitivnih na CD56

Potrebni dodatni materijali

- **Cell Preparation Bag:**
  jedna vrećica za prijenos od 600 mL, prikladna za centrifugiranje kao i jedna spojnica za mjesto uzorkovanja i jedan komplet za prijenos plazme, za uporabu tijekom postupka pripreme stanica
- **Plasma Waste Bag i Wash Waste Bag:**
  dvije vrećice za prijenos od 600 mL, prikladne za centrifugiranje
- **Cell Collection Bag:**
  jedna vrećica za prijenos od 150 mL ili od 600 mL u kombinaciji s priključkom Luer/Spike Interconnector za spajanje vrećice Cell Collection Bag na komplet cijevi (vidjeti Tablica 6.12)

- **Ako je potrebna zamjena vrećice Negative Fraction Bag i vrećice Buffer Waste Bag:**
  dvije vrećice za prijenos od 1000 mL u kombinaciji s dva priključka Luer/Spike Interconnector za spajanje vrećica na komplet cijevi (vidjeti Tablica 6.12)
- **Ako je za razdvajanje potrebno više od jedne litre pufera:**
  jedan komplet za prijenos plazme za spajanje vrećica za pufer (vidjeti Tablica 6.12)
- jedan filtar predsustava
- forceps za zaključavanje
- štrcaljke (različitih veličina) i hipodermične igle veličine 20 gauge
- humani serumski albumin (HSA) koji treba dodati u pufer CliniMACS PBS/EDTA Buffer do konačne koncentracije od 0,5% (m/v)
- epruvete za uzorke

Pregled potrebnih materijala

Priprema stanica	
Ukupan broj stanica (WBC)	$\leq 40 \times 10^9$
Broj bočica reagensa	1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 mL
Komplet za prijenos plazme	1

Tablica 6.11: Materijali potrebni za pripremu stanica pozitivnih na CD56

Razdvajanje		
Označene stanice	$\leq 2 \times 10^9$	$>2 – 5 \times 10^9$
Negative Fraction Bag	–	Zamijenite originalne vrećice kompleta cijevi s vrećicama za prijenos od 1000 mL
Buffer Waste Bag	–	
Priming Waste Bag	–	–
Cell Collection Bag	150 mL	600 mL
Luer/Spike Interconnector	1	3
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 mL	2000 mL
Komplet za prijenos plazme	–	1

Tablica 6.12: Materijali potrebni za obogaćivanje stanica pozitivnih na CD56

▶ Priprema vrećica

Odredite težinu prazne vrećice Cell Collection Bag i vrećice Cell Preparation Bag na način opisan u odjeljku 7.1.1 na stranici 119.

Magnetsko označavanje stanica

Pogledajte odjeljak 7.1 „KORAK 1: Priprema stanica i magnetsko označavanje" na stranici 119 za detaljan opis sljedećih koraka.

▶ Analiza početnog staničnog proizvoda

▶ Prijenos početnog staničnog proizvoda u vrećicu Cell Preparation Bag

▶ Razrjeđivanje početnog staničnog proizvoda

Dodajte pufer: težina pufera koji treba dodati = 600 g – težina početnog staničnog proizvoda

▶ Centrifugiranje

Centrifugirajte na 200 × g, bez kočnice, tijekom 15 minuta, na sobnoj temperaturi (sobna temperatura: od +19 do +25 °C [+66 do +77 °F]).

▶ Prilagodba volumena: volumen označavanja 95 g (±5 g)

1. U potpunosti uklonite supernatant pazeći da ne resuspendirate stanični pelet.
2. Pažljivo resuspendirajte stanični pelet nakon uklanjanja supernatanta.
3. Podesite težinu vrećice Cell Preparation Bag (CPB) dodavanjem pufera uz primjenu sljedeće jednadžbe: ciljna težina napunjene vrećice CPB = 95 g + težina prazne vrećice CPB
4. Resuspendirajte stanice.

▶ Inkubacija s CliniMACS CD56 Reagent

1. Dodajte 1 bočicu CliniMACS CD56 Reagent. Lagano izmiješajte sadržaj.
2. Inkubirajte na orbitalnom rotatoru (25 o/min.) tijekom 30 minuta na sobnoj temperaturi.

▶ **Uklanjanje viška reagensa**

1. Napunite vrećicu Cell Preparation Bag puferom.
2. Centrifugirajte (300 × g, bez kočnice, tijekom 15 minuta, na sobnoj temperaturi).
3. Uklonite supernatant koliko je god moguće. **Napomena:** uklonite najmanje 500 g supernatanta. Ako se supernatant ukloni u količini manjoj od 500 g, preporučuju se ukupno dva koraka ispiranja (umjesto samo jednog). U suprotnom uklanjanje nevezanog reagensa može biti nedostatno.
4. Pažljivo resuspendirajte stanični pelet nakon uklanjanja supernatanta.
5. Podesite volumen umetanja uzorka na 150 g.

Napomena: uzmite uzorak nakon uklanjanja viška reagensa za kasniju analizu (opcionalno).

6.4.2 KORAK 2: Odabir programa razdvajanja

▶ **Uključivanje sustava CliniMACS Plus Instrument**

▶ **Odabir programa razdvajanja ENRICHMENT 1.1**

▶ **Unos parametara uzorka**

Vidjeti odjeljak 7.2.3 na stranici 136.

6.4.3 KORAK 3: Instalacija kompleta cijevi CliniMACS

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

Vidjeti odjeljak 7.3.1 na stranici 153.

6.4.4 KORAK 4: CliniMACS Plus separacija

▶ **Postupak razdvajanja**

▶ **Odspajanje vrećica i bilježenje procesnog koda**

▶ **Uklanjanje kompleta cijevi i isključivanje**

▶ **Analiza stanica**

Vidjeti odjeljak 7.4.2 na stranici 192.

6.5 Iscrpljivanje stanica pozitivnih na CD3

CliniMACS Plus CD3 System uključujući CliniMACS Plus Instrument, CliniMACS CD3 Reagent, CliniMACS Tubing Set LS ili CliniMACS Depletion Tubing Set i CliniMACS PBS/EDTA Buffer namijenjen je *in vitro* iscrpljivanju ljudskih stanica pozitivnih na CD3 iz heterogenih hematoloških staničnih populacija.

6.5.1 KORAK 1: Priprema stanica i magnetsko označavanje

Prve potrebne radnje

Kapacitet primjene

- Normalna primjena: do 15×10^9 stanica pozitivnih na CD3 od do 40×10^9 ukupnog broja stanica (WBC) uz primjenu ili CliniMACS Tubing Set LS ili CliniMACS Depletion Tubing Set
- Opsežna primjena: veći od 15×10^9i do 20×10^9 stanica pozitivnih na CD3 od više od 40×10^9 i do 80×10^9 ukupnog broja stanica (WBC) uz primjenu CliniMACS Tubing Set LS ili veći od 15×10^9 i do 30×10^9 stanica pozitivnih na CD3 od većeg od 40×10^9 i do 80×10^9 ukupnog broja stanica (WBC) uz primjenu CliniMACS Depletion Tubing Set

⚠ OPREZ

Rizik od nezadovoljavajuće učinkovitosti razdvajanja označenih stanica. Ako su specifikacije primjene premašene, postoji rizik od nezadovoljavajućeg specifičnog označavanja. Upotrijebite potrebnu količinu stanica i reagensa kako je opisano za odgovarajuću primjenu.

Potrebni CliniMACS materijali

Materijal	Kataloški broj	Količina	Program razdvajanja
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1	
CliniMACS CD3 Reagent	273-01	• 1 bočica (obična) • 2 bočice (velike)	
CliniMACS Tubing Set LS	162-01	1 komplet cijevi	DEPLETION 2.1
CliniMACS Depletion Tubing Set	261-01	1 komplet cijevi	DEPLETION 3.1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	Do 5 × 1000 mL vrećica[1]	

1 Vidjeti Tablica 6.14 do Tablica 6.16. Prije uporabe puferu CliniMACS PBS/EDTA Buffer dodajte HSA do konačne koncentracije od 0,5% (m/v).

2 **Napomena:** za visoke brojeve označenih stanica preporučuje se uporaba CliniMACS Depletion Tubing Set kako bi se uštedjelo vrijeme obrade (npr. 20 × 10 označenih stanica bit će obrađeno unutar pet sati uz primjenu CliniMACS Tubing Set LS u usporedbi s dva sata uz primjenu CliniMACS Depletion Tubing Set).

Tablica 6.13: CliniMACS materijali potrebni za iscrpljivanje stanica pozitivnih na CD3

Potrebni dodatni materijali

- **Cell Preparation Bag:**
  jedna do dvije vrećice za prijenos od 600 mL, prikladne za centrifugiranje kao i jedna spojnica za mjesto uzorkovanja i dva kompleta za prijenos plazme, za uporabu tijekom postupka pripreme stanica
- **Plasma Waste Bag i Wash Waste Bag:**
  dvije vrećice za prijenos od 600 mL, prikladne za centrifugiranje
- **Cell Collection Bag:**
  jedna do dvije vrećice za prijenos od 600 mL u kombinaciji s priključkom Luer/Spike Interconnector za spajanje vrećice Cell Collection Bag na komplet cijevi

  Ako su za razdvajanje potrebne dvije vrećice Cell Collection Bags, upotrijebite komplet za prijenos plazme za spajanje te dvije vrećice. Jedna vrećica za prijenos od 600 mL već je spojena na CliniMACS Depletion Tubing Set (vidjeti Tablica 6.15 i Tablica 6.16).
- **Ako je potrebna zamjena vrećice Negative Fraction Bag, vrećice Buffer Waste Bag i/ili vrećice Priming Waste Bag:**
  dvije do tri vrećice za prijenos od 1000 mL u kombinaciji s dva priključka Luer/Spike Interconnector za spajanje vrećica na komplet cijevi (vidjeti Tablica 6.15 i Tablica 6.16)

  Zamijenite vrećicu Priming Waste Bag koristeći sterilan priključak cijevi.
- **Ako je za razdvajanje potrebno više od jedne litre pufera:**
  jedan do dva kompleta za prijenos plazme za spajanje vrećica za pufer (vidjeti Tablica 6.15 i Tablica 6.16)
- jedan filtar predsustava
- forceps za zaključavanje
- štrcaljke (različitih veličina) i hipodermične igle veličine 20 gauge
- humani serumski albumin (HSA) koji treba dodati u pufer CliniMACS PBS/EDTA Buffer do konačne koncentracije od 0,5% (m/v)
- imunoglobulin G kliničke kakvoće
- epruvete za uzorke

VAŽNO

Nakon unosa parametara uzorka (KORAK 2) softver CliniMACS Plus Software izračunava volumene koji će se prikupiti u vrećice Reapplication Bag, Cell Collection Bag, Non-Target Cell Bag i Buffer Waste Bag. Ako volumen izračunate tekućine premaši standardni volumen od 500 mL, neophodna je zamjena vrećica.

Pregled potrebnih materijala

Priprema stanica		
Ukupan broj stanica (WBC)	≤40 × 10^9	>40 – 80 × 10^9
Označene stanice	≤15 × 10^9	>15 – 30 × 10^9
Broj bočica reagensa	1	2
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	2000 mL	2000 mL
Komplet za prijenos plazme	2	2
Volumen umetanja uzorka	150 mL	250 – 300 mL

Tablica 6.14: Materijali potrebni za pripremu stanica pozitivnih na CD3

Razdvajanje (DEPLETION 2.1)			
Označene stanice	≤5 × 10^9	>5 – 13 × 10^9	>13 – 20 × 10^9
Negative Fraction Bag	–	Zamijenite originalne vrećice kompleta cijevi s vrećicama za prijenos od 1000 mL	Zamijenite originalne vrećice kompleta cijevi s vrećicama za prijenos od 1000 mL
Buffer Waste Bag	–		
Priming Waste Bag	–	–	
Cell Collection Bag	600 mL	1 – 2 × 600 mL	2 × 600 mL
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 mL	2000 mL	3000 mL
Luer/Spike Interconnector	1	3	3
Komplet za prijenos plazme	–	1 – 2	3

Tablica 6.15: Materijali potrebni za iscrpljivanje stanica pozitivnih na CD3 (DEPLETION 2.1)

Razdvajanje (DEPLETION 3.1)		
Označene stanice	≤29 × 10^9	>29 – 30 × 10^9
Non-Target Cell Bag	Zamjena vrećice nije potrebna	
Buffer Waste Bag		
Reapplication Bag		
Cell Collection Bag	–	1 × 600 mL (dodatno)
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 mL	
Komplet za prijenos plazme	–	1

Tablica 6.16: Materijali potrebni za iscrpljivanje stanica pozitivnih na CD3 (DEPLETION 3.1)

Napomena: Materijali potrebni za razdvajanje također se mogu odrediti prebacivanjem na CliniMACS Plus Instrument, odabirom programa razdvajanja koji će se upotrebljavati (DEPLETION 2.1 za CliniMACS Tubing Set LS i DEPLETION 3.1 za CliniMACS Depletion Tubing Set) te unosom parametara uzorka. CliniMACS Plus softver izračunat će potrebne veličine vrećica koje treba spojiti na komplet cijevi i potrebnu težinu pufera.

▶ Priprema vrećica

Odredite težinu prazne vrećice Cell Collection Bag i vrećice Cell Preparation Bag na način opisan u odjeljku 7.1.1 na stranici 119.

Magnetsko označavanje stanica

Pogledajte odjeljak 7.1 „KORAK 1: Priprema stanica i magnetsko označavanje" na stranici 119 za detaljan opis sljedećih koraka.

▶ Analiza početnog staničnog proizvoda

Odredite broj svih stanica označenih s CD3 (uključujući nespecifično vezanje CD3, ne samo stvarne T-stanice). Uzmite taj broj u obzir za specifikacije primjene i unos parametara uzorka (vidjeti KORAK 2).

▶ Prijenos početnog staničnog proizvoda u vrećicu Cell Preparation Bag

▶ Razrjeđivanje početnog staničnog proizvoda

Dodajte pufer: težina pufera koji treba dodati = 600 g – težina početnog staničnog proizvoda

▶ Centrifugiranje

Centrifugirajte na 200 × g, bez kočnice, tijekom 15 minuta, na sobnoj temperaturi (sobna temperatura: od +19 do +25 °C [+66 do +77 °F]).

▶ Prilagodba volumena: volumen označavanja 95 g (±5 g) (normalna primjena) ili 190 g (±5 g) (opsežna primjena)

1. U potpunosti uklonite supernatant pazeći da ne resuspendirate stanični pelet.
2. Pažljivo resuspendirajte stanični pelet nakon uklanjanja supernatanta.
3. Prilagodite težinu vrećice Cell Preparation Bag (CPB) dodavanjem pufera uz primjenu sljedeće jednadžbe (uzmite u obzir težinu IgG): ciljna težina napunjene vrećice CPB = volumen označavanja – težina IgG + težina prazne vrećice CPB
4. Resuspendirajte stanični pelet.

▶ Inkubacija s imunoglobulinom kliničke kakvoće

1. Dodajte IgG (1,5 mg/mL).
2. Inkubirajte na orbitalnom rotatoru (25 o/min.) tijekom 5 minuta na sobnoj temperaturi.

▶ Inkubacija s CliniMACS CD3 Reagent

1. Dodajte 1 ili 2 bočice CliniMACS CD3 Reagent (vidjeti Tablica 6.14). Lagano izmiješajte sadržaj.
2. Inkubirajte na orbitalnom rotatoru (25 o/min.) tijekom 30 minuta na sobnoj temperaturi.

▶ **Uklanjanje viška reagensa**

1. Napunite vrećicu Cell Preparation Bag puferom.
2. Centrifugirajte (300 × g, bez kočnice, tijekom 15 minuta, na sobnoj temperaturi).
3. Uklonite supernatant koliko je god moguće. **Napomena:** uklonite najmanje 500 g supernatanta. Ako se supernatant ukloni u količini manjoj od 500 g, preporučuju se ukupno dva koraka ispiranja (umjesto samo jednog). U suprotnom uklanjanje nevezanog reagensa može biti nedostatno.
4. Resuspendirajte stanični pelet.
5. Podesite volumen umetanja uzorka na 150 g (normalna primjena) ili 250 – 300 g (opsežna primjena).

6.5.2 KORAK 2: Odabir programa razdvajanja

▶ **Uključivanje sustava CliniMACS Plus Instrument**

▶ **Odabir programa razdvajanja DEPLETION 2.1 ili DEPLETION 3.1**
(tijekom uporabe CliniMACS Tubing Set LS odn. CliniMACS Depletion Tubing Set)

▶ **Unos parametara uzorka**
(prema analizi početnog staničnog proizvoda (vidjeti KORAK 1))

Vidjeti odjeljak 7.2.5 na stranici 143 ili 7.2.6 na stranici 148.

6.5.3 KORAK 3: Instalacija kompleta cijevi CliniMACS

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

ili

▶ **CliniMACS Depletion Tubing Set**

Vidjeti odjeljak 7.3.1 na stranici 153 ili 7.3.3 na stranici 173.

6.5.4 KORAK 4: CliniMACS Plus separacija

▶ **Postupak razdvajanja**

▶ **Odspajanje vrećica i bilježenje procesnog koda**

▶ **Uklanjanje kompleta cijevi i isključivanje**

▶ **Analiza stanica**

Vidjeti odjeljak 7.4.4 na stranici 200 i 7.4.5 na stranici 204.

6.6 Iscrpljivanje stanica pozitivnih na CD19

CliniMACS Plus CD19 System uključujući CliniMACS Plus Instrument, CliniMACS CD19 Reagent, CliniMACS Tubing Set LS i CliniMACS PBS/EDTA Buffer namijenjen je *in vitro* iscrpljivanju ljudskih stanica pozitivnih na CD19 iz heterogenih hematoloških staničnih populacija.

6.6.1 KORAK 1: Priprema stanica i magnetsko označavanje

Prve potrebne radnje

Kapacitet primjene

Do 5×10^9 stanica pozitivnih na CD19 od do 40×10^9 ukupnog broja stanica (WBC)

⚠ OPREZ

Rizik od nezadovoljavajuće učinkovitosti razdvajanja označenih stanica. Ako su specifikacije primjene premašene, postoji rizik od nezadovoljavajućeg specifičnog označavanja. Upotrijebite potrebnu količinu stanica i reagensa kako je opisano za odgovarajuću primjenu.

Potrebni CliniMACS materijali

Materijal	Kataloški broj	Količina
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS CD19 Reagent	179-01	1 bočica
CliniMACS Tubing Set LS	162-01	1 komplet cijevi
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	2 × 1000 mL vrećice[1]

1 Prije uporabe puferu CliniMACS PBS/EDTA Buffer dodajte HSA do konačne koncentracije od 0,5% (m/v).

Tablica 6.17: CliniMACS materijali potrebni za iscrpljivanje stanica pozitivnih na CD19

Potrebni dodatni materijali

- **Cell Preparation Bag:**
  jedna do dvije vrećice za prijenos od 600 mL, prikladne za centrifugiranje kao i jedna spojnica za mjesto uzorkovanja i jedan komplet za prijenos plazme, za uporabu tijekom postupka pripreme stanica
- **Plasma Waste Bag i Wash Waste Bag:**
  dvije vrećice za prijenos od 600 mL, prikladne za centrifugiranje
- **Cell Collection Bag:**

jedna vrećica za prijenos od 600 mL u kombinaciji s priključkom Luer/Spike Interconnector za spajanje vrećice Cell Collection Bag na komplet cijevi

- jedan filtar predsustava
- forceps za zaključavanje
- štrcaljke (različitih veličina) i hipodermične igle veličine 20 gauge
- humani serumski albumin (HSA) koji treba dodati u pufer CliniMACS PBS/EDTA Buffer do konačne koncentracije od 0,5% (m/v)
- epruvete za uzorke

▶ Priprema vrećica

Odredite težinu prazne vrećice Cell Collection Bag i vrećice Cell Preparation Bag na način opisan u odjeljku 7.1.1 na stranici 119.

Magnetsko označavanje stanica

Pogledajte odjeljak 7.1 „KORAK 1: Priprema stanica i magnetsko označavanje" na stranici 119 za detaljan opis sljedećih koraka.

▶ Analiza početnog staničnog proizvoda

▶ Prijenos početnog staničnog proizvoda u vrećicu Cell Preparation Bag

▶ Razrjeđivanje početnog staničnog proizvoda

Dodajte pufer: težina pufera koji treba dodati = 600 g – težina početnog staničnog proizvoda

▶ Centrifugiranje

Centrifugirajte na 200 × g, bez kočnice, tijekom 15 minuta, na sobnoj temperaturi (sobna temperatura: od +19 do +25 °C [+66 do +77 °F]).

▶ Prilagodba volumena: volumen označavanja 95 g (±5 g)

1. U potpunosti uklonite supernatant pazeći da ne resuspendirate stanični pelet.
2. Pažljivo resuspendirajte stanični pelet nakon uklanjanja supernatanta.
3. Podesite težinu vrećice Cell Preparation Bag (CPB) dodavanjem pufera uz primjenu sljedeće jednadžbe: ciljna težina napunjene vrećice CPB = 95 g + težina prazne vrećice CPB
4. Resuspendirajte stanični pelet.

▶ **Inkubacija s CliniMACS CD19 Reagent**

1. Dodajte 1 bočicu CliniMACS CD19 Reagent. Lagano izmiješajte sadržaj.
2. Inkubirajte na orbitalnom rotatoru (25 o/min.) tijekom 30 minuta na sobnoj temperaturi.

▶ **Uklanjanje viška reagensa**

1. Napunite vrećicu Cell Preparation Bag puferom.
2. Centrifugirajte (300 × g, bez kočnice, tijekom 15 minuta, na sobnoj temperaturi).
3. Uklonite supernatant koliko je god moguće. **Napomena:** uklonite najmanje 500 g supernatanta. Ako se supernatant ukloni u količini manjoj od 500 g, preporučuju se ukupno dva koraka ispiranja (umjesto samo jednog). U suprotnom uklanjanje nevezanog reagensa može biti nedostatno.
4. Resuspendirajte stanični pelet.
5. Podesite volumen umetanja uzorka na 100 g.

6.6.2 KORAK 2: Odabir programa razdvajanja

▶ **Uključivanje sustava CliniMACS Plus Instrument**

▶ **Odabir programa razdvajanja DEPLETION 2.1**

▶ **Unos parametara uzorka**

Vidjeti odjeljak 7.2.5 na stranici 143.

6.6.3 KORAK 3: Instalacija kompleta cijevi CliniMACS

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

Vidjeti odjeljak 7.3.1 na stranici 153.

6.6.4 KORAK 4: CliniMACS Plus separacija

▶ **Postupak razdvajanja**

▶ **Odspajanje vrećica i bilježenje procesnog koda**

- **Uklanjanje kompleta cijevi i isključivanje**
- **Analiza stanica**

Vidjeti odjeljak 7.4.4 na stranici 200.

6.7 Iscrpljivanje stanica pozitivnih na CD3 i stanica pozitivnih na CD19

CliniMACS Plus CD3/CD19 System uključujući CliniMACS Plus Instrument, CliniMACS CD3 Reagent, CliniMACS CD19 Reagent, CliniMACS Depletion Tubing Set i CliniMACS PBS/EDTA Buffer namijenjen je istodobnom *in vitro* iscrpljivanju ljudskih stanica pozitivnih na CD3 i ljudskih stanica pozitivnih na CD19 iz heterogenih hematoloških staničnih populacija.

6.7.1 KORAK 1: Priprema stanica i magnetsko označavanje

Prve potrebne radnje

Kapacitet primjene

Do 15×10^9 stanica pozitivnih na CD3 i 5×10^9 stanica pozitivnih na CD19 od do 40×10^9 ukupnog broja stanica (WBC)

⚠ OPREZ

Rizik od nezadovoljavajuće učinkovitosti razdvajanja označenih stanica. Ako su specifikacije primjene premašene, postoji rizik od nezadovoljavajućeg specifičnog označavanja. Upotrijebite potrebnu količinu stanica i reagensa kako je opisano za odgovarajuću primjenu.

Potrebni CliniMACS materijali

Materijal	Kataloški broj	Količina
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS CD3 Reagent	273-01	1 bočica
CliniMACS CD19 Reagent	179-01	1 bočica
CliniMACS Depletion Tubing Set	261-01	1 komplet cijevi
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	4 × 1000 mL vrećice[1]

1 Prije uporabe puferu CliniMACS PBS/EDTA Buffer dodajte HSA do konačne koncentracije od 0,5% (m/v).

Tablica 6.18: CliniMACS materijali potrebni za iscrpljivanje stanica pozitivnih na CD3 i stanica pozitivnih na CD19

Potrebni dodatni materijali

- **Cell Preparation Bag:**
  jedna do dvije vrećice za prijenos od 600 mL, prikladne za centrifugiranje kao i jedna spojnica za mjesto uzorkovanja i dva kompleta za prijenos plazme, za uporabu tijekom postupka pripreme stanica
- **Plasma Waste Bag i Wash Waste Bag:**
  dvije vrećice za prijenos od 600 mL, prikladne za centrifugiranje
- **Cell Collection Bag:**
  jedna do dvije vrećice za prijenos od 600 mL u kombinaciji s priključkom Luer/Spike Interconnector za spajanje vrećice Cell Collection Bag na komplet cijevi
- jedan filtar predsustava
- forceps za zaključavanje
- štrcaljke (različitih veličina) i hipodermične igle veličine 20 gauge
- humani serumski albumin (HSA) koji treba dodati u pufer CliniMACS PBS/EDTA Buffer do konačne koncentracije od 0,5% (m/v)
- imunoglobulin G kliničke kakvoće
- epruvete za uzorke

VAŽNO
Nakon unosa parametara uzorka (KORAK 2) softver CliniMACS Plus Software izračunava volumene koji će se prikupiti u vrećice Reapplication Bag, Cell Collection Bag, Non-Target Cell Bag i Buffer Waste Bag. Ako volumen izračunate tekućine premaši standardni volumen od 500 mL, neophodna je zamjena potrebnih vrećica.

▶ Priprema vrećica

Odredite težinu prazne vrećice Cell Collection Bag i vrećice Cell Preparation Bag na način opisan u odjeljku 7.1.1 na stranici 119.

Magnetsko označavanje stanica

Pogledajte odjeljak 7.1 „KORAK 1: Priprema stanica i magnetsko označavanje" na stranici 119 za detaljan opis sljedećih koraka.

▶ Analiza početnog staničnog proizvoda

Odredite broj svih stanica označenih s CD3 i CD19 (uključujući nespecifično vezanje CD3 i CD19, ne samo stvarne T- i B-stanice). Uzmite taj broj u obzir za specifikacije primjene i unos parametara uzorka (vidjeti KORAK 2).

▶ Prijenos početnog staničnog proizvoda u vrećicu Cell Preparation Bag

▶ Razrjeđivanje početnog staničnog proizvoda

Dodajte pufer: težina pufera koji treba dodati = 600 g – težina početnog staničnog proizvoda

Centrifugiranje

Centrifugirajte na 200 × g, bez kočnice, tijekom 15 minuta, na sobnoj temperaturi (sobna temperatura: od +19 do +25 °C [+66 do +77 °F]).

Prilagodba volumena: volumen označavanja 87,5 g (±5 g)

1. U potpunosti uklonite supernatant pazeći da ne resuspendirate stanični pelet.
2. Pažljivo resuspendirajte stanični pelet nakon uklanjanja supernatanta.
3. Prilagodite težinu vrećice Cell Preparation Bag (CPB) dodavanjem pufera uz primjenu sljedeće jednadžbe (uzmite u obzir težinu IgG): ciljna težina napunjene vrećice CPB = 87,5 g – težina IgG + težina prazne vrećice CPB
4. Resuspendirajte stanični pelet.

Inkubacija s imunoglobulinom kliničke kakvoće

1. Dodajte IgG (1,5 mg/mL).
2. Inkubirajte na orbitalnom rotatoru (25 o/min.) tijekom 5 minuta na sobnoj temperaturi.

Inkubacija s CliniMACS CD3 Reagent i CliniMACS CD19 Reagent

1. Dodajte 1 bočicu CliniMACS CD3 Reagent i 1 bočicu CliniMACS CD19 Reagent. Lagano izmiješajte sadržaj.
2. Inkubirajte na orbitalnom rotatoru (25 o/min.) tijekom 30 minuta na sobnoj temperaturi.

Uklanjanje viška reagensa

1. Napunite vrećicu Cell Preparation Bag puferom.
2. Centrifugirajte (300 × g, bez kočnice, tijekom 15 minuta, na sobnoj temperaturi).
3. Uklonite supernatant koliko je god moguće. **Napomena:** uklonite najmanje 500 g supernatanta. Ako se supernatant ukloni u količini manjoj od 500 g, preporučuju se ukupno dva koraka ispiranja (umjesto samo jednog). U suprotnom uklanjanje nevezanog reagensa može biti nedostatno.
4. Resuspendirajte stanični pelet.
5. Podesite volumen umetanja uzorka na 150 g.

6.7.2 KORAK 2: Odabir programa razdvajanja

- **Uključivanje sustava CliniMACS Plus Instrument**
- **Odabir programa razdvajanja DEPLETION 3.1**
- **Unos parametara uzorka**
  (prema analizi početnog staničnog proizvoda (vidjeti KORAK 1))

Vidjeti odjeljak 7.2.6 na stranici 148.

6.7.3 KORAK 3: Instalacija kompleta cijevi CliniMACS

- **CliniMACS Depletion Tubing Set**

Vidjeti odjeljak 7.3.3 na stranici 173.

6.7.4 KORAK 4: CliniMACS Plus separacija

- **Postupak razdvajanja**
- **Odspajanje vrećica i bilježenje procesnog koda**
- **Uklanjanje kompleta cijevi i isključivanje**
- **Analiza stanica**

Vidjeti odjeljak 7.4.5 na stranici 204.

6.8 Obogaćivanje/iscrpljivanje stanica pozitivnih na CD8

CliniMACS Plus CD8 System uključujući CliniMACS Plus Instrument, CliniMACS CD8 Reagent, CliniMACS Tubing Set ili CliniMACS Tubing Set LS i CliniMACS PBS/EDTA Buffer namijenjen je *in vitro* obogaćivanju ili iscrpljivanju ljudskih stanica pozitivnih na CD8 iz heterogenih hematoloških staničnih populacija.

6.8.1 KORAK 1: Priprema stanica i magnetsko označavanje

Prve potrebne radnje

Kapacitet primjene

- **Obogaćivanje:** do 4×10^9 označenih stanica od do 40×10^9 ukupnog broja stanica (WBC) uz primjenu CliniMACS Tubing Set
- **Iscrpljivanje:** do 4×10^9 označenih stanica od do 40×10^9 ukupnog broja stanica (WBC) uz primjenu CliniMACS Tubing Set LS

⚠ OPREZ

Rizik od nezadovoljavajuće učinkovitosti razdvajanja označenih stanica. Ako su specifikacije primjene premašene, postoji rizik od nezadovoljavajućeg specifičnog označavanja. Upotrijebite potrebnu količinu stanica i reagensa kako je opisano za odgovarajuću primjenu.

Potrebni CliniMACS materijali

Materijal	Kataloški broj	Količina	Program razdvajanja
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1	–
CliniMACS CD8 Reagent	275-01	1 bočica	–
CliniMACS Tubing Set	161-01	1 komplet cijevi	ENRICHMENT 1.1
CliniMACS Tubing Set LS	162-01	1 komplet cijevi	DEPLETION 2.1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	Do 3 × 1000 mL vrećica[1]	–

1 Vidjeti Tablica 6.20 do Tablica 6.22. Prije uporabe puferu CliniMACS PBS/EDTA Buffer dodajte HSA do konačne koncentracije od 0,5% (m/v).

Tablica 6.19: CliniMACS materijali potrebni za obogaćivanje/iscrpljivanje stanica pozitivnih na CD8

Potrebni dodatni materijali

- **Cell Preparation Bag:**
  jedna do dvije vrećice za prijenos od 600 mL, prikladne za centrifugiranje kao i jedna spojnica za mjesto uzorkovanja i jedan komplet za prijenos plazme, za uporabu tijekom postupka pripreme stanica
- **Plasma Waste Bag i Wash Waste Bag:**
  dvije vrećice za prijenos od 600 mL, prikladne za centrifugiranje

- **Cell Collection Bag:**
  jedna vrećica za prijenos od 600 mL u kombinaciji s priključkom Luer/Spike Interconnector za spajanje vrećice Cell Collection Bag na komplet cijevi (vidjeti Tablica 6.21 i Tablica 6.22)
- **Ako je potrebna zamjena vrećice Negative Fraction Bag i vrećice Buffer Waste Bag:**
  dvije vrećice za prijenos od 1000 mL u kombinaciji s dva priključka Luer/Spike Interconnector za spajanje vrećica na komplet cijevi (vidjeti Tablica 6.21 i Tablica 6.22)
- **Ako je za razdvajanje potrebno više od jedne litre pufera:**
  jedan komplet za prijenos plazme za spajanje vrećica za pufer (vidjeti Tablica 6.21 i Tablica 6.22)
- jedan filtar predsustava
- forceps za zaključavanje
- štrcaljke (različitih veličina) i hipodermične igle veličine 20 gauge
- humani serumski albumin (HSA) koji treba dodati u pufer CliniMACS PBS/EDTA Buffer do konačne koncentracije od 0,5% (m/v)
- epruvete za uzorke

VAŽNO

Nakon unosa parametara uzorka (KORAK 2), CliniMACS Plus softver izračunava volumene koji će se prikupiti u vrećice Priming Waste Bag, Cell Collection Bag, Negative Fraction Bag i Buffer Waste Bag. Ako volumen izračunate tekućine premaši standardni volumen od 500 mL, neophodna je zamjena potrebnih vrećica u skladu sa sljedećim pregledom materijala.

Pregled potrebnih materijala

Priprema stanica	
Ukupan broj stanica	$\leq 40 \times 10^9$
Označene stanice	$\leq 4 \times 10^9$
Broj bočica reagensa	1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 mL
Komplet za prijenos plazme	1
Volumen umetanja uzorka	100 mL

Tablica 6.20: Materijali potrebni za pripremu stanica pozitivnih na CD8

Razdvajanje (ENRICHMENT 1.1)		
Označene stanice	$<2 \times 10^9$	$2 – 4 \times 10^9$
Negative Fraction Bag	–	Zamijenite originalne vrećice kompleta cijevi s vrećicama za prijenos od 1000 mL
Buffer Waste Bag	–	
Priming Waste Bag	–	–
Cell Collection Bag	600 mL	600 mL
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 mL	2000 mL
Luer/Spike Interconnector	1	3
Komplet za prijenos plazme	–	1

Tablica 6.21: Materijali potrebni za obogaćivanje stanica pozitivnih na CD8

Razdvajanje (DEPLETION 2.1)	
Označene stanice	$\leq 4 \times 10^9$
Negative Fraction Bag	Zamjena vrećice nije potrebna
Buffer Waste Bag	
Priming Waste Bag	
Cell Collection Bag	600 mL
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 mL
Luer/Spike Interconnector	1

Tablica 6.22: Materijali potrebni za iscrpljivanje stanica pozitivnih na CD8

▶ Priprema vrećica

Odredite težinu prazne vrećice Cell Collection Bag i vrećice Cell Preparation Bag na način opisan u odjeljku 7.1.1 na stranici 119.

Magnetsko označavanje stanica

Pogledajte odjeljak 7.1 „KORAK 1: Priprema stanica i magnetsko označavanje" na stranici 119 za detaljan opis sljedećih koraka.

▶ Analiza početnog staničnog proizvoda

▶ Prijenos početnog staničnog proizvoda u vrećicu Cell Preparation Bag

▶ Razrjeđivanje početnog staničnog proizvoda

Dodajte pufer: težina pufera koji treba dodati = težina početnog staničnog proizvoda × 2

▶ Centrifugiranje

Centrifugirajte na 300 × g, bez kočnice, tijekom 15 minuta, na sobnoj temperaturi (sobna temperatura: od +19 do +25 °C [+66 do +77 °F]).

▶ **Prilagodba volumena: volumen označavanja 95 g (±5 g)**

1. U potpunosti uklonite supernatant pazeći da ne resuspendirate stanični pelet.
2. Pažljivo resuspendirajte stanični pelet nakon uklanjanja supernatanta.
3. Prilagodite težinu vrećice Cell Preparation Bag (CPB) dodavanjem pufera. Izračunajte ciljnu težinu vrećice CPB napunjenu razrijeđenim staničnim proizvodom uz primjenu sljedeće jednadžbe: ciljna težina napunjene vrećice CPB = 95 g – težina prazne vrećice CPB
4. Resuspendirajte stanični pelet.

▶ **Inkubacija s CliniMACS CD8 Reagent**

1. Dodajte 1 bočicu CliniMACS CD8 Reagent. Lagano izmiješajte sadržaj.
2. Inkubirajte na orbitalnom rotatoru (25 o/min.) tijekom 30 minuta na sobnoj temperaturi.

▶ **Uklanjanje viška reagensa**

1. Napunite vrećicu Cell Preparation Bag puferom.
2. Centrifugirajte (300 × g, bez kočnice, tijekom 15 minuta, na sobnoj temperaturi).
3. Uklonite supernatant koliko je god moguće. **Napomena:** uklonite najmanje 500 g supernatanta. Ako se supernatant ukloni u količini manjoj od 500 g, preporučuju se ukupno dva koraka ispiranja (umjesto samo jednog). U suprotnom uklanjanje nevezanog reagensa može biti nedostatno.
4. Resuspendirajte stanični pelet.
5. Podesite volumen umetanja uzorka na 100 g.

6.8.2 KORAK 2: Odabir programa razdvajanja

▶ **Uključivanje sustava CliniMACS Plus Instrument**

▶ **Odabir programa razdvajanja ENRICHMENT 1.1 ili DEPLETION 2.1**

▶ **Unos parametara uzorka**

Vidjeti odjeljak 7.2.3 na stranici 136 ili 7.2.5 na stranici 143.

6.8.3 KORAK 3: Instalacija kompleta cijevi CliniMACS

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

Vidjeti odjeljak 7.3.1 na stranici 153.

6.8.4 KORAK 4: CliniMACS Plus separacija

- **Postupak razdvajanja**
- **Odspajanje vrećica i bilježenje procesnog koda**
- **Uklanjanje kompleta cijevi i isključivanje**
- **Analiza stanica**

Vidjeti odjeljak 7.4.2 na stranici 192 ili 7.4.4 na stranici 200.

6.9 Obogaćivanje/iscrpljivanje stanica pozitivnih na CD25

CliniMACS Plus CD25 System uključujući CliniMACS Plus Instrument, CliniMACS CD25 Reagent, CliniMACS Tubing Set ili CliniMACS Tubing Set LS i CliniMACS PBS/EDTA Buffer namijenjen je *in vitro* obogaćivanju ili iscrpljivanju ljudskih stanica pozitivnih na CD25, po mogućnosti stanica sa stanicama s visoko izraženim CD25, iz heterogenih hematoloških staničnih populacija.

6.9.1 KORAK 1: Priprema stanica i magnetsko označavanje

Prve potrebne radnje

Kapacitet primjene

- **Obogaćivanje:** stanice pozitivne na CD25 ili stanice s visoko izraženim CD25: do 0,6 × 10^9 označenih stanica od do 40 × 10^9 ukupnog broja stanica (WBC) uz primjenu CliniMACS Tubing Set
- **Iscrpljivanje:**
  Normalna primjena: do 6 × 10^9 stanica pozitivnih na CD25 od do 40 × 10^9 ukupnog broja stanica (WBC) uz primjenu CliniMACS Tubing Set LS
  Opsežna primjena: veći od 6 × 10^9 i do 12 × 10^9 stanica pozitivnih na CD25 od većeg od 40 × 10^9 i do 80 × 10^9 ukupnog broja stanica (WBC) uz primjenu CliniMACS Tubing Set LS

⚠ OPREZ

Rizik od nezadovoljavajuće učinkovitosti razdvajanja označenih stanica. Ako su specifikacije primjene premašene, postoji rizik od nezadovoljavajućeg specifičnog označavanja. Upotrijebite potrebnu količinu stanica i reagensa kako je opisano za odgovarajuću primjenu.

Potrebni CliniMACS materijali

Materijal	Kataloški broj	Količina	Program razdvajanja
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1	–
CliniMACS CD25 Reagent	274-01	• 1 bočica (obična) • 2 bočice (velike)	–
CliniMACS Tubing Set	161-01	1 komplet cijevi	ENRICHMENT 3.2
CliniMACS Tubing Set LS	162-01	1 komplet cijevi	DEPLETION 2.1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	Do 4 × 1000 mL vrećica[1]	–

1 Vidjeti Tablica 6.24 do Tablica 6.27. Prije uporabe puferu CliniMACS PBS/EDTA Buffer dodajte HSA do konačne koncentracije od 0,5% (m/v).

Tablica 6.23: CliniMACS materijali potrebni za obogaćivanje/iscrpljivanje stanica pozitivnih na CD25

Potrebni dodatni materijali

- **Cell Preparation Bag:**
  jedna do dvije vrećice za prijenos od 600 mL, prikladne za centrifugiranje kao i jedna spojnica za mjesto uzorkovanja i jedan do dva kompleta za prijenos plazme, za uporabu tijekom postupka pripreme stanica
- **Plasma Waste Bag i Wash Waste Bag:**
  dvije vrećice za prijenos od 600 mL (ili dvije vrećice od 1000 mL), prikladne za centrifugiranje
- **Cell Collection Bag:**
  jedna vrećica za prijenos od 150 mL ili jedna do dvije vrećice za prijenos od 600 mL u kombinaciji s priključkom Luer/Spike Interconnector za spajanje vrećice Cell Collection Bag na komplet cijevi

  Ako su za razdvajanje potrebne dvije vrećice Cell Collection Bags, upotrijebite komplet za prijenos plazme da spojite dvije vrećice (vidjeti Tablica 6.25 i Tablica 6.27).
- **Ako je potrebna zamjena vrećice Negative Fraction Bag i vrećice Buffer Waste Bag:**
  dvije vrećice za prijenos od 1000 mL u kombinaciji s dva priključka Luer/Spike Interconnector za spajanje vrećica na komplet cijevi (vidjeti Tablica 6.25 i Tablica 6.27)
- **Ako je za razdvajanje potrebno više od jedne litre pufera:**
  jedan komplet za prijenos plazme za spajanje vrećica za pufer (vidjeti Tablica 6.25 i Tablica 6.27)
- jedan filtar predsustava
- forceps za zaključavanje
- štrcaljke (različitih veličina) i hipodermične igle veličine 20 gauge
- humani serumski albumin (HSA) koji treba dodati u pufer CliniMACS PBS/EDTA Buffer do konačne koncentracije od 0,5% (m/v)
- epruvete za uzorke

VAŽNO

Nakon unosa parametara uzorka (KORAK 2), CliniMACS Plus softver izračunava volumene koji će se prikupiti u vrećice Priming Waste Bag, Cell Collection Bag, Negative Fraction Bag i Buffer Waste Bag. Ako volumen izračunate tekućine premaši standardni volumen od 500 mL, neophodna je zamjena potrebnih vrećica u skladu sa sljedećim pregledom materijala.

Pregled potrebnih materijala

Priprema stanica (ENRICHMENT 3.2)		
Primjena	**Obogaćivanje stanica pozitivnih na CD25**	**Obogaćivanje stanica s visoko izraženim CD25**
Ukupan broj stanica (WBC)	$\leq 40 \times 10^9$	$\leq 40 \times 10^9$
Označene stanice	$\leq 0{,}6 \times 10^9$	$\leq 0{,}6 \times 10^9$
Broj bočica reagensa	1	1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 – 2000 mL	2000 mL
Komplet za prijenos plazme	1 – 2	2
Volumen označavanja	190 mL	380 mL
Temperatura označavanja	Sobna temperatura	+4 do +8 °C (+39 do +46 °F)

Tablica 6.24: Materijali potrebni za pripremu stanica pozitivnih na CD25 odnosno stanice kod kojih je ta molekula visoko izražena (ENRICHMENT 3.2)

Razdvajanje (ENRICHMENT 3.2)		
Primjena	**Obogaćivanje stanica pozitivnih na CD25**	**Obogaćivanje stanica s visoko izraženim CD25**
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 mL	1000 mL
Negative Fraction Bag	Zamjena vrećice nije potrebna	
Buffer Waste Bag		
Priming Waste Bag		
Cell Collection Bag	150 mL	150 mL
Luer/Spike Interconnector	1	1

Tablica 6.25: Materijali potrebni za obogaćivanje stanica pozitivnih na CD25 odnosno stanica kod kojih je ta molekula visoko izražena (ENRICHMENT 3.2)

Priprema stanica (DEPLETION 2.1)		
Ukupan broj stanica (WBC)	≤40 × 10^9	>40 – 80 × 10^9
Označene stanice	≤6 × 10^9	>6 – 12 × 10^9
Broj bočica reagensa	1	2
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 – 2000 mL	1000 – 2000 mL
Komplet za prijenos plazme	1 – 2	1 – 2
Volumen označavanja	95 mL	190 mL
Temperatura označavanja	Sobna temperatura	Sobna temperatura

Tablica 6.26: Materijali potrebni za pripremu stanica pozitivnih na CD25 (DEPLETION 2.1)

Razdvajanje (DEPLETION 2.1)		
Ukupan broj stanica (WBC)	≤40 × 10^9	>40 – 80 × 10^9
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 mL za <5 × 10^9 označene stanice	2000 mL za 5 – 12 × 10^9 označenih stanica
Negative Fraction Bag	–	Zamijenite originalne vrećice kompleta cijevi s vrećicama za prijenos od 1000 mL
Buffer Waste Bag	–	
Priming Waste Bag	–	–
Cell Collection Bag	600 mL	2 × 600 mL
Luer/Spike Interconnector	1	3
Komplet za prijenos plazme	–	2

Tablica 6.27: Materijali potrebni za iscrpljivanje stanica pozitivnih na CD25 (DEPLETION 2.1)

▶ Priprema vrećica

Odredite težinu prazne vrećice Cell Collection Bag i vrećice Cell Preparation Bag na način opisan u odjeljku 7.1.1 na stranici 119.

Magnetsko označavanje stanica

Pogledajte odjeljak 7.1 „KORAK 1: Priprema stanica i magnetsko označavanje" na stranici 119 za detaljan opis sljedećih koraka.

VAŽNO

- Pohranite pufer za pripremu stanica za obogaćivanje ili iscrpljivanje za stanice pozitivne na CD25 na temperaturi od+19 do +25 °C [+66 do +77 °F].
- Magnetsko označavanje tijekom pripreme stanica za obogaćivanje stanica s visoko izraženim CD25 mora se provesti uz primjenu hladnog pufera (od +4 do +8 °C [+39 do +46 °F]). Niža ili viša temperatura za posljedicu može imati smanjenu čistoću i niži broj ciljnih stanica.

▶ Analiza početnog staničnog proizvoda

▶ Prijenos početnog staničnog proizvoda u vrećicu Cell Preparation Bag

Razrjeđivanje početnog staničnog proizvoda

Dodajte pufer: težina pufera koji treba dodati = težina početnog staničnog proizvoda × 2

Centrifugiranje

Centrifugirajte na 300 × g, bez kočnice, tijekom 15 minuta, na sobnoj temperaturi (sobna temperatura: od +19 do +25 °C [+66 do +77 °F]).

Prilagodba volumena: volumen označavanja za

obogaćivanje stanica pozitivnih na CD25: 190 g (±5 g)
obogaćivanje stanica s visoko izraženim CD25: 380 g (±5 g)[1]
iscrpljivanje stanica pozitivnih na CD25 (normalna primjena): 95 g
iscrpljivanje stanica pozitivnih na CD25 (opsežna primjena): 190 g

1. U potpunosti uklonite supernatant pazeći da ne resuspendirate stanični pelet.
2. Pažljivo resuspendirajte stanični pelet nakon uklanjanja supernatanta.
3. Podesite težinu vrećice Cell Preparation Bag (CPB) dodavanjem pufera uz primjenu sljedeće jednadžbe: ciljna težina napunjene vrećice CPB = volumen označavanja + težina prazne vrećice CPB
4. Resuspendirajte stanični pelet.

Inkubacija s CliniMACS CD25 Reagent

1. Dodajte 1 ili 2 bočice CliniMACS CD25 Reagent (vidjeti Tablica 6.24 i Tablica 6.26). Lagano izmiješajte sadržaj.
2. Inkubirajte na orbitalnom rotatoru (25 o/min.):
   a) obogaćivanje ili iscrpljivanje stanica pozitivnih na CD25: 30 minuta na sobnoj temperaturi
   b) obogaćivanje stanica s visoko izraženim CD25: 15 minuta na temperaturi od +4 do +8 °C (+39 do +46 °F)

Uklanjanje viška reagensa

1. Napunite vrećicu Cell Preparation Bag puferom.
2. Centrifugirajte (300 × g, bez kočnice, tijekom 15 minuta, na sobnoj temperaturi).
3. Uklonite supernatant koliko je god moguće. **Napomena:** uklonite najmanje 500 g supernatanta. Ako se supernatant ukloni u količini manjoj od 500 g, preporučuju se ukupno dva koraka ispiranja (umjesto samo jednog). U suprotnom uklanjanje nevezanog reagensa može biti nedostatno.
4. Resuspendirajte stanični pelet.
5. Podesite volumen umetanja uzorka na 100 g (normalna primjena) ili 200 g (opsežna primjena).

1 Magnetsko označavanje za obogaćivanje stanica s visoko izraženim CD25 mora se provesti uz primjenu hladnog pufera (od +4 do +8 °C [+39 do +46 °F]).

6.9.2 KORAK 2: Odabir programa razdvajanja

- **Uključivanje sustava CliniMACS Plus Instrument**
- **Odabir programa razdvajanja ENRICHMENT 3.2 ili DEPLETION 2.1**
- **Unos parametara uzorka**
  (ne za ENRICHMENT 3.2)

Vidjeti odjeljak 7.2.4 na stranici 141 ili 7.2.5 na stranici 143.

6.9.3 KORAK 3: Instalacija kompleta cijevi CliniMACS

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

Vidjeti odjeljak 7.3.1 na stranici 153.

6.9.4 KORAK 4: CliniMACS Plus separacija

- **Postupak razdvajanja**
- **Odspajanje vrećica i bilježenje procesnog koda**
- **Uklanjanje kompleta cijevi i isključivanje**
- **Analiza stanica**

Vidjeti odjeljak 7.4.3 na stranici 196 ili 7.4.4 na stranici 200.

6.10 Obogaćivanje/iscrpljivanje stanica pozitivnih na CD4

CliniMACS Plus CD4 System uključujući CliniMACS Plus Instrument, CliniMACS CD4 Reagent, CliniMACS Tubing Set ili CliniMACS Tubing Set LS i CliniMACS PBS/EDTA Buffer namijenjen je *in vitro* obogaćivanju ili iscrpljivanju ljudskih stanica pozitivnih na CD4 iz heterogenih hematoloških staničnih populacija.

6.10.1 KORAK 1: Priprema stanica i magnetsko označavanje

Prve potrebne radnje

Kapacitet primjene

- **Obogaćivanje:** do 5×10^9 označenih stanica od do 40×10^9 ukupnog broja stanica (WBC) uz primjenu CliniMACS Tubing Set
- **Iscrpljivanje:** do 12×10^9 označenih stanica od do 40×10^9 ukupnog broja stanica (WBC) uz primjenu CliniMACS Tubing Set LS

Napomena: ako broj izračunatih stanica premašuje kapacitet primjene, podijelite uzorak i nastavite sa svakim uzorkom zasebno, uz primjenu novog kompleta cijevi za svaki rad s CliniMACS Plus Instrument.

⚠ OPREZ

Rizik od nezadovoljavajuće učinkovitosti razdvajanja označenih stanica. Ako su specifikacije primjene premašene, postoji rizik od nezadovoljavajućeg specifičnog označavanja. Upotrijebite potrebnu količinu stanica i reagensa kako je opisano za odgovarajuću primjenu.

Potrebni CliniMACS materijali

Materijal	Kataloški broj	Količina	Program razdvajanja
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1	–
CliniMACS CD4 Reagent	276-01	1 bočica	–
CliniMACS Tubing Set	161-01	1 komplet cijevi	ENRICHMENT 1.1
CliniMACS Tubing Set LS	162-01	1 komplet cijevi	DEPLETION 2.1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	Do 4 × 1000 mL vrećica[1]	–

1 Vidjeti Tablica 6.29 do Tablica 6.32. Prije uporabe puferu CliniMACS PBS/EDTA Buffer dodajte HSA do konačne koncentracije od 0,5% (m/v).

Tablica 6.28: CliniMACS materijali potrebni za obogaćivanje/iscrpljivanje stanica pozitivnih na CD4

Potrebni dodatni materijali

- **Cell Preparation Bag:**
  jedna do dvije vrećice za prijenos od 600 mL, prikladne za centrifugiranje kao i jedna spojnica za mjesto uzorkovanja i jedan komplet za prijenos plazme, za uporabu tijekom postupka pripreme stanica
- **Plasma Waste Bag i Wash Waste Bag:**
  dvije vrećice za prijenos od 600 mL (ili dvije vrećice od 1000 mL), prikladne za centrifugiranje
- **Cell Collection Bag:**
  jedna vrećica za prijenos od 150 mL ili jedna do dvije vrećice za prijenos od 600 mL u kombinaciji s priključkom Luer/Spike Interconnector za spajanje vrećice Cell Collection Bag na komplet cijevi

  Ako su za razdvajanje potrebne dvije vrećice Cell Collection Bags, upotrijebite komplet za prijenos plazme da spojite dvije vrećice (vidjeti Tablica 6.30 i Tablica 6.32).
- **Ako je potrebna zamjena vrećice Negative Fraction Bag, vrećice Buffer Waste Bag i/ili vrećice Priming Waste Bag:**
  do tri vrećice za prijenos od 1000 mL u kombinaciji s dva priključka Luer/Spike Interconnector za spajanje vrećica na komplet cijevi (vidjeti Tablica 6.30 i Tablica 6.32)

  Zamijenite vrećicu Priming Waste Bag koristeći sterilan priključak cijevi.
- **Ako je za razdvajanje potrebno više od jedne litre pufera:**
  jedan do dva kompleta za prijenos plazme za spajanje vrećica za pufer (vidjeti Tablica 6.30 i Tablica 6.32)
- jedan filtar predsustava
- forceps za zaključavanje
- štrcaljke (različitih veličina) i hipodermične igle veličine 20 gauge
- humani serumski albumin (HSA) koji treba dodati u pufer CliniMACS PBS/EDTA Buffer do konačne koncentracije od 0,5% (m/v)
- epruvete za uzorke

VAŽNO

Nakon unosa parametara uzorka (KORAK 2) CliniMACS Plus softver izračunava volumene koji će se prikupiti u vrećice Priming Waste Bag, Cell Collection Bag, Negative Fraction Bag i Buffer Waste Bag. Ako volumen izračunate tekućine premaši standardni volumen od 500 mL, neophodna je zamjena potrebnih vrećica u skladu sa sljedećim pregledom materijala.

Pregled potrebnih materijala

Priprema stanica (ENRICHMENT 1.1)	
Ukupan broj stanica (WBC)	≤40 × 10^9
Označene stanice	≤5 × 10^9
Broj bočica reagensa	1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 mL
Komplet za prijenos plazme	1

Tablica 6.29: Materijali potrebni za pripremu stanica pozitivnih na CD4 (ENRICHMENT 1.1)

Razdvajanje (ENRICHMENT 1.1)		
Označene stanice	≤2 × 10^9	>2 – 5 × 10^9
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 mL	2000 mL
Negative Fraction Bag	–	Zamijenite originalne vrećice kompleta cijevi s vrećicama za prijenos od 1000 mL
Buffer Waste Bag	–	
Priming Waste Bag	–	–
Cell Collection Bag	150 mL	600 mL
Luer/Spike Interconnector	1	3
Komplet za prijenos plazme	–	1

Tablica 6.30: Materijali potrebni za obogaćivanje stanica pozitivnih na CD4 (ENRICHMENT 1.1)

Priprema stanica (DEPLETION 2.1)	
Ukupan broj stanica (WBC)	≤40 × 10^9
Označene stanice	≤12 × 10^9
Broj bočica reagensa	1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 mL
Komplet za prijenos plazme	1

Tablica 6.31: Materijali potrebni za pripremu stanica pozitivnih na CD4 (DEPLETION 2.1)

Razdvajanje (DEPLETION 2.1)		
Označene stanice	<5 × 10^9	5 – 12 × 10^9
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 mL	2000 mL
Negative Fraction Bag	–	Zamijenite originalne vrećice kompleta cijevi s vrećicama za prijenos od 1000 mL
Buffer Waste Bag	–	
Priming Waste Bag	–	–
Cell Collection Bag	1 × 600 mL	1 – 2 × 600 mL
Luer/Spike Interconnector	1	3
Komplet za prijenos plazme	–	1 – 2

Tablica 6.32: Materijali potrebni za iscrpljivanje stanica pozitivnih na CD4 (DEPLETION 2.1)

▶ Priprema vrećica

Odredite težinu prazne vrećice Cell Collection Bag i vrećice Cell Preparation Bag na način opisan u odjeljku 7.1.1 na stranici 119.

Magnetsko označavanje stanica

Pogledajte odjeljak 7.1 „KORAK 1: Priprema stanica i magnetsko označavanje" na stranici 119 za detaljan opis sljedećih koraka.

▶ Analiza početnog staničnog proizvoda

▶ Prijenos početnog staničnog proizvoda u vrećicu Cell Preparation Bag

▶ Razrjeđivanje početnog staničnog proizvoda

Dodajte pufer: težina pufera koji treba dodati = težina početnog staničnog proizvoda × 2

▶ Centrifugiranje

Centrifugirajte na 300 × g, bez kočnice, tijekom 15 minuta, na sobnoj temperaturi (sobna temperatura: od +19 do +25 °C [+66 do +77 °F]).

▶ Prilagodba volumena: volumen označavanja 95 g (±5 g)

1. Uklonite supernatant da prilagodite uzorak koristeći se sljedećom jednadžbom: težina supernatanta koju treba ukloniti = težina razrijeđenog staničnog proizvoda – 95 g
2. Resuspendirajte stanični pelet.

▶ Inkubacija s CliniMACS CD4 Reagent

1. Dodajte 1 bočicu CliniMACS CD4 Reagent. Lagano izmiješajte sadržaj.
2. Inkubirajte na orbitalnom rotatoru (25 o/min.) tijekom 30 minuta na sobnoj temperaturi.

▶ Uklanjanje viška reagensa

1. Napunite vrećicu Cell Preparation Bag puferom.
2. Centrifugirajte (300 × g, bez kočnice, tijekom 15 minuta, na sobnoj temperaturi).
3. Uklonite supernatant koliko je god moguće. **Napomena:** uklonite najmanje 500 g supernatanta. Ako se supernatant ukloni u količini manjoj od 500 g, preporučuju se ukupno dva koraka ispiranja (umjesto samo jednog). U suprotnom uklanjanje nevezanog reagensa može biti nedostatno.
4. Resuspendirajte stanični pelet.
5. Podesite volumen umetanja uzorka na 100 g.

6.10.2 KORAK 2: Odabir programa razdvajanja

- **Uključivanje sustava CliniMACS Plus Instrument**
- **Odabir programa razdvajanja ENRICHMENT 1.1 ili DEPLETION 2.1**
- **Unos parametara uzorka**

Vidjeti odjeljak 7.2.3 na stranici 136 i 7.2.5 na stranici 143.

6.10.3 KORAK 3: Instalacija kompleta cijevi CliniMACS

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

Vidjeti odjeljak 7.3.1 na stranici 153.

6.10.4 KORAK 4: CliniMACS Plus separacija

- **Postupak razdvajanja**
- **Odspajanje vrećica i bilježenje procesnog koda**
- **Uklanjanje kompleta cijevi i isključivanje**
- **Analiza stanica**

Vidjeti odjeljak 7.4.2 na stranici 192 ili 7.4.4 na stranici 200.

6.11 Iscrpljivanje stanica pozitivnih na CD4 i stanica pozitivnih na CD8

CliniMACS Plus CD4/CD8 System uključujući CliniMACS Plus instrument, CliniMACS CD4 Reagent, CliniMACS CD8 Reagent, CliniMACS Tubing Set LS i CliniMACS PBS/EDTA Buffer namijenjen je istodobnom *in vitro* iscrpljivanju ljudskih stanica pozitivnih na CD4 i ljudskih stanica pozitivnih na CD8 iz heterogenih hematoloških staničnih populacija.

6.11.1 KORAK 1: Priprema stanica i magnetsko označavanje

Prve potrebne radnje

Kapacitet primjene

Do 12×10^9 stanica pozitivnih na CD4 i 4×10^9 stanica pozitivnih na CD8 od do 40×10^9 ukupnog broja stanica (WBC)

Napomena: ako broj izračunatih stanica premašuje kapacitet primjene, podijelite uzorak i nastavite sa svakim uzorkom zasebno, uz primjenu novog kompleta cijevi za svaki rad s CliniMACS Plus Instrument.

⚠ OPREZ

Rizik od nezadovoljavajuće učinkovitosti razdvajanja označenih stanica. Ako su specifikacije primjene premašene, postoji rizik od nezadovoljavajućeg specifičnog označavanja. Upotrijebite potrebnu količinu stanica i reagensa kako je opisano za odgovarajuću primjenu.

Potrebni CliniMACS materijali

Materijal	Kataloški broj	Količina
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS CD4 Reagent	276-01	1 bočica
CliniMACS CD8 Reagent	275-01	1 bočica
CliniMACS Tubing Set LS	162-01	1 komplet cijevi
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	Do 4 × 1000 mL vrećica[1]

1 Vidjeti Tablica 6.34 i Tablica 6.35. Prije uporabe puferu CliniMACS PBS/EDTA Buffer dodajte HSA do konačne koncentracije od 0,5% (m/v).

Tablica 6.33: CliniMACS materijali potrebni za iscrpljivanje stanica pozitivnih na CD4 i stanica pozitivnih na CD8

Potrebni dodatni materijali

- **Cell Preparation Bag:**
  jedna do dvije vrećice za prijenos od 600 mL, prikladne za centrifugiranje kao i jedna spojnica za mjesto uzorkovanja i jedan komplet za prijenos plazme, za uporabu tijekom postupka pripreme stanica
- **Plasma Waste Bag i Wash Waste Bag:**
  dvije vrećice za prijenos od 600 mL (ili dvije vrećice od 1000 mL), prikladne za centrifugiranje
- **Cell Collection Bag:**
  jedna do dvije vrećice za prijenos od 600 mL u kombinaciji s priključkom Luer/Spike Interconnector za spajanje vrećice Cell Collection Bag na komplet cijevi

  Ako su za razdvajanje potrebne dvije vrećice Cell Collection Bags, upotrijebite komplet za prijenos plazme da spojite obje vrećice (vidjeti Tablica 6.35).
- **Ako je potrebna zamjena vrećice Negative Fraction Bag, vrećice Buffer Waste Bag i/ili vrećice Priming Waste Bag:**
  do tri vrećice za prijenos od 1000 mL u kombinaciji s dva priključka Luer/Spike Interconnector za spajanje vrećica na komplet cijevi (vidjeti Tablica 6.35)

  Zamijenite vrećicu Priming Waste Bag koristeći sterilan priključak cijevi.
- **Ako je za razdvajanje potrebno više od jedne litre pufera:**
  jedan do dva kompleta za prijenos plazme za spajanje vrećica za pufer (vidjeti Tablica 6.35)
- jedan filtar predsustava
- forceps za zaključavanje
- štrcaljke (različitih veličina) i hipodermične igle veličine 20 gauge
- humani serumski albumin (HSA) koji treba dodati u pufer CliniMACS PBS/EDTA Buffer do konačne koncentracije od 0,5% (m/v)
- epruvete za uzorke

VAŽNO

Nakon unosa parametara uzorka (KORAK 2), CliniMACS Plus softver izračunava volumene koji će se prikupiti u vrećice Priming Waste Bag, Cell Collection Bag, Negative Fraction Bag i Buffer Waste Bag. Ako volumen izračunate tekućine premaši standardni volumen od 500 mL, neophodna je zamjena potrebnih vrećica u skladu sa sljedećim pregledom materijala.

Pregled potrebnih materijala

Priprema stanica	
Ukupan broj stanica (WBC)	≤40 × 10^9
Označene stanice	≤12 × 10^9 stanica pozitivnih na CD4 i ≤4 × 10^9 stanica pozitivnih na CD8
Broj bočica reagensa	1 bočica CliniMACS CD4 Reagent i 1 bočica CliniMACS CD8 Reagent
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 mL
Komplet za prijenos plazme	1

Tablica 6.34: Materijal potreban za pripremu stanica za stanice pozitivne na CD4 i stanice pozitivne na CD8

Razdvajanje			
Označene stanice	<5 × 10^9	5 – 13 × 10^9	>13 – 16 × 10^9
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 mL	2000 mL	3000 mL
Negative Fraction Bag	–	Zamijenite originalne vrećice kompleta cijevi s vrećicama za prijenos od 1000 mL	Zamijenite originalne vrećice kompleta cijevi s vrećicama za prijenos od 1000 mL
Buffer Waste Bag	–		
Priming Waste Bag	–	–	
Cell Collection Bag	1 × 600 mL	1 – 2 × 600 mL	2 × 600 mL
Luer/Spike Interconnector	1	3	3
Komplet za prijenos plazme	–	1 – 2	3

Tablica 6.35: 'Materijal potreban za iscrpljivanje stanica pozitivnih na CD4 i stanica pozitivnih na CD8

▶ Priprema vrećica

Odredite težinu prazne vrećice Cell Collection Bag i vrećice Cell Preparation Bag na način opisan u odjeljku 7.1.1 na stranici 119.

Magnetsko označavanje stanica

Pogledajte odjeljak 7.1 „KORAK 1: Priprema stanica i magnetsko označavanje" na stranici 119 za detaljan opis sljedećih koraka.

▶ Analiza početnog staničnog proizvoda

▶ Prijenos početnog staničnog proizvoda u vrećicu Cell Preparation Bag

▶ Razrjeđivanje početnog staničnog proizvoda

Dodajte pufer: težina pufera koji treba dodati = težina početnog staničnog proizvoda × 2

▶ Centrifugiranje

Centrifugirajte na 300 × g, bez kočnice, tijekom 15 minuta, na sobnoj temperaturi (sobna temperatura: od +19 do +25 °C [+66 do +77 °F])

▶ Prilagodba volumena: volumen označavanja 88 g (±5 g)

1. Uklonite supernatant da prilagodite uzorak koristeći se sljedećom jednadžbom: težina supernatanta koju treba ukloniti = težina razrijeđenog staničnog proizvoda – volumen označavanja
2. Resuspendirajte stanični pelet.

▶ Inkubacija s CliniMACS CD4 Reagent i CliniMACS CD8 Reagent

1. Dodajte 1 bočicu CliniMACS CD4 Reagent i 1 bočicu CliniMACS CD8 Reagent. Lagano izmiješajte sadržaj.
2. Inkubirajte na orbitalnom rotatoru (25 o/min.) tijekom 30 minuta na sobnoj temperaturi.

▶ Uklanjanje viška reagensa

1. Napunite vrećicu Cell Preparation Bag puferom.
2. Centrifugirajte (300 × g, bez kočnice, tijekom 15 minuta, na sobnoj temperaturi).
3. Uklonite supernatant koliko je god moguće. **Napomena:** uklonite najmanje 500 g supernatanta. Ako se supernatant ukloni u količini manjoj od 500 g, preporučuju se ukupno dva koraka ispiranja (umjesto samo jednog). U suprotnom uklanjanje nevezanog reagensa može biti nedostatno.
4. Resuspendirajte stanični pelet.
5. Podesite volumen umetanja uzorka na 100 g.

6.11.2 KORAK 2: Odabir programa razdvajanja

▶ Uključivanje sustava CliniMACS Plus Instrument

▶ Odabir programa razdvajanja DEPLETION 2.1

▶ Unos parametara uzorka

Vidjeti odjeljak 7.2.5 na stranici 143.

6.11.3 KORAK 3: Instalacija kompleta cijevi CliniMACS

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

Vidjeti odjeljak 7.3.1 na stranici 153.

6.11.4 KORAK 4: CliniMACS Plus separacija

- **Postupak razdvajanja**
- **Odspajanje vrećica i bilježenje procesnog koda**
- **Uklanjanje kompleta cijevi i isključivanje**
- **Analiza stanica**

Vidjeti odjeljak 7.4.4 na stranici 200.

6.12 Obogaćivanje stanica pozitivnih na CD1c (BDCA-1) – Dio 1: Iscrpljivanje stanica pozitivnih na CD19 i označavanje stanica pozitivnih na CD1c (BDCA-1)

CliniMACS Plus CD1c (BDCA-1)-Biotin System uključujući CliniMACS Plus Instrument, CliniMACS CD1c (BDCA-1)-Biotin, CliniMACS CD19 Reagent, CliniMACS Anti-Biotin Reagent, CliniMACS Tubing Set LS, CliniMACS Tubing Set i CliniMACS PBS/EDTA Buffer namijenjen je *in vitro* obogaćivanju ljudskih stanica pozitivnih na CD1c (BDCA-1) iz heterogenih hematoloških staničnih populacija nakon iscrpljivanja stanica pozitivnih na CD19.

6.12.1 KORAK 1: Priprema stanica i magnetsko označavanje

Prve potrebne radnje

Kapacitet primjene

Iscrpljivanje do 5×10^9 stanica pozitivnih na CD19 i označavanje do $0{,}2 \times 10^9$ stanica pozitivnih na CD1c (BDCA-1) od do 40×10^9 ukupnog broja stanica (WBC)

⚠ OPREZ

Rizik od nezadovoljavajuće učinkovitosti razdvajanja označenih stanica. Ako su specifikacije primjene premašene, postoji rizik od nezadovoljavajućeg specifičnog označavanja. Upotrijebite potrebnu količinu stanica i reagensa kako je opisano za odgovarajuću primjenu.

Potrebni CliniMACS materijali

Materijal	Kataloški broj	Količina
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS CD1c (BDCA-1)-Biotin	277-01	1 bočica
CliniMACS CD19 Reagent	179-01	1 bočica
CliniMACS Tubing Set LS	162-01	1 komplet cijevi
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	2 × 1000 mL vrećice[1]

1 Prije uporabe dodajte puferu HSA do konačne koncentracije od 0,5% (m/v).

Tablica 6.36: CliniMACS materijali potrebni za obogaćivanje stanica pozitivnih na CD1c (BDCA-1) (dio 1)

Dodatni potrebni materijali (za dio 1 i dio 2)

- **Cell Preparation Bag:**
  dvije vrećice za prijenos od 600 mL, prikladne za centrifugiranje kao i dvije spojnice za mjesto uzorkovanja i tri kompleta za prijenos plazme, za uporabu tijekom postupaka pripreme stanica
- **Plasma Waste Bags i Wash Waste Bags:**
  pet vrećica za prijenos od 600 mL, prikladnih za centrifugiranje
- **Cell Collection Bag (dio 1):**
  jedna vrećica za prijenos od 600 mL prikladna za centrifugiranje u kombinaciji s priključkom Luer/Spike Interconnector za spajanje vrećice Cell Collection Bag na komplet cijevi
- **Cell Collection Bag (dio 2):**
  jedna vrećica za prijenos od 150 mL prikladna za centrifugiranje u kombinaciji s priključkom Luer/Spike Interconnector za spajanje vrećice za prijenos na komplet cijevi
- dva filtra predsustava
- forceps za zaključavanje
- štrcaljke (različitih veličina) i hipodermične igle veličine 20 gauge
- humani serumski albumin (HSA) koji treba dodati u pufer CliniMACS PBS/EDTA Buffer do konačne koncentracije od 0,5% (m/v)
- epruvete za uzorke

Magnetsko označavanje stanica (dio 1)

Pogledajte odjeljak 7.1 „KORAK 1: Priprema stanica i magnetsko označavanje" na stranici 119 za detaljan opis sljedećih koraka.

▶ Analiza početnog staničnog proizvoda

▶ Prijenos početnog staničnog proizvoda u vrećicu Cell Preparation Bag

▶ Razrjeđivanje početnog staničnog proizvoda

Dodajte pufer: težina pufera koji treba dodati = težina početnog staničnog proizvoda × 2

▶ Centrifugiranje

Centrifugirajte na 200 × g, bez kočnice, tijekom 15 minuta, na sobnoj temperaturi (sobna temperatura: od +19 do +25 °C [+66 do +77 °F]).

▶ **Prilagodba volumena: volumen označavanja 90 g (±5 g)**

1. Pažljivo resuspendirajte stanični pelet nakon uklanjanja supernatanta.
2. Prilagodite težinu vrećice Cell Preparation Bag (CPB) za dio 1 dodavanjem pufera uz primjenu sljedeće jednadžbe: ciljna težina napunjene vrećice CPB za dio 1 = 90 g + težina prazne vrećice CPB
3. Resuspendirajte stanični pelet.

▶ **Inkubacija s CliniMACS CD19 Reagent i CliniMACS CD1c (BDCA-1)-Biotin**

1. Dodajte 1 bočicu CliniMACS CD19 Reagent i 1 bočicu CliniMACS CD1c (BDCA-1)-Biotin. Lagano izmiješajte sadržaj.
2. Inkubirajte na orbitalnom rotatoru (25 o/min.) tijekom 30 minuta na sobnoj temperaturi.

▶ **Uklanjanje viška reagensa**

1. Napunite vrećicu Cell Preparation Bag za dio 1 puferom.
2. Centrifugirajte (300 × g, bez kočnice, tijekom 15 minuta, na sobnoj temperaturi).
3. Uklonite supernatant koliko je god moguće. **Napomena:** uklonite najmanje 500 g supernatanta. Ako se supernatant ukloni u količini manjoj od 500 g, preporučuju se ukupno dva koraka ispiranja (umjesto samo jednog). U suprotnom uklanjanje nevezanog reagensa može biti nedostatno.
4. Resuspendirajte stanični pelet.
5. Podesite volumen umetanja uzorka na 100 g.

6.12.2 KORAK 2: Odabir programa razdvajanja

▶ **Uključivanje sustava CliniMACS Plus Instrument**

▶ **Odabir programa razdvajanja DEPLETION 2.1**

▶ **Unos parametara uzorka**

Vidjeti odjeljak 7.2.5 na stranici 143.

6.12.3 KORAK 3: Instalacija kompleta cijevi CliniMACS

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

Vidjeti odjeljak 7.3.1 na stranici 153.

6.12.4 KORAK 4: CliniMACS Plus separacija

- **Postupak razdvajanja**
- **Odspajanje vrećica i bilježenje procesnog koda**
- **Uklanjanje kompleta cijevi i isključivanje**
- **Analiza stanica**

Vidjeti odjeljak 7.4.4 na stranici 200.

6.13 Obogaćivanje stanica pozitivnih na CD1c (BDCA-1) – Dio 2: Flexible Labeling System

CliniMACS Plus CD1c (BDCA-1)-Biotin System uključujući CliniMACS Plus Instrument, CliniMACS CD1c (BDCA-1)-Biotin, CliniMACS CD19 Reagent, CliniMACS Anti-Biotin Reagent, CliniMACS Tubing Set LS, CliniMACS Tubing Set i CliniMACS PBS/EDTA Buffer namijenjen je *in vitro* obogaćivanju ljudskih stanica pozitivnih na CD1c (BDCA-1) iz heterogenih hematoloških staničnih populacija nakon iscrpljivanja stanica pozitivnih na CD19.

6.13.1 KORAK 1: Priprema stanica i magnetsko označavanje

Prve potrebne radnje

Kapacitet primjene

Do 0,2 × 10^9 stanica pozitivnih na CD1c (BDCA-1) od do 40 × 10^9 ukupnog broja stanica (WBC)

⚠ OPREZ

Rizik od nezadovoljavajuće učinkovitosti razdvajanja označenih stanica. Ako su specifikacije primjene premašene, postoji rizik od nezadovoljavajućeg specifičnog označavanja. Upotrijebite potrebnu količinu stanica i reagensa kako je opisano za odgovarajuću primjenu.

Potrebni CliniMACS materijali

Materijal	Kataloški broj	Količina
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS Anti-Biotin Reagent	173-01	1 bočica
CliniMACS Tubing Set	161-01	1 komplet cijevi
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	3 × 1000 mL vrećice[1]

1 Prije uporabe dodajte puferu HSA do konačne koncentracije od 0,5% (m/v).

Tablica 6.37: CliniMACS materijali potrebni za obogaćivanje stanica pozitivnih na CD1c (BDCA-1) (dio 2)

Potrebni dodatni materijali

Pogledajte dio 1 za dodatne potrebne materijale.

▶ Priprema vrećica

Odredite težinu prazne vrećice Cell Collection Bag i vrećice Cell Preparation Bag na način opisan u odjeljku 7.1.1 na stranici 119.

Magnetsko označavanje stanica (iscrpljeni stanični proizvod CD19 (dio 2))

Pogledajte odjeljak 7.1 „KORAK 1: Priprema stanica i magnetsko označavanje" na stranici 119 za detaljan opis sljedećih koraka.

▶ Prijenos iscrpljenog početnog staničnog proizvoda CD19 u vrećicu Cell Preparation Bag za dio 2

▶ Razrjeđivanje iscrpljenog početnog staničnog proizvoda CD19

Dodajte pufer: težina pufera koji treba dodati = 600 g – težina iscrpljenog početnog staničnog proizvoda CD19

▶ Centrifugiranje

Centrifugirajte na 300 × g, bez kočnice, tijekom 15 minuta, na sobnoj temperaturi (sobna temperatura: od +19 do +25 °C [+66 do +77 °F]).

▶ Prilagodba volumena: volumen označavanja 95 g (±5 g)

1. Uklonite supernatant da prilagodite uzorak koristeći se sljedećom jednadžbom: težina supernatanta koju treba ukloniti = težina razrijeđenog staničnog proizvoda – volumen označavanja
2. Resuspendirajte stanični pelet.

▶ **Inkubacija s CliniMACS Anti-Biotin Reagent**

1. Dodajte 1 bočicu CliniMACS Anti-Biotin Reagent. Lagano izmiješajte sadržaj.
2. Inkubirajte na orbitalnom rotatoru (25 o/min.) tijekom 30 minuta na sobnoj temperaturi.

▶ **Uklanjanje viška reagensa**

1. Napunite vrećicu Cell Preparation Bag za dio 2 puferom.
2. Centrifugirajte (300 × g, bez kočnice, tijekom 15 minuta, na sobnoj temperaturi).
3. Uklonite supernatant koliko je god moguće.
4. Resuspendirajte stanični pelet.
5. Napunite vrećicu Cell Preparation Bag za dio 2 puferom.
6. Centrifugirajte (300 × g, bez kočnice, tijekom 15 minuta, na sobnoj temperaturi).
7. Uklonite supernatant koliko je god moguće.
8. Resuspendirajte stanični pelet.
9. Podesite volumen umetanja uzorka na 100 g.

6.13.2 KORAK 2: Odabir programa razdvajanja

▶ **Uključivanje sustava CliniMACS Plus Instrument**

▶ **Odabir programa razdvajanja ENRICHMENT 3.2**

Vidjeti odjeljak 7.2.4 na stranici 141.

6.13.3 KORAK 3: Instalacija kompleta cijevi CliniMACS

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

Vidjeti odjeljak 7.3.1 na stranici 153.

6.13.4 KORAK 4: CliniMACS Plus separacija

▶ **Postupak razdvajanja**

▶ **Odspajanje vrećica i bilježenje procesnog koda**

▶ **Uklanjanje kompleta cijevi i isključivanje**

▶ **Analiza stanica**

Vidjeti odjeljak 7.4.3 na stranici 196.

6.14 Obogaćivanje stanica pozitivnih na CD304 (BDCA-4)

CliniMACS Plus CD304 (BDCA-4) System uključujući CliniMACS Plus Instrument, CliniMACS CD304 (BDCA-4) Reagent, CliniMACS Tubing Set i CliniMACS PBS/EDTA Buffer namijenjen je *in vitro* obogaćivanju ljudskih stanica pozitivnih na CD304 (BDCA-4) iz heterogenih hematoloških staničnih populacija.

6.14.1 KORAK 1: Priprema stanica i magnetsko označavanje

Prve potrebne radnje

Kapacitet primjene

Do $0{,}2 \times 10^9$ stanica pozitivnih na CD304 (BDCA-4) od do 40×10^9 ukupnog broja stanica (WBC)

⚠ OPREZ

Rizik od nezadovoljavajuće učinkovitosti razdvajanja označenih stanica. Ako su specifikacije primjene premašene, postoji rizik od nezadovoljavajućeg specifičnog označavanja. Upotrijebite potrebnu količinu stanica i reagensa kako je opisano za odgovarajuću primjenu.

Potrebni CliniMACS materijali

Materijal	Kataloški broj	Količina
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS CD304 (BDCA-4) Reagent	278-01	1 bočica
CliniMACS Tubing Set	161-01	1 komplet cijevi
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	4 × 1000 mL vrećice[1]

1 Prije uporabe puferu CliniMACS PBS/EDTA Buffer dodajte HSA do konačne koncentracije od 0,5% (m/v).

Tablica 6.38: CliniMACS materijali potrebni za obogaćivanje stanica pozitivnih na CD304 (BDCA-4)

Potrebni dodatni materijali

- **Cell Preparation Bag:**

jedna vrećica za prijenos od 600 mL, prikladna za centrifugiranje kao i jedna spojnica za mjesto uzorkovanja i tri kompleta za prijenos plazme, za uporabu tijekom postupaka pripreme stanica

- **Plasma Waste Bags i Wash Waste Bags:**
  pet vrećica za prijenos od 600 mL, prikladnih za centrifugiranje
- **Cell Collection Bag:**
  jedna vrećica za prijenos od 150 mL u kombinaciji s priključkom Luer/Spike Interconnector za spajanje vrećice Cell Collection Bag na komplet cijevi
- jedan filtar predsustava
- forceps za zaključavanje
- štrcaljke (različitih veličina) i hipodermične igle veličine 20 gauge
- humani serumski albumin (HSA) koji treba dodati u pufer CliniMACS PBS/EDTA Buffer do konačne koncentracije od 0,5% (m/v)
- epruvete za uzorke

▶ Priprema vrećica

Odredite težinu prazne vrećice Cell Collection Bag i vrećice Cell Preparation Bag na način opisan u odjeljku 7.1.1 na stranici 119.

Magnetsko označavanje stanica

Pogledajte odjeljak 7.1 „KORAK 1: Priprema stanica i magnetsko označavanje" na stranici 119 za detaljan opis sljedećih koraka.

▶ Analiza početnog staničnog proizvoda

▶ Prijenos početnog staničnog proizvoda u vrećicu Cell Preparation Bag

▶ Razrjeđivanje iscrpljenog početnog staničnog proizvoda

Dodajte pufer: težina pufera koji treba dodati = 600 g – težina početnog staničnog proizvoda

▶ Centrifugiranje

Centrifugirajte na 200 × g, bez kočnice, tijekom 15 minuta, na sobnoj temperaturi (sobna temperatura: od +19 do +25 °C [+66 do +77 °F]).

▶ Dvaput ponovite korake „Razrjeđivanje početnog staničnog proizvoda" i „Centrifugiranje"

1. Napunite jednu vrećicu za prijenos do 600 g
2. Centrifugirajte na 300 × g, bez kočnice, tijekom 15 minuta, na sobnoj temperaturi (sobna temperatura: od +19 do +25 °C [+66 do +77 °F]).
3. Uklonite supernatant.

▶ **Prilagodba volumena: volumen označavanja 95 g (±5 g)**

1. U potpunosti uklonite supernatant pazeći da ne resuspendirate stanični pelet.
2. Pažljivo resuspendirajte stanični pelet nakon uklanjanja supernatanta.
3. Podesite težinu vrećice Cell Preparation Bag (CPB) dodavanjem pufera uz primjenu sljedeće jednadžbe: ciljna težina napunjene vrećice CPB = 95 g + težina prazne vrećice CPB.
4. Resuspendirajte stanični pelet.

▶ **Inkubacija s reagensom CliniMACS CD304 (BDCA-4) Reagent**

1. Dodajte 1 bočicu CliniMACS CD304 (BDCA-4) Reagent. Lagano izmiješajte sadržaj.
2. Inkubirajte na orbitalnom rotatoru (25 o/min.) tijekom 30 minuta na sobnoj temperaturi.

▶ **Uklanjanje viška reagensa**

1. Napunite vrećicu Cell Preparation Bag puferom.
2. Centrifugirajte (300 × g, bez kočnice, tijekom 15 minuta, na sobnoj temperaturi).
3. Uklonite supernatant koliko je god moguće.
4. Resuspendirajte stanični pelet.
5. Podesite volumen umetanja uzorka na 100 g.

6.14.2 KORAK 2: Odabir programa razdvajanja

▶ **Uključivanje sustava CliniMACS Plus Instrument**

▶ **Odabir programa razdvajanja ENRICHMENT 3.2**

Vidjeti odjeljak 7.2.4 na stranici 141.

6.14.3 KORAK 3: Instalacija kompleta cijevi CliniMACS

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

Vidjeti odjeljak 7.3.1 na stranici 153.

6.14.4 KORAK 4: CliniMACS Plus separacija

- **Postupak razdvajanja**
- **Odspajanje vrećica i bilježenje procesnog koda**
- **Uklanjanje kompleta cijevi i isključivanje**
- **Analiza stanica**

Vidjeti odjeljak 7.4.3 na stranici 196.

6.15 Iscrpljivanje stanica pozitivnih na TCRα/β

CliniMACS Plus TCRα/β-Biotin System uključujući CliniMACS Plus Instrument, CliniMACS TCRα/β-Biotin, CliniMACS Anti-Biotin Reagent, CliniMACS Depletion Tubing Set i CliniMACS PBS/EDTA Buffer namijenjen je *in vitro* iscrpljivanju ljudskih stanica pozitivnih na TCRα/β iz heterogenih hematoloških staničnih populacija.

6.15.1 KORAK 1: Priprema stanica i magnetsko označavanje

Prve potrebne radnje

Kapacitet primjene

Do 24×10^9 stanica pozitivnih na TCRα/β od do 60×10^9 ukupnog broja stanica (WBC)

⚠ OPREZ

Rizik od nezadovoljavajuće učinkovitosti razdvajanja označenih stanica. Ako su specifikacije primjene premašene, postoji rizik od nezadovoljavajućeg specifičnog označavanja. Upotrijebite potrebnu količinu stanica i reagensa kako je opisano za odgovarajuću primjenu.

Potrebni CliniMACS materijali

Materijal	Kataloški broj	Količina
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS TCRα/β-Biotin	701-48	1 bočica
CliniMACS Anti-Biotin Reagent	173-01	2 bočice
CliniMACS Depletion Tubing Set	261-01	1 komplet cijevi
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	Do 4 × 1000 mL vrećica[1]

1 Prije uporabe puferu CliniMACS PBS/EDTA Buffer dodajte HSA do konačne koncentracije od 0,5% (m/v).

Tablica 6.39: CliniMACS materijali potrebni za iscrpljivanje stanica pozitivnih na TCRα/β

Potrebni dodatni materijali

- **Cell Preparation Bag:**
  jedna do dvije vrećice za prijenos od 600 mL, prikladne za centrifugiranje kao i jedna spojnica za mjesto uzorkovanja i dva kompleta za prijenos plazme, za uporabu tijekom postupka pripreme stanica
- **Plasma Waste Bags i Wash Waste Bags:**
  četiri vrećice za prijenos od 600 mL (ili 1000 mL), prikladne za centrifugiranje
- **Cell Collection Bag:**
  Jedna je vrećica Cell Collection Bag od 600 mL već priključena na CliniMACS Depletion Tubing Set.
- jedan filtar predsustava
- forceps za zaključavanje
- štrcaljke (različitih veličina) i hipodermične igle veličine 20 gauge
- humani serumski albumin (HSA) koji treba dodati u pufer CliniMACS PBS/EDTA Buffer do konačne koncentracije od 0,5% (m/v)
- epruvete za uzorke

▶ Priprema vrećica

Odredite težinu prazne vrećice Cell Collection Bag i vrećice Cell Preparation Bag na način opisan u odjeljku 7.1.1 na stranici 119.

Magnetsko označavanje stanica

Pogledajte odjeljak 7.1 „KORAK 1: Priprema stanica i magnetsko označavanje" na stranici 119 za detaljan opis sljedećih koraka.

▶ Analiza početnog staničnog proizvoda

Odredite postotak/ukupni broj svih stanica označenih s TCRα/β (uključujući nespecifično vezanje TCRα/β, ne samo pravih stanica pozitivnih na TCRα/β). Uzmite taj broj u obzir za specifikacije primjene i unos parametara uzorka (vidjeti KORAK 2).

▶ Prijenos početnog staničnog proizvoda u vrećicu Cell Preparation Bag

▶ Razrjeđivanje početnog staničnog proizvoda

Dodajte pufer: težina pufera koji treba dodati = težina početnog staničnog proizvoda × 2

▶ Centrifugiranje

1. Centrifugirajte na 200 × g, bez kočnice, tijekom 15 minuta, na sobnoj temperaturi (sobna temperatura: od +19 do +25 °C [+66 do +77 °F]).
2. Uklonite supernatant.

Prilagodba volumena: volumen označavanja 95 g (±5 g)

1. U potpunosti uklonite supernatant pazeći da ne resuspendirate stanični pelet.
2. Pažljivo resuspendirajte stanični pelet nakon uklanjanja supernatanta.
3. Podesite težinu vrećice Cell Preparation Bag (CPB) dodavanjem pufera uz primjenu sljedeće jednadžbe: ciljna težina napunjene vrećice CPB = 95 g + težina prazne vrećice CPB
4. Resuspendirajte stanični pelet.

Označavanje stanica: inkubacija s CliniMACS TCRα/β-Biotin

1. Dodajte 1 bočicu CliniMACS TCRα/β-Biotin. Lagano izmiješajte sadržaj.
2. Inkubirajte na orbitalnom rotatoru (25 o/min.) tijekom 30 minuta na sobnoj temperaturi.

Uklanjanje viška konjugata: ponovite ovaj korak

1. Napunite vrećicu Cell Preparation Bag puferom.
2. Centrifugirajte (300 × g, bez kočnice, tijekom 15 minuta, na sobnoj temperaturi).
3. Uklonite supernatant koliko je god moguće.
4. Resuspendirajte stanični pelet i podesite težinu na 190 g nakon drugog ispiranja.

Magnetsko označavanje stanica: inkubacija s CliniMACS Anti-Biotin Reagent

1. Dodajte 2 bočice CliniMACS Anti-Biotin Reagent. Lagano izmiješajte sadržaj.
2. Inkubirajte na orbitalnom rotatoru (25 o/min.) tijekom 30 minuta na sobnoj temperaturi.

Uklanjanje viška reagensa

1. Napunite vrećicu Cell Preparation Bag puferom.
2. Centrifugirajte (300 × g, bez kočnice, tijekom 15 minuta, na sobnoj temperaturi).
3. Uklonite supernatant koliko je god moguće. **Napomena:** uklonite najmanje 500 g supernatanta. Ako se supernatant ukloni u količini manjoj od 500 g, preporučuju se ukupno dva koraka ispiranja (umjesto samo jednog). U suprotnom uklanjanje nevezanog reagensa može biti nedostatno.
4. Resuspendirajte stanični pelet.
5. Podesite volumen umetanja uzorka na 150 g. Preporučuje se maksimalna koncentracija WBC od 0,4 × 10^9 WBC/mL.

6.15.2 KORAK 2: Odabir programa razdvajanja

- **Uključivanje sustava CliniMACS Plus Instrument**
- **Odabir programa razdvajanja DEPLETION 3.1**
- **Unos parametara uzorka**

Vidjeti odjeljak 7.2.6 na stranici 148.

6.15.3 KORAK 3: Instalacija kompleta cijevi CliniMACS

- **CliniMACS Depletion Tubing Set**

Vidjeti odjeljak 7.3.3 na stranici 173.

6.15.4 KORAK 4: CliniMACS Plus separacija

- **Postupak razdvajanja**
- **Odspajanje vrećica i bilježenje procesnog koda**
- **Uklanjanje kompleta cijevi i isključivanje**
- **Analiza stanica**

Vidjeti odjeljak 7.4.5 na stranici 204.

6.16 Iscrpljivanje stanica pozitivnih na CD45RA

CliniMACS Plus CD45RA System uključujući CliniMACS Plus Instrument, CliniMACS CD45RA Reagent, CliniMACS Depletion Tubing Set i CliniMACS PBS/EDTA Buffer namijenjen je *in vitro* iscrpljivanju ljudskih stanica pozitivnih na CD45RA iz heterogenih hematoloških staničnih populacija.

6.16.1 KORAK 1: Priprema stanica i magnetsko označavanje

Prve potrebne radnje

Kapacitet primjene

Do 20×10^9 stanica pozitivnih na CD45RA od do 50×10^9 ukupnog broja stanica (WBC)

⚠ OPREZ

Rizik od nezadovoljavajuće učinkovitosti razdvajanja označenih stanica. Ako su specifikacije primjene premašene, postoji rizik od nezadovoljavajućeg specifičnog označavanja. Upotrijebite potrebnu količinu stanica i reagensa kako je opisano za odgovarajuću primjenu.

Potrebni CliniMACS materijali

Materijal	Kataloški broj	Količina
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS CD45RA Reagent	701-46	1 bočica
CliniMACS Depletion Tubing Set	261-01	1 komplet cijevi
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	3 × 1000 mL vrećice[1]

1 Prije uporabe puferu CliniMACS PBS/EDTA Buffer dodajte HSA do konačne koncentracije od 0,5% (m/v).

Tablica 6.40: CliniMACS materijali potrebni za iscrpljivanje stanica pozitivnih na CD45RA

Potrebni dodatni materijali

- **Cell Preparation Bags:**
  jedna do dvije vrećice za prijenos od 600 mL, prikladne za centrifugiranje kao i jedna spojnica za mjesto uzorkovanja i dva kompleta za prijenos plazme, za uporabu tijekom postupka pripreme stanica
- **Plasma Waste Bags i Wash Waste Bags:**
  dvije vrećice za prijenos od 600 mL, prikladne za centrifugiranje
- **Cell Collection Bag:**
  Jedna je vrećica Cell Collection Bag od 600 mL već priključena na CliniMACS Depletion Tubing Set.
- jedan filtar predsustava

- forceps za zaključavanje
- štrcaljke (različitih veličina) i hipodermične igle veličine 20 gauge
- humani serumski albumin (HSA) koji treba dodati u pufer CliniMACS PBS/EDTA Buffer do konačne koncentracije od 0,5% (m/v)
- epruvete za uzorke

VAŽNO

Alternativni izvor početnih stanica može biti neciljana frakcija stanica CliniMACS Plus CD34 separacije. Uporaba reagensa CliniMACS CD45RA Reagent preporučuje se samo za početni stanični proizvod koji sadrži stanice pozitivne na CD45RA unutar normalnog frekvencijskog raspona (do 80%). Više su frekvencije primijećene u nekoliko davatelja gdje je CD45RA izražen na gotovo svim PBMC zbog rijetke mutacije unutar CD45 gena. U takvim slučajevima učinkovitost iscrpljivanja i/ili oporavka može postati neadekvatna.

▶ Priprema vrećica

Odredite težinu prazne vrećice Cell Collection Bag i vrećice Cell Preparation Bag na način opisan u odjeljku 7.1.1 na stranici 119.

Magnetsko označavanje stanica

Pogledajte odjeljak 7.1 „KORAK 1: Priprema stanica i magnetsko označavanje" na stranici 119 za detaljan opis sljedećih koraka.

▶ Analiza početnog staničnog proizvoda

Odredite postotak/ukupni broj svih stanica označenih s CD45RA (uključujući nespecifično vezanje CD45RA, ne samo pravih stanica pozitivnih na CD45RA). Uzmite taj broj u obzir za specifikacije primjene i unos parametara uzorka (vidjeti KORAK 2).

▶ Prijenos početnog staničnog proizvoda u vrećicu Cell Preparation Bag

▶ Razrjeđivanje iscrpljenog početnog staničnog proizvoda

Dodajte pufer: težina pufera koji treba dodati = težina početnog staničnog proizvoda × 2

▶ Centrifugiranje

Centrifugirajte na 200 × g, bez kočnice, tijekom 15 minuta, na sobnoj temperaturi (sobna temperatura: od +19 do +25 °C [+66 do +77 °F]).

Ako se neciljana frakcija stanica CliniMACS CD34 separacije upotrebljava kao alternativni izvor početnih stanica, korak razrjeđivanja može se preskočiti. Nastavite s korakom centrifugiranja i centrifugirajte stanice na 300 × g (bez kočnice) tijekom 15 minuta na sobnoj temperaturi.

▶ Prilagodba volumena: volumen označavanja 95 g (±5 g)

1. U potpunosti uklonite supernatant pazeći da ne resuspendirate stanični pelet.
2. Pažljivo resuspendirajte stanični pelet nakon uklanjanja supernatanta.
3. Podesite težinu vrećice Cell Preparation Bag (CPB) dodavanjem pufera uz primjenu sljedeće jednadžbe: ciljna težina napunjene vrećice CPB = 95 g + težina prazne vrećice CPB
4. Resuspendirajte stanični pelet.

▶ Inkubacija s CliniMACS CD45RA Reagent

1. Dodajte 1 bočicu CliniMACS CD45RA Reagent. Lagano izmiješajte sadržaj.
2. Inkubirajte na orbitalnom rotatoru (25 o/min.) tijekom 30 minuta na sobnoj temperaturi.

▶ Uklanjanje viška reagensa

1. Napunite vrećicu Cell Preparation Bag puferom.
2. Centrifugirajte (300 × g, bez kočnice, tijekom 15 minuta, na sobnoj temperaturi).
3. Uklonite supernatant koliko je god moguće. **Napomena:** uklonite najmanje 500 g supernatanta. Ako se supernatant ukloni u količini manjoj od 500 g, preporučuju se ukupno dva koraka ispiranja (umjesto samo jednog). U suprotnom uklanjanje nevezanog reagensa može biti nedostatno.
4. Resuspendirajte stanični pelet.
5. Prilagodite volumen umetanja uzorka. Izračunajte težinu pufera potrebnu za podešavanje težine stanične suspenzije na približno 125 g. Koncentracija stanica ne smije premašiti 0,4 × 10^9 WBC/mL: težina pufera koji treba dodati (g) = 125 g – težina staničnog proizvoda nakon ispiranja (g)

6.16.2 KORAK 2: Odabir programa razdvajanja

▶ Uključivanje sustava CliniMACS Plus Instrument

▶ Odabir programa razdvajanja DEPLETION 3.1

▶ Unos parametara uzorka

Vidjeti odjeljak 7.2.6 na stranici 148.

6.16.3 KORAK 3: Instalacija kompleta cijevi CliniMACS

- **CliniMACS Depletion Tubing Set**

Vidjeti odjeljak 7.3.3 na stranici 173.

6.16.4 KORAK 4: CliniMACS Plus separacija

- **Postupak razdvajanja**
- **Odspajanje vrećica i bilježenje procesnog koda**
- **Uklanjanje kompleta cijevi i isključivanje**
- **Analiza stanica**

Vidjeti odjeljak 7.4.5 na stranici 204.

6.17 Obogaćivanje ljudskih stanica koje izlučuju IFN-gamma s CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma)

CliniMACS Plus CCS (IFN-gamma) System uključujući CliniMACS Plus Instrument, CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma), CliniMACS Tubing Set i CliniMACS PBS/EDTA Buffer namijenjen je *in vitro* obogaćivanju ljudskih stanica koje izlučuju IFN-gamma iz heterogenih hematoloških staničnih populacija.

6.17.1 KORAK 1: Priprema stanica i magnetsko označavanje

Prve potrebne radnje

Kapacitet primjene

Stanice koje izlučuju IFN-gamma od do 1×10^9 ukupnog broja stanica (WBC)

⚠ OPREZ

Rizik od nezadovoljavajuće učinkovitosti razdvajanja označenih stanica. Ako su specifikacije primjene premašene, postoji rizik od nezadovoljavajućeg specifičnog označavanja. Upotrijebite potrebnu količinu stanica i reagensa kako je opisano za odgovarajuću primjenu.

Potrebni CliniMACS materijali

Materijal	Kataloški broj	Količina
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma)	279-01	1 komplet
CliniMACS Tubing Set	161-01	1 komplet cijevi
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	3 × 1000 mL vrećice[1]

1 Prije uporabe puferu CliniMACS PBS/EDTA Buffer dodajte HSA do konačne koncentracije od 0,5% (m/v).

Tablica 6.41: CliniMACS materijali potrebni za obogaćivanje ljudskih stanica koje izlučuju IFN-gamma

VAŽNO

Pohranite pufer za pripremu stanica na hladnom mjestu na temperaturi od +2 do +8 °C (+36 do +46 °F). Niža ili viša ambijentalna temperatura za posljedicu može imati smanjenu čistoću i niži broj ciljnih stanica.

Potrebni dodatni materijali

- **Cell Preparation Bags:**
  dvije vrećice za prijenos od 600 mL, prikladne za centrifugiranje kao i dvije spojnice za mjesto uzorkovanja i dva kompleta za prijenos plazme, za uporabu tijekom postupaka pripreme stanica
- **Plasma Waste Bags i Wash Waste Bags:**
  devet vrećica za prijenos od 600 mL, prikladnih za centrifugiranje
- **Vrećica za medij:**
  osam vrećica za prijenos od 600 mL, prikladnih za centrifugiranje
- **Cell Collection Bag (dio 2):**
  jedna vrećica za prijenos od 150 mL prikladna za centrifugiranje u kombinaciji s priključkom Luer/Spike Interconnector za spajanje vrećice za prijenos na komplet cijevi
- jedna plinopropusna vrećica za staničnu kulturu od 100 mL
- jedan filtar predsustava
- forceps za zaključavanje
- štrcaljke (različitih veličina) i hipodermične igle veličine 20 gauge
- humani serumski albumin (HSA) koji treba dodati u pufer CliniMACS PBS/EDTA Buffer do konačne koncentracije od 0,5% (m/v)
- epruvete za uzorke
- 120 mL AB seruma ili alternativno autolognog seruma kao dodatak korištenom mediju
- 1000 mL medija stanične kulture (RPMI 1640), +4 °C (+39 °F)
- 1100 mL medija stanične kulture (RPMI 1640), +37 °C (+99 °F) kojem je dodano 10% (v/v) AB seruma ili, alternativno, autolognog seruma

- 500 mL medija stanične kulture (RPMI 1640), +4 °C (+39 °F) kojem je dodano 2% (v/v) AB seruma ili, alternativno, autolognog seruma

▶ Potrebna oprema

Pronađite informacije vezane uz opremu potrebnu za CliniMACS Plus separaciju u odjeljku 4.7.

Dodatna oprema potrebna za primjenu uz uporabu CliniMACS Plus CCS (IFN-gamma) System:

- posuda za kulturu s 24 odjeljka
- MiniMACS Separation Unit
- MS Columns
- filtar za pred-razdvajanje (samo za MS Columns)
- MACSmix rotator epruveta

▶ Priprema vrećica

Odredite težinu prazne vrećice Cell Collection Bag i vrećice Cell Preparation Bag na način opisan u odjeljku 7.1.1 na stranici 119.

Napomena: prethodno rashladite centrifugu do +4 °C (+39 °F). Nakon faze izlučivanja treća je vrećica Cell Preparation Bag potrebna za rekombiniranje stanične suspenzije. Dakle, označite jednu od četiri vrećice za prijenos od 600 mL (pripremljene sa 125 mL medija (RPMI) kojem je dodan 10% AB serum) kao **Cell Preparation br. 3 (razdvajanje)**.

Priprema početnog staničnog proizvoda

U sljedećim je odjeljcima opisan preporučeni postupak u vrećici za pripremu početnog staničnog proizvoda uz primjenu sterilnog priključka cijevi.

- Rukovatelj mora biti upoznat s radom i uporabom sterilnog priključka cijevi.
- Prije započinjanja označavanja stanica i postupka razdvajanja uvjerite se da su sav potrebni materijal i oprema na raspolaganju.

Prijenos početnog staničnog proizvoda u vrećicu Cell Preparation Bag br. 1

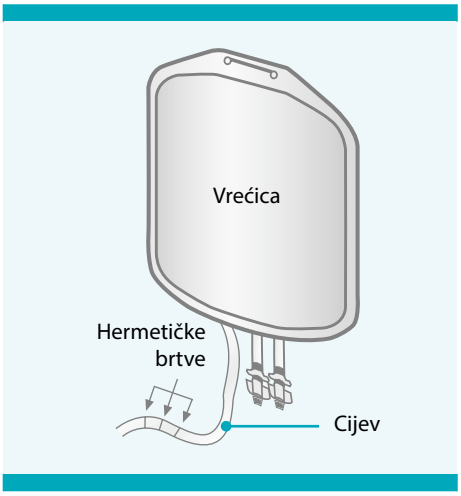
1. Pribilježite datum i vrijeme početka prije započinjanja pripreme početnog staničnog proizvoda.
2. Odredite volumen originalnog početnog staničnog proizvoda tako što ćete pretpostaviti da je 1 mL originalnog proizvoda jednako 1 g (1 g ≙ 1 mL).
3. Držeći vrećicu u kojoj se nalazi početni stanični proizvod s obje ruke, temeljito izmiješajte sadržaj blagim kružnim pokretima.

4. Koristeći sterilni priključak cijevi spojite vrećicu Cell Preparation Bag br. 1 na vrećicu u kojoj se nalazi početni stanični proizvod.

5. Otvorite forceps za zaključavanje da prenesete odgovarajuću težinu početnog staničnog proizvoda (sadrži maksimalno 1×10^9 stanica, ovisno o ranije utvrđenoj učestalosti leukocita) u vrećicu Cell Preparation Bag br. 1. Vizualno prekontrolirajte (praćenjem ljestvice) je li prenesena odgovarajuća težina. Zatvorite forceps za zaključavanje pored vrećice Cell Preparation Bag.

6. Zabrtvite cijev i odvojite vrećice ostavljajući najmanje 15 cm cijevi na vrećici Cell Preparation Bag br. 1 radi daljnjih spajanja (vidjeti Slika 6.1). Upotrijebite uređaj za toplinsko brtvljenje kako biste na cijevi napravili tri brtve jednu pored druge. Uvjerite se da su brtve u potpunosti zatvorene. Prerežite na središnjoj brtvi. Zadržite vrećicu u kojoj se nalazio početni stanični proizvod dok se razdvajanje i završna analiza svih stanica ne dovrše.

7. Tarirajte vagu. Stavite napunjenu vrećicu Cell Preparation Bag br. 1 na vagu, cijev neka bude na stolu. Zabilježite težinu napunjene vrećice Cell Preparation Bag br. 1.



Slika 6.1: Brtvljenje vrećice

8. Odredite težinu početnog staničnog proizvoda tako što ćete oduzeti težinu prazne vrećice Cell Preparation Bag br. 1 od težine vrećice Cell Preparation Bag br. 1 napunjene originalnim početnim staničnim proizvodom. Zapišite izračunatu težinu.

težina početnog staničnog proizvoda (g)	=	težina napunjene vrećice Cell Preparation Bag br. 1 (g)	–	težina prazne vrećice Cell Preparation Bag br. 1 (g)

Razrjeđivanje početnog staničnog proizvoda

Početni stanični proizvod mora se razrijediti s medijem za kulturu. Razrijedite proizvod s hladnim medijem (od +2 do +8 °C [+36 do +46 °F]) do ukupnog volumena od 500 mL. Izračunajte težinu medija koju treba dodati uz primjenu sljedeće jednadžbe i pribilježite.

težina medija koju treba dodati (g)	=	500 g	–	težina razrijeđenog početnog staničnog proizvoda (g)

1. Uzmite jednu od vrećica za medij i spojite je na vrećicu Cell Preparation Bag br. 1 koristeći sterilan priključak cijevi.

2. Stavite vrećicu Cell Preparation Bag br. 1 na vagu i tarirajte vagu. Objesite vrećicu za medij na vješalicu za vrećicu.

3. Otvorite forceps za zaključavanje pored vrećice Cell Preparation Bag br 1. Vizualno pratite ljestvicu na vagi, prenesite izračunatu težinu medija u vrećicu Cell Preparation Bag br. 1.
4. Kada se prenese odgovarajuća težina medija, zatvorite forceps za zaključavanje pored vrećice Cell Preparation Bag br. 1 kako biste zaustavili protok tekućine.
5. Koristeći uređaj za toplinsko brtvljenje zabrtvite cijev ostavljajući najmanje 15 cm cijevi na vrećici Cell Preparation Bag br. 1 radi daljnjih spajanja. Odspojite vrećicu za medij.
6. Držeći vrećicu Cell Preparation Bag br. 1 s obje ruke, temeljito izmiješajte sadržaj blagim kružnim pokretima. Izbjegavajte snažno miješanje stanica.
7. Tarirajte vagu i izvažite napunjenu vrećicu Cell Preparation Bag br. 1. Zapišite težinu.
8. Odredite težinu razrijeđenog početnog staničnog proizvoda tako što ćete oduzeti težinu prazne vrećice Cell Preparation Bag br. 1 od težine napunjene vrećice Cell Preparation Bag br. 1. Zapišite izračunatu težinu.

težina razrijeđenog početnog staničnog proizvoda (g)	=	težina napunjene vrećice Cell Preparation Bag br. 1 (g)	–	težina prazne vrećice Cell Preparation Bag br. 1 (g)

⚠ UPOZORENJE

Rizik od kontaminacije. Ako vrećice nisu prikladne za pripremu stanica ili nisu pravilno postavljene u košaru za centrifugu, postoji rizik od kontaminacije zbog oštećenja vrećice. Upotrijebite prikladne vrećice, presavijte prazne dijelove vrećice ili cijevi prema dolje, pazeći da ne oštetite vrećicu i sigurno stavite vrećice u košaru za centrifugu.

⚠ OPREZ

Rizik od smanjene učinkovitosti razdvajanja stanica. Ako vrećice nisu pravilno postavljene u košaru za centrifugu, postoji rizik od gubitka stanica tijekom uklanjanja supernatanta. Presavijte prazne dijelove vrećice ili cijevi prema dolje i sigurno stavite vrećice u košaru za centrifugu.

Centrifugiranje

1. Koristeći sterilan priključak cijevi spojite praznu vrećicu Plasma Waste Bag br. 1 na vrećicu Cell Preparation Bag br. 1.
2. Presavijte prazne dijelove vrećice Cell Preparation Bag br. 1 ili cijevi prema dolje. Sigurno stavite dvije vrećice u košaru za centrifugu.
3. Izvagajte napunjenu košaru s prikladnom izvaganom košarom. Od presudnog je značaja da se centrifuga točno izvaga.
4. Centrifugirajte stanice na 200 × g (bez kočnice) tijekom 10 minuta na sobnoj temperaturi (od +19 do +25 °C [+66 do +77 °F]).
5. Uklonite vrećice iz centrifuge pazeći da ne zamutite stanični pelet. Postavite vrećicu Cell Preparation Bag br. 1 na ekstraktor plazme.

6. Otvorite forceps za zaključavanje pored vrećice Cell Preparation Bag br 1. U potpunosti uklonite supernatant pazeći da ne resuspendirate stanični pelet tijekom uklanjanja supernatanta. Kada se prenese odgovarajuća težina medija, zatvorite forceps za zaključavanje pored vrećice Cell Preparation Bag br. 1 kako biste zaustavili protok tekućine.
7. Koristeći uređaj za toplinsko brtvljenje zabrtvite cijev ostavljajući najmanje 15 cm cijevi na vrećici Cell Preparation Bag br. 1 radi daljnjih spajanja. Odspojite vrećicu Plasma Waste Bag br. 1.
8. Ponovite razrjeđivanje i centrifugiranje uz primjenu druge vrećice za medij pripremljene s hladnim medijem i vrećicom Plasma Waste Bag br. 2.
9. Zadržite vrećice Plasma Waste Bag dok se razdvajanje i završna analiza svih stanica ne dovrše.

Prilagodba volumena

1. Za *in vitro* restimulaciju stanica volumen staničnog uzorka mora se podesiti na 100 mL. Kada se supernatant ukloni, pažljivo resuspendirajte pelet.
2. Prilagodite težinu vrećice Cell Preparation Bag br. 1 dodavanjem medija za kulturu. Izračunajte težinu medija koju treba dodati uz primjenu sljedeće jednadžbe:

težina napunjene vrećice Cell Preparation Bag br. 1 nakon prilagodbe volumena (g)	=	100 g	+	težina prazne vrećice Cell Preparation Bag br. 1 (g)

3. Koristeći sterilan priključak cijevi spojite vrećicu Cell Preparation Bag br. 1 na pripremljenu vrećicu za medij za kulturu od 10% (koja sadrži 600 mL unaprijed zagrijanog medija za kulturu kojem je dodan 10% AB serum). Objesite vrećicu za medij 10% na vješalicu za vrećicu.
4. Tarirajte vagu. Stavite vrećicu Cell Preparation Bag br. 1 sa staničnim peletom na vagu.
5. Otvorite forceps za zaključavanje pored vrećice Cell Preparation Bag br 1. Napunite vrećicu Cell Preparation Bag br. 1 medijem dok se ne dostigne izračunata „težina napunjene vrećice Cell Preparation Bag br. 1 nakon prilagodbe volumena". Zatvorite forceps za zaključavanje pored vrećice Cell Preparation Bag br. 1 kako biste zaustavili protok tekućine.
6. Koristeći uređaj za toplinsko brtvljenje zabrtvite cijev ostavljajući najmanje 15 cm cijevi na vrećici Cell Preparation Bag radi daljnjih spajanja. Odspojite vrećicu za medij 10%.
7. Koristeći sterilan priključak cijevi spojite napunjenu vrećicu Cell Preparation Bag br. 1 do 100 mL na plinopropusnu vrećicu za kulturu. Otvorite forceps za zaključavanje pored vrećice Cell Preparation Bag br. 1 i u potpunosti prenesite sadržaj.

⚠ OPREZ

Rizik od smanjene učinkovitosti. Ako vrećice nisu prikladne za pripremu stanica, postoji rizik od kontaminacije zbog oštećenja vrećice. Upotrijebite plinopropusne vrećice za kulturu prikladne za pripremu stanica.

Označavanje stanica

Jedan CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma), koji se sastoji od dvije bočice (svaka po 7,5 mL), spreman je za uporabu i dostatan za jednu primjenu na način opisan ispod. Reagensi nisu za parenteralnu primjenu.

Ciljni uzorak i kontrolni uzorak

Protokol koji opisuje postupak označavanja „ciljnog uzorka" i „kontrolnog uzorka". Oba se uzorka obrađuju paralelno, kontrolni se uzorak tretira točno na isti način kao ciljni uzorak, ali bez dodavanja antigena. Stoga analiza kontrolnog uzorka pruža informacije o spontanom izlučivanju citokina.

In vitro restimulacija

VAŽNO

- Mali uzorak negativne kontrole (kontrolni uzorak) tretiran točno na isti način kao antigenom stimulirani ciljni uzorak, ali bez dodavanja antigena treba biti uključen kao mjera spontanog izlučivanja citokina.
- Za *in vitro* restimulaciju optimalna je gustoća stanica 0,5 – 1 × 10^9 stanica/cm^2 i 1 × 10^9 stanica/mL.

1. Koristeći sterilnu štrcaljku (1 mL) s iglom veličine 20 gauge uzmite mali alikvot (npr. 1 mL = pribl. 1 × 10^9 stanica) stanica koje služe kao **kontrolni uzorak (nestimulirani)**.
2. Napravite kulturu alikvota pod optimalnim uvjetima u jednoj posudi za kulturu s 24 odjeljka.
3. Koristeći štrcaljku ubrizgajte antigen u stanice u plinopropusnoj vrećici za kulturu stanica **(ciljni uzorak)** s unaprijed određenom koncentracijom preko jednog od priključaka.
4. Inkubirajte oba uzorka na +37 °C (+99 °F) i 5 – 7,5% CO^2 tijekom prikladnog vremena u inkubatoru. Kada se proteini ili stanični lizati upotrebljavaju kao antigeni, vrijeme inkubacije iznosi između 4 i 16 sati. Za peptide vrijeme inkubacije iznosi 3 do 6 sati. S obzirom na to da na optimalno vrijeme stimulacije utječu specifične karakteristike antigena, tvrtka Miltenyi Biotec preporučuje provođenje namjenskih postupaka validacije kako bi se postigao bolji rezultat.

Označavanje s CliniMACS IFN-gamma Catchmatrix Reagent

Zabilježite broj serije i rok upotrebe za CliniMACS IFN-gamma Catchmatrix Reagent.

Ciljni uzorak

VAŽNO

Za fazu izlučivanja odabrana krvna žila mora imati dostatnu veličinu kako bi se omogućilo dodavanje najmanje 1 volumena hladnog pufera na kraju faze izlučivanja. Gustoća stanica ne smije premašiti 1×10^6 stanica/mL. Dakle, 1×10^9 stanica mora se inkubirati za izlučivanje u ukupno 1000 mL toplog medija za kulturu.

1. Upotrijebite sterilan priključak cijevi za spajanje vrećice za kulturu na vrećicu Cell Preparation Bag br. 2 (izlučivanje) i prenesite stanice. Osigurajte kompletan prijenos stanica u vrećicu Cell Preparation Bag br. 2. Zatvorite forceps za zaključavanje pored vrećice Cell Preparation Bag br. 2 kako biste zaustavili protok tekućine.
2. Koristeći uređaj za toplinsko brtvljenje zabrtvite cijev ostavljajući najmanje 15 cm cijevi na vrećici Cell Preparation Bag br. 2 radi daljnjih spajanja. Odspojite praznu vrećicu za kulturu.
3. Upotrijebite sterilan priključak cijevi da spojite pripremljenu vrećicu za medij 2% (koja sadrži 500 mL hladnog (od +2 do +8 °C [+36 °F do +46 °F]) medija za kulturu kojem je dodan 2% AB serum) na vrećicu Cell Preparation Bag br. 2.
4. Otvorite forceps za zaključavanje pored vrećice Cell Preparation Bag br 2. Napunite vrećicu Cell Preparation Bag br. 2 do oznake od 600 mL. Kada se prenese odgovarajuća težina medija, zatvorite forceps za zaključavanje pored vrećice Cell Preparation Bag br. 2 kako biste zaustavili protok tekućine.
5. Koristeći uređaj za toplinsko brtvljenje zabrtvite cijev ostavljajući najmanje 15 cm cijevi na vrećici Cell Preparation Bag br. 2 radi daljnjih spajanja. Odspojite vrećicu za medij 2%.
6. Upotrijebite uređaj za toplinsko brtvljenje da spojite praznu vrećicu Wash Waste Bag br. 1 na vrećicu Cell Preparation Bag br. 2.
7. Presavijte prazne dijelove vrećice ili cijev prema dolje. Sigurno stavite dvije vrećice u košaru za centrifugu.
8. Izvagajte napunjenu košaru s prikladnom izvaganom košarom. Od presudnog je značaja da se centrifuga točno izvaga.
9. Centrifugirajte stanice na 300 × g (bez kočnice) tijekom 10 minuta na temperaturi od+4 °C do +8 °C (+39 do +46 °F).
10. Stavite vrećicu Cell Preparation Bag br. 2 na ekstraktor plazme. Otvorite forceps za zaključavanje pored vrećice Cell Preparation Bag br 2. U potpunosti uklonite supernatant pazeći da ne zamutite stanični pelet. Zatvorite forceps za zaključavanje pored vrećice Cell Preparation Bag br. 2 kako biste zaustavili protok tekućine.
11. Koristeći uređaj za toplinsko brtvljenje zabrtvite cijev ostavljajući najmanje 15 cm cijevi na vrećici Cell Preparation Bag br. 2 radi daljnjih spajanja. Odspojite vrećicu Wash Waste Bag br. 1.
12. Pažljivo resuspendirajte stanični pelet u preostalom volumenu nakon uklanjanja supernatanta.

13. Priključite spojnicu za mjesto uzorkovanja na vrećicu Cell Preparation Bag br. 2 i dezinficirajte septum. Upotrijebite odgovarajuću sterilnu štrcaljku i iglu te uklonite 7,425 mL iz bočice CliniMACS IFN-gamma Catchmatrix Reagent. Štrcaljka od 10 mL dostatna je za uklanjanje sadržaja jedne bočice reagensa. Štrcaljka mora imati iglu veličine 20 gauge.
14. Držeći vrećicu Cell Preparation Bag br. 2 s obje ruke, temeljito izmiješajte sadržaj blagim kružnim pokretima.
15. Koristeći priključak za ubrizgavanje na spojnici za mjesto uzorkovanja ubrizgajte cijeli volumen reagensa u vrećicu Cell Preparation Bag br. 2. Pazite da ne probijete vrećicu.
16. Resuspendirajte stanice i inkubirajte ih tijekom 5 minuta na ledu. Zabilježite vrijeme inkubacije.

Kontrolni uzorak (nestimulirani)

1. Prenesite stanice u epruvetu od 15 mL koja se može zatvoriti.
2. Dodajte hladni (od +2 do +8 °C [+36 do +46 °F]) medij za kulturu kojem je dodan 2% AB serum u količini do 15 mL.
3. Centrifugirajte stanice na 300 × g (bez kočnice) tijekom 10 minuta na temperaturi od +4 °C do +8 °C i pažljivo u potpunosti uklonite supernatant.
4. Resuspendirajte stanični pelet u 100 µL hladnog (od +2 do +8 °C [+36 do +46 °F]) medija za kulturu kojem je dodan 2% AB serum.
5. Dodajte preostalih 75 µL CliniMACS IFN-gamma Catchmatrix Reagent i inkubirajte suspenziju tijekom 5 minuta na ledu.

Faza izlučivanja

Ciljni uzorak

1. Uzmite četiri unaprijed napunjene vrećice za prijenos (uključujući označenu vrećicu Cell Preparation Bag br. 3) koje sadrže 125 mL toplog (+37 °C [+99 °F]) medija za kulturu kojem je dodan 10% AB serum.
2. Koristeći sterilni priključak cijevi spojite vrećicu Cell Preparation Bag br. 2 na pripremljenu vrećicu za medij 10% (koja sadrži unaprijed zagrijani (+37 °C [+99 °F]) medij za kulturu kojem je dodan 10% AB serum).
3. Dodajte 500 mL unaprijed zagrijanog medija za kulturu u uzorak stanica u vrećici Cell Preparation Bag br. 2. Odmah započnite s mjerenjem vremena inkubacije od 45 minuta.
4. Raspodijelite 125 mL dobivene stanične suspenzije u svaku od četiri vrećice za prijenos serijskim priključivanjem vrećica za prijenos na vrećicu Cell Preparation Bag br. 2 koristeći sterilni priključak cijevi. Vizualnod o pratite ljestvicu na vagi, prenesite odgovarajuću težinu stanične suspenzije. Rezultat ovog postupka je dobivanje ukupno 250 g stanične suspenzije u svakoj od četiri vrećice za prijenos. Nakon prijenosa zabrtvite cijev da odspojite vrećice za prijenos koristeći uređaj za toplinsko brtvljenje.

5. Inkubirajte stanice na +37 °C (+99 °F) tijekom preostalog vremena od 45 minuta s kontinuiranim sporim rotiranjem (maks. 50 o/min.) do kraja vremena inkubacije. Zabilježite vrijeme inkubacije.
6. Uzmite komplet za prijenos plazme i osigurajte da je stezaljka u zatvorenom položaju. Uvedite šiljak kompleta za prijenos plazme u priključak vrećice za pufer.
7. Nakon 45 minuta spojite vrećicu za pufer na vrećicu Cell Preparation Bag br. 3 koristeći sterilan priključak cijevi. Dodajte hladan (od +2 do +8 °C [+36 do +46 °F]) pufer u svaku od četiri vrećice za prijenos (najmanje jedan volumen, tj. 250 mL u svaku) serijskim priključivanjem vrećica za prijenos na vrećicu za pufer. Ostavite stanice da se rashlade tako što ćete staviti vrećice na led tijekom 10 minuta.
8. Koristeći sterilni priključak cijevi spojite jednu vrećicu Wash Waste Bag (Wash Waste Bag br. 2 do 5) na svaku od četiri vrećice za prijenos.
9. Centrifugirajte stanice na 300 × g (bez kočnice) tijekom 10 minuta na +4 °C (+39 °F). Koristeći ekstraktor plazme u potpunosti uklonite supernatant iz svih vrećica.
10. Koristeći uređaj za toplinsko brtvljenje zabrtvite cijev svake vrećice. Odspojite vrećice Wash Waste Bag.
11. Uzmite komplet za prijenos plazme i osigurajte da je stezaljka u zatvorenom položaju. Uvedite šiljak kompleta za prijenos plazme u priključak vrećice za pufer.
12. Koristeći sterilan priključak cijevi, spojite vrećicu za pufer na vrećicu Cell Preparation Bag br. 3.
13. Gurnite stezaljku na komplet za prijenos plazme do otvorenog položaja i napunite vrećicu Cell Preparation Bag br. 3 s 200 mL pufera.
14. Kada se prenese odgovarajuća težina pufera, gurnite stezaljku na kompletu za prijenos plazme do zatvorenog položaja kako biste zaustavili protok tekućine.
15. Koristeći uređaj za toplinsko brtvljenje zabrtvite cijev ostavljajući najmanje 15 cm cijevi na vrećici Cell Preparation Bag br. 3. Odspojite vrećicu za pufer.
16. Koristeći sterilni priključak cijevi priključite jednu od preostale tri vrećice za prijenos u kojoj se nalaze stanice na vrećicu Cell Preparation Bag br. 3 i rekombinirajte obje suspenzije.

VAŽNO

Podijeljeni uzorci moraju se rekombinirati u vrećici Cell Preparation Bag br. 3 prije centrifugiranja.

17. Ponavljajte ovaj postupak dok se stanične suspenzije iz sve četiri vrećice za prijenos ne rekombiniraju u vrećici Cell Preparation Bag br. 3.
18. Nakon što su stanice rekombinirane, spojite vrećicu za pufer na vrećicu Cell Preparation Bag br. 3 koristeći sterilan priključak cijevi.
19. Gurnite stezaljku na kompletu za prijenos plazme u otvoreni položaj. Napunite vrećicu Cell Preparation Bag puferom do oznake od 500 mL.

20. Kada se prenese odgovarajuća težina pufera, gurnite stezaljku na kompletu za prijenos plazme do zatvorenog položaja kako biste zaustavili protok tekućine. Zatvorite forceps za zaključavanje pored vrećice Cell Preparation Bag br. 3.
21. Koristeći uređaj za toplinsko brtvljenje zabrtvite cijev između dvije stezaljke ostavljajući najmanje 15 cm cijevi na vrećici Cell Preparation Bag br. 3 radi daljnjih spajanja. Odspojite vrećicu za pufer.
22. Koristeći sterilan priključak cijevi spojite praznu vrećicu Wash Waste Bag br. 6 na vrećicu Cell Preparation Bag br. 3.
23. Presavijte prazne dijelove vrećice Cell Preparation Bag br. 3 ili cijevi prema dolje. Sigurno stavite dvije vrećice u košaru za centrifugu.
24. Izvagajte napunjenu košaru s prikladnom izvaganom košarom. Od presudnog je značaja da se centrifuga točno izvaga.
25. Centrifugirajte stanice na 300 × g (bez kočnice) tijekom 10 minuta na +4 °C (+39 °F).

Kontrolni uzorak (nestimulirani)

1. Dodajte topli (+37 °C [+99 °F]) medij za kulturu kojem je dodan 10% AB serum da razrijedite uzorak do maksimalno 1×10^6 stanica/mL, tj. ukupni volumen od 10 mL mora se upotrijebiti za 1×10^9 stanica.
2. Inkubirajte stanice u zatvorenoj epruveti tijekom 45 minuta na +37 °C (+99 °F) uz neprestano rotiranje u uređaju MACSmix Tube Rotator (maks. 50 o/min.).
3. Nakon 45 minuta napunite epruvetu hladnim puferom (+4 °C [+39 °F]) i ostavite je na ledu tijekom 5 – 10 minuta.
4. Centrifugirajte stanice na 300 × g (bez kočnice) tijekom 10 minuta na +4 do +8 °C (+39 do +46 °F).

Magnetsko označavanje stanica s CliniMACS IFN-gamma Enrichment Reagent

Zabilježite broj serije i rok upotrebe za CliniMACS IFN-gamma Enrichment Reagent.

Ciljni uzorak

1. Nakon koraka centrifugiranja pažljivo uklonite supernatant koristeći ekstraktor plazme na način opisan u prethodnom tekstu i resuspendirajte stanični pelet u preostalom volumenu. Zatvorite forceps za zaključavanje pored vrećice Cell Preparation Bag br. 3.
2. Koristeći uređaj za toplinsko brtvljenje zabrtvite cijev ostavljajući najmanje 15 cm cijevi na vrećici Cell Preparation Bag br. 3 radi daljnjih spajanja. Odspojite vrećicu Wash Waste Bag br. 6.
3. Priključite spojnicu za mjesto uzorkovanja na vrećicu Cell Preparation Bag br. 3 i dezinficirajte septum. Upotrijebite odgovarajuću sterilnu štrcaljku i iglu i uklonite 7,425 mL iz bočice CliniMACS IFN-gamma Enrichment Reagent. Štrcaljka od 10 mL dostatna je za uklanjanje sadržaja jedne bočice reagensa. Štrcaljka mora imati iglu veličine 20 gauge.

4. Koristeći priključak za ubrizgavanje na spojnici za mjesto uzorkovanja ubrizgajte reagens u vrećicu Cell Preparation Bag br. 3. Pazite da ne probijete vrećicu. Odmah započnite s odbrojavanjem vremena inkubacije od 15 minuta. Zabilježite vrijeme početka inkubacije.
5. Držeći vrećicu Cell Preparation Bag s obje ruke, temeljito izmiješajte sadržaj blagim kružnim pokretima.
6. Inkubirajte stanice tijekom 15 minuta na ledu. Zabilježite vrijeme završetka inkubacije.
7. Koristeći sterilan priključak cijevi, spojite vrećicu za pufer na vrećicu Cell Preparation Bag br. 3.
8. Otvorite forceps za zaključavanje pored vrećice Cell Preparation Bag br 3. Gurnite stezaljku na kompletu za prijenos plazme u otvoreni položaj. Napunite vrećicu Cell Preparation Bag br. 3 s najviše 500 mL hladnog pufera (od +2 do +8 °C [+36 do +46 °F]).
9. Kada se prenese odgovarajuća težina pufera, gurnite stezaljku na kompletu za prijenos plazme do zatvorenog položaja. Zatvorite forceps za zaključavanje pored vrećice Cell Preparation Bag br. 3. Koristeći uređaj za toplinsko brtvljenje zabrtvite cijev između dvije stezaljke. Odspojite vrećicu za pufer.
10. Koristeći sterilan priključak cijevi spojite praznu vrećicu Wash Waste Bag br. 7 na vrećicu Cell Preparation Bag br. 3.
11. Presavijte prazne dijelove vrećice ili cijev prema dolje. Sigurno stavite dvije vrećice u košaru za centrifugu.
12. Izvagajte napunjenu košaru s prikladnom izvaganom košarom. Od presudnog je značaja da se centrifuga točno izvaga.
13. Centrifugirajte na 300 × g (bez kočnice) tijekom 10 minuta na +4 °C (+39 °F).
14. Pažljivo uklonite supernatant na gore opisani način i resuspendirajte stanice u 100 mL hladnog pufera (od +2 do +8 °C [+36 do +46 °F]).
15. Dezinficirajte septum spojnice za mjesto uzorkovanja. Uvedite iglu s odgovarajućom štrcaljkom u spojnicu za mjesto uzorkovanja vrećice Cell Preparation Bag i uklonite volumen od 0,5 mL označenog proizvoda. Pazite da ne probijete vrećicu. Prenesite uzorak u epruvetu za uzorak. Označite epruvetu kao ORIGINALNI CILJNI UZORAK (uključujući identifikaciju pacijenta).

    VAŽNO

    Osigurajte da su stanice temeljito izmiješane prije uzimanja uzorka. Da biste dobili reprezentativan uzorak, upotrijebite štrcaljku kapaciteta najmanje 5 mL.
16. Čuvajte uzorak stanica za analizu stanica pohranjen na hladnom (od +2 do +8 °C [+36 do +46 °F]).

Kontrolni uzorak (nestimulirani)

1. Nakon centrifugiranja pažljivo uklonite supernatant.
2. Resuspendirajte stanice u 100 µL hladnog pufera (od +2 do +8 °C [+36 do +46 °F]).

3. Dodajte 75 µL preostalog reagensa CliniMACS IFN-gamma Enrichment Reagent.
4. Inkubirajte stanice tijekom 15 minuta na ledu.
5. Napunite posudu hladnim puferom (od +2 do +8 °C [+36 do +46 °F]) i centrifugirajte na 300 × g (bez kočnice) tijekom 10 minuta na +4 °C (+39 °F).
6. Pažljivo uklonite supernatant i resuspendirajte stanice u 1 mL hladnog pufera (od +2 do +8 °C [+36 do +46 °F]).
7. Uklonite mali uzorak (pribl. 100 µL) stanične suspenzije i prenesite ga u epruvetu označenu kao frakcija ORIGINALNOG KONTROLNOG UZORKA prije razdvajanja. Do analize pohranite na hladnom mjestu.

Magnetsko razdvajanje

Ciljni uzorak

Magnetsko razdvajanje ciljnog uzorka provodi se uz primjenu CliniMACS Plus Instrument. Nakon postupka razdvajanja obradite kontrolni uzorak na način opisan u nastavku.

Kontrolni uzorak (nestimulirani)

1. Pripremite dvije kolone MS Columns tako što ćete ih isprati s 500 µL hladnog (od +2 do +8 °C [+36 do +46 °F]) pufera i bacite efluent.
2. Stavite prvu kolonu u magnetsko polje MiniMACS separatora.
3. Provedite stanice kroz filtar za pred-razdvajanje i uklonite zbijene dijelove.
4. Nanesite staničnu suspenziju na kolonu.
5. Prikupite cjelokupni efluent (koji sadrži frakciju neoznačenih stanica). Isperite kolonu tako što ćete dodati 500 µL hladnog pufera na kolonu. Provedite ukupno tri koraka ispiranja tako što ćete uzastopno primijeniti 500 µL pufera na kolonu nakon što se spremnik kolone isprazni.
6. Uklonite kolonu iz separatora, stavite drugu kolonu u separator, a prvu kolonu stavite na drugu.
7. Pipetirajte 1 mL pufera na prvu kolonu. Odmah isperite frakciju s magnetski označenim stanicama tako što ćete klip isporučen s kolonom čvrsto primijeniti izravno na drugu kolonu.
8. Prikupite neoznačene stanice koje prolaze i isperite kolonu s 500 µL hladnog pufera. Provedite ukupno tri koraka ispiranja tako što ćete uzastopno primijeniti 500 µL pufera na kolonu nakon što se spremnik kolone isprazni.
9. Uklonite drugu kolonu iz separatora i stavite kolonu na prikladnu epruvetu za prikupljanje označenu kao pozitivna frakcija.
10. Pipetirajte 0,5 mL hladnog pufera na prvu kolonu. Odmah isperite frakciju s magnetski označenim stanicama tako što ćete čvrsto primijeniti klip isporučen s kolonom.
11. Do analize držite ciljanu frakciju stanica na hladnom mjestu.

6.17.2 KORAK 2: Odabir programa razdvajanja

- **Odabir programa razdvajanja ENRICHMENT 3.2**

Vidjeti odjeljak 7.2.4 na stranici 141.

6.17.3 KORAK 3: Instalacija kompleta cijevi CliniMACS

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

Vidjeti odjeljak 7.3.1 na stranici 153.

6.17.4 KORAK 4: CliniMACS Plus separacija

- **Postupak razdvajanja**
- **Odspajanje vrećica i bilježenje procesnog koda**
- **Uklanjanje kompleta cijevi i isključivanje**
- **Analiza stanica**

Vidjeti odjeljak 7.4.3 na stranici 196.

7 Detaljno objašnjenje KORAKA 1 – 4

7.1 KORAK 1: Priprema stanica i magnetsko označavanje

U ovom poglavlju navedena su detaljna objašnjenja postupaka koji su potrebni za razdvajanje stanica uz primjenu CliniMACS Plus sustava.

7.1.1 Prve potrebne radnje

Za materijale koji su potrebni za određenu primjenu pogledajte odjeljak specifičan za primjenu (vidjeti odjeljak 5.2 na stranici 37).

Priprema pufera CliniMACS PBS/EDTA Buffer

Pufer CliniMACS PBS/EDTA Buffer dodajte HSA do konačne koncentracije od 0,5% (m/v).

Priprema vrećica

Pogledajte odjeljak specifičan za primjenu za potrebne vrećice:

- **Cell Preparation Bag:** umetnite spojnicu za mjesto uzorkovanja (ili jednakovrijednu) u vanjski priključak vrećice Cell Preparation Bag. Stavite forceps za zaključavanje na cijev u blizini vrećice i zatvorite forceps za zaključavanje. Izvažite praznu vrećicu Cell Preparation Bag s forcepsom za zaključavanje postavljenim u blizini vrećice i cijevi obješenom na stol pored vage. Zapišite težinu.

VAŽNO
Budući da duljina cijev može varirati tijekom postupka pripreme, pažljivo postupajte tijekom vaganja vrećice Cell Preparation Bag. Da biste dobili točno očitavanje, potvrdite da je forceps za zaključavanje uvijek pozicioniran u blizini vrećice te da se nalazi na vagi i da se ostatak cijevi nalazi na stolu pored vage.

- **Cell Collection Bag:**
  - CliniMACS Tubing Set/CliniMACS Tubing Set LS: od priključak Luer/Spike Interconnector (ili jednakovrijedan) u vanjski priključak vrećice Cell Collection Bag. Stavite forceps za zaključavanje na cijev u blizini vrećice i zatvorite forceps za zaključavanje. Izvažite praznu vrećicu Cell Collection Bag s forcepsom za zaključavanje postavljenim u blizini vrećice i cijevi obješenom na stol pored vage. Zapišite težinu.
  - CliniMACS Depletion Tubing Set: jedna je vrećica Cell Collection Bag već priključena na komplet cijevi. Umetnite priključak Luer/Spike Interconnector (ili jednakovrijedan) u vanjski priključak vrećice Cell Collection Bag. Stavite forceps za zaključavanje na cijev u blizini vrećice i zatvorite forceps za zaključavanje. Izvažite praznu vrećicu Cell Collection Bag s forcepsom za zaključavanje postavljenim u blizini vrećice i cijevi obješenom na stol pored vage. Zapišite težinu.

7.1.2 Magnetsko označavanje stanica

U sljedećim je odjeljcima opisan preporučeni postupak u vrećici za pripremu staničnog proizvoda uz primjenu sterilnog priključka cijevi.

- Rukovatelj mora biti upoznat s radom i uporabom sterilnog priključka cijevi.
- Prije započinjanja označavanja stanica i postupka razdvajanja uvjerite se da su sav potrebni materijal i oprema na raspolaganju.

VAŽNO

- Svako se rukovanje vrećicom mora provesti u sterilnom okruženju (npr. u laminarnom kabinetu) uz primjenu aseptičnih tehnika. Spajanje cijevi uz primjenu sterilnog priključka cijevi može se provesti izvan laminarnog kabineta.
- Provedite pripremu uzroka i razdvajanje stanica pod uvjetima temperature definiranim u odjeljku specifičnom za primjenu. Niža ili viša ambijentalna temperatura za posljedicu može imati smanjenu čistoću i niži broj ciljnih stanica.

Ukratko, magnetsko označavanje staničnog proizvoda provodi se u sljedećim koracima:

1. analiza početnog staničnog proizvoda
2. prijenos početnog staničnog proizvoda u vrećicu Cell Preparation Bag
3. razrjeđivanje početnog staničnog proizvoda
4. centrifugiranje
5. samo za CliniMACS Plus Anti-Biotin System i CliniMACS Plus TCRα/β-Biotin System: označavanje stanica (inkubacija s primarnim protutijelom/CliniMACS TCRα/β-Biotin) i uklanjanje viška konjugata (1. ispiranje)
6. prilagodba volumena
7. samo za CliniMACS Plus CD3 i CD3/CD19 Systems: inkubacija s imunoglobulinom kliničke kakvoće
8. magnetsko označavanje stanica (inkubacija s CliniMACS reagensom)
9. uklanjanje viška reagensa
10. prilagodba volumena za razdvajanje stanica

Analiza početnog staničnog proizvoda

Prije započinjanja pripreme početnog staničnog proizvoda odredite sljedeće parametre:

- ukupni broj leukocita
- postotak stanica koje treba označiti
- ukupni broj leukocita koje treba označiti
- vijabilnost

Osigurajte da se rad provodi unutar raspona specifikacija za primjenu.

Ponovno provjerite parametre nakon postupka označavanja. To je potrebno za programe s punjenjem u fazama (ENRICHMENT 1.1/DEPLETION 2.1/DEPLETION 3.1), jer se sljedeća tri parametra uzorka moraju unijeti u softver tijekom podešavanja sustava CliniMACS Plus Instrument prije punjenja kompleta cijevi na instrument:

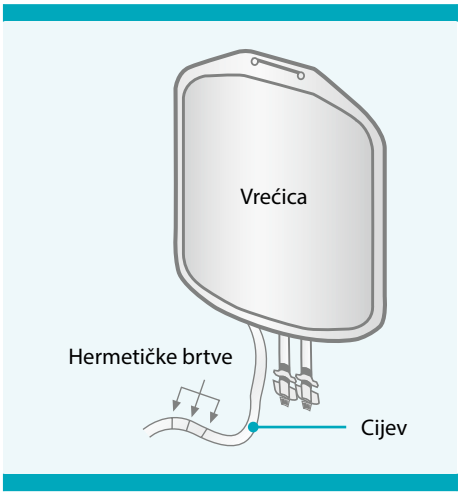
- koncentracija leukocita po mL
- postotak stanica koje treba označiti
- konačni volumen uzorka stanica (volumen umetanja uzorka)

Mogu biti potrebni drugi testovi ovisno o predviđenoj uporabi stanica (npr. broj T-stanica, fenotip). Zabilježite sve podatke.

Prijenos početnog staničnog proizvoda u vrećicu Cell Preparation Bag

1. Pribilježite datum i vrijeme početka prije započinjanja pripreme početnog staničnog proizvoda.
2. Odredite volumen početnog staničnog proizvoda tako što ćete pretpostaviti da je 1 mL početnog staničnog proizvoda jednako 1 g (1 g $\triangleq$ 1 mL).
3. Držeći vrećicu s početnim staničnim proizvodom s obje ruke, temeljito izmiješajte sadržaj blagim kružnim pokretima.
4. Koristeći sterilni priključak cijevi spojite vrećicu Cell Preparation Bag na vrećicu originalnog početnog staničnog proizvoda.
5. Otvorite forceps za zaključavanje kako biste prenijeli početni stanični proizvod u vrećicu Cell Preparation Bag. Upotrijebite pomagalo za pražnjenje cijevi kako biste ispraznili preostalu krv iz cijevi. Zatvorite forceps za zaključavanje na cijevi što je moguće bliže vrećici.

6. Zabrtvite cijev i odvojite vrećice ostavljajući najmanje 15 cm cijevi na vrećici Cell Preparation Bag radi daljnjih spajanja (vidjeti Slika 7.1). Upotrijebite uređaj za toplinsko brtvljenje kako biste na cijevi napravili tri brtve jednu pored druge. Uvjerite se da su brtve u potpunosti zatvorene. Prerežite na središnjoj brtvi. Zadržite originalnu vrećicu u kojoj se nalazila leukafereza / početni stanični proizvod dok se razdvajanje i završna analiza svih stanica ne dovrše.



Slika 7.1: Brtvljenje vrećice.

7. Za uzimanje uzorka dezinficirajte septum spojnice za mjesto uzorkovanja. Izmiješajte sadržaj vrećice. Uvedite iglu s odgovarajućom štrcaljkom u spojnicu za mjesto uzorkovanja vrećice Cell Preparation Bag i uklonite volumen od 0,5 mL. Prenesite uzorak u epruvetu za uzorak. Označite epruvetu kao LEUKAFEREZA/POČETNI STANIČNI PROIZVOD (uključujući identifikaciju proizvoda) i zadržite za analizu stanica.

   VAŽNO

   Osigurajte da je početni stanični proizvod temeljito izmiješan prije uzimanja uzorka. Da biste dobili reprezentativan uzorak, upotrijebite štrcaljku kapaciteta najmanje 5 mL.

8. Tarirajte vagu. Stavite napunjenu vrećicu Cell Preparation Bag na vagu, cijev neka bude na stolu. Zapišite težinu.

9. Odredite težinu početnog staničnog proizvoda tako što ćete oduzeti težinu prazne vrećice Cell Preparation Bag od težine vrećice Cell Preparation Bag napunjene početnim staničnim proizvodom. Zapišite izračunatu težinu.

težina početnog staničnog proizvoda (g)	=	težina napunjene vrećice Cell Preparation Bag (g)	–	težina prazne vrećice Cell Preparation Bag (g)

Razrjeđivanje početnog staničnog proizvoda

Pogledajte odjeljak specifičan za primjenu za potrebni omjer razrjeđivanja.

Početni stanični proizvod mora se razrijediti s CliniMACS PBS/EDTA Buffer (kojem je dodan HSA do konačne koncentracije od 0,5% (m/v)) prije magnetskog označavanja. Izračunajte težinu pufera koji treba dodati uz primjenu sljedeće jednadžbe (1 ili 2), ovisno o primjeni i zabilježite je.

(1) težina pufera koju treba dodati (g)	=	600 g	–	težina početnog staničnog proizvoda (g)

(2) težina pufera koju treba dodati (g)	=	težina početnog staničnog proizvoda (g)	×	2	

1. Uzmite komplet za prijenos plazme i uvjerite se da je stezaljka u zatvorenom položaju. Uvedite šiljak kompleta za prijenos plazme u priključak vrećice za pufer.
2. Koristeći sterilan priključak cijevi spojite vrećicu za pufer na vrećicu Cell Preparation Bag. Objesite vrećicu za pufer na vješalicu za vrećicu.
3. Stavite vrećicu Cell Preparation Bag na vagu i tarirajte je.
4. Otvorite forceps za zaključavanje pored vrećice Cell Preparation Bag. Gurnite stezaljku na kompletu za prijenos plazme u otvoreni položaj. Vizualno pratite ljestvicu na vagi, prenesite izračunatu težinu pufera u vrećicu Cell Preparation Bag.
5. Kada se prenese odgovarajuća težina pufera, gurnite stezaljku na kompletu za prijenos plazme do zatvorenog položaja kako biste zaustavili protok tekućine. Zatvorite forceps za zaključavanje na cijevi što je moguće bliže vrećici.
6. Upotrijebite uređaj za toplinsko brtvljenje da zabrtvite cijev između stezaljke i forcepsa za zaključavanje tako da ostavite najmanje 15 cm cijevi na vrećici Cell Preparation Bag za daljnja spajanja. Odspojite vrećicu za pufer.
7. Držeći vrećicu Cell Preparation Bag s obje ruke, temeljito izmiješajte sadržaj blagim kružnim pokretima. Izbjegavajte snažno miješanje stanica.
8. Tarirajte vagu i izvažite napunjenu vrećicu Cell Preparation Bag. Zapišite težinu.
9. Odredite težinu razrijeđenog početnog staničnog proizvoda tako što ćete oduzeti težinu prazne vrećice Cell Preparation Bag od težine napunjene vrećice Cell Preparation Bag. Zapišite izračunatu težinu.

težina razrijeđenog početnog staničnog proizvoda (g)	=	težina napunjene vrećice Cell Preparation Bag (g)	–	težina prazne vrećice Cell Preparation Bag (g)

Centrifugiranje

⚠ UPOZORENJE

Rizik od kontaminacije. Ako vrećice nisu prikladne za pripremu stanica ili nisu pravilno postavljene u košaru za centrifugu, postoji rizik od kontaminacije zbog oštećenja vrećice. Upotrijebite prikladne vrećice, presavijte prazne dijelove vrećice ili cijevi prema dolje, pazeći da ne oštetite vrećicu i sigurno stavite vrećice u košaru za centrifugu.

⚠ OPREZ

Rizik od smanjene učinkovitosti razdvajanja stanica. Ako vrećice nisu pravilno postavljene u košaru za centrifugu, postoji rizik od gubitka stanica tijekom uklanjanja supernatanta. Presavijte prazne dijelove vrećice ili cijevi prema dolje i sigurno stavite vrećice u košaru za centrifugu.

1. Koristeći sterilan priključak cijevi spojite praznu vrećicu Plasma Waste Bag na vrećicu Cell Preparation Bag.
2. Presavijte prazne dijelove vrećice Cell Preparation Bag ili cijevi prema dolje. Sigurno stavite dvije vrećice u košaru za centrifugu.
3. Izvagajte napunjenu košaru s prikladnom izvaganom košarom. Od presudnog je značaja da se centrifuga točno izvaga.
4. Centrifugirajte stanice pod uvjetima definiranim u odjeljku specifičnom za primjenu. Zabilježite uvjete centrifugiranja.
5. Uklonite vrećice iz centrifuge pazeći da ne zamutite stanični pelet. Napunite vrećicu Cell Preparation Bag na ekstraktor plazme i spojenu vrećicu za otpad na vagu na stolu.

Prilagodba volumena

Za magnetsko označavanje stanica optimalna težina staničnog proizvoda varira ovisno o primjeni. Pogledajte volumen označavanja u odjeljku specifičnom za primjenu.

Ovisno o primjeni, može biti potrebno ili samo ukloniti određenu količinu supernatanta kako bi se postigao volumen označavanja (planirano uklanjanje supernatanta) ili u potpunosti ukloniti supernatant i dodati pufer kako bi se postigao volumen označavanja (potpuno uklanjanje supernatanta). Pogledajte odjeljak specifičan za primjenu za primjenjivu opciju i nastavite u skladu s tim.

VAŽNO

- Koristeći ekstraktor plazme održavajte stalni kontakt ručke za otpuštanje ekstraktora i osigurajte da je forceps za zaključavanje pored vrećice Cell Preparation Bag otvoren prije početka prijenosa. Polako otpustite ručku ekstraktora.
- Tijekom uklanjanja supernatanta pazite da ne izgubite stanice.

Planirano uklanjanje supernatanta

Izračunajte težinu supernatanta koju treba ukloniti kako bi se uzorak prilagodio volumenu označavanja uz primjenu sljedeće jednadžbe:

težina supernatanta koju treba ukloniti (g)	=	težina staničnog proizvoda nakon ispiranja (g)	–	volumen označavanja (g)

Zabilježite težinu supernatanta koju treba ukloniti.

1. Stavite praznu vrećicu Plasma Waste Bag ili Wash Waste Bag br. 1 na vagu i tarirajte vagu.
2. Otvorite forceps za zaključavanje pored vrećice Cell Preparation Bag. Vizualnim praćenjem ljestvice na vagi uklonite supernatant koristeći ekstraktor plazme. Pažljivo istiskajte višak supernatanta dok se ne dostigne izračunata „težina supernatanta koju treba ukloniti".

3. Kada se ukloni odgovarajuća težina supernatanta, zatvorite forceps za zaključavanje pored vrećice Cell Preparation Bag kako biste zaustavili protok tekućine. Zabilježite težinu uklonjenog supernatanta.
4. Koristeći uređaj za toplinsko brtvljenje zabrtvite cijev ostavljajući najmanje 15 cm cijevi na vrećici Cell Preparation Bag radi daljnjih spajanja. Odspojite vrećicu Plasma Waste Bag ili Wash Waste Bag br. 1.
5. Pažljivo resuspendirajte stanice u vrećicu Cell Preparation Bag. Izbjegavajte snažno miješanje stanica. Uvjerite se da su sve stanice resuspendirane.
6. Tarirajte vagu i izvažite napunjenu vrećicu Cell Preparation Bag. Zapišite težinu.
7. Odredite težinu staničnog proizvoda nakon prilagodbe volumena tako što ćete oduzeti težinu prazne vrećice Cell Preparation Bag od težine vrećice Cell Preparation Bag napunjene originalnim staničnim proizvodom. Zapišite izračunatu težinu.

težina staničnog proizvoda nakon prilagodbe volumena (g)	=	težina napunjene vrećice Cell Preparation Bag (g)	–	težina prazne vrećice Cell Preparation Bag (g)

8. Zadržite vrećicu Plasma Waste Bag ili Wash Waste Bag do završnog razdvajanja i dovršetka analize svih stanica.

Potpuno uklanjanje supernatanta

U potpunosti uklonite supernatant pazeći da ne resuspendirate stanični pelet tijekom uklanjanja supernatanta. Kada se ukloni supernatant, zatvorite forceps za zaključavanje pored vrećice Cell Preparation Bag kako biste zaustavili protok tekućine. Koristeći uređaj za toplinsko brtvljenje zabrtvite cijev ostavljajući najmanje 15 cm cijevi na vrećici Cell Preparation Bag radi daljnjih spajanja. Odspojite vrećicu Plasma Waste Bag. Pažljivo resuspendirajte pelet.

Prilagodite težinu vrećice Cell Preparation Bag tako što ćete dodati pufer. Izračunajte ciljnu težinu vrećice Cell Preparation Bag (CPB) napunjenu razrijeđenim staničnim proizvodom uz primjenu sljedeće jednadžbe:

ciljna težina vrećice CPB napunjene ispranim staničnim proizvodom (g)	=	volumen označavanja (g)	+	težina prazne vrećice CPB (g)

1. Umetnite šiljak kompleta za prijenos plazme u priključak vrećice za pufer. Potvrdite da je stezaljka na kompletu za prijenos plazme u zatvorenom položaju.
2. Koristeći sterilan priključak cijevi spojite vrećicu za pufer na vrećicu Cell Preparation Bag. Objesite vrećicu za pufer na vješalicu za vrećicu.
3. Tarirajte vagu. Stavite vrećicu Cell Preparation Bag sa staničnim peletom na vagu.
4. Otvorite forceps za zaključavanje pored vrećice Cell Preparation Bag. Gurnite stezaljku na kompletu za prijenos plazme u otvoreni položaj. Napunite vrećicu Cell Preparation Bag puferom dok se ne dostigne izračunata „ciljna vrijednost vrećice Cell Preparation Bag napunjene ispranim staničnim proizvodom".

Gurnite stezaljku na kompletu za prijenos plazme do zatvorenog položaja kako biste zaustavili protok tekućine. Zatvorite forceps za zaključavanje pored vrećice Cell Preparation Bag.

5. Koristeći uređaj za toplinsko brtvljenje zabrtvite cijev ostavljajući najmanje 15 cm cijevi na vrećici Cell Preparation Bag radi daljnjih spajanja. Odspojite vrećicu za pufer.

6. Pažljivo resuspendirajte stanice u vrećicu Cell Preparation Bag. Izbjegavajte snažno miješanje stanica. Uvjerite se da su sve stanice resuspendirane.

7. Tarirajte vagu i izvažite napunjenu vrećicu Cell Preparation Bag. Zapišite težinu.

8. Odredite težinu staničnog proizvoda nakon prilagodbe volumena tako što ćete oduzeti težinu prazne vrećice Cell Preparation Bag od težine vrećice Cell Preparation Bag napunjene originalnim staničnim proizvodom. Zapišite izračunatu težinu.

težina staničnog proizvoda nakon prilagodbe volumena (g)	=	težina napunjene vrećice Cell Preparation Bag (g)	–	težina prazne vrećice Cell Preparation Bag (g)

9. Zadržite vrećicu Plasma Waste Bag dok se razdvajanje i završna analiza svih stanica ne dovrše.

Označavanje stanica (samo za CliniMACS Plus Anti-Biotin System i CliniMACS Plus TCRα/β-Biotin System)

Inkubacija s CliniMACS TCRα/β-Biotin

Bočica CliniMACS TCRα/β-Biotin spremna je za uporabu i dostatna za primjenu na način opisan u nastavku. Konjugat nije za parenteralnu primjenu.

Pohranite konjugat na temperaturi od +2 °C do +8 °C. NEMOJTE zamrzavati. Konjugat se mora upotrijebiti hladan izravno iz hladnjaka. NEMOJTE zagrijavati prije uporabe. Broj serije i rok upotrebe konjugata otisnuti su na oznaci bočice. NEMOJTE upotrebljavati konjugat nakon isteka roka upotrebe.

1. Zabilježite broj serije i rok upotrebe za CliniMACS TCRα/β-Biotin.

2. Dezinficirajte septum spojnice za mjesto uzorkovanja. Upotrijebite prikladnu sterilnu štrcaljku i iglu da uklonite cijeli volumen iz jedne bočice (7,5 mL). Štrcaljka od 10 mL dostatna je za uklanjanje sadržaja jedne bočice. Štrcaljka mora imati iglu veličine 20 gauge.

3. Koristeći priključak za ubrizgavanje na spojnici za mjesto uzorkovanja ubrizgajte cijeli volumen konjugata u vrećicu Cell Preparation Bag (opcionalno prenesite sadržaj vrećice Cell Preparation Bag u novu vrećica za prijenos kako biste osigurali visoku učinkovitost iscrpljivanja). Odmah započnite s razdobljem inkubacije od 30 minuta.

4. Držeći vrećicu Cell Preparation Bag s obje ruke, temeljito izmiješajte sadržaj blagim kružnim pokretima. Zabilježite vrijeme početka inkubacije.

5. Stavite vrećicu Cell Preparation Bag položenu ravno na orbitalni rotator namješten na brzinu od približno 25 o/min. i osigurajte da vrećica nije naborana ili presavijena. Inkubirajte vrećicu tijekom ukupno 30 minuta pri kontroliranoj sobnoj temperaturi (od +19 °C do +25 °C). Zabilježite vrijeme završetka inkubacije.

Inkubiranje s primarnim protutijelom (biotinilirano protutijelo drugog proizvođača)

1. Resuspendirajte stanični pelet i označite stanice s primarnim biotiniliranim protutijelom tijekom vremena i pri titru koje je preporučio proizvođač protutijela. Uvjerite se da su sve stanice resuspendirane. (Primarno protutijelo treba upotrijebiti pri njegovom optimalnom titru, tj. s optimalnim intenzitetom bojanja i bez pozadinskog bojanja. Pridržavajte se uputa za korištenje koje je isporučio proizvođač primarnog protutijela.)
2. Inkubirajte vrećicu Cell Preparation Bag na orbitalnom vibratoru pri 25 o/min. Pridržavajte se uputa za korištenje koje je isporučio proizvođač primarnog protutijela.

Uklanjanje viška konjugata (1. ispiranje) (samo za CliniMACS Plus Anti-Biotin System i CliniMACS Plus TCRα/β-Biotin System)

Razrijedite stanični proizvod s puferom do ukupne težine od 600 g. Izračunajte težinu pufera koju treba dodati uz primjenu sljedeće jednadžbe i zabilježite je.

težina pufera koju treba dodati (g)	=	600 g	–	težina označenog staničnog proizvoda (g)

1. Razrijedite stanični proizvod slijedeći korake opisane u koraku „Razrjeđivanje početnog staničnog proizvoda" (koraci 1 – 8) do ukupne težine od 600 g.
2. Odredite težinu staničnog proizvoda nakon uklanjanja viška konjugata (1. ispiranje) tako što ćete oduzeti težinu prazne vrećice Cell Preparation Bag od težine napunjene vrećice Cell Preparation Bag. Zapišite izračunatu težinu.

težina staničnog proizvoda nakon uklanjanja viška konjugata (1. ispiranje) (g)	=	težina napunjene vrećice Cell Preparation Bag (g)	–	težina prazne vrećice Cell Preparation Bag (g)

3. Koristeći sterilan priključak cijevi spojite praznu vrećicu Wash Waste Bag na vrećicu Cell Preparation Bag.
4. Presavijte prazne dijelove vrećice Cell Preparation Bag ili cijevi prema dolje. Sigurno stavite dvije vrećice u košaru za centrifugu.
5. Izvagajte napunjenu košaru s prikladnom izvaganom košarom. Od presudnog je značaja da se centrifuga točno izvaga.
6. Centrifugirajte stanice pod uvjetima definiranim u odjeljku specifičnom za primjenu.
7. Uklonite vrećice iz centrifuge pazeći da ne resuspendirate stanični pelet. Napunite vrećicu Cell Preparation Bag na ekstraktor plazme i spojenu vrećicu za otpad na vagu na stolu.
8. Za potrebni broj ispiranja pogledajte odjeljak koji opisuje primjenu.
9. Podesite težinu stanične suspenzije na način opisan u odjeljku „Prilagodba volumena" do približno 190 g, za magnetsko označavanje stanica s CliniMACS Anti-Biotin Reagent.

Inkubacija s imunoglobulinom kliničke kakvoće (samo za CliniMACS Plus CD3 System ili CD3/CD19 System)

VAŽNO

Imajte na umu da ljudski IgG nije komponenta CliniMACS sustava. Upotrebljavajte samo ljudski IgG farmaceutske kakvoće koji je odobren u Vašoj državi. Pažljivo pročitajte prilog pakiranja za upotrijebljeni ljudski IgG; osobito odjeljak koji se odnosi na reakcije preosjetljivosti i rizik od infekcije koji ljudski IgG kao proizvod izveden iz krvi predstavlja za sve pacijente. Korisnik mora procijeniti sve rizike koji se jave vezano uz ove materijale.

Dezinficirajte septum spojnice za mjesto uzorkovanja vrećice Cell Preparation Bag. Upotrijebite odgovarajuću sterilnu štrcaljku i iglu da dodate 1,5 mg ljudskog IgG po mL staničnog proizvoda (npr. 1,6 mL Gamunex 10% za 95 mL staničnog proizvoda). Temeljito izmiješajte sadržaj. Inkubirajte tijekom 5 minuta na kontroliranoj sobnoj temperaturi praveći kružne pokrete (npr. 25 o/min. na orbitalnom rotatoru).

Magnetsko označavanje stanica: inkubacija s CliniMACS reagensom

Bočice CliniMACS reagensa spremne su za uporabu i dostatne za primjenu na način opisan u nastavku. Reagensi nisu za parenteralnu primjenu.

Pohranite reagense na temperaturi od +2 °C do +8 °C. NEMOJTE zamrzavati. Reagensi se moraju upotrijebiti hladni izravno iz hladnjaka. NEMOJTE zagrijavati prije uporabe. Broj serije i rok upotrebe reagensa otisnuti su na oznaci bočice. NEMOJTE upotrebljavati reagense nakon isteka roka upotrebe.

1. Zabilježite broj serije i rok upotrebe CliniMACS reagensa.
2. Dezinficirajte septum spojnice za mjesto uzorkovanja. Upotrijebite prikladnu sterilnu štrcaljku i iglu da uklonite cijeli volumen iz a) jedne bočice ili b) dvije bočice s reagensom (svaka po 7,5 mL). Štrcaljka od 10 mL dostatna je za uklanjanje sadržaja jedne bočice, odn. štrcaljka od 20 mL dostatna je za uklanjanje sadržaja dvije bočice reagensa. Štrcaljka mora imati iglu veličine 20 gauge.
3. Koristeći priključak za ubrizgavanje na spojnici za mjesto uzorkovanja ubrizgajte cijeli volumen reagensa u vrećicu Cell Preparation Bag (opcionalno u primjenama iscrpljivanja prenesite sadržaj vrećice Cell Preparation Bag u novu vrećica za prijenos kako biste osigurali visoku učinkovitost iscrpljivanja). Vrijeme inkubacije započinje u ovom trenutku.
4. Držeći vrećicu Cell Preparation Bag s obje ruke, temeljito izmiješajte sadržaj blagim kružnim pokretima.
5. Stavite vrećicu Cell Preparation Bag položenu ravno na orbitalni rotator namješten na brzinu od približno 25 o/min. i osigurajte da vrećica nije naborana ili presavijena. Inkubirajte vrećicu pod uvjetima i tijekom vremena koji su definirani u odjeljku o primjeni.

Uklanjanje viška reagensa

Za uklanjanje nevezanog reagensa nakon dovršetka inkubacije neophodno je ispiranje stanica. Pogledajte odjeljak specifičan za primjenu za potrebni broj ispiranja.

1. Umetnite šiljak kompleta za prijenos plazme u priključak vrećice za pufer u kojoj se nalazi najmanje 500 mL pufera. Potvrdite da je stezaljka na kompletu za prijenos plazme u zatvorenom položaju.
2. Koristeći sterilan priključak cijevi spojite vrećicu za pufer na vrećicu Cell Preparation Bag. Objesite vrećicu za pufer na vješalicu za vrećicu.
3. Stavite vrećicu Cell Preparation Bag na vagu i tarirajte je.
4. Otvorite forceps za zaključavanje pored vrećice Cell Preparation Bag. Gurnite stezaljku na kompletu za prijenos plazme u otvoreni položaj. Napunite vrećicu Cell Preparation Bag puferom do oznake od 600 mL. Gurnite stezaljku na kompletu za prijenos plazme do zatvorenog položaja kako biste zaustavili protok tekućine. Zatvorite forceps za zaključavanje pored vrećice Cell Preparation Bag. Zabilježite težinu napunjene vrećice Cell Preparation Bag.
5. Zabrtvite cijev između dvije stezaljke ostavljajući najmanje 15 cm cijevi na vrećici Cell Preparation Bag radi daljnjih spajanja. Odspojite vrećicu za pufer.
6. Držeći vrećicu Cell Preparation Bag s obje ruke, temeljito izmiješajte sadržaj blagim kružnim pokretima.
7. Koristeći sterilan priključak cijevi spojite praznu vrećicu Wash Waste Bag na vrećicu Cell Preparation Bag.
8. Presavijte prazne dijelove vrećice ili cijevi prema dolje. Prenesite vrećice Cell Preparation Bag i Wash Waste Bag sigurno na košaru za centrifugu.
9. Centrifugirajte stanice pod uvjetima i tijekom vremena koji su definirani u odjeljku o primjeni.
10. Pazeći da ne zamutite stanični pelet uklonite vrećice iz centrifuge.
11. Pažljivo objesite vrećicu Cell Preparation Bag na ekstraktor plazme.
12. Stavite vrećicu Wash Waste Bag na vagu i tarirajte je.
13. Otvorite forceps za zaključavanje pored vrećice Cell Preparation Bag. Koristeći ekstraktor plazme uklonite što je više moguće supernatanta iz vrećice Cell Preparation Bag. Zatvorite forceps za zaključavanje pored vrećice Cell Preparation Bag kako biste zaustavili protok tekućine.
14. Koristeći uređaj za toplinsko brtvljenje zabrtvite cijev ostavljajući najmanje 15 cm cijevi na vrećici Cell Preparation Bag radi daljnjih spajanja. Odspojite vrećicu Wash Waste Bag.
15. Zadržite vrećicu Wash Waste Bag dok se razdvajanje i završna analiza svih stanica ne dovrše.
16. Resuspendirajte stanični pelet u vrećici Cell Preparation Bag. Izbjegavajte snažno miješanje stanica. Uvjerite se da su sve stanice resuspendirane.

17. Ako je potrebno više ispiranja (npr. za obogaćivanje stanica pozitivnih na CD34), ponovite korake 1 – 16.
18. Tarirajte vagu i izvažite napunjenu vrećicu Cell Preparation Bag. Zapišite težinu.
19. Odredite težinu staničnog proizvoda nakon ispiranja tako što ćete oduzeti težinu prazne vrećice Cell Preparation Bag od težine napunjene vrećice Cell Preparation Bag. Zapišite izračunatu težinu.

težina staničnog proizvoda nakon ispiranja (g)	=	težina napunjene vrećice Cell Preparation Bag (g)	–	težina prazne vrećice Cell Preparation Bag (g)

20. Prilagodite volumen umetanja uzorka: izračunajte težinu pufera koja je potrebna za prilagodbu težine stanične suspenzije do odgovarajućeg volumena umetanja uzorka u skladu s primjenom koristeći se sljedećom jednadžbom. Za punjenje označenih i ispranih stanica na kompletu cijevi preporučena je maksimalna koncentracija stanica od $0{,}4 \times 10^9$ stanica po mL.

težina pufera koju treba dodati (g)	=	Volumen umetanja uzorka (u skladu s primjenom)	–	težina staničnog proizvoda nakon ispiranja (g)

21. Koristeći sterilan priključak cijevi spojite vrećicu za pufer na vrećicu Cell Preparation Bag. Objesite vrećicu za pufer na vješalicu za vrećicu.
22. Stavite vrećicu Cell Preparation Bag na vagu i tarirajte je.
23. Otvorite forceps za zaključavanje pored vrećice Cell Preparation Bag. Gurnite stezaljku na kompletu za prijenos plazme u otvoreni položaj. Vizualno pratite ljestvicu na vagi, prenesite izračunatu težinu pufera u vrećicu Cell Preparation Bag.
24. Kada se prenese odgovarajuća težina pufera, gurnite stezaljku na kompletu za prijenos plazme do zatvorenog položaja kako biste zaustavili protok tekućine. Zatvorite forceps za zaključavanje pored vrećice Cell Preparation Bag.
25. Koristeći uređaj za toplinsko brtvljenje zabrtvite cijev između dvije stezaljke. Odspojite vrećicu za pufer.
26. Resuspendirajte stanični pelet u vrećici Cell Preparation Bag. Izbjegavajte snažno miješanje stanica. Uvjerite se da su sve stanice resuspendirane.
27. Dezinficirajte septum spojnice za mjesto uzorkovanja. Uvedite iglu s odgovarajućom štrcaljkom u spojnicu za mjesto uzorkovanja vrećice Cell Preparation Bag i uklonite volumen od 0,5 mL označenog proizvoda. Prenesite uzorak u epruvetu za uzorak. Označite epruvetu kao ORIGINAL (uključujući identifikaciju proizvoda) i zadržite je za analizu.
28. Tarirajte vagu i izvažite napunjenu vrećicu Cell Preparation Bag. Zapišite težinu.

29. Odredite težinu staničnog proizvoda nakon dodavanja pufera (volumen umetanja uzorka) tako što ćete oduzeti težinu prazne vrećice Cell Preparation Bag od težine napunjene vrećice Cell Preparation Bag. Zapišite izračunatu težinu.

težina staničnog proizvoda nakon dodavanja pufera (g)	=	težina napunjene vrećice Cell Preparation Bag (g)	–	težina prazne vrećice Cell Preparation Bag (g)

▶ **Prijeđite na KORAK 2.**

NEMOJTE spajati vrećicu Cell Preparation Bag na komplet cijevi dok za to ne dobijete uputu na zaslonu instrumenta.

7.2 KORAK 2: Odabir programa razdvajanja

7.2.1 Uključivanje sustava CliniMACS Plus Instrument

Uključite CliniMACS Plus Instrument tako što ćete upotrijebiti sklopku ON/OFF koja se nalazi na stražnjoj ploči instrumenta. Zabilježite vrijeme početka rada instrumenta.

Prozor prikazuje glavni zaslon u odjeljku „Instalacija" u korisničkom priručniku za CliniMACS Plus Instrument.

Za prelazak na izbornik programa pritisnite **ENT**.

7.2.2 CD34 SELECTION 1/2

VAŽNO

- CD34 SELECTION 1 smije se upotrijebiti samo u kombinaciji s CliniMACS Tubing Set (REF 161-01), dok se CD34 SELECTION 2 smije upotrijebiti samo u kombinaciji s CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01). Pažljivo provjerite komplet cijevi prije instaliranja.
- Pojavljuje se zaslon i dijagrami koji služe kao vodiči za postupak pojavit će se na prozoru zaslona. Provedite i provjerite svaki korak u skladu s uputama iz priručnika prije nego što prijeđete na sljedeći korak. Za ispravak greške tijekom unosa podataka pritisnite tipku „Undo" (vidjeti odjeljak „Opis" u korisničkom priručniku za CliniMACS Plus Instrument).

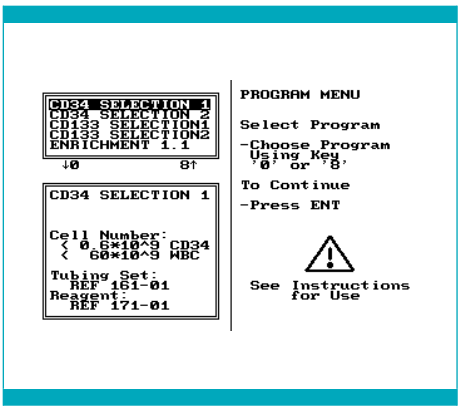
Odabir programa razdvajanja CD34 SELECTION 1/2

Na prozoru se prikazuje Zaslon 7.1.

Ovisno o primjeni odaberite CD34 SELECTION 1 ili CD34 SELECTION 2.

Za odabir programa razdvajanja istaknite naziv programa s crnom podlogom. Pomičite oznaku gore i dolje koristeći se tipkama **0** i **8**.

Za nastavak rada s istaknutim programom pritisnite **ENT**.



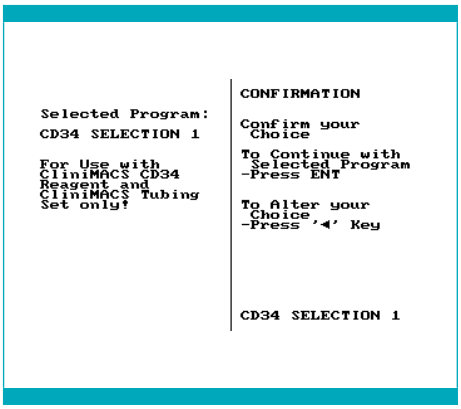
Zaslon 7.1: Odabir programa razdvajanja

Potvrda

Na prozoru se prikazuje Zaslon 7.2.

Za potvrdu programa razdvajanja i nastavak pritisnite ENT.

U suprotnom pritisnite ◄ da se vratite na prethodni korak kako biste dopunili odabir.



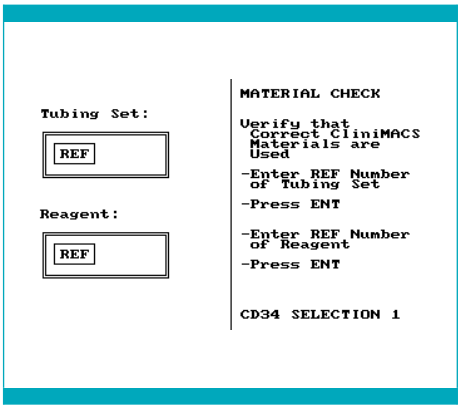
Zaslon 7.2: Potvrda

Provjera materijala

Na prozoru se prikazuje Zaslon 7.3.

CD34 SELECTION 1 i CD34 SELECTION 2 optimizirani su za obogaćivanje stanica pozitivnih na CD34.

Da biste potvrdili da je dostupan odgovarajući komplet cijevi te da se za označavanje stanica upotrebljava odgovarajući reagens, unesite potrebni kataloški broj (REF) u polje upita. Softver instrumenta provjerava mogu li se materijali upotrebljavati u kombinaciji s izabranim programom.



Zaslon 7.3: Provjera materijala

1. Unesite kataloški broj kompleta cijevi koji će se upotrebljavati za automatizirano razdvajanje stanica. Za potvrdu i nastavak pritisnite ENT.
2. Unesite kataloški broj reagensa koji je upotrijebljen za označavanje stanica. Za potvrdu i nastavak pritisnite ENT.

Ako je unesen kataloški broj kompleta cijevi ili reagensa koji nisu navedeni za odabrani program razdvajanja, pojavljuje se poruka. Pritisnite ENT da potvrdite i ponovno unesite odgovarajući kataloški broj. Ako je uneseni broj i dalje netočan, poruka će se pojaviti još jednom. Nakon što ste pritisnuli ENT, program će se vratiti na izbornik programa (vidjeti Zaslon 7.1).

VAŽNO

- CD34 SELECTION 1 smije se upotrijebiti samo u kombinaciji s CliniMACS Tubing Set (REF 161-01), dok se CD34 SELECTION 2 smije upotrijebiti samo u kombinaciji s CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01). Pažljivo provjerite komplet cijevi prije instaliranja.
- Za ispravak greške tijekom unosa podataka pritisnite tipku „Undo" (vidjeti odjeljak „Opis" u korisničkom priručniku za CliniMACS Plus Instrument).

Ako je provjera materijala uspješna, program se nastavlja automatski s uputama za instaliranje kompleta cijevi.

▶ **Prijeđite na KORAK 3.**

7.2.3 ENRICHMENT 1.1

VAŽNO

- Program razdvajanja ENRICHMENT 1.1 smije se upotrijebiti samo s CliniMACS Tubing Set (REF 161-01).
- Pojavljuje se zaslon i dijagrami koji služe kao vodiči za postupak pojavit će se na prozoru zaslona. Provedite i provjerite svaki korak u skladu s uputama iz priručnika prije nego što prijeđete na sljedeći korak. Za ispravak greške tijekom unosa podataka pritisnite tipku „Undo" (vidjeti odjeljak „Opis" u korisničkom priručniku za CliniMACS Plus Instrument).

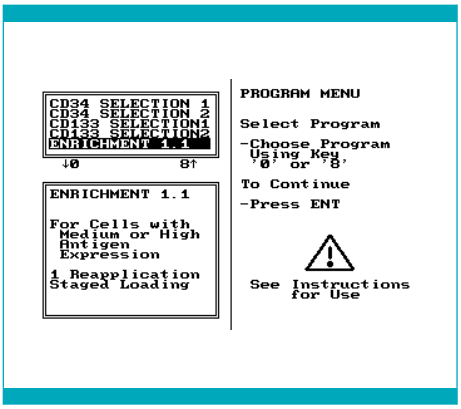
Odabir programa razdvajanja ENRICHMENT 1.1

Na prozoru se prikazuje Zaslon 7.4.

Odaberite ENRICHMENT 1.1.

Za odabir programa razdvajanja istaknite naziv programa s crnom podlogom. Pomičite oznaku gore i dolje koristeći se tipkama **0** i **8**.

Za nastavak rada s istaknutim programom pritisnite **ENT**.



Zaslon 7.4: Odabir programa razdvajanja

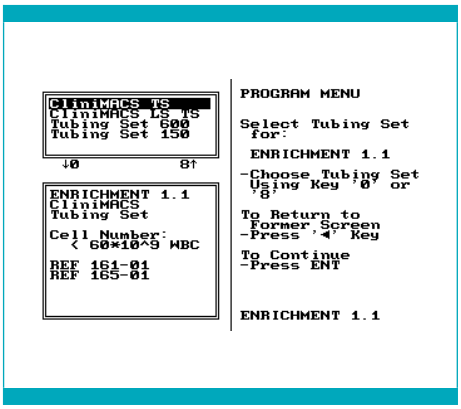
Odabir kompleta cijevi

Na prozoru se prikazuje Zaslon 7.5.

Potvrdite da je odabran odgovarajući program. U suprotnom pritisnite ◄ da se vratite na prethodni korak kako biste dopunili odabir.

Odaberite komplet cijevi tako što ćete ga istaknuti u polju s crnom podlogom u polju gore lijevo. Pomičite oznaku gore i dolje koristeći se tipkama **0** i **8**.

Na prozoru ispod prikazani su relevantni podatci poput kapaciteta i kataloškog broja odabranog kompleta cijevi.



Zaslon 7.5: Odabir kompleta cijevi

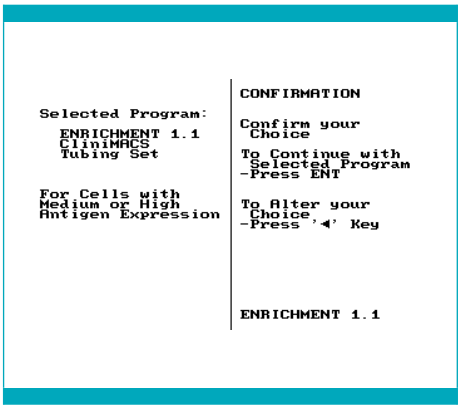
Za nastavak rada s odabranom kombinacijom programa razdvajanja i kompleta cijevi pritisnite **ENT**.

Potvrda

Na prozoru se prikazuje Zaslon 7.6.

Za potvrdu kombinacije programa razdvajanja i kompleta cijevi te nastavak pritisnite **ENT**.

U suprotnom pritisnite ◄ da se vratite na prethodni korak kako biste dopunili odabir.



Zaslon 7.6: Potvrda

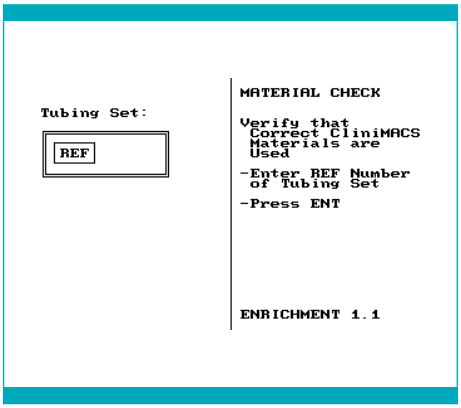
Provjera materijala

Na prozoru se prikazuje Zaslon 7.7.

Upit za kataloški broj (REF) kompleta cijevi služi kao sigurnosna provjera kako bi se potvrdilo da se odabrani komplet cijevi može upotrebljavati s odabranim programom.

Unesite kataloški broj odabranog kompleta cijevi i pritisnite **ENT** da nastavite.

Ako je unesen neodgovarajući kataloški broj, pojavljuje se poruka. Za potvrdu pritisnite **ENT** i unesite odgovarajući kataloški broj. Ako je uneseni broj i dalje pogrešan, poruka će se pojaviti još jednom. Nakon što ste pritisnuli **ENT**, program će se vratiti na izbornik programa (vidjeti Zaslon 7.4).



Zaslon 7.7: Provjera materijala

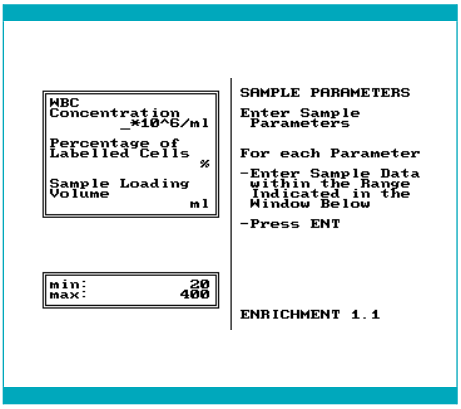
Unos parametara uzorka

Ako je provjera materijala uspješna, program se nastavlja automatski s upitom za parametre uzorka koji su potrebni za prilagodbu razdvajanja svakom pojedinačnom uzorku i pružanje rukovatelju važnih informacija za potrebni pufer i volumene vrećice.

Na prozoru se prikazuje Zaslon 7.8.

1. Započnite s unošenjem WBC koncentracije uzorka. Dopušteni je raspon prikazan u polju na donjoj lijevoj strani. Pritisnite ◄ da ispravite pogrešan unos.

   Potvrdite da unesena vrijednost odražava vrijednost uzorka. U suprotnom obrada uzorka neće biti optimalna. Da biste nastavili sa sljedećim unosom, pritisnite **ENT**.



Zaslon 7.8: Unos parametara uzorka

VAŽNO

Svi potrebni parametri uzorka odnose se na uzorak nakon označavanja stanica i postupka ispiranja. Dopušteni raspon prikazan u polju na donjoj lijevoj strani uvijek uzima u obzir prethodni unos. Nakon svakog unosa softver izračunava i prilagođava prihvaćeni raspon sljedećeg upita.

⚠ OPREZ

Specificiranje pogrešnih parametara za posljedicu može imati neoptimalnu obradu uzorka i može povećati rizik od gubitka ciljnih stanica. Unošenje vrijednosti za WBC koncentraciju i/ili postotka označenih stanica koje su niže od stvarnih vrijednosti uzorka može dovesti do gubitka stanica zbog preopterećenja sustava. Unošenje nižeg volumena uzorka za posljedicu može imati gubitak stanica zbog preopterećenja ili čak nepotpunu obrade uzorka. Ako je specifikacija bilo kojeg od tri parametra previsoka, to će za posljedicu imati povećano vrijeme obrade i povećan volumen ciljane frakcije stanica. Uvijek potvrdite da ste unijeli odgovarajuće parametre.

2. Unesite postotak označenih stanica. Potvrdite da unesena vrijednost odražava vrijednost uzorka. U suprotnom obrada uzorka neće biti optimalna (vidjeti „Važno"). Da biste nastavili sa sljedećim unosom, pritisnite **ENT**.

3. Unesite konačni volumen uzorka stanica. Potvrdite da unesena vrijednost odražava vrijednost uzorka. U suprotnom obrada uzorka neće biti optimalna (vidjeti „Važno").

Za nastavak pritisnite **ENT**.

Izračun

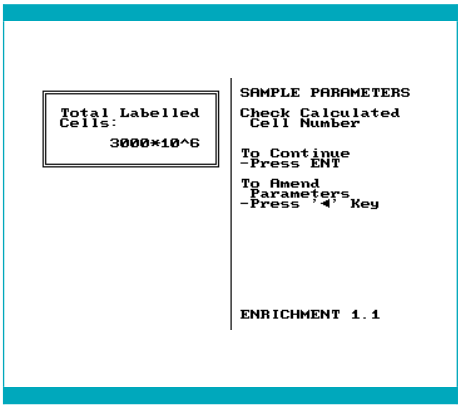
CliniMACS Plus softver izračunava ukupan broj označenih stanica kako bi se provjerilo je li kapacitet razdvajanja dostatan.

Rezultat je prikazan na jednom od dva moguća zaslona:

- Rezultat izračuna prikazan je na zaslonu sličnom Zaslon 7.9. Potvrdite da je izračunati broj označenih stanica točan.

  Za nastavak pritisnite **ENT**.

  Moguć je ispravak podataka. Pritisnite ◄ da se vratite na prethodni zaslon radi ispravka.

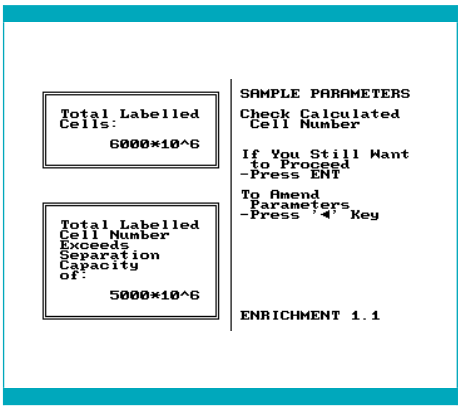


Zaslon 7.9: Izračun

- Ako izračunati broj označenih stanica premašuje kapacitet razdvajanja sustava CliniMACS Plus, prikazuje se zaslon sličan Zaslon 7.10. Potvrdite da su uneseni točni parametri uzorka te da je izračunati broj stanica točan. Pritisnite ◄ da se vratite na prethodni Zaslon 7.8 i ispravite parametre uzorka.

  Radi izbjegavanja preopterećenja sustava podijelite uzorak i odredite volumen svakog dijela. Pritisnite ◄ da se vratite na prethodni Zaslon 7.8. Unesite uzorke parametra za prvi alikvot uzorka i nastavite s razdvajanjem tog dijela. Nakon što se razdvajanje dovrši, započnite drugo razdvajanje s drugim alikvotom uz primjenu novog kompleta cijevi.

  Za nastavak pritisnite **ENT**.



Zaslon 7.10: Izračun: broj stanica premašuje kapacitet razdvajanja

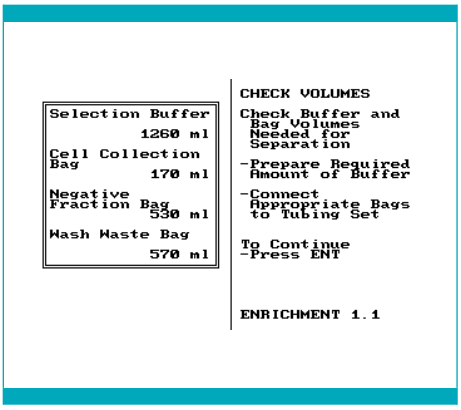
Informacije o volumenu

Iz ukupnog broja označenih stanica (vidjeti odjeljak „Izračun") softver izračunava broj faza razdvajanja, količinu pufera potrebnu za kompletno razdvajanje i volumene tekućina koje će se prikupiti u vrećice Negative Fraction Bag, Buffer Waste Bag i Cell Collection Bag.

Standardne vrijednosti su sljedeće:

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

Ako jedna od izračunatih vrijednosti premaši ove standardne vrijednosti, Zaslon 7.11 pojavljuje se da informira o količini tekućine koja će biti potrebna i prikupljena tijekom procesa razdvajanja. Zamijenite vrećice isporučene s kompletom cijevi (kapacitet približno 500 mL) alternativnim vrećicama odgovarajuće veličine, ako je zamjena potrebna. Vrećice koje su originalno priključene na komplet cijevi spojene su luer spojevima. Vrećice koje zamjenjuju originalne vrećice trebaju imati ženski luer priključak. Standardne se vrećice mogu spojiti preko priključka Luer/Spike Interconnector.



Zaslon 7.11: Provjera volumena

1. Potvrdite da je potrebna količina pufera dostupna. Nemojte priključivati više od tri litre pufera na vješalicu za vrećicu.

   OBAVIJEST

   Rizik od oštećenja instrumenta. Preopterećenje vješalica za vrećicu može oštetiti instrument. Nosivi kapacitet jedne vješalice za vrećicu je 3 kg. Nemojte preopterećivati vješalice za vrećice.

2. Otvorite pladanj kompleta cijevi pod sterilnim uvjetima i zamijenite originalne vrećice većim vrećicama ako je potrebno. Osigurajte neometan protok do tih vrećica.

3. Priključite vrećicu Cell Collection Bag dostatne veličine na slobodan luer priključak. Ako nije specificirano na Zaslon 7.11, maksimalni obujam eluiranja ciljane frakcije stanica iznosi 150 mL. Pobrinite se da je moguć neometan protok do vrećice Cell Collection Bag.

VAŽNO

- Osigurajte da je potrebna količina pufera dostupna i da je volumen vrećica spomenutih na Zaslon 7.11 dostatan. U suprotnom učinkovitost razdvajanja može biti umanjena.
- Sve se preinake na kompletima cijevi CliniMACS Tubing Sets moraju provoditi pod sterilnim uvjetima, npr. u laminarnom kabinetu.
- Za daljnju analizu ili obradu stanica imajte na umu da volumeni navedeni na Zaslon 7.11 nisu točni volumeni, nego volumeni unutar sigurnosnih zahtjeva.

4. Provjerite luer lock priključke na kolonama. Luer lock priključci moraju biti čvrsto zatvoreni.

Za nastavak pritisnite **ENT**.

Program se automatski nastavlja s uputama za instaliranje kompleta cijevi na instrumentu.

▶ **Prijeđite na KORAK 3.**

7.2.4 ENRICHMENT 3.2

VAŽNO

- Program razdvajanja ENRICHMENT 3.2 smije se upotrijebiti samo s CliniMACS Tubing Set (REF 161-01).
- Pojavljuje se zaslon i dijagrami koji služe kao vodiči za postupak pojavit će se na prozoru zaslona. Provedite i provjerite svaki korak u skladu s uputama iz priručnika prije nego što prijeđete na sljedeći korak. Za ispravak greške tijekom unosa podataka pritisnite tipku „Undo" (vidjeti odjeljak „Opis" u korisničkom priručniku za CliniMACS Plus Instrument).

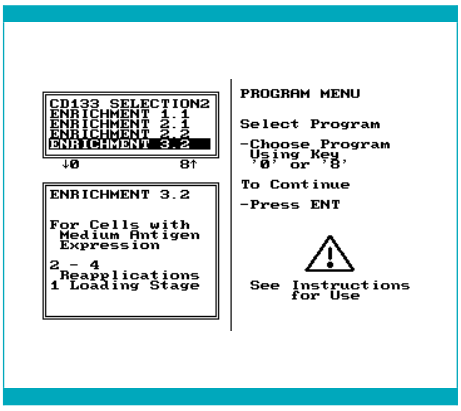
Odabir programa razdvajanja ENRICHMENT 3.2

Na prozoru se prikazuje Zaslon 7.12.

Odaberite ENRICHMENT 3.2.

Za odabir programa razdvajanja istaknite naziv programa s crnom podlogom. Pomičite oznaku gore i dolje koristeći se tipkama **0** i **8**.

Za nastavak rada s istaknutim programom pritisnite **ENT**.



Zaslon 7.12: Odabir programa razdvajanja

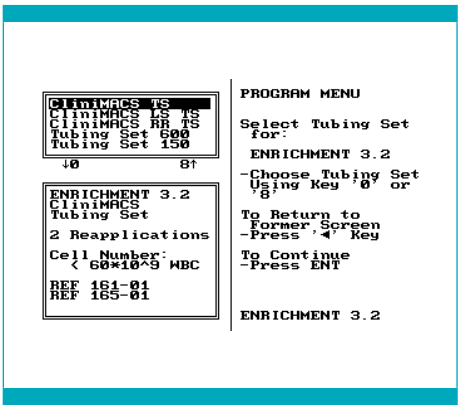
Odabir kompleta cijevi

Na prozoru se prikazuje Zaslon 7.13.

Potvrdite da je odabran odgovarajući program. U suprotnom pritisnite ◄ da se vratite na prethodni korak kako biste dopunili odabir.

Odaberite komplet cijevi tako što ćete ga istaknuti u polju s crnom podlogom na lijevoj strani. Pomičite označeno polje gore i dolje koristeći se tipkama **0** i **8**.

Na prozoru ispod prikazani su relevantni podatci poput kapaciteta i kataloškog broja odabranog kompleta cijevi.



Zaslon 7.13: Odabir kompleta cijevi

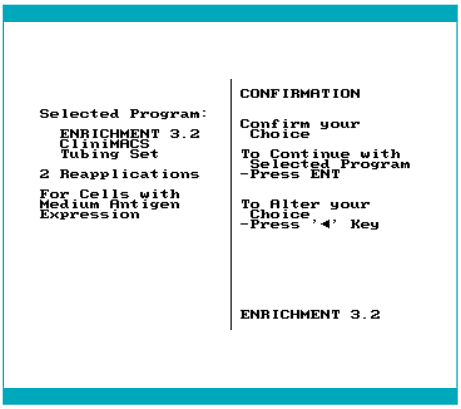
Za nastavak rada s odabranom kombinacijom programa razdvajanja i kompleta cijevi pritisnite **ENT**.

Potvrda

Na prozoru se prikazuje Zaslon 7.14.

Za potvrdu kombinacije programa razdvajanja i kompleta cijevi te nastavak pritisnite **ENT**.

U suprotnom pritisnite ◄ da se vratite na prethodni korak kako biste dopunili odabir.



Zaslon 7.14: Potvrda

Provjera materijala

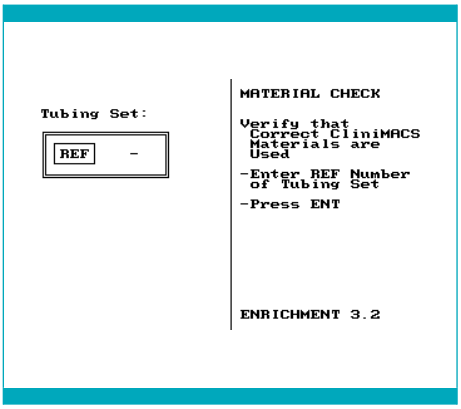
Na prozoru se prikazuje Zaslon 7.15.

Upit za kataloški broj (REF) kompleta cijevi služi kao sigurnosna provjera kako bi se potvrdilo da se odabrani komplet cijevi može upotrebljavati s odabranim programom.

Unesite kataloški broj odabranog kompleta cijevi i pritisnite **ENT** da nastavite.

Ako je unesen neodgovarajući kataloški broj, pojavljuje se poruka.

Za potvrdu pritisnite **ENT** i unesite odgovarajući kataloški broj. Ako je uneseni broj i dalje pogrešan, poruka će se pojaviti još jednom. Nakon što ste pritisnuli **ENT**, program će se vratiti na izbornik programa (vidjeti Zaslon 7.12).



Zaslon 7.15: Provjera materijala

Ako je provjera materijala uspješna, program se nastavlja automatski s uputama za instaliranje kompleta cijevi.

▶ **Prijeđite na KORAK 3.**

7.2.5 DEPLETION 2.1

VAŽNO

- Program razdvajanje DEPLETION 2.1 smije se upotrijebiti samo s CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01).
- Pojavljuje se zaslon i dijagrami koji služe kao vodiči za postupak pojavit će se na prozoru zaslona. Provedite i provjerite svaki korak u skladu s uputama iz priručnika prije nego što prijeđete na sljedeći korak. Za ispravak greške tijekom unosa podataka pritisnite tipku „Undo" (vidjeti odjeljak „Opis" u korisničkom priručniku za CliniMACS Plus Instrument).

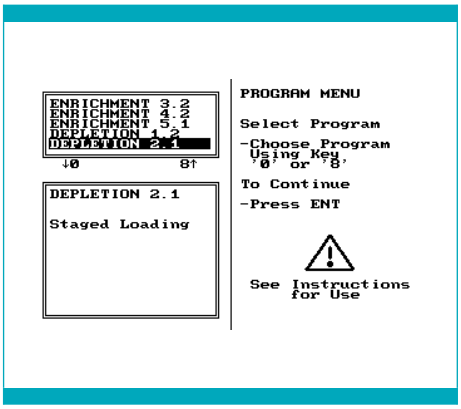
Odabir programa razdvajanja DEPLETION 2.1

Na prozoru se prikazuje Zaslon 7.16.

Odaberite DEPLETION 2.1.

Za odabir programa razdvajanja istaknite naziv programa s crnom podlogom. Pomičite oznaku gore i dolje koristeći se tipkama **0** i **8**.

Za nastavak rada s istaknutim programom pritisnite **ENT**.



Zaslon 7.16: Odabir programa razdvajanja

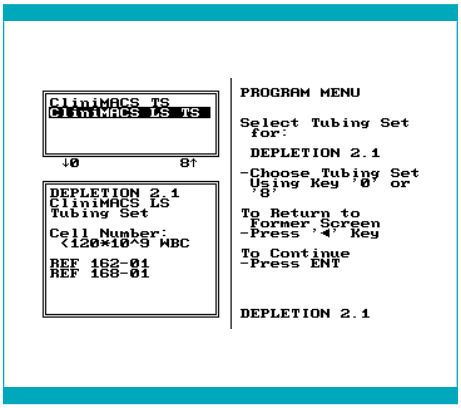
Odabir kompleta cijevi

Na prozoru se prikazuje Zaslon 7.17.

Potvrdite da je odabran odgovarajući program.

U suprotnom pritisnite ◀ da se vratite na prethodni korak kako biste dopunili odabir.

Odaberite komplet cijevi tako što ćete ga istaknuti u polju s crnom podlogom u polju gore lijevo. Pomičite oznaku gore i dolje koristeći se tipkama **0** i **8**.



Zaslon 7.17: Odabir kompleta cijevi

Na prozoru ispod prikazani su relevantni podatci poput kapaciteta i kataloškog broja odabranog kompleta cijevi.

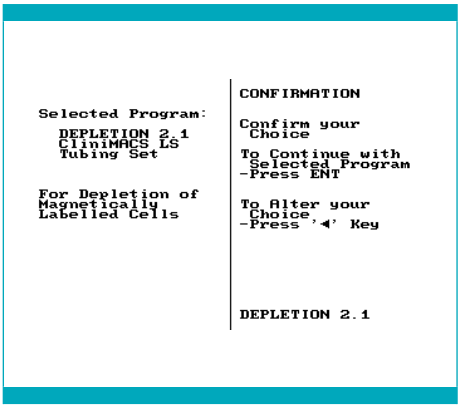
Za nastavak rada s odabranom kombinacijom programa razdvajanja i kompleta cijevi pritisnite **ENT**.

Potvrda

Na prozoru se prikazuje Zaslon 7.18.

Za potvrdu kombinacije programa razdvajanja i kompleta cijevi te nastavak pritisnite **ENT**.

U suprotnom pritisnite ◄ da se vratite na prethodni korak kako biste dopunili odabir.



Zaslon 7.18: Potvrda

Provjera materijala

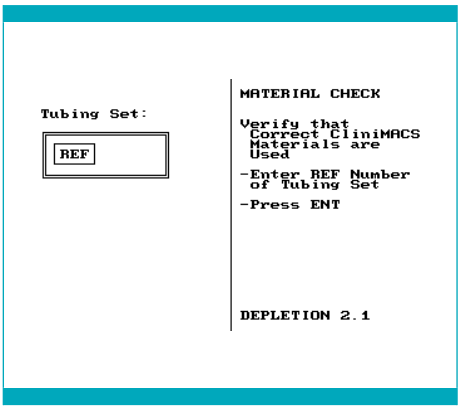
Na prozoru se prikazuje Zaslon 7.19.

Upit za kataloški broj (REF) kompleta cijevi služi kao sigurnosna provjera kako bi se potvrdilo da se komplet cijevi koji je rukovatelj odabrao može upotrebljavati.

Unesite kataloški broj odabranog kompleta cijevi i pritisnite **ENT** da nastavite.

Ako je unesen neodgovarajući kataloški broj, pojavljuje se poruka.

Za potvrdu pritisnite **ENT** i unesite odgovarajući kataloški broj. Ako je uneseni broj i dalje pogrešan, poruka će se pojaviti još jednom. Nakon što ste pritisnuli **ENT**, program će se vratiti na izbornik programa (vidjeti Zaslon 7.16).

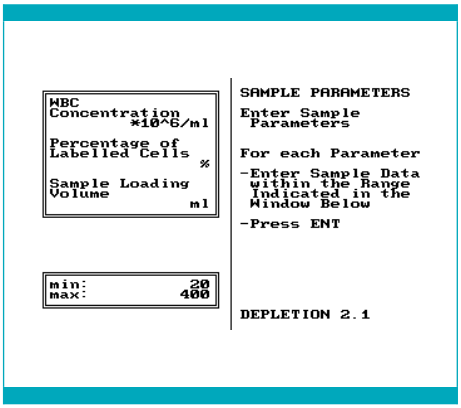


Zaslon 7.19: Provjera materijala

Unos parametara uzorka

Ako je provjera materijala uspješna, program se nastavlja automatski s upitom za parametre uzorka koji su potrebni za prilagodbu razdvajanja svakom pojedinačnom uzorku i pružanje rukovatelju važnih informacija za potrebni pufer i volumene vrećice.

Na prozoru se prikazuje Zaslon 7.20.



Zaslon 7.20: Unos parametara uzorka

1. Započnite s unošenjem WBC koncentracije uzorka. Dopušteni je raspon prikazan u polju na donjoj lijevoj strani. Pritisnite ◄ da ispravite pogrešan unos.

   Potvrdite da unesena vrijednost odražava vrijednost uzorka. U suprotnom obrada uzorka neće biti optimalna.

   VAŽNO
   Svi potrebni parametri uzorka odnose se na uzorak nakon označavanja stanica i postupka ispiranja. Dopušteni raspon prikazan u polju na donjoj lijevoj strani uvijek uzima u obzir prethodni unos. Nakon svakog unosa softver izračunava i prilagođava prihvaćeni raspon sljedećeg upita.

   ⚠ OPREZ

   Specificiranje pogrešnih parametara za posljedicu može imati neoptimalnu obradu uzorka i može povećati rizik od gubitka ciljnih stanica. Unošenje vrijednosti za WBC koncentraciju i/ili postotka označenih stanica koje su niže od stvarnih vrijednosti uzorka može dovesti do gubitka stanica zbog preopterećenja sustava. Unošenje nižeg volumena uzorka za posljedicu može imati gubitak stanica zbog preopterećenja ili čak nepotpunu obradu uzorka. Ako je specifikacija bilo kojeg od tri parametra previsoka, to će za posljedicu imati povećano vrijeme obrade i povećan volumen ciljane frakcije stanica. Uvijek potvrdite da ste unijeli odgovarajuće parametre.

   Da biste nastavili sa sljedećim unosom, pritisnite **ENT**.

2. Unesite postotak označenih stanica. Potvrdite da unesena vrijednost odražava vrijednost uzorka. U suprotnom obrada uzorka neće biti optimalna (vidjeti „Važno").

   Da biste nastavili sa sljedećim unosom, pritisnite **ENT**.

3. Unesite konačni volumen uzorka stanica. Potvrdite da unesena vrijednost odražava vrijednost uzorka. U suprotnom obrada uzorka neće biti optimalna (vidjeti „Važno").

Za nastavak pritisnite **ENT**.

Izračun

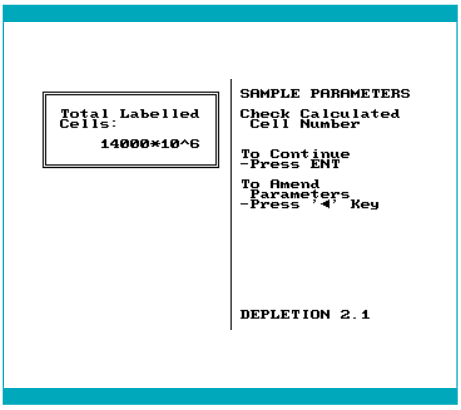
CliniMACS Plus softver izračunava ukupan broj označenih stanica kako bi se provjerilo je li kapacitet razdvajanja dostatan.

Rezultat je prikazan na jednom od dva moguća zaslona:

- Rezultat izračuna prikazan je na zaslonu sličnom Zaslon 7.21. Potvrdite da je izračunati broj označenih stanica točan.

  Za nastavak pritisnite **ENT**.

  Moguć je ispravak podataka. Pritisnite ◄ da se vratite na prethodni zaslon radi ispravka.

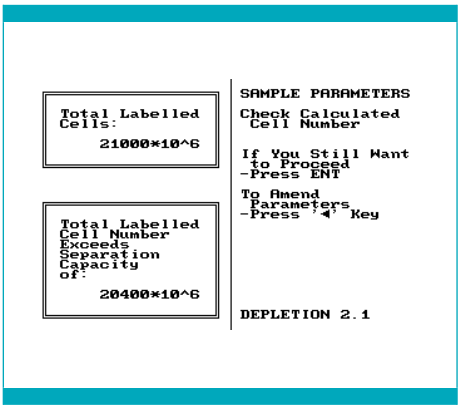


Zaslon 7.21: Izračun

- Ako izračunati broj označenih stanica premašuje kapacitet razdvajanja sustava CliniMACS Plus, prikazuje se zaslon sličan Zaslon 7.22. Potvrdite da su uneseni točni parametri uzorka te da je izračunati broj stanica točan. Pritisnite ◄ da se vratite na prethodni zaslon i ispravite parametre uzorka.

  Radi izbjegavanja preopterećenja sustava podijelite uzorak i odredite volumen svakog dijela. Pritisnite ◄ da se vratite na prethodni Zaslon 7.20. Unesite uzorke parametra za prvi alikvot uzorka i nastavite s razdvajanjem tog dijela. Nakon što se razdvajanje dovrši, započnite drugo razdvajanje s drugim alikvotom uz primjenu novog kompleta cijevi.

  Za nastavak pritisnite **ENT**.



Zaslon 7.22: Izračun: broj stanica premašuje kapacitet razdvajanja

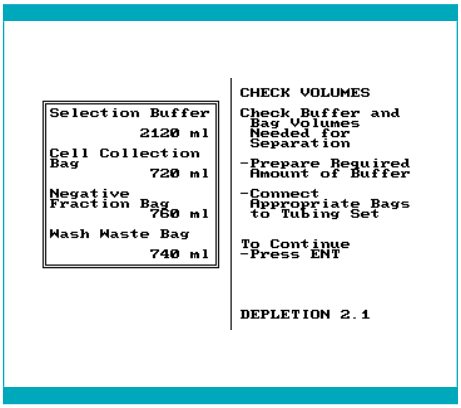
Informacije o volumenu

Iz ukupnog broja označenih stanica (vidjeti odjeljak „Izračun") softver izračunava broj faza razdvajanja, količinu pufera potrebnu za kompletno razdvajanje i volumene tekućina koje će se prikupiti u vrećice Negative Fraction Bag, Buffer Waste Bag i Cell Collection Bag.

Standardne vrijednosti su sljedeće:

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

Ako jedna od izračunatih vrijednosti premaši ove standardne vrijednosti, Zaslon 7.23 pojavljuje se da informira o količini tekućine koja će biti potrebna i prikupljena tijekom procesa razdvajanja. Zamijenite vrećice isporučene s kompletom cijevi (kapacitet približno 500 mL) alternativnim vrećicama odgovarajuće veličine, ako je zamjena potrebna. Vrećice koje su originalno priključene na komplet cijevi spojene su luer spojevima. Vrećice koje zamjenjuju originalne vrećice trebaju imati ženski luer priključak. Standardne se vrećice mogu spojiti preko priključka Luer/Spike Interconnector.



Zaslon 7.23: Provjera volumena

1. Potvrdite da je potrebna količina pufera dostupna. Nemojte priključivati više od tri litre pufera na vješalicu za vrećicu.

   OBAVIJEST

   Rizik od oštećenja instrumenta. Preopterećenje vješalica za vrećicu može oštetiti instrument. Nosivi kapacitet jedne vješalice za vrećicu je 3 kg. Nemojte preopterećivati vješalice za vrećice.

2. Otvorite pladanj kompleta cijevi pod sterilnim uvjetima i zamijenite originalne vrećice većim vrećicama ako je potrebno. Osigurajte neometan protok do tih vrećica.

3. Priključite vrećicu Cell Collection Bag dostatne veličine na slobodan luer priključak. Ako nije specificirano na Zaslon 7.23, maksimalni obujam eluiranja ciljane frakcije stanica iznosi 150 mL. Pobrinite se da je moguć neometan protok do vrećice Cell Collection Bag.

   VAŽNO

   - Osigurajte da je potrebna količina pufera dostupna i da je volumen vrećica spomenutih na Zaslon 7.23 dostatan. U suprotnom učinkovitost razdvajanja može biti umanjena.
   - Sve se preinake na kompletima cijevi CliniMACS Tubing Sets moraju provoditi pod sterilnim uvjetima, npr. u laminarnom kabinetu.
   - Za daljnju analizu ili obradu stanica imajte na umu da volumeni navedeni na Zaslon 7.23 nisu točni volumeni, nego volumeni unutar sigurnosnih zahtjeva.

4. Provjerite luer lock priključke na kolonama. Luer lock priključci moraju biti čvrsto zatvoreni.

Za nastavak pritisnite **ENT**.

Program se automatski nastavlja s uputama za instaliranje kompleta cijevi na instrumentu.

▶ **Prijeđite na KORAK 3.**

7.2.6 DEPLETION 3.1

VAŽNO

- Program razdvajanja DEPLETION 3.1 smije se upotrijebiti samo s CliniMACS Depletion Tubing Set (REF 261-01).
- Pojavljuje se zaslon i dijagrami koji služe kao vodiči za postupak pojavit će se na prozoru zaslona. Provedite i provjerite svaki korak u skladu s uputama iz priručnika prije nego što prijeđete na sljedeći korak. Za ispravak greške tijekom unosa podataka pritisnite tipku „Undo" (vidjeti odjeljak „Opis" u korisničkom priručniku za CliniMACS Plus Instrument).

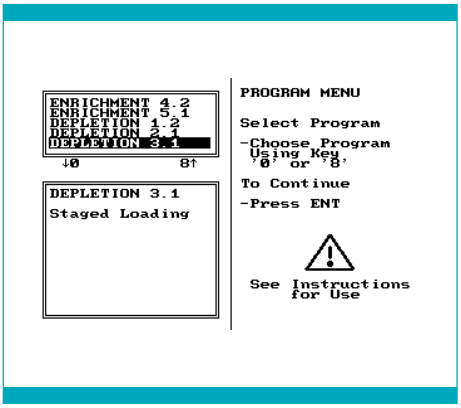
Odabir programa razdvajanja DEPLETION 3.1

Na prozoru se prikazuje Zaslon 7.24.

Odaberite DEPLETION 3.1.

Za odabir programa razdvajanja istaknite naziv programa s crnom podlogom. Pomičite oznaku gore i dolje koristeći se tipkama **0** i **8**.

Za nastavak rada s istaknutim programom pritisnite **ENT**.



Zaslon 7.24: Odabir programa razdvajanja

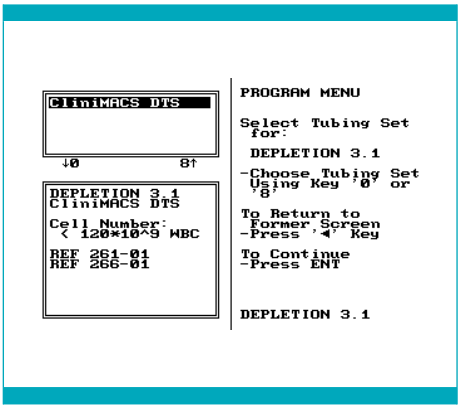
Odabir kompleta cijevi

Na prozoru se prikazuje Zaslon 7.25.

Potvrdite da je odabran odgovarajući program. U suprotnom pritisnite ◄ da se vratite na prethodni korak kako biste dopunili odabir.

Odaberite komplet cijevi tako što ćete ga istaknuti u polju s crnom podlogom u polju gore lijevo. Pomičite oznaku gore i dolje koristeći se tipkama **0** i **8**.

Na prozoru ispod prikazani su relevantni podatci poput kapaciteta i kataloškog broja odabranog kompleta cijevi.



Zaslon 7.25: Odabir kompleta cijevi

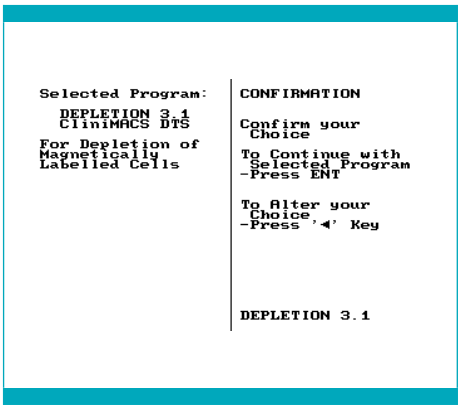
Za nastavak rada s odabranom kombinacijom programa razdvajanja i kompleta cijevi pritisnite **ENT**.

Potvrda

Na prozoru se prikazuje Zaslon 7.26.

Za potvrdu kombinacije programa razdvajanja i kompleta cijevi te nastavak pritisnite ENT.

U suprotnom pritisnite ◄ da se vratite na prethodni korak kako biste dopunili odabir.



Zaslon 7.26: Potvrda

Provjera materijala

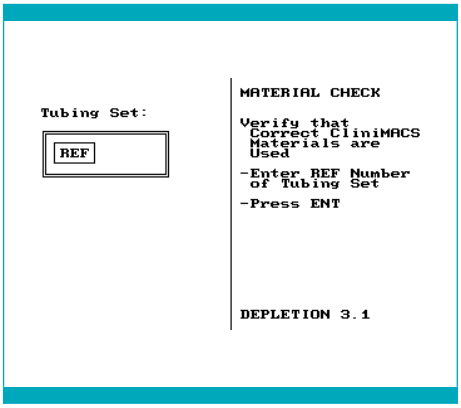
Na prozoru se prikazuje Zaslon 7.27.

Upit za kataloški broj (REF) kompleta cijevi služi kao sigurnosna provjera kako bi se potvrdilo da se komplet cijevi koji je rukovatelj odabrao može upotrebljavati.

Unesite kataloški broj odabranog kompleta cijevi i pritisnite ENT da nastavite.

Ako je unesen neodgovarajući kataloški broj, pojavljuje se poruka.

Za potvrdu pritisnite ENT i unesite odgovarajući kataloški broj. Ako je uneseni broj i dalje pogrešan, poruka će se pojaviti još jednom. Nakon što ste pritisnuli ENT, program će se vratiti na izbornik programa (vidjeti Zaslon 7.25).

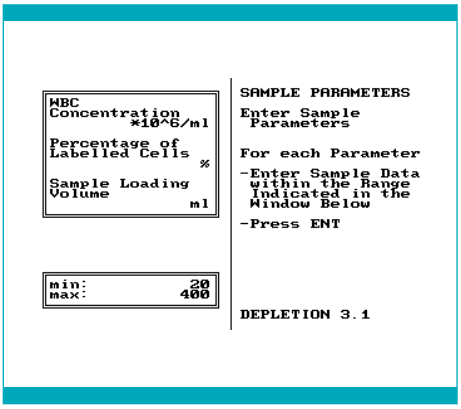


Zaslon 7.27: Provjera materijala

Unos parametara uzorka

Ako je provjera materijala uspješna, program se nastavlja automatski s upitom za parametre uzorka koji su potrebni za prilagodbu razdvajanja svakom pojedinačnom uzorku i pružanje rukovatelju važnih informacija za potrebni pufer i volumene vrećice.

Na prozoru se prikazuje Zaslon 7.28.



Zaslon 7.28: Unos parametara uzorka

1. Započnite s unošenjem WBC koncentracije uzorka. Dopušteni je raspon prikazan u polju na donjoj lijevoj strani. Pritisnite ◄ da ispravite pogrešan unos.

   Potvrdite da unesena vrijednost odražava vrijednost uzorka. U suprotnom obrada uzorka neće biti optimalna.

   VAŽNO
   Svi potrebni parametri uzorka odnose se na uzorak nakon označavanja stanica i postupka ispiranja. Dopušteni raspon prikazan u polju na donjoj lijevoj strani uvijek uzima u obzir prethodni unos. Nakon svakog unosa softver izračunava i prilagođava prihvaćeni raspon sljedećeg upita.

   ⚠ OPREZ

   Specificiranje pogrešnih parametara za posljedicu može imati neoptimalnu obradu uzorka i može povećati rizik od gubitka ciljnih stanica. Unošenje vrijednosti za WBC koncentraciju i/ili postotka označenih stanica koje su niže od stvarnih vrijednosti uzorka može dovesti do gubitka stanica zbog preopterećenja sustava. Unošenje nižeg volumena uzorka za posljedicu može imati gubitak stanica zbog preopterećenja ili čak nepotpunu obradu uzorka. Ako je specifikacija bilo kojeg od tri parametra previsoka, to će za posljedicu imati povećano vrijeme obrade i povećan volumen ciljane frakcije stanica. Uvijek potvrdite da ste unijeli odgovarajuće parametre.

   Da biste nastavili sa sljedećim unosom, pritisnite **ENT**.

2. Unesite postotak označenih stanica. Potvrdite da unesena vrijednost odražava vrijednost uzorka. U suprotnom obrada uzorka neće biti optimalna (vidjeti „Važno").

   Da biste nastavili sa sljedećim unosom, pritisnite **ENT**.

3. Unesite konačni volumen uzorka stanica. Potvrdite da unesena vrijednost odražava vrijednost uzorka. U suprotnom obrada uzorka neće biti optimalna (vidjeti „Važno").

Za nastavak pritisnite **ENT**.

Izračun

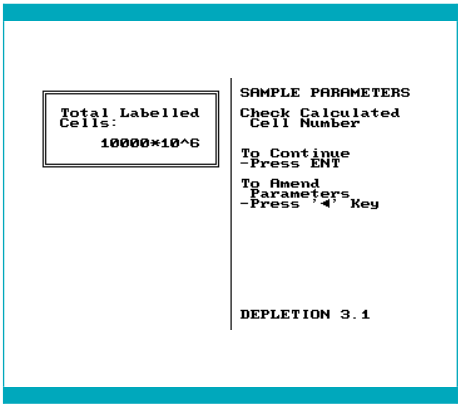
CliniMACS Plus softver izračunava ukupan broj označenih stanica kako bi se provjerilo je li kapacitet razdvajanja dostatan.

Rezultat je prikazan na jednom od dva moguća zaslona:

- Rezultat izračuna prikazan je na zaslonu sličnom Zaslon 7.29. Potvrdite da je izračunati broj označenih stanica točan.

  Za nastavak pritisnite **ENT**.

  Moguć je ispravak podataka. Pritisnite ◄ da se vratite na prethodni zaslon radi ispravka.

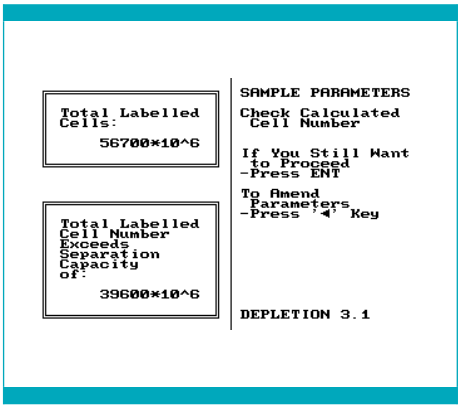


Zaslon 7.29: Odabir kompleta cijevi

- Ako izračunati broj označenih stanica premašuje kapacitet razdvajanja sustava CliniMACS Plus, prikazuje se zaslon sličan Zaslon 7.30. Potvrdite da su uneseni točni parametri uzorka te da je izračunati broj stanica točan. Pritisnite ◄ da se vratite na prethodni zaslon i ispravite parametre uzorka.

  Radi izbjegavanja preopterećenja sustava podijelite uzorak i odredite volumen svakog dijela. Pritisnite ◄ da se vratite na prethodni Zaslon 7.28. Unesite uzorke parametra za prvi alikvot uzorka i nastavite s razdvajanjem tog dijela. Nakon što se razdvajanje dovrši, započnite drugo razdvajanje s drugim alikvotom uz primjenu novog kompleta cijevi.

  Za nastavak pritisnite **ENT**.



Zaslon 7.30: Izračun: broj stanica premašuje kapacitet razdvajanja

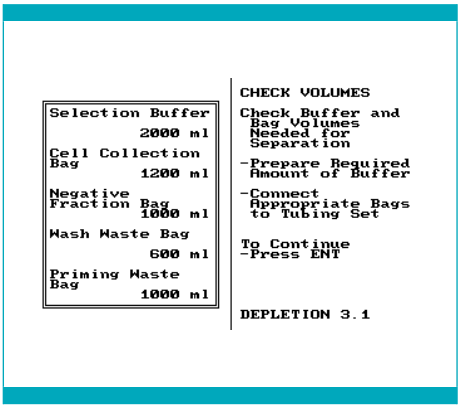
Informacije o volumenu

Iz ukupnog broja označenih stanica (vidjeti odjeljak „Izračun") softver izračunava broj faza razdvajanja, količinu pufera potrebnu za kompletno iscrpljivanje i volumene tekućina koje će se prikupiti u vrećice Cell Collection Bag, Non-Target Cell Bag i Reapplication Bag.

VAŽNO

- Vrećica Negative Fraction Bag odgovara vrećici Non-Target Cell Bag.
- Vrećica Priming Waste Bag odgovara vrećici Reapplication Bag.

Ako jedna od izračunatih vrijednosti premaši ove standardne vrijednosti, zaslon sličan Zaslon 7.31 pojavljuje se kako bi informirao o količini tekućine koja će biti potrebna i prikupljena tijekom procesa razdvajanja. Zamijenite vrećice isporučene s kompletom cijevi alternativnim vrećicama odgovarajuće veličine, ako je zamjena potrebna. Vrećice koje su originalno priključene na komplet cijevi spojene su luer spojevima. Vrećice koje zamjenjuju originalne vrećice trebaju imati ženski luer priključak. Standardne se vrećice mogu spojiti preko priključka Luer/Spike Interconnector.



Zaslon 7.31: Provjera volumena

1. Potvrdite da je potrebna količina pufera dostupna. Nemojte priključivati više od tri litre pufera na vješalicu za vrećicu.

   OBAVIJEST

   Rizik od oštećenja instrumenta. Preopterećenje vješalica za vrećicu može oštetiti instrument. Nosivi kapacitet jedne vješalice za vrećicu je 3 kg. Nemojte preopterećivati vješalice za vrećice.

2. Otvorite pladanj kompleta cijevi pod sterilnim uvjetima i zamijenite originalne vrećice većim vrećicama ako je potrebno. Osigurajte neometan protok do tih vrećica.

3. Ako je neophodna zamjena, zamijenite vrećicu Cell Collection Bag kompleta cijevi vrećicom za prijenos dostatne veličine. Odredite težinu nove, prazne vrećice Cell Collection Bag i zabilježite je. Pobrinite se da je moguć neometan protok do vrećice Cell Collection Bag. Alternativno priključite dodatnu vrećicu za prijenos od 600 mL na prvu vrećicu Cell Collection Bag, npr. koristeći komplet za prijenos plazme.

   VAŽNO

   - Osigurajte da je potrebna količina pufera dostupna i da je volumen vrećica spomenutih na Zaslon 7.31 dostatan. U suprotnom učinkovitost razdvajanja može biti umanjena.
   - Sve se preinake na kompletima cijevi CliniMACS Tubing Sets moraju provoditi pod sterilnim uvjetima, npr. u laminarnom kabinetu.
   - Za daljnju analizu ili obradu stanica imajte na umu da volumeni navedeni na Zaslon 7.31 nisu točni volumeni, nego volumeni unutar sigurnosnih zahtjeva.

4. Provjerite luer lock priključke na kolonama. Luer lock priključci moraju biti čvrsto zatvoreni.

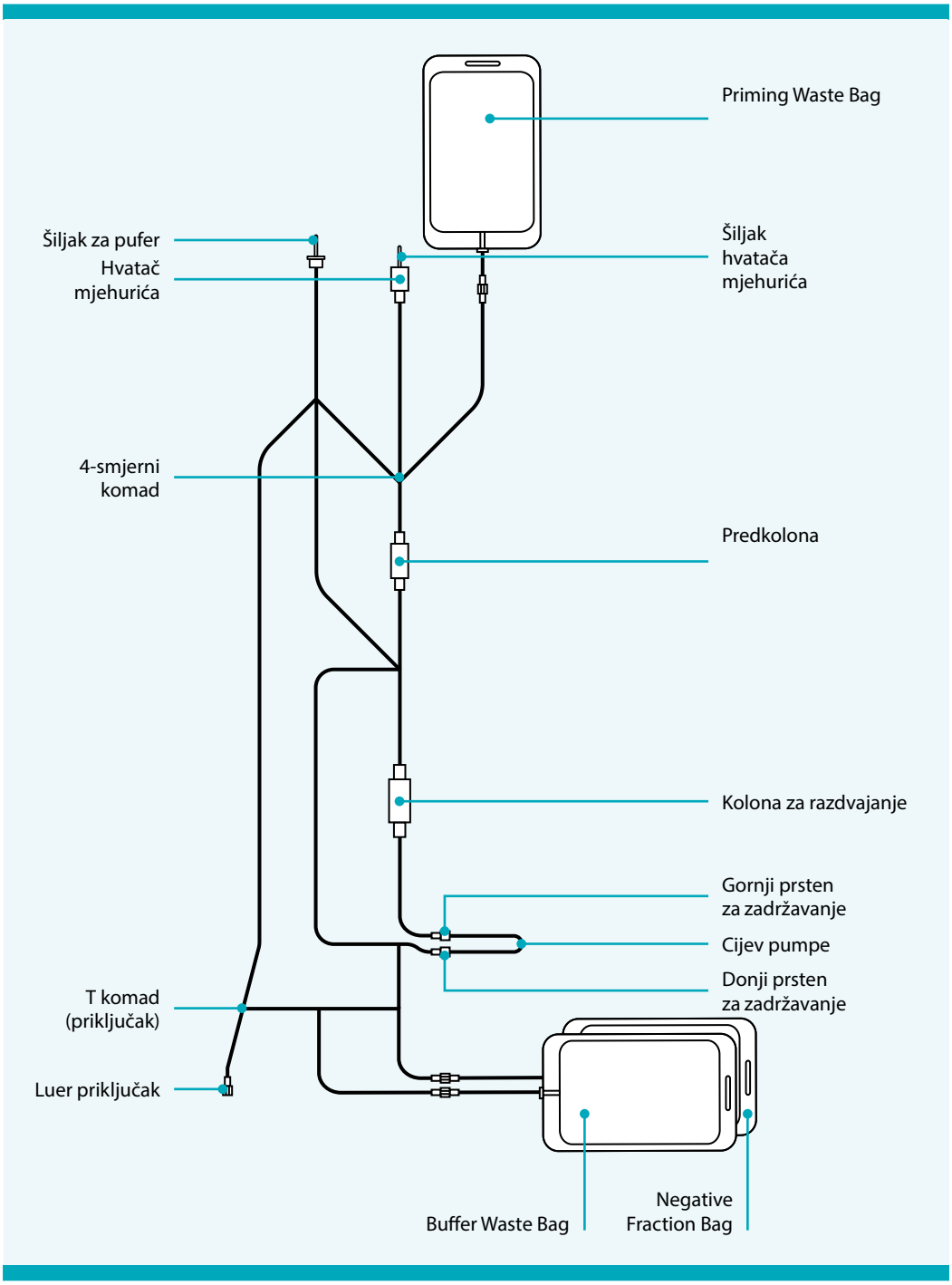
Za nastavak pritisnite **ENT**.

Program se automatski nastavlja s uputama za instaliranje kompleta cijevi na instrumentu.

▶ **Prijeđite na KORAK 3.**

7.3 KORAK 3: Instalacija kompleta cijevi CliniMACS

7.3.1 CliniMACS Tubing Set i CliniMACS Tubing Set LS

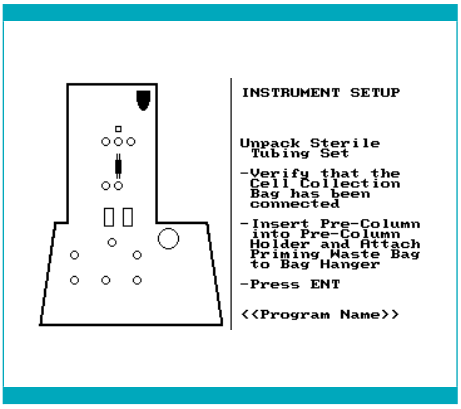


Slika 7.2: Opća konstrukcija kompleta cijevi CliniMACS (npr. CliniMACS Tubing Set)

Priprema za instalaciju kompleta cijevi

Na prozoru se prikazuje Zaslon 7.32.

Upute su prikazane na desnoj strani, a dijagram koji odgovara uputama na lijevoj strani zaslona. Trepereća svojstva na zaslonu označavaju područja od interesa.



Zaslon 7.32: Raspakiravanje kompleta cijevi

CliniMACS Tubing Set i CliniMACS Tubing Set LS isporučuju se u zatvorenim, steriliziranim pakiranjima. Svaki komplet cijevi sadrži unaprijed montiranu cijev i kolone za jedno razdvajanje stanica (vidjeti Slika 7.2). Ako je pakiranje neoštećeno, omogućen je sterilan prolaz tekućine.

⚠ UPOZORENJE

Rizik od kontaminacije. Oštećeno pakiranje ukazuje na to da komplet cijevi možda više nije sterilan i stoga se ne smije upotrebljavati. Pažljivo pregledajte ima li na pakiranju oštećenja, probušenih dijelova ili poderotina. Upotrijebite komplet cijevi samo ako je pakiranje neoštećeno i zabrtvljeno.

Napomena: na sustavu CliniMACS Plus Instrument prikazuje se izabrani naziv programa, npr. CD34 SELECTION 1, u donjem retku zaslona instrumenta. Pri bilo kojem koraku tijekom instaliranja kompleta cijevi tipka „Undo" (vidjeti „Opis" u korisničkom priručniku za CliniMACS Plus Instrument) može se pritisnuti za povratak na prethodni korak.

1. Zabilježite broj serije i rok upotrebe kompleta cijevi.

   Raspakirajte sterilni komplet cijevi pod sterilnim uvjetima (npr. u laminarnom kabinetu). Prije uporabe kompleta cijevi uklonite stezaljku korištenu za pakiranje kompleta cijevi CliniMACS Tubing Set LS. Stezaljka ima oznaku „Ukloniti prije priključenja na CliniMACS Plus Instrument".

2. Provjerite luer lock priključke za vrećice. Luer lock priključci moraju biti čvrsto zatvoreni.

Spajanje Cell Collection Bag

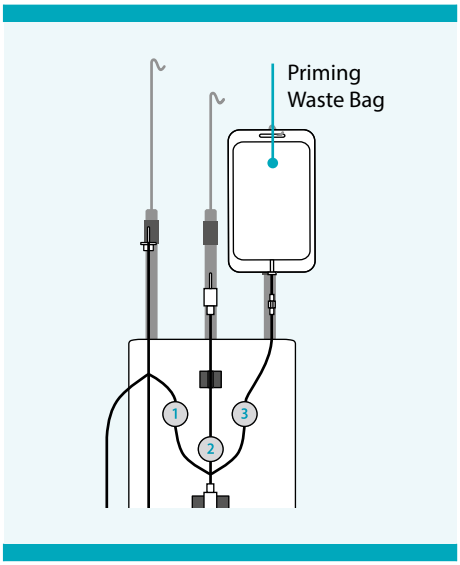
1. Zabilježite težinu prazne vrećice Cell Collection Bag.
2. U aseptičnom okruženju uklonite čepove i priključite sterilnu vrećicu Cell Collection Bag koja ima priključak Luer/Spike Interconnector na komplet cijevi prije postavljanja kompleta cijevi na CliniMACS Plus Instrument. Osigurajte da je originalna cijev vrećice Cell Collection Bag ili zatvorena stezaljkom ili zabrtvljena.

   Ako je za razdvajanje potrebno više od jedne vrećice Cell Collection Bag, spojite vrećice uz primjenu kompleta za prijenos plazme. Uvjerite se da su svi spojevi čvrsto zatvoreni.
3. Pobrinite se da je moguć neometan protok do vrećice Cell Collection Bag.
4. Prijeđite na instaliranje kompleta cijevi uz primjenu postupka opisanog ispod ili slijedeći odjeljak „Alternativna instalacija za komplete cijevi CliniMACS Tubing Sets".

Priključite vrećicu Priming Waste Bag i umetnite predkolonu

Na prozoru se prikazuje Zaslon 7.32.

1. Postavite vrećicu Priming Waste Bag na desnu vješalicu za vrećicu na instrumentu (vidjeti Slika 7.3).
2. Podesite visinu vješalice za vrećicu. Podignite ili spustite vješalicu za vrećicu kako biste prilagodili visinu veličini vrećice Priming Waste Bag. Osigurajte da je pozicionirana dovoljno visoko kako bi se spriječilo savijanje cijevi koje bi moglo ograničiti protok te da je dovoljno nisko kako bi se izbjeglo da se spojevi cijevi zategnu.
3. Stavite predkolonu u držač (vidjeti Slika 7.43).



Slika 7.3: Priključivanje vrećice Priming Waste Bag na vješalicu za vrećicu

Za nastavak pritisnite **ENT**.

Umetnite kolonu za razdvajanje i postavite ventil br. 5

Na prozoru se prikazuje Zaslon 7.33.

Ventili prikazani crnom bojom na zaslonu automatski će se otvoriti kako bi se olakšalo uvođenje cijevi.

1. Umetnite kolonu za razdvajanje u držač kolone za razdvajanje (vidjeti Slika 7.4).

   ⚠ UPOZORENJE

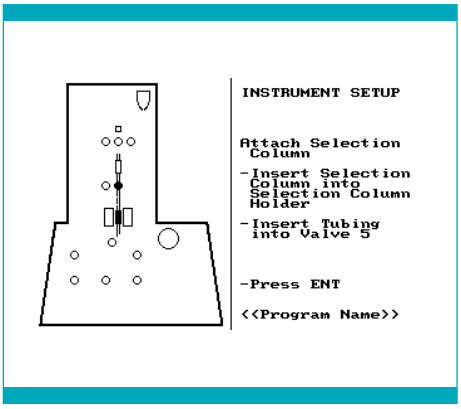
   Rizik od ozljede. Ako se kolona za razdvajanje umetne ili ukloni dok je jedinica magneta uključena, postoji rizik od ozljeda. Umetnite ili uklonite kolonu za razdvajanje samo kada je jedinica magneta isključena.

2. Stavite cijev u ventil br. 5.

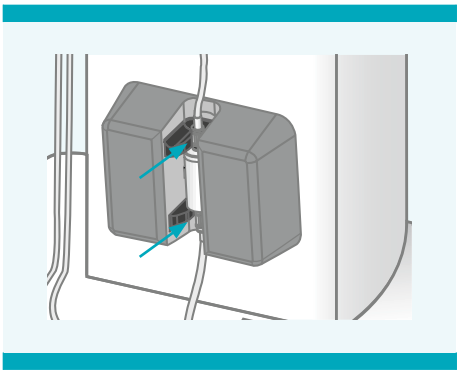
VAŽNO

- Pri provođenju svakog koraka provjerite sve cijevi i priključke kako biste potvrdili da nema prignječenih ili jako savijenih mjesta što bi moglo ograničiti protok tekućine kroz cijev. Provjerite sve ventile kako biste se uvjerili da je cijev pravilno namještena.
- Uvodite komplet cijevi samo u otvorene ventile (kada je gumb pritisnut unutra). Cijev neće pravilno uleći ako je uvedena u zatvoren ventil.
- Ako se cijev mora prilagoditi nakon što je ventil zatvoren, nemojte povlačiti cijev bez pritiskanja gumba ventila da otvorite ventil (vidjeti Slika 7.5).

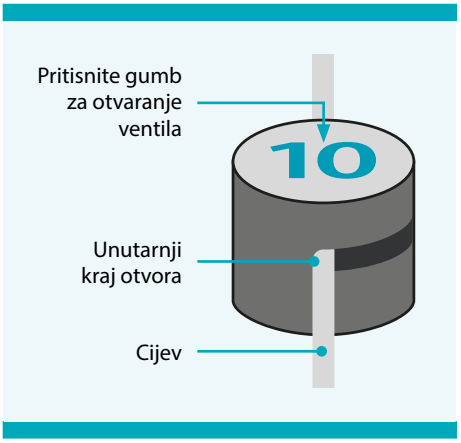
Za nastavak pritisnite **ENT**.



Zaslon 7.33: Umetnite kolonu za razdvajanje i postavite ventil br. 5



Slika 7.4: Kolona za razdvajanje u držaču kolone za razdvajanje



Slika 7.5: Pravilno uvedena cijev

Postavite ventile br. 1, 2, 3 i 4

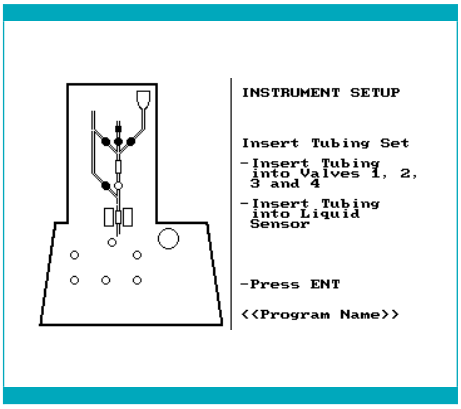
Na prozoru se prikazuje Zaslon 7.34.

1. Stavite cijev u ventil br. 4. Potvrdite da je cijev sigurno postavljena u otvor ventila (vidjeti Slika 7.5). Osobitu pažnju obratite na područje između ventila br. 4 i 5 (vidjeti Slika 7.6) i držite četverosmjerni nastavak u uspravnom položaju.
2. Uvedite cijev u ventil br. 1.
3. Pozicionirajte 4-smjerni nastavak odmah ispod ventila br. 2. Osobitu pažnju obratite na područje ispod ventila br. 2.
4. Uvedite cijev u ventil br. 2 i 3.
5. Montirajte cijev između ventila br. 2 i hvatača mjehurića u senzor tekućine. Potvrdite da je cijev postavljena pravilno u nastavak za senzor.

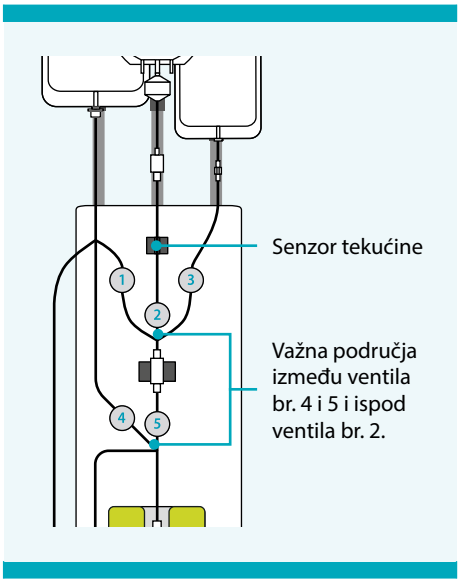
VAŽNO

Da biste osigurali pravilan rad, i senzor tekućine i cijev koja se uvodi moraju biti suhi. Pažljivo pregledajte oboje. Ako ima bilo kakve tekućine, osušite to područje mekom krpom koja se ne linja.

Za nastavak pritisnite **ENT**.



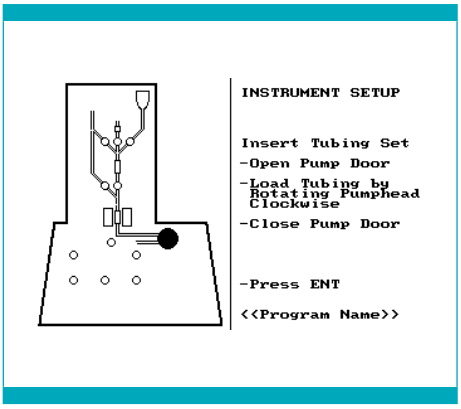
Zaslon 7.34: Postavite ventile br. 1, 2, 3, 4 i senzor tekućine.



Slika 7.6: Cijev u ventilima

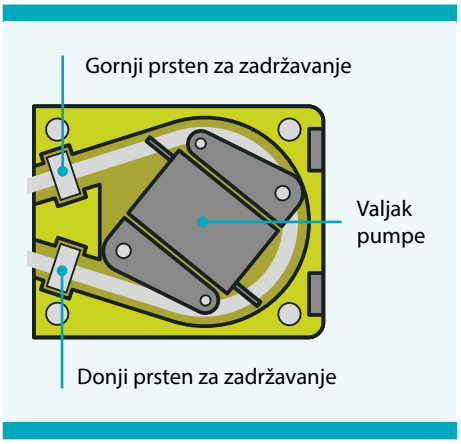
Postavljanje cijevi pumpe

Na prozoru se prikazuje Zaslon 7.35.



Zaslon 7.35: Postavljanje cijevi pumpe

1. Otvorite vrata pumpe tako što ćete ih podići na lijevom kraju.
2. Umetnite gornji prsten za zadržavanje na cijev pumpe u žlijeb prstena za zadržavanje na kućištu pumpe (vidjeti Slika 7.7).
3. Zarotirajte valjak pumpe u smjeru kazaljki sata dok se cijev ne navije između dva kompleta pribadača za vodilicu za cijev te dok cijev pravilno ne nalegne oko valjka pumpe. Uvjerite se da cijev nije prignječena na kraju pribadača za vodilicu. Ako je neophodna prilagodba cijevi unutar pumpe, cijev se može ukloniti podizanjem donjeg kraja i okretanjem valjka pumpe u smjeru suprotnom od smjera kazaljki sata.
4. Umetnite donji prsten za zadržavanje na cijev pumpe u žlijeb za prsten za zadržavanje na kućištu pumpe.
5. Zarotirajte valjak pumpe u smjeru kazaljki sata i suprotno od smjera kazaljki sata, kako biste osigurali da se valjak pumpe slobodno pomiče.
6. Zatvorite vrata pumpe.



Slika 7.7: Postavljanje cijevi pumpe

VAŽNO

Tijekom programa razdvajanja stanica pumpa će odmah zaustaviti rad ako se otvori kućište pumpe. Ako se ostavi otvoreno tijekom dulje od 600 sekundi, instrument će prekinuti rad koji je u tijeku.

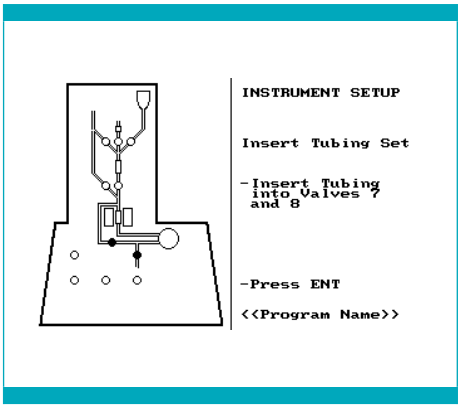
Za nastavak pritisnite **ENT**.

Postavite ventile br. 7 i 8

Na prozoru se prikazuje Zaslon 7.36.

1. Stavite cijev u ventil br. 7.
2. Stavite cijev u ventil br. 8.

Za nastavak pritisnite **ENT**.



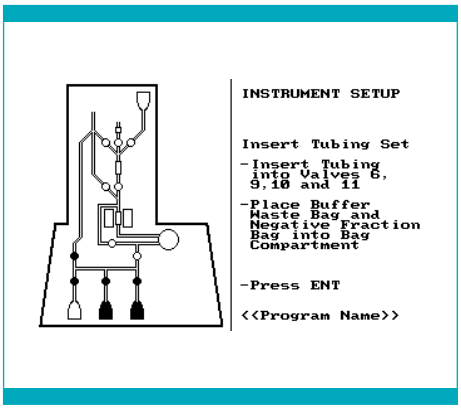
Zaslon 7.36: Postavite ventile br. 7 i 8

Postavite ventile br. 6, 9, 10 i 11

Na prozoru se prikazuje Zaslon 7.37.

1. Uvedite cijev u ventile br. 6, 9, 10 i 11.
2. Stavite vrećicu Negative Fraction Bag i vrećicu Buffer Waste Bag u odjeljak za vrećicu. Uvjerite se da cijev nije zbijena ispod poklopca odjeljka za vrećicu.

Za nastavak pritisnite **ENT**.



Zaslon 7.37: Postavite ventile br. 6, 9, 10 i 11

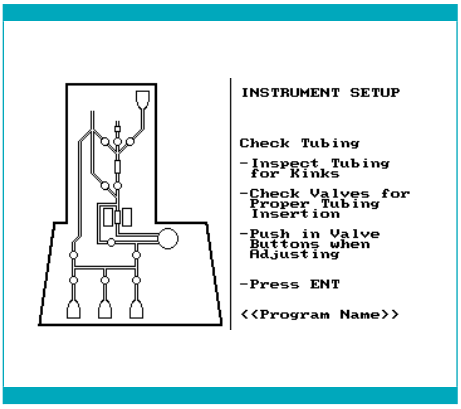
Ponovna provjera svih cijevi i priključaka

Na prozoru se prikazuje Zaslon 7.38.

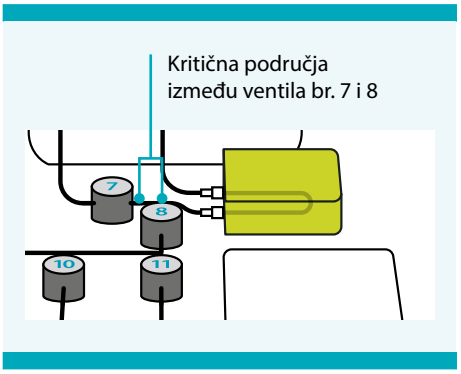
Prije započinjanja razdvajanja stanica ponovno provjerite sve cijevi i priključke.

Napomena: provjerite jesu li cijevi na svim ventilima pravilno umetnute. Uvjerite se da je cijev pravilno postavljena te da nema savijenih ili zategnutih mjesta na cijevi. Osobitu pozornost obratite na područje predkolone kao i područje između pumpe i ventila br. 7 i 8 (vidjeti Slika 7.8) i između ventila br. 4 i 5 (vidjeti Slika 7.6). Ako se cijev mora prilagoditi nakon što je ventil zatvoren, nemojte povlačiti cijev bez pritiskanja gumba ventila da otvorite ventil. Ako se cijev mora prilagoditi, odgovarajući se ventili obavezno dvaput čvrsto moraju pritisnuti.

Za nastavak pritisnite **ENT**.



Zaslon 7.38: Ponovna provjera svih cijevi i priključaka



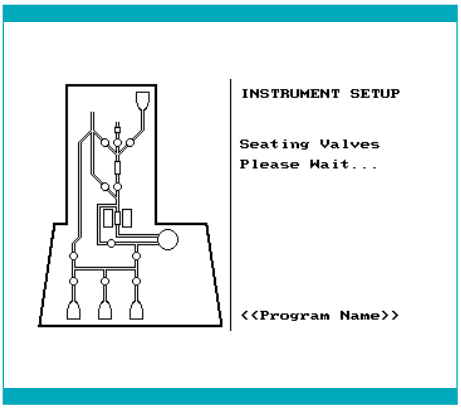
Slika 7.8: Cijev u ventilima

Namještanje ventila

Na prozoru se prikazuje Zaslon 7.39.

Radi osiguravanja pravilnog nalijeganja cijevi u ventile, instrument će dvaput u nizu aktivirati sve ventile. Promatrajte i osluškujte kako biste se uvjerili da svi ventili pravilno rade. Ako bilo koji od ventila ne radi pravilno, pogledajte poglavlje 8 „Rješavanje problema" na stranici 209. Ovaj se korak može ponoviti pritiskom na ◄ te potom **ENT** (vidjeti poglavlje „Opis" u korisničkom priručniku za CliniMACS Plus Instrument).

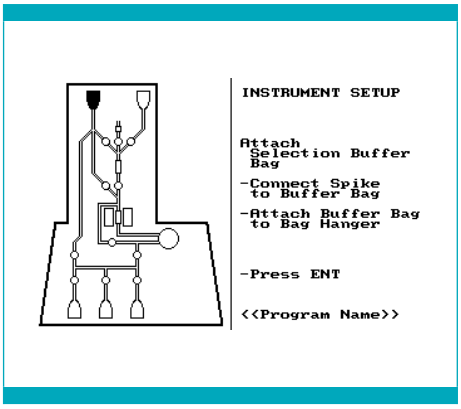
Pogon magneta također će biti ispitan tijekom sekvence provjere.



Zaslon 7.39: Namještanje ventila

Priključivanje pufera CliniMACS PBS/EDTA Buffer

Na prozoru se prikazuje Zaslon 7.40.



Zaslon 7.40: Priključivanje vrećica za pufer

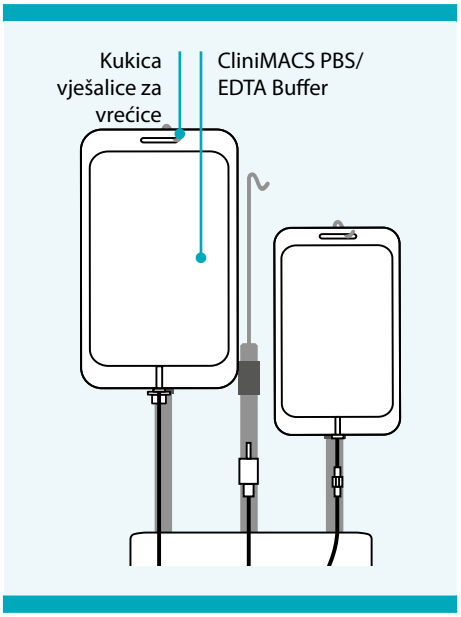
Propisani pufer za CliniMACS Plus separaciju je CliniMACS PBS/EDTA Buffer kojem je dodan HSA do konačne koncentracije od 0,5% (m/v).

1. Primjenom aseptičnih tehnika uklonite čep sa šiljka pufera na kompletu cijevi (vidjeti Slika 7.2 na stranici 153) i spojite ga na vrećicu za pufer. Uvjerite se da je septum probijen što omogućuje slobodan protok tekućine. Lagano stisnite vrećicu da potvrdite da je šiljak probio vrećicu.

   Ako je za razdvajanje potrebno više od jedne litre pufera, spojite dvije vrećice za pufer uz primjenu kompleta za prijenos plazme.

2. Priključite vrećicu za pufer na kukicu vrećice za pufer na vješalici za vrećicu (vidjeti Slika 7.9).

3. Prilagodite visinu vješalice za vrećicu za pufer. Podignite ili spustite vješalicu za vrećicu kako biste prilagodili visinu veličini vrećice za pufer. Osigurajte da je pozicionirana dovoljno visoko kako bi se spriječilo savijanje cijevi koje bi moglo ograničiti protok te da je dovoljno nisko kako bi se izbjeglo da se spojevi cijevi zategnu.



Slika 7.9: Priključivanje vrećica za pufer

OBAVIJEST

Rizik od oštećenja instrumenta. Preopterećenje vješalica za vrećicu može oštetiti instrument. Nosivi kapacitet jedne vješalice za vrećicu je 3 kg. Nemojte preopterećivati vješalice za vrećice.

Za nastavak pritisnite **ENT**.

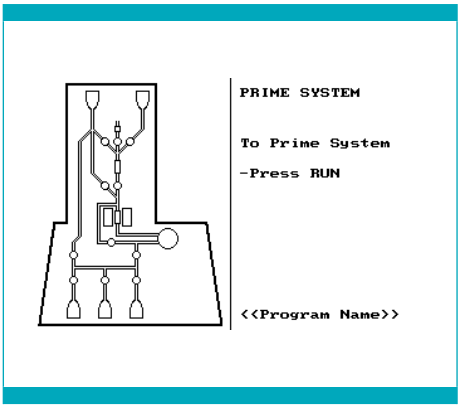
Početak pripreme

Na prozoru se prikazuje Zaslon 7.41.

Da biste započeli pripremu, pritisnite **RUN**.

Na prozoru se prikazuje Zaslon 7.42.

Tijekom faze pripreme komplet cijevi puni se puferom. Pufer će cirkulirati kroz komplet cijevi uključujući i predkolonu i kolonu za razdvajanje. Otpad iz pripreme prikuplja se u vrećicu Priming Waste Bag i vrećicu Buffer Waste Bag (vidjeti Slika 7.2 na stranici 153). Ciklusi pripreme bit će nastavljeni uz ponavljanje niza koraka. Faza pripreme trajat će približno 1 minutu. Status pripreme bit će ažuriran na zaslonu.



Zaslon 7.41: Početak pripreme

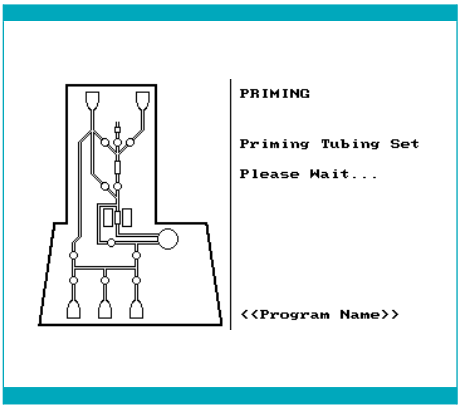
Provjera tijekom pripreme

Tijekom faze pripreme provjerite ima li na svim cijevima, nastavcima, ventilima i kolonama bilo kakvog curenja ili bilo kakvih presavijenih mjesta koja bi mogla blokirati protok tekućine.

Ako primijetite curenja ili kvarove, pritisnite **STOP** da zaustavite rad.

Rukovatelj će imati 600 sekundi na raspolaganju da riješi problem.

Nastavite s procesom tako što ćete pritisnuti **RUN**.



Zaslon 7.42: Priprema u tijeku

Nakon 600 sekundi razdvajanje će biti prekinuto. Ako rukovatelj ne može riješiti problem ili ako je komplet cijevi u kvaru, uklonite komplet cijevi i zamijenite ga novim.

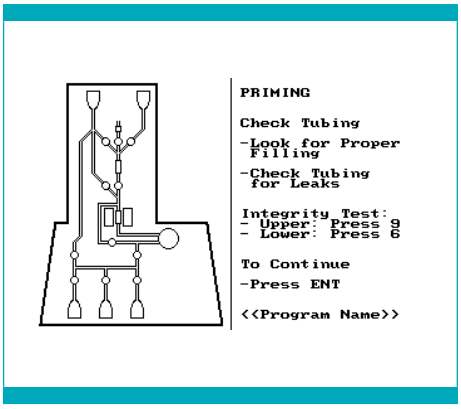
Napomena: nakon što priprema započne, nije moguće vratiti se na postupak podešavanja instrumenta.

Završna provjera svih cijevi i priključaka

Na prozoru se prikazuje Zaslon 7.43.

Prije nastavka programa provjerite sljedeće:

- tekućinu u svim dijelovima kompleta cijevi (osim filtra predsustava)
- da nema viška zraka u kompletu cijevi
- tekućinu u vrećici Priming Waste Bag i vrećici Buffer Waste Bag
- da nema tekućine u vrećici Negative Fraction Bag ili vrećici Cell Collection Bag



Zaslon 7.43: Završna provjera cijevi

Još uvijek nemojte pritisnuti ENT.

Ispitivanje cjelovitosti

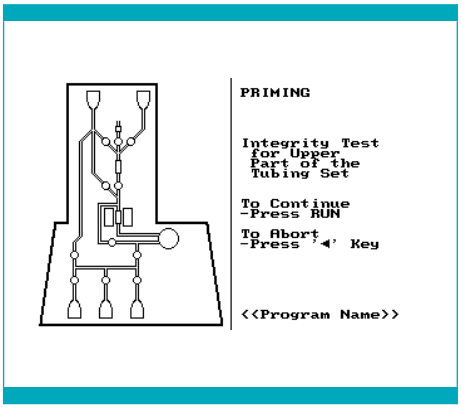
Radi dodatne sigurnosti mora se provesti ispitivanje cjelovitosti kako bi se ispitalo ima li propuštanja na kompletu cijevi. Sekvenca ispitivanja sastoji se od dvije automatizirane sekvence koje omogućuju zasebno stvaranje tlaka i promatranje oba dijela kompleta cijevi, i gornjeg i donjeg.

Ispitivanje cjelovitosti za gornji dio kompleta cijevi

1. Kada rukovatelj provede „završnu provjeru svih cijevi i priključaka" na prozoru se prikazuje Zaslon 7.43.
2. Nakon provođenja „završne provjere svih cijevi i priključaka" nastavite s izvođenjem ispitivanja cjelovitosti. **Nemojte** pritisnuti ENT.
3. Za izvođenje ispitivanja cjelovitosti za gornji dio pritisnite 9.

   Na prozoru se prikazuje Zaslon 7.44.
4. Za pokretanje sekvence ispitivanja pritisnite RUN.

   Za povratak na Zaslon 7.43 pritisnite ◄.



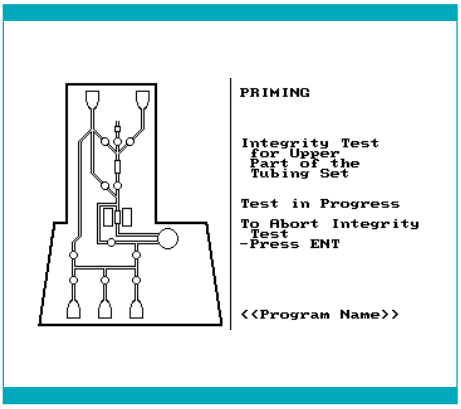
Zaslon 7.44: Pokretanje ispitivanja cjelovitosti za gornji dio

5. Kada se pritisne **RUN**, instrument započinje automatiziranu sekvencu ispitivanja za gornji dio kompleta cijevi.

   Na prozoru se prikazuje Zaslon 7.45.

   Stvorit će se predtlak i zadržat će se dvije minute. Tijekom tog vremena rukovatelj treba provjeriti sve spojeve iznad gornjeg spoja cijevi pumpe.

   U svakoj se točki sekvenca ispitivanja može dovršiti pritiskom na **ENT**.



Zaslon 7.45: Ispitivanje cjelovitosti za gornji dio u tijeku

6. Nakon dvije minute tlak se automatski otpušta, a na prozoru se prikazuje Zaslon 7.43.

   Provjerite je li došlo do bilo kakvih curenja tijekom sekvence ispitivanja. Ako primijetite curenje na bilo kojem spoju komplete cijevi, komplet cijevi se mora ukloniti i zamijeniti novim. Obratite se tehničkoj službi Miltenyi Biotec Technical Support kako biste dobili upute vezane uz povrat neispravnog kompleta cijevi.

7. Ako nema curenja, nastavite s ispitivanjem cjelovitosti donjeg dijela kompleta cijevi.

Ispitivanje cjelovitosti za donji dio kompleta cijevi

Na prozoru se prikazuje Zaslon 7.46.

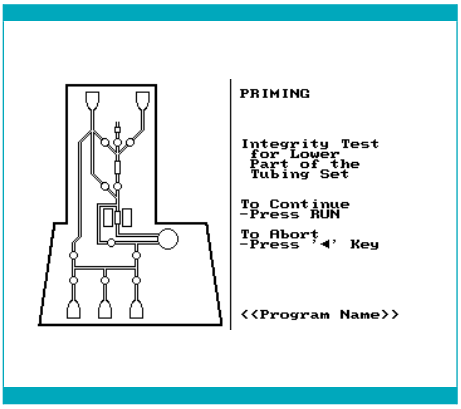
1. Da biste započeli ispitivanje cjelovitosti za donji dio, pritisnite **6**.
   Nemojte pritisnuti ENT.

   Na prozoru se prikazuje Zaslon 7.46.

2. Da biste pokrenuli sekvencu ispitivanja, pritisnite **RUN**.

   Za povratak na Zaslon 7.43 pritisnite ◄.

3. Kada se pritisne **RUN**, instrument započinje automatiziranu sekvencu ispitivanja za donji dio kompleta cijevi.

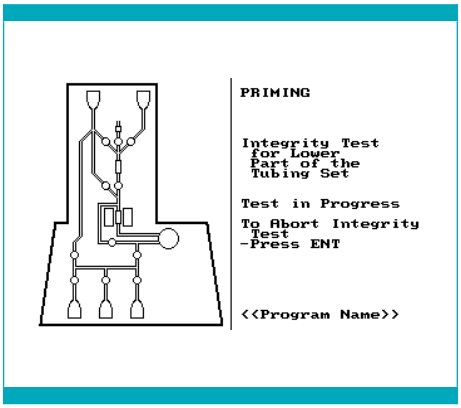


Zaslon 7.46: Pokretanje ispitivanja cjelovitosti za donji dio

Na prozoru se prikazuje Zaslon 7.47.

Stvorit će se predtlak i zadržat će se 30 sekundi. Tijekom tog vremena rukovatelj treba pratiti donji spoj cijevi pumpe i T-komade između ventila br. 6, 8, 9, 10 i 11.

U svakoj se točki sekvenca ispitivanja može dovršiti pritiskom na **ENT**.



Zaslon 7.47: Ispitivanje cjelovitosti za donji dio u tijeku

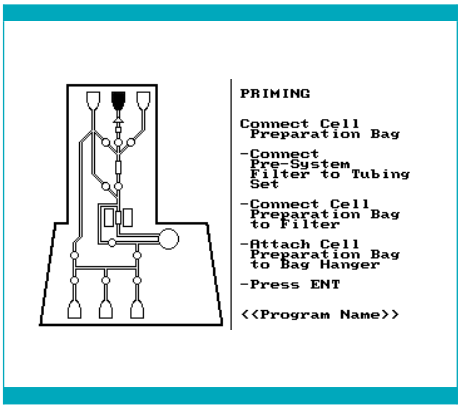
4. Nakon 30 sekundi tlak se automatski otpušta, a na prozoru se prikazuje Zaslon 7.43.

   Provjerite je li došlo do bilo kakvih curenja tijekom sekvence ispitivanja. Ako primijetite curenje na bilo kojem spoju komplete cijevi, komplet cijevi se mora ukloniti i zamijeniti novim. Obratite se tehničkoj službi Miltenyi Biotec Technical Support kako biste dobili upute vezane uz povrat neispravnog kompleta cijevi.

5. Ako nema curenja, rukovatelj sad može nastaviti sa sljedećim korakom pritiskom na **ENT**.

Spajanje vrećice Cell Preparation Bag

Na prozoru se prikazuje Zaslon 7.48.



Zaslon 7.48: Spajanje vrećice Cell Preparation Bag

Spojite vrećicu Cell Preparation Bag u kojoj se nalazi spreman označen stanični proizvod:

1. Uklonite čep sa šiljka hvatača mjehurića na kompletu cijevi (vidjeti Slika 7.2).
2. Uklonite čep s tupog kraja filtra predsustava (vidjeti Slika 7.10). Čvrsto uvedite šiljak u filtar predsustava.
3. Uklonite čep sa šiljka za filtar predsustava.
4. Umetnite filtar predsustava u neiskorišteni priključak vrećice Cell Preparation Bag tako da osigurate da je septum probijen uz omogućavanje slobodnog protoka tekućine. Lagano stisnite vrećicu da potvrdite da je šiljak probio vrećicu.
5. Pažljivo provjerite spoj između filtra predsustava i kompleta cijevi da potvrdite da je spoj siguran.
6. Objesite vrećicu Cell Preparation Bag na središnju vješalicu za vrećicu.
7. Prilagodite vješalicu za vrećicu Cell Preparation Bag kako bi se vrećica Cell Preparation Bag držala u uspravnom položaju.

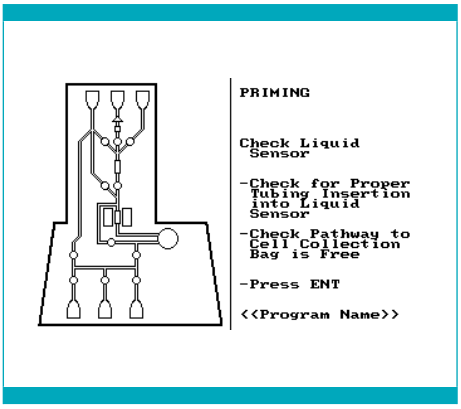
Za nastavak pritisnite **ENT**.

Završna provjera senzora tekućine

Na prozoru se prikazuje Zaslon 7.49.

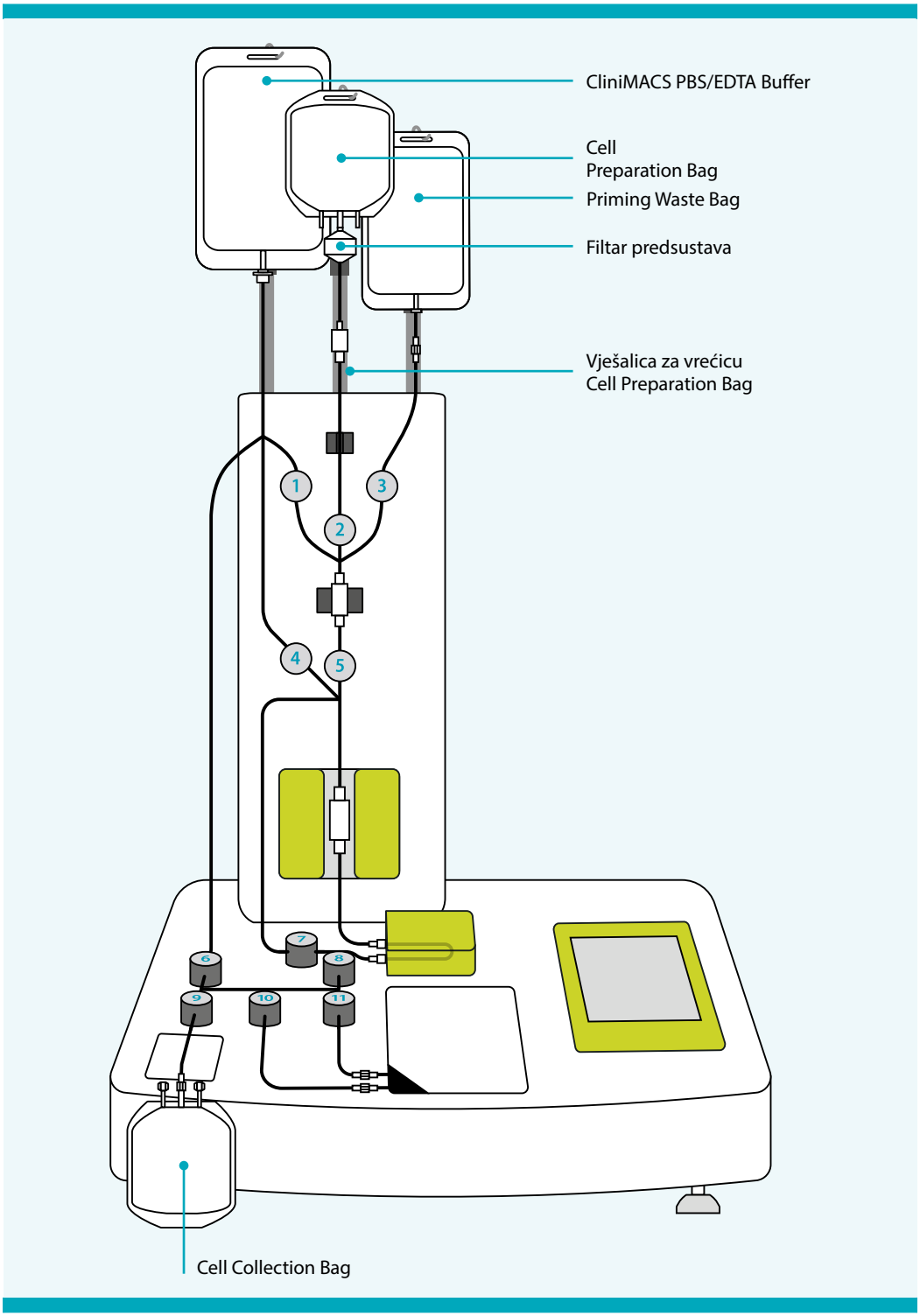
1. Provjerite cijev senzora tekućine. Osigurajte da je cijev pravilno uvedena, da u njoj nema nikakve vanjske tekućine te da nije pomjerena tijekom postupka postavljanja.
2. Potvrdite da je moguć neometan protok do vrećice Cell Collection Bag (npr. otvorite stezaljku ispod ventila 9).

Za nastavak pritisnite **ENT**.



Zaslon 7.49: Završna provjera senzora tekućine

▶ **Prijeđite na KORAK 4.**



Slika 7.10: CliniMACS Plus Instrument s CliniMACS Tubing Set, CliniMACS PBS/EDTA Buffer, Cell Preparation Bag i Cell Collection Bag

7.3.2 Alternativna Instalacija kompleta cijevi CliniMACS

Upute u KORAKU 3 i zasloni prikazani na CliniMACS Plus Instrument opisuju instalaciju kompleta cijevi CliniMACS pod sterilnim uvjetima (čista soba).

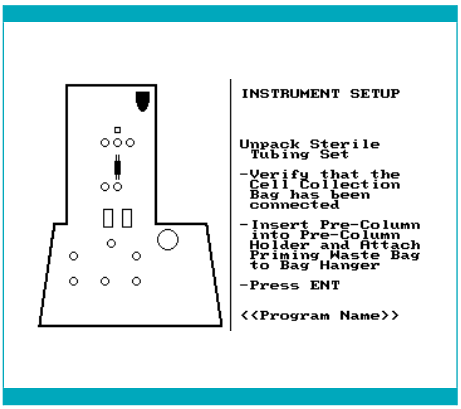
Sam sustav CliniMACS Plus je zatvoren sustav koji ne mora obvezno raditi u čistoj sobi. Međutim, ako radi izvan čiste sobe, postupak instalacije kompleta cijevi treba prilagoditi kako bi se osiguralo da je sterilnost procesa razdvajanja stanica zajamčena.

Sterilnost procesa razdvajanja stanica može biti umanjena tijekom priključivanja vrećice Cell Collection Bag, CliniMACS PBS/EDTA Buffer, filtra predsustava i vrećice Cell Preparation Bag. Da bi se osiguralo da sustav ostaje sterilan, ove se komponente moraju priključiti na komplet cijevi pod sterilnim uvjetima (npr. laminarni kabinet). Kada se komponente priključe na komplet cijevi prije instalacije na CliniMACS Plus Instrument, redoslijed uputa koje daje instrument i uputa u KORAKU 3 mora se promijeniti i moraju se poduzeti daljnje radnje.

Kada CliniMACS Plus Instrument radi izvan čiste sobe, pridržavajte se sljedećih dodatnih uputa koje se razlikuju od uputa u KORAKU 3.

Priprema za instalaciju kompleta cijevi

Na prozoru se prikazuje Zaslon 7.50.



Zaslon 7.50: Raspakiravanje kompleta cijevi

Kao što je opisano, vrećica Cell Collection Bag, CliniMACS PBS/EDTA Buffer, filtar predsustava i vrećica Cell Preparation Bag moraju se priključiti na komplet cijevi prije instaliranja kompleta cijevi na instrument pod sterilnim uvjetima.

Raspakirajte komplet cijevi pod sterilnim uvjetima i priključite sljedeće komponente pod sterilnim uvjetima:

- **Spajanje Cell Collection Bag**

  Pogledajte stranicu 155.

Priključivanje pufera CliniMACS PBS/EDTA Buffer

VAŽNO

Prije priključivanja pufera CliniMACS PBS/EDTA Buffer na komplet cijevi stegnite cijev ispod šiljka za pufer s pomoću forcepsa za zaključavanje kako biste spriječili da pufer teče u komplet cijevi prije instalacije (vidjeti stezaljku 1, Slika 7.11 na stranici 172).

Primjenom aseptičnih tehnika uklonite čep sa šiljka za pufer na komplet cijevi i spojite ga na vrećicu za pufer. Uvjerite se da je septum probijen što omogućuje slobodan protok tekućine. Lagano stisnite vrećicu da osigurate da je šiljak probio vrećicu.

Priključivanje filtra predsustava

Uklonite čep sa šiljka hvatača mjehurića. Uklonite čep s donjeg otvora filtra predsustava.

Čvrsto uvedite šiljak u filtar predsustava. NEMOJTE uklanjati gornji čep s filtra predsustava. Zatvorite cijev odmah ispod hvatača mjehurića koristeći se forcepsom za zaključavanje (vidjeti stezaljku 2, Slika 7.11 na stranici 172). Time se sprječava da pripremljena stanična suspenzija u vrećici Cell Preparation Bag uđe u filtar predsustava i komplet cijevi.

Priključivanje vrećice Cell Preparation Bag

Na komplet cijevi spojite vrećicu Cell Preparation Bag u kojoj se nalaze magnetski označene i isprane stanice. Probušite vrećicu Cell Preparation Bag s filtrom predsustava tako da osigurate da je septum probijen što omogućuje slobodan protok tekućine. Lagano stisnite vrećicu da osigurate da je šiljak probio vrećicu.

Instalacija na CliniMACS Plus Instrument

Objesite vrećicu za pufer na lijevu vješalicu za vrećicu, vrećicu Cell Preparation Bag na srednju vješalicu za vrećicu, a vrećicu Priming Waste Bag na desnu vješalicu za vrećicu na instrumentu.

Za nastavak pritisnite **ENT**.

- **Priključite vrećicu Priming Waste Bag i umetnite predkolonu**

  Pogledajte stranicu 155.

- **Umetnite kolonu za razdvajanje i postavite ventil br. 5**

  Pogledajte stranicu 156.

- **Postavite ventile br. 1, 2, 3 i 4**

  Pogledajte stranicu 157.

- **Postavljanje cijevi pumpe**

  Pogledajte stranicu 158.

▶ Postavite ventile br. 7 i 8

Pogledajte stranicu 159.

▶ Postavite ventile br. 6, 9, 10 i 11

Pogledajte stranicu 159.

▶ Ponovna provjera svih cijevi i priključaka

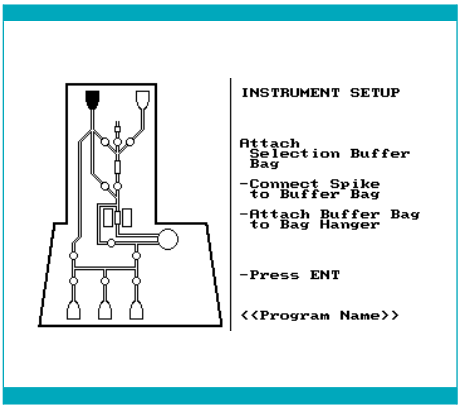
Pogledajte stranicu 160.

▶ Namještanje ventila

Pogledajte stranicu 160.

Priključivanje pufera CliniMACS PBS/EDTA Buffer

Na prozoru se prikazuje Zaslon 7.51.



Zaslon 7.51: Priključivanje vrećica za pufer

1. Vrećica za pufer priključena je tijekom „pripreme za instalaciju kompleta cijevi". Stoga može biti potrebno samo prilagoditi visinu vješalica za vrećicu za pufer. Podignite ili spustite vješalicu kako biste prilagodili veličinu vrećice za pufer, uz osiguravanje da je razina visine dovoljno visoka da se spriječi jako savijanje cijevi koje bi moglo ograničiti protok tekućine i dovoljno niska da se izbjegne rastezanje cijevi ili spojeva.
2. Uklonite forceps za zaključavanje s cijevi odmah ispod šiljka za pufer.

Za nastavak pritisnite **ENT**.

▶ Početak pripreme

Pogledajte stranicu 162.

▶ Provjera tijekom pripreme

Pogledajte stranicu 162.

▶ Završna provjera svih cijevi i priključaka

Pogledajte stranicu 163.

▶ Ispitivanje cjelovitosti

Pogledajte stranicu 163.

Spajanje vrećice Cell Preparation Bag (i filtar predsustava)

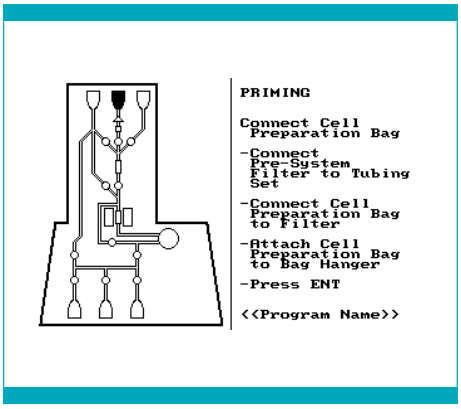
Na prozoru se prikazuje Zaslon 7.52.

1. Vrećica Cell Preparation Bag i filtar predsustava priključeni su tijekom „pripreme za instalaciju kompleta cijevi".
2. Uklonite forceps za zaključavanje ispod hvatača mjehurića.

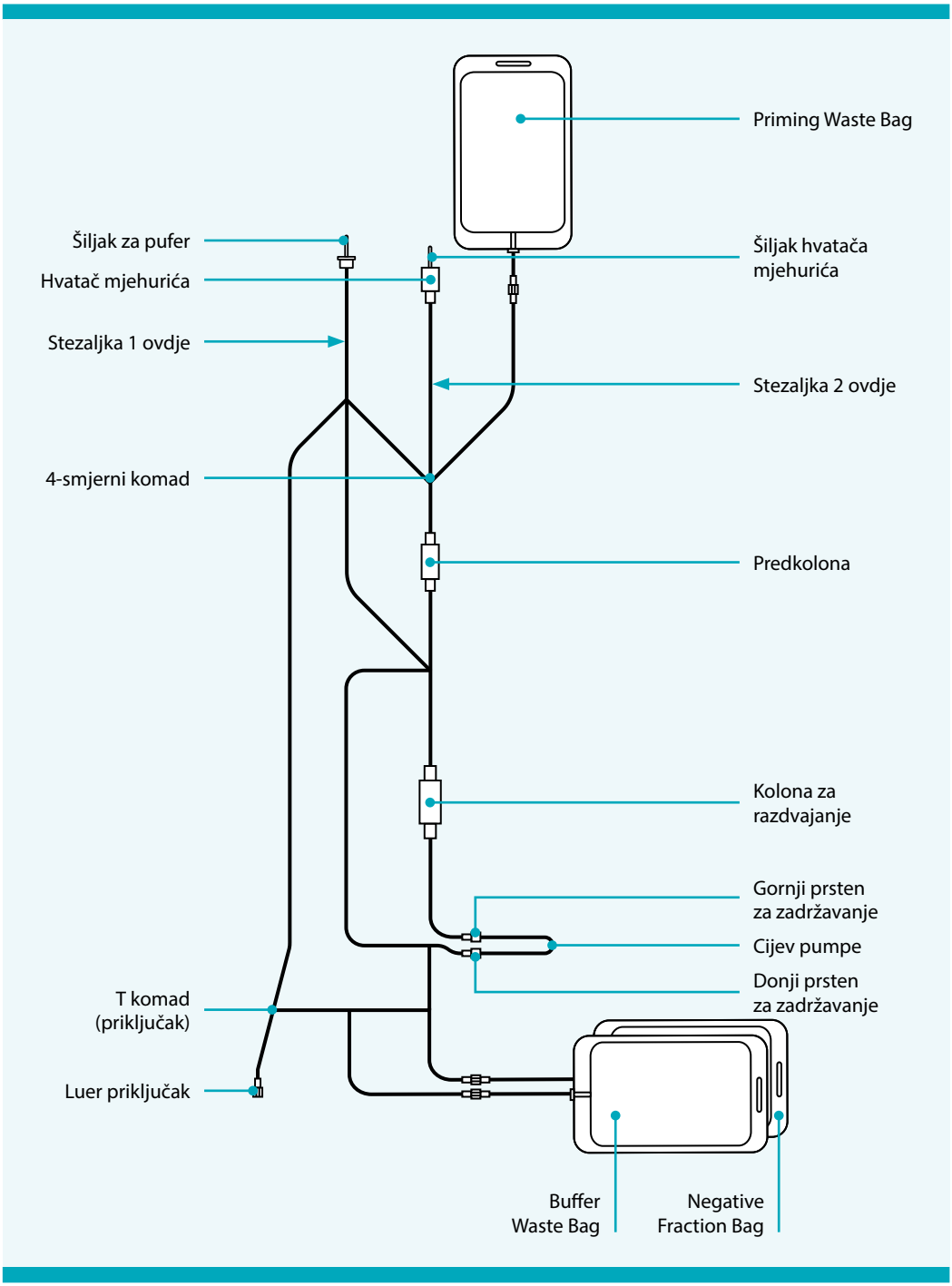
Za nastavak pritisnite **ENT**.

▶ Završna provjera senzora tekućine

Pogledajte stranicu 166.

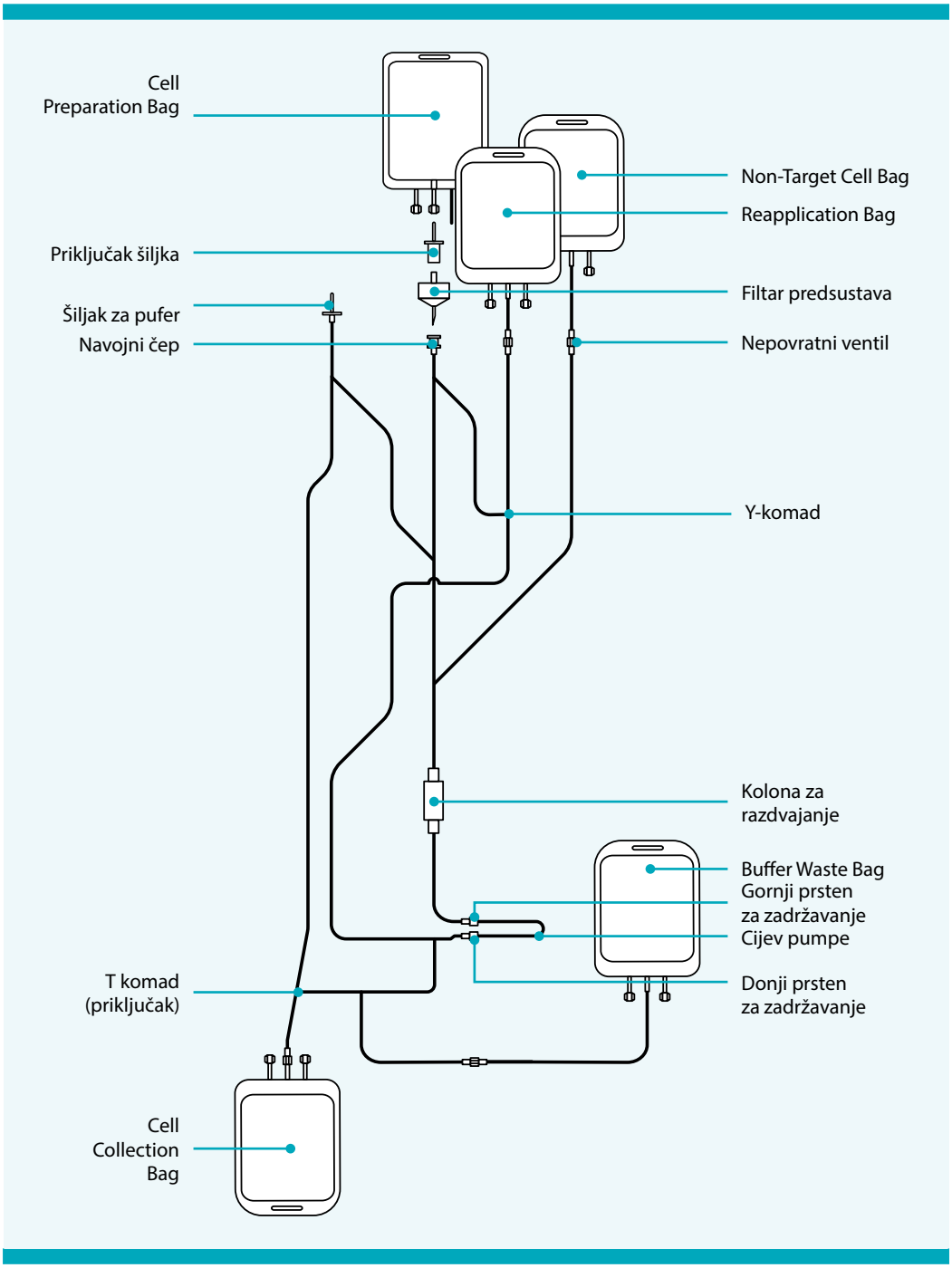


Zaslon 7.52: Spajanje vrećice Cell Preparation Bag



Slika 7.11: Opća konstrukcija kompleta cijevi CliniMACS (npr. CliniMACS Tubing Set) s pozicijama za stezanje 1 i 2

7.3.3 CliniMACS Depletion Tubing Set



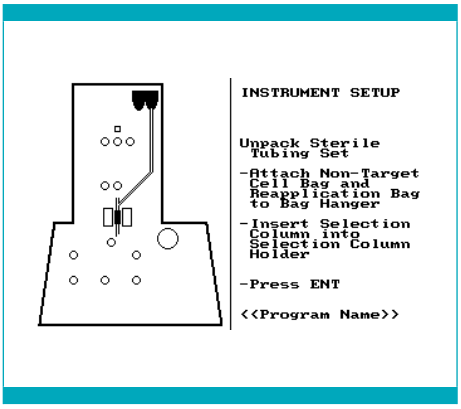
Slika 7.12: Opća konstrukcija kompleta cijevi CliniMACS Depletion Tubing Set

Priprema za instalaciju kompleta cijevi

Na prozoru se prikazuje Zaslon 7.53.

Upute su na desnoj strani, a dijagram koji odgovara uputama prikazan je na lijevoj strani. Trepereća svojstva na zaslonu označavaju područja od interesa.

CliniMACS Depletion Tubing Set isporučuje se u zatvorenom, steriliziranom pakiranju. Svaki komplet cijevi sadrži unaprijed montirane cijevi, kolonu i vrećice za jedno razdvajanje stanica (vidjeti Slika 7.12). Ako je pakiranje neoštećeno, omogućen je sterilan prolaz tekućine.



Zaslon 7.53: Raspakiravanje kompleta cijevi

Napomena: CliniMACS Plus Instrument prikazuje izabrani naziv programa, npr. DEPLETION 3.1, u donjem retku. Pri bilo kojem koraku tijekom instaliranja kompleta cijevi tipka „Undo" (vidjeti „Opis" u korisničkom priručniku za CliniMACS Plus Instrument) može se pritisnuti za povratak na prethodni korak.

1. Zabilježite broj serije i rok upotrebe kompleta cijevi.

   Raspakirajte sterilni komplet cijevi pod sterilnim uvjetima (npr. u laminarnom kabinetu). Prije korištenja kompleta cijevi uklonite stezaljku korištenu za pakiranje. Stezaljka ima oznaku „Ukloniti prije priključenja na CliniMACS Plus Instrument".

2. Provjerite luer lock priključke za vrećice. Luer lock priključci moraju biti čvrsto zatvoreni.

Cell Collection Bag

CliniMACS Depletion Tubing Set isporučuje se s priključenom vrećicom Cell Collection Bag. Zabilježite težinu prazne vrećice Cell Collection Bag. Ako je za razdvajanje potrebno više od jedne vrećice Cell Collection Bag, spojite vrećice uz primjenu kompleta za prijenos plazme. Uvjerite se da su svi spojevi čvrsto zatvoreni. Zabilježite težinu prazne vrećice/praznih vrećica Cell Collection Bag.

Priključite vrećice Non-Target Cell Bag i Reapplication Bag i umetnite kolonu za razdvajanje

1. Postavite vrećice Non-Target Cell Bag i Reapplication Bag na desnu vješalicu za vrećicu na instrumentu (vidjeti Slika 7.13).
2. Prilagodite visinu vješalice za vrećicu. Podignite ili spustite vješalice za vrećicu kako biste prilagodili visinu veličini vrećica Non-Target Cell Bag i Reapplication Bag. Osigurajte da su pozicionirane dovoljno visoko kako bi se spriječilo savijanje cijevi koje bi moglo ograničiti protok te da je dovoljno nisko kako bi se izbjeglo da se spojevi cijevi zategnu.

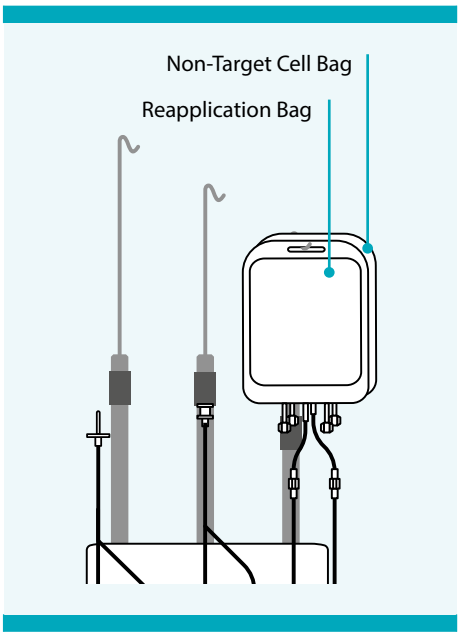
   OBAVIJEST

   Rizik od oštećenja instrumenta. Preopterećenje vješalica za vrećicu može oštetiti instrument. Nosivi kapacitet jedne vješalice za vrećicu je 3 kg. Nemojte preopterećivati vješalice za vrećice.
3. Umetnite kolonu za razdvajanje u držač kolone za razdvajanje (vidjeti Slika 7.14).

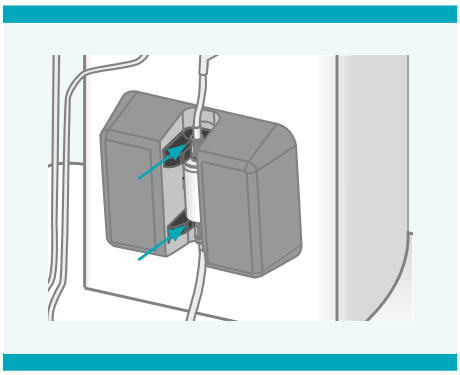
   ⚠ UPOZORENJE

   Rizik od ozljede. Ako se kolona za razdvajanje umetne ili ukloni dok je jedinica magneta uključena, postoji rizik od ozljeda. Umetnite ili uklonite kolonu za razdvajanje samo kada je jedinica magneta isključena.

Za nastavak pritisnite **ENT**.



Slika 7.13: Priključivanje vrećica Non-Target Cell Bag i Reapplication Bag



Slika 7.14: Kolona za razdvajanje u držaču kolone za razdvajanje

Postavite ventile br. 1, 2, 3, 4 i 5

Na prozoru se prikazuje Zaslon 7.54.

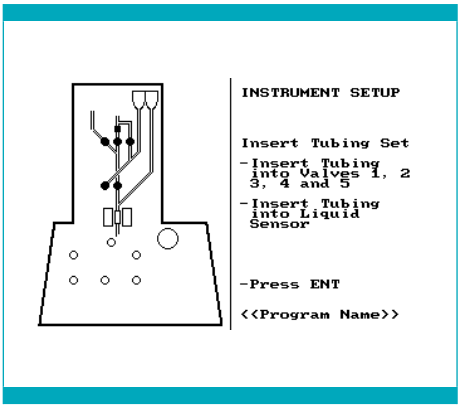
Ventili prikazani na zaslonu automatski će se otvoriti.

1. Uvedite cijev u ventile br. 1, 2, 3, 4 i 5.
2. Uvedite cijev iznad ventila br. 2 u senzor tekućine (vidjeti Slika 7.15).

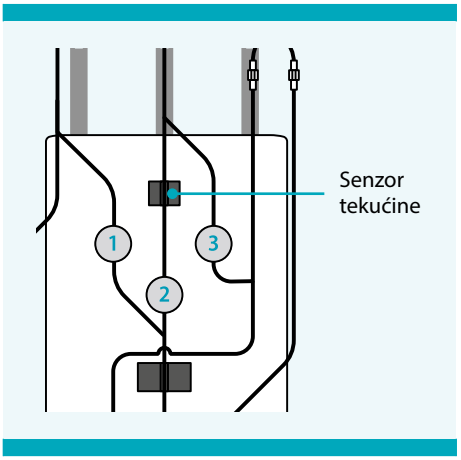
VAŽNO

- Da biste osigurali pravilan rad, i senzor tekućine i cijev koja se uvodi moraju biti suhi. Pažljivo pregledajte oboje. Ako ima bilo kakve tekućine, osušite to područje mekom krpom koja se ne linja.
- Pri provođenju svakog koraka provjerite sve cijevi i priključke kako biste potvrdili da nema prignječenih ili jako savijenih mjesta što bi moglo ograničiti protok tekućine kroz cijev. Provjerite sve ventile kako biste se uvjerili da je cijev pravilno namještena.
- Uvodite komplet cijevi samo u otvorene ventile (kada je gumb pritisnut unutra). Cijev neće pravilno uleći ako je uvedena u zatvoren ventil.
- Ako se cijev mora prilagoditi nakon što je ventil zatvoren, nemojte povlačiti cijev bez pritiskanja gumba ventila da otvorite ventil (vidjeti Slika 7.16).

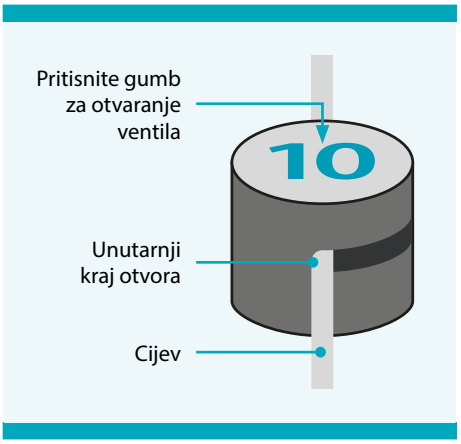
Za nastavak pritisnite **ENT**.



Zaslon 7.54: Postavite ventile br. 1, 2, 3, 4 i 5.



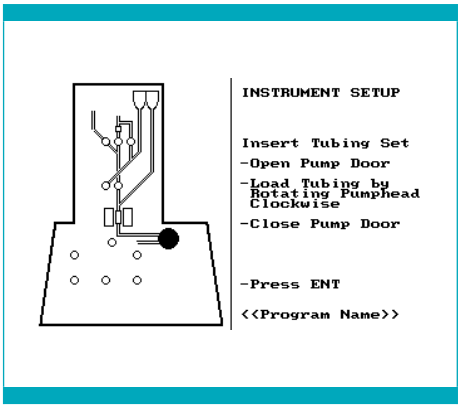
Slika 7.15: Cijev u ventilima



Slika 7.16: Pravilno uvedena cijev

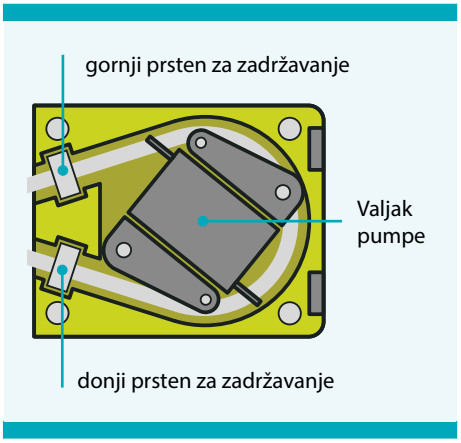
Postavljanje cijevi pumpe

Na prozoru se prikazuje Zaslon 7.55.



Zaslon 7.55: Postavljanje cijevi pumpe

1. Otvorite vrata pumpe tako što ćete ih podići na lijevom kraju.
2. Umetnite gornji prsten za zadržavanje na cijev pumpe u žlijeb prstena za zadržavanje na kućištu pumpe (vidjeti Slika 7.17).
3. Zarotirajte valjak pumpe u smjeru kazaljki sata dok se cijev ne navije između dva kompleta pribadača za vodilicu za cijev te dok cijev pravilno ne nalegne oko valjka pumpe. Uvjerite se da cijev nije prignječena na kraju pribadača za vodilicu. Ako je neophodna prilagodba cijevi unutar pumpe, cijev se može ukloniti podizanjem donjeg kraja i okretanjem valjka pumpe u smjeru suprotnom od smjera kazaljki sata.
4. Umetnite donji prsten za zadržavanje na cijev pumpe u žlijeb za prsten za zadržavanje na kućištu pumpe.
5. Ponovite rotiranje valjka pumpe u smjeru kazaljki sata kako biste bili sigurni da se valjak pumpe slobodno pomiče.
6. Zatvorite vrata pumpe.



Slika 7.17: Postavljanje cijevi pumpe

VAŽNO

Tijekom razdvajanja stanica pumpa će odmah zaustaviti rad ako se otvori kućište pumpe. Ako se ostavi otvoreno tijekom dulje od 600 sekundi, instrument će prekinuti rad koji je u tijeku.

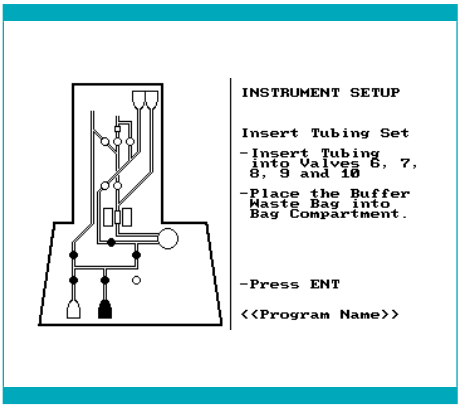
Za nastavak pritisnite **ENT**.

Postavite ventile br. 6, 7, 8, 9 i 10

Na prozoru se prikazuje Zaslon 7.56.

1. Uvedite cijev u ventile br. 6, 7, 8, 9 i 10. Osigurajte da je cijev sigurno postavljena u otvor ventila.
2. Stavite vrećicu Buffer Waste Bag u odjeljak za vrećicu. Uvjerite se da cijev nije zbijena ispod poklopca odjeljka za vrećicu.
3. Pobrinite se da je moguć neometan protok do vrećice Cell Collection Bag.

Za nastavak pritisnite **ENT**.



Zaslon 7.56: Postavite ventile br. 6, 7, 8, 9 i 10.

Ponovna provjera svih cijevi i priključaka

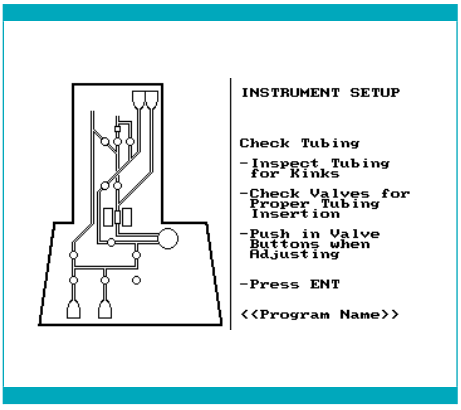
Na prozoru se prikazuje Zaslon 7.57.

1. Započevši s ventilom br. 1 potvrdite da cijev pravilno naliježe te da je pravilno pozicionirana u svaki ventil.

   Ponovno pregledajte cijev u svakom ventilu. Osigurajte da cijev ulazi i napušta svaki ventil kroz uvećavanje na unutarnjem kraju otvora (vidjeti Slika 7.16).
2. Potvrdite da cijev nije savijena ili uvrnuta.

Napomena: ako se cijev mora prilagoditi nakon što je ventil zatvoren, nemojte povlačiti cijev bez pritiskanja gumba ventila da otvorite ventil.

Za nastavak pritisnite **ENT**.



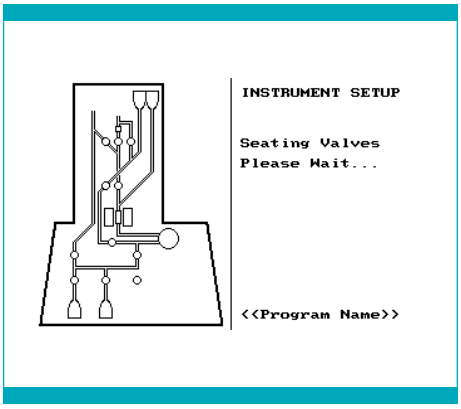
Zaslon 7.57: Ponovna provjera svih cijevi i priključaka

Namještanje ventila

Na prozoru se prikazuje Zaslon 7.58.

Radi osiguravanja pravilnog nalijeganja cijevi u ventile instrument će u nizu dvaput aktivirati sve ventile. Promatrajte i osluškujte kako biste se uvjerili da svi ventili pravilno rade. Ako bilo koji od ventila ne radi pravilno, pogledajte poglavlje 8 „Rješavanje problema" na stranici 209. Ovaj se korak može ponoviti pritiskom na ◀ te potom **ENT** (vidjeti poglavlje „Opis" u korisničkom priručniku za CliniMACS Plus Instrument).

Pogon magneta također će biti ispitan tijekom sekvence provjere.



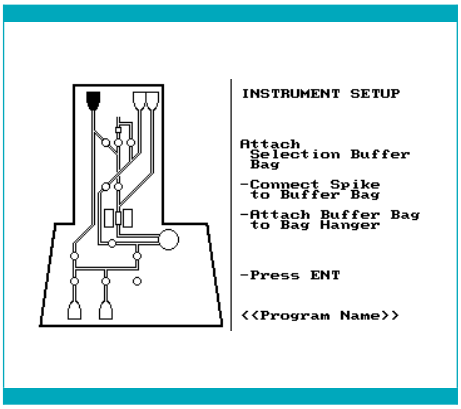
Zaslon 7.58: Namještanje ventila

Priključivanje pufera CliniMACS PBS/EDTA Buffer

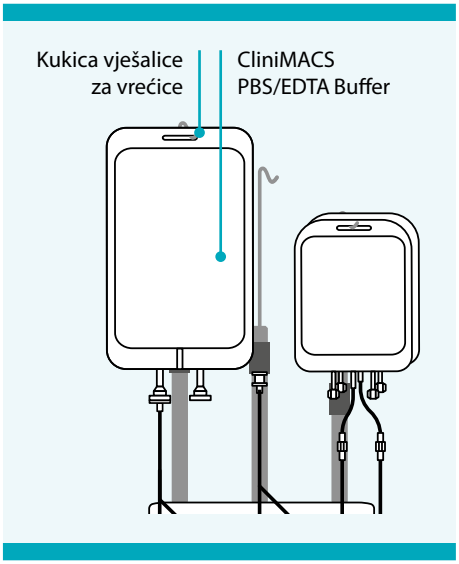
Na prozoru se prikazuje Zaslon 7.59.

Propisani pufer za CliniMACS Plus separaciju je CliniMACS PBS/EDTA Buffer kojem je dodan HSA do konačne koncentracije od 0,5% (m/v).

1. Primjenom aseptičnih tehnika uklonite čep sa šiljka za pufer (vidjeti Slika 7.12 na stranici 173) na kompletu cijevi i spojite ga na vrećicu za pufer. Uvjerite se da je septum probijen što omogućuje slobodan protok tekućine. Lagano stisnite vrećicu da osigurate da je šiljak probio vrećicu bez vanjskog curenja.
2. Priključite vrećicu za pufer na kukicu vrećice za pufer na vješalici za vrećicu (vidjeti Slika 7.18).
3. Prilagodite visinu vješalice za vrećicu za pufer. Podignite ili spustite vješalicu za vrećicu kako biste prilagodili visinu veličini vrećice za pufer. Osigurajte da je pozicionirana dovoljno visoko kako bi se spriječilo savijanje cijevi koje bi moglo ograničiti protok te da je dovoljno nisko kako bi se izbjeglo da se spojevi cijevi zategnu.



Zaslon 7.59: Priključivanje vrećica za pufer



Slika 7.18: Priključivanje vrećica za pufer

VAŽNO

Zbog nekoliko gravimetrijskih koraka pripreme i ispiranja, od velike je važnosti da se vrećica za pufer pozicionira što je moguće na većoj visini kako bi se osiguralo da je iznad vrećice Reapplication Bag i vrećice Non-Target Cell Bag (vidjeti Slika 7.20 na stranici 185).

Za nastavak pritisnite **ENT**.

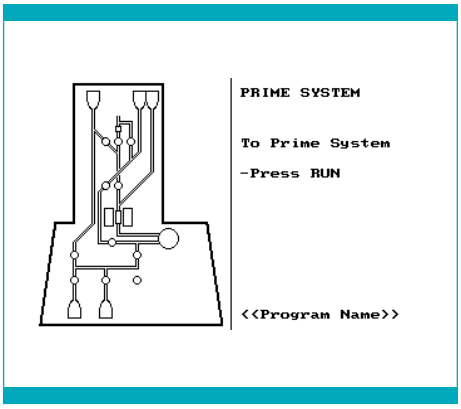
Početak pripreme

Na prozoru se prikazuje Zaslon 7.60.

Da biste započeli pripremu, pritisnite **RUN**.

Na prozoru se prikazuje Zaslon 7.61.

Tijekom faze pripreme komplet cijevi puni se puferom CliniMACS PBS/EDTA Buffer. Pufer će cirkulirati kroz komplet cijevi uključujući i kolonu za razdvajanje. Tekućina za pripremu prikuplja se u vrećice Buffer Waste Bag, Reapplication Bag i Non-Target Cell Bag dok vrećica Cell Collection Bag ostaje prazna (vidjeti Slika 7.12 na stranici 173). Ciklusi pripreme bit će nastavljeni uz ponavljanje niza koraka.



Zaslon 7.60: Početak pripreme

Faza pripreme trajat će približno 2,5 minute. Status pripreme bit će ažuriran na zaslonu.

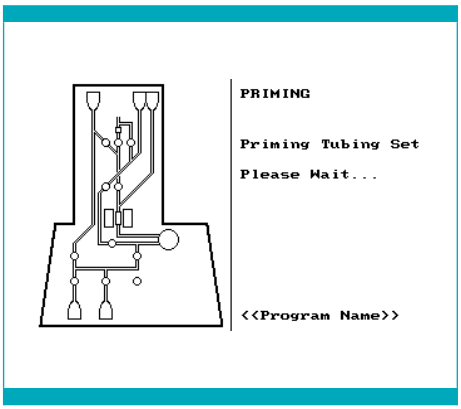
Provjera tijekom pripreme

Tijekom faze pripreme provjerite ima li na svim cijevima, nastavcima, ventilima i koloni za razdvajanje bilo kakvog curenja ili bilo kakvih presavijenih mjesta koja bi mogla blokirati protok tekućine.

Ako primijetite curenja ili kvarove, pritisnite **STOP** da zaustavite rad.

Rukovatelj će imati 600 sekundi na raspolaganju da riješi problem.

Nastavite s procesom tako što ćete pritisnuti **RUN**.



Zaslon 7.61: Priprema u tijeku

Nakon 600 sekundi razdvajanje će biti prekinuto. Ako rukovatelj ne može riješiti problem ili ako je komplet cijevi u kvaru, uklonite komplet cijevi i zamijenite ga novim.

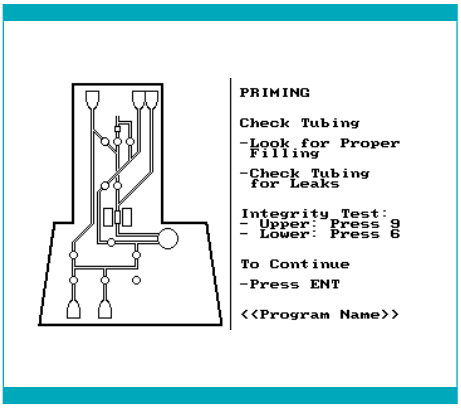
Napomena: nakon što priprema započne, nije moguće vratiti se na postupak podešavanja instrumenta.

Završna provjera svih cijevi i priključaka

Na prozoru se prikazuje Zaslon 7.62.

Prije početka rada provjerite sljedeće:

- tekućinu u svim dijelovima kompleta cijevi osim cijevi iznad ventila br. 2 i 3
- da nema viška zraka u kompletu cijevi
- tekućinu u vrećicama Reapplication Bag, Buffer Waste Bag i Non-Target Cell Bag
- da nema tekućine u vrećici Cell Collection Bag



Zaslon 7.62: Završna provjera cijevi i priključaka

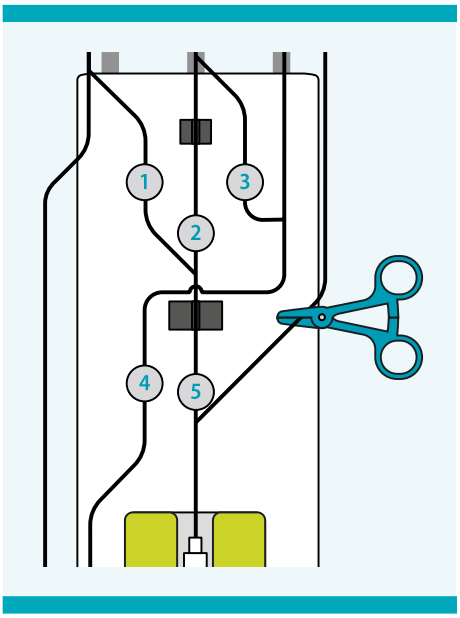
Još uvijek nemojte pritisnuti **ENT**.

Ispitivanje cjelovitosti

Radi dodatne sigurnosti mora se provesti ispitivanje cjelovitosti kako bi se ispitalo ima li propuštanja na kompletu cijevi. Sekvenca ispitivanja sastoji se od dvije automatizirane sekvence koje omogućuju zasebno stvaranje predtlaka i ispitivanje oba dijela kompleta cijevi, i gornjeg i donjeg.

⚠ OPREZ

Rizik od kašnjenja procesa. Ako stezaljka ispod vrećice Non-Target Cell Bag nije uklonjena nakon dovršetka ispitivanja cjelovitosti, neciljane (označene) stanice ne mogu se ukloniti iz kolone za razdvajanje tijekom eluiranja. Daljnje zadržavanje neciljnih stanica nakon toga bit će nemoguće. Postupak razdvajanja treba ponoviti. Uklonite stezaljku nakon dovršetka ispitivanja cjelovitosti.



Slika 7.19: Priprema za ispitivanje cjelovitosti

VAŽNO

Ispitivanje cjelovitosti funkcionirat će pravilno samo ako je cijev stegnuta ispod vrećice Non-Target Cell Bag. Stegnite cijev ispod vrećice Non-Target Cell Bag prije pokretanja ispitivanja cjelovitosti. Uklonite stezaljku nakon dovršetka ispitivanja cjelovitosti.

Ispitivanje cjelovitosti za gornji dio kompleta cijevi

1. Kada rukovatelj provede „završnu provjeru svih cijevi i priključaka" na prozoru se prikazuje Zaslon 7.63.
2. Nakon provođenja „završne provjere svih cijevi i priključaka" **nemojte** pritisnuti ENT.
3. Da biste započeli ispitivanje cjelovitosti na gornjem dijelu, pritisnite 9.

   Na prozoru se prikazuje Zaslon 7.64.

   VAŽNO
   Stegnite cijev ispod nepovratnog ventila vrećice Non-Target Cell Bag.
4. Za pokretanje sekvence ispitivanja pritisnite RUN.

   Za povratak na Zaslon 7.63 pritisnite ◄.
5. Kada se pritisne RUN, instrument započinje automatiziranu sekvencu ispitivanja za gornji dio kompleta cijevi.

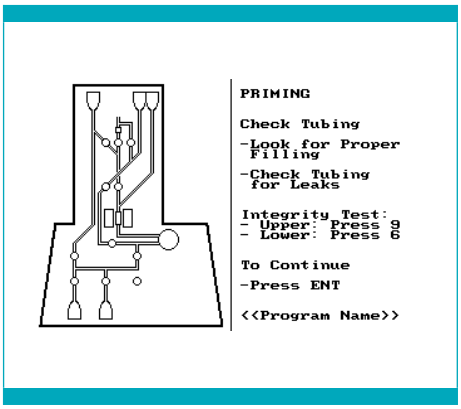
   Na prozoru se prikazuje Zaslon 7.65.

   Stvorit će se predtlak i zadržat će se dvije minute. Tijekom tog vremena rukovatelj treba provjeriti sve spojeve iznad gornjeg spoja cijevi pumpe.

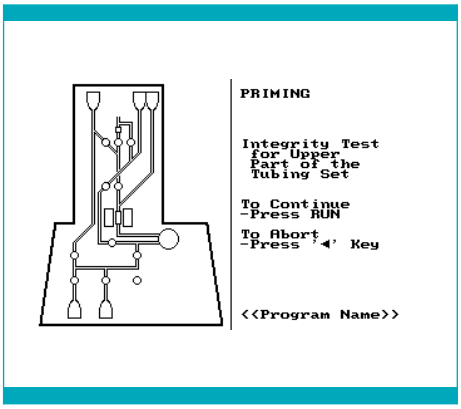
   U svakoj se točki sekvenca ispitivanja može dovršiti pritiskom na ENT.
6. Nakon dvije minute tlak se automatski otpušta, a na prozoru se prikazuje Zaslon 7.63.

   Provjerite je li došlo do bilo kakvih curenja tijekom sekvence ispitivanja. Ako primijetite curenje na bilo kojem spoju komplete cijevi, komplet cijevi se mora ukloniti i zamijeniti novim.

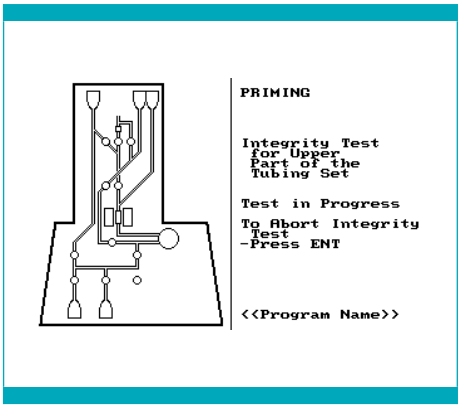
   Obratite se tehničkoj službi Miltenyi Biotec Technical Support kako biste dobili upute vezane uz povrat neispravnog kompleta cijevi.
7. Ako nema curenja, nastavite s ispitivanjem cjelovitosti donjeg dijela kompleta cijevi.



Zaslon 7.63: Pokretanje ispitivanja cjelovitosti za gornji dio



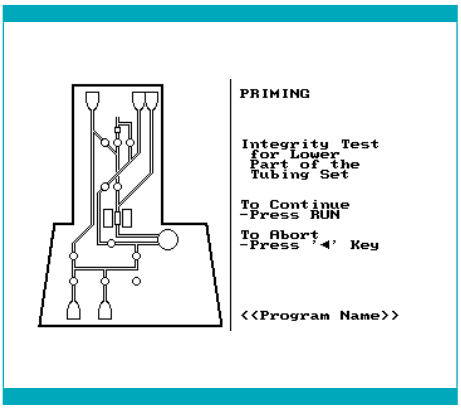
Zaslon 7.64: Pokretanje ispitivanja cjelovitosti za gornji dio



Zaslon 7.65: Pokretanje ispitivanja cjelovitosti za gornji dio

Ispitivanje cjelovitosti za donji dio kompleta cijevi

Na prozoru se prikazuje Zaslon 7.63.



Zaslon 7.66: Pokretanje ispitivanja cjelovitosti za donji dio

1. Da biste započeli ispitivanje cjelovitosti, pritisnite **6**.
   Nemojte pritisnuti **ENT**.

   Na prozoru se prikazuje Zaslon 7.66.

2. Za pokretanje sekvence ispitivanja pritisnite **RUN**.

   Za povratak na Zaslon 7.63 pritisnite ◄.

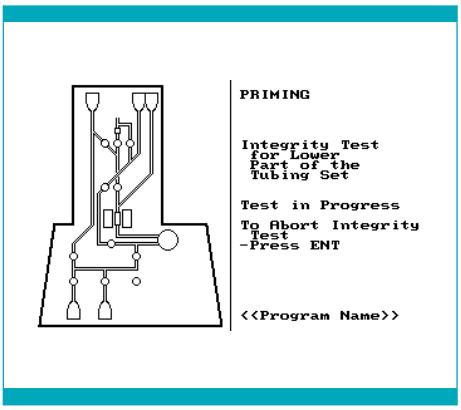
3. Kada se pritisne **RUN**, instrument započinje automatiziranu sekvencu ispitivanja za donji dio kompleta cijevi.

   Na prozoru se prikazuje Zaslon 7.67.

   Stvorit će se predtlak i zadržat će se 30 sekundi.

   Tijekom tog vremena rukovatelj treba pratiti donji spoj cijevi pumpe i T-komade između ventila br. 6, 8, 9 i 10.

   U svakoj se točki sekvenca ispitivanja može dovršiti pritiskom na **ENT**.



Zaslon 7.67: Ispitivanje cjelovitosti za donji dio u tijeku

4. Nakon 30 sekundi tlak se automatski otpušta, a na prozoru se prikazuje Zaslon 7.63.

   Rukovatelj mora provjeriti je li došlo do bilo kakvih curenja tijekom sekvence ispitivanja. Ako primijetite curenje na bilo kojem spoju komplete cijevi, komplet cijevi se mora ukloniti i zamijeniti novim.

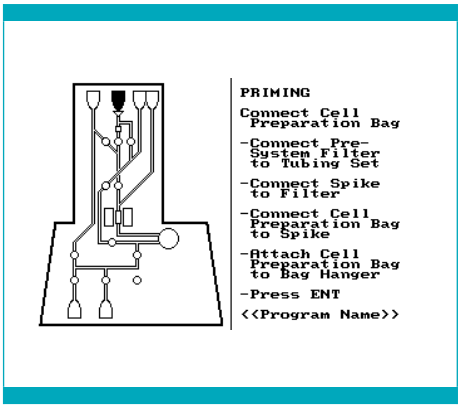
   Obratite se tehničkoj službi Miltenyi Biotec Technical Support kako biste dobili upute vezane uz povrat neispravnog kompleta cijevi.

5. **Otvorite prolaz do vrećice Non-Target Cell Bag tako što ćete ukloniti stezaljku ispod nepovratnog ventila.**

6. Ako nema curenja, rukovatelj sad može nastaviti sa sljedećim korakom pritiskom na **ENT**.

Spajanje vrećice Cell Preparation Bag

Na prozoru se prikazuje Zaslon 7.68.



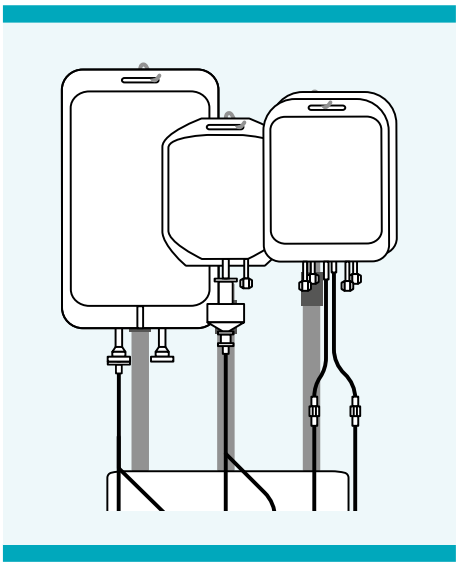
Zaslon 7.68: Spajanje vrećice Cell Preparation Bag

Spojite vrećicu Cell Preparation Bag (u kojoj se nalaze magnetski označene stanice) na komplet cijevi:

1. Uklonite navojni čep (vidjeti Slika 7.12 na stranici 173) s kompleta cijevi.
2. Uklonite čep sa šiljka filtra predsustava. Čvrsto umetnite šiljak filtra predsustava u komplet cijevi tako da osigurate da je septum probijen.
3. Uklonite čepove s filtra predsustava i tupog kraja priključka šiljka i međusobno spojite oba dijela.
4. Uklonite drugi čep s priključka šiljka i spojite šiljak na vrećicu Cell Preparation Bag tako da osigurate da je septum probijen što omogućuje slobodan protok tekućine. Lagano stisnite vrećicu da osigurate da je šiljak probio vrećicu.
5. Provjerite spoj između vrećice Cell Preparation Bag, priključka šiljka, filtra predsustava i kompleta cijevi da potvrdite da je spoj siguran.
6. Objesite vrećicu Cell Preparation Bag na vješalicu za vrećicu (vidjeti Slika 7.21).
7. Uvjerite se da vrećice i cijevi priključene na vješalicu za vrećicu nisu niti zategnute niti savijene.

   Zbog gravimetrijskih koraka pripreme i ispiranja koji su provedeni tijekom automatiziranog razdvajanja vrlo je važno da se vrećice pravilno izravnaju. Također, radi osiguravanja kompletne obrade uzorka od velike je važnosti staviti vrećicu Reapplication i vrećicu Non-Target Cell Bag tako da su više od vrećice Cell Preparation Bag (vidjeti Slika 7.20):

   - **Najviši položaj:** vrećica za pufer
   - **Središnji položaj:** vrećice Reapplication i Non-Target Cell Bag
   - **Najniži položaj:** Cell Preparation Bag



Slika 7.20: Pravilno položene vrećice

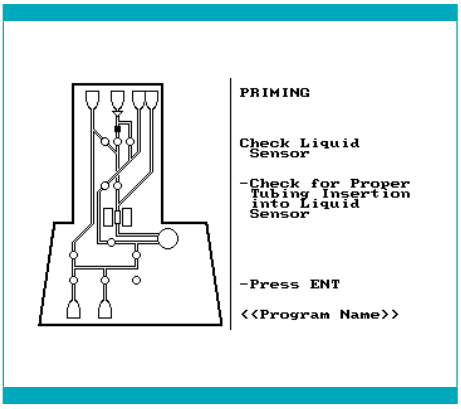
Za nastavak pritisnite **ENT**.

Završna provjera senzora tekućine

Na prozoru se prikazuje Zaslon 7.69.

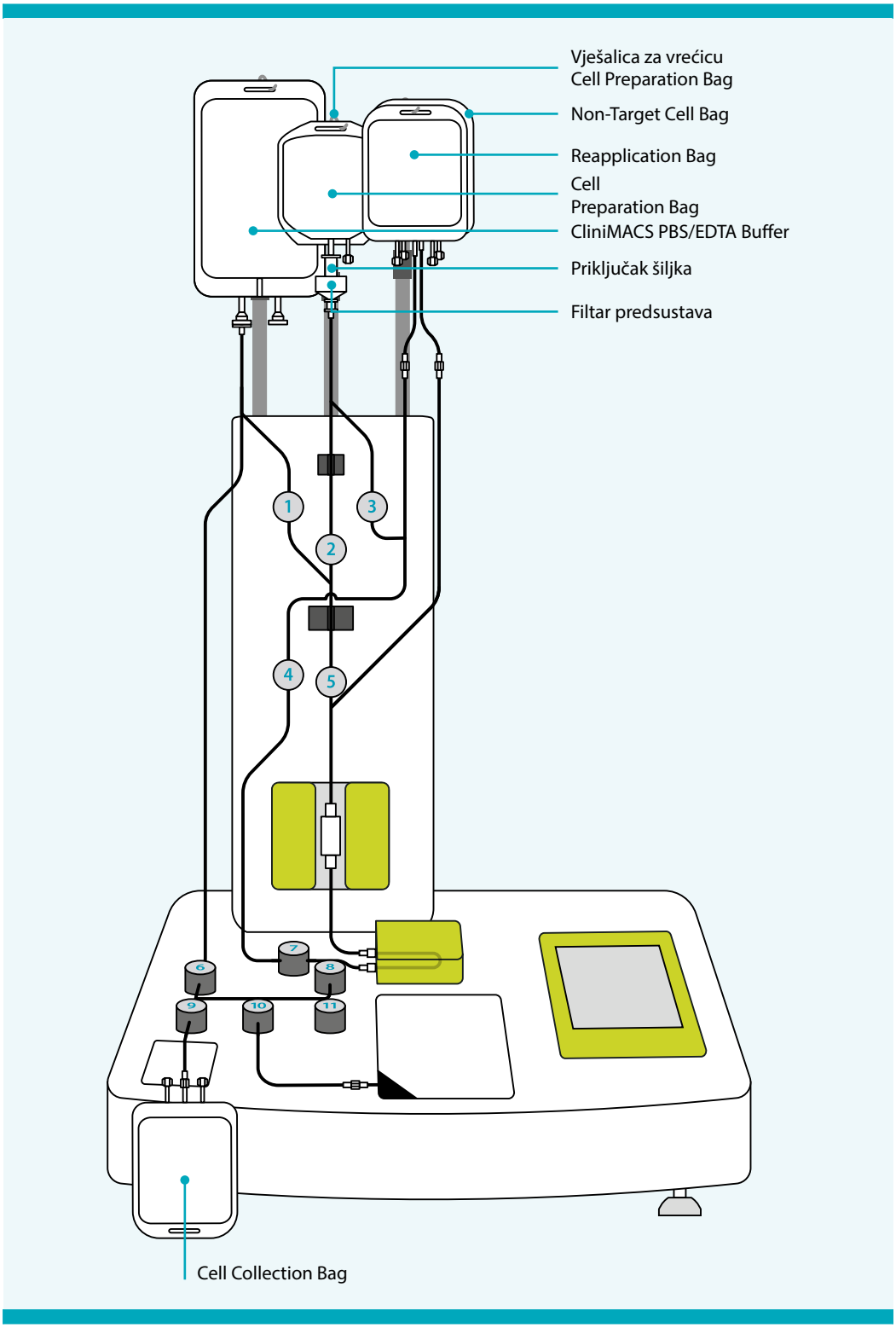
1. Provjerite cijev senzora tekućine. Osigurajte da je cijev pravilno uvedena, da u njoj nema nikakve vanjske tekućine te da nije pomjerena tijekom postupka postavljanja.
2. Potvrdite da je neometan protok tekućine moguć do svake vrećice.

Za nastavak pritisnite **ENT**.



Zaslon 7.69: Završna provjera senzora tekućine

▶ **Prijeđite na KORAK 4.**

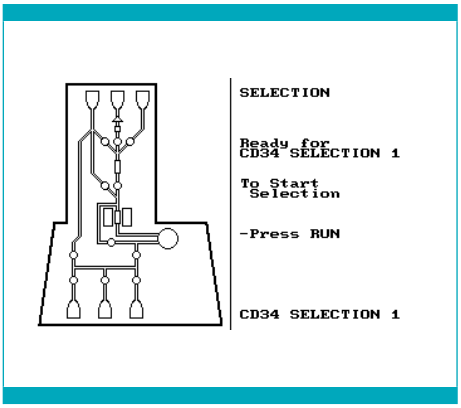


Slika 7.21: CliniMACS Plus Instrument s CliniMACS Depletion Tubing Set, CliniMACS PBS/EDTA Buffer, Cell Preparation Bag i Cell Collection Bag

7.4 KORAK 4: CliniMACS Plus separacija

7.4.1 CD34 SELECTION 1/2

Kada se završna provjera dovrši, CliniMACS Plus Instrument spreman je za započinjanje razdvajanja. Na prozoru se prikazuje Zaslon 7.70.

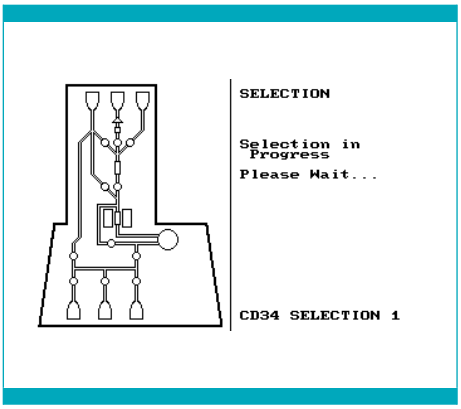


Zaslon 7.70: Pokretanje razdvajanja

Za nastavak pritisnite **RUN**.

Kada se pritisne **RUN**, instrument će automatski provesti odabrani postupak razdvajanja.

U svakoj fazi rada zaslon sličan Zaslon 7.71 prikazuje se kako bi se predstavio status postupka razdvajanja.



Zaslon 7.71: Razdvajanje u tijeku

Indikator položaja magneta prikazan je u vidu dva crna polja pored kolone za razdvajanje kada je magnet u otvorenom položaju „ON", tj. kada je pomaknut naprijed kako bi magnetizirao kolonu za razdvajanje. Ako je indikator položaja magneta proziran (npr. Zaslon 7.70), magnet je u zatvorenom položaju „OFF", tj. pomaknut je prema stražnjoj strani instrumenta. Kada se magnet izvuče, kolona za razdvajanje je izvan magnetskog polja i više se ne magnetizira.

Napomena: na zaslonu se može prikazati drugačiji naziv programa ovisno o odabranom programu razdvajanja (CD34 SELECTION 1 ili 2).

Postupak razdvajanja

Punjenje stanica

Postupak razdvajanja započinje s punjenjem filtra predsustava kako bi se uklonio preostali zrak iz filtra predsustava.

Potom započinje razdvajanje označenih stanica. Pumpa povlači sadržaj vrećice Cell Preparation Bag u komplet cijevi i puni stanični proizvod preko predkolone u kolonu za razdvajanje. Magnetski označene stanice (ciljne stanice) zadržavaju se u koloni za razdvajanje, stavljaju se u magnetsko polje, dok neoznačene stanice (neciljne stanice) prolaze i prikupljaju se u vrećicu Negative Fraction Bag. Kada je vrećica Cell Preparation Bag prazna (otkriva se automatskim senzorom tekućine), filtar predsustava dvaput se ispire puferom.

Ispiranje kolone I

Predkolona i kolona za razdvajanje temeljito se ispiru kako bi se uklonile sve neoznačene stanice. Pufer za ispiranje prikuplja se u vrećicu Buffer Waste Bag. Kada započne ispiranje kolone I, prikazuje se ukupno preostalo vrijeme do kraja postupka razdvajanja.

VAŽNO
Na početku razdvajanja pufer se pumpa nagore prema vrećici Cell Preparation Bag kako bi se napunio filtar predsustava. Lagano dodirnite bočnu stranu filtra nekoliko puta kako biste uklonili sve mjehuriće koji bi mogli biti uhvaćeni u filtru.

Otpuštanje stanica I

Magnet se pomiče prema stražnjoj strani instrumenta (zatvoreni položaj „OFF"). Zadržane se stanice otpuštaju pri velikoj brzini, ali stanice ostaju unutar internog ciklusa cijevi.

Ponovno punjenje stanica I

Magnet se ponovno pomiče u otvoreni položaj „ON" kako bi magnetizirao kolonu za razdvajanje i stanice se ponovno primjenjuju na kolonu za razdvajanje.

Ispiranje kolone II

Nakon ponovnog punjenja stanica slijedi drugi korak ispiranja kako bi se uklonile preostale neoznačene stanice. Također se sve cijevi ispiru nekoliko puta.

Otpuštanje stanica II, ponovno punjenje stanica II, ispiranje kolone III

Stanice se otpuštaju i još jednom primjenjuju na kolonu za razdvajanje kako bi se uklonile sve neoznačene stanice koje su se nespecifično zalijepile za matricu kolone. Nakon toga kolona za razdvajanje još se jednom ispire.

Otpuštanje stanica III, ponovno punjenje stanica III, ispiranje kolone IV

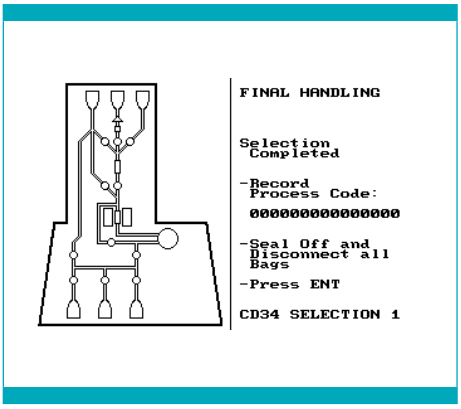
Pored toga, program razdvajanja CD34 SELECTION 2 uključuje treći korak otpuštanja i ponovne primjene.

Završno eluiranje stanica

Magnet se pomiče u zatvoreni položaj „OFF" i magnetski označene stanice otpuštaju se iz kolone za razdvajanje i prikupljaju u priključenu vrećicu Cell Collection Bag.

Odspajanje vrećica i bilježenje procesnog koda

Kada se rad dovrši, na prozoru se prikazuje Zaslon 7.72.

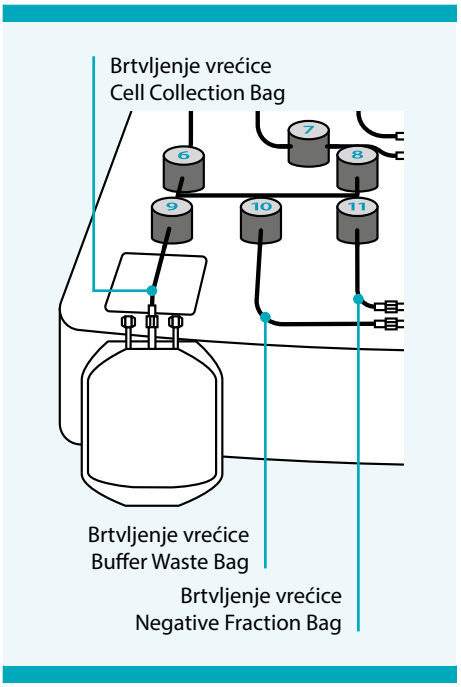


Zaslon 7.72: Odspajanje vrećica i bilježenje procesnog koda

1. Zabilježite procesni kod.
2. Stegnite ili zabrtvite cijev iznad luer lock priključka koji povezuje vrećicu Cell Collection Bag s kompletom cijevi (vidjeti Slika 7.22).

   Napravite tri hermetičke brtve na cijevi izravno ispod ventila br. 9. Pažljivo odvojite srednji šav da odspojite vrećicu Cell Collection Bag s kompleta cijevi.
3. Izvažite napunjenu vrećicu Cell Collection Bag. Zapišite težinu.

   Odredite težinu ciljane frakcije stanica tako što ćete oduzeti težinu prazne vrećice Cell Collection Bag od težine vrećice Cell Collection Bag u kojoj se nalaze ciljne stanice. Zapišite težinu.
4. Temeljito izmiješajte suspenziju ciljnih stanica rotiranjem vrećice. Uzmite prikladnu količinu, npr. 0,5 mL i zadržite za analizu.
5. Koristeći uređaj za toplinsko brtvljenje zabrtvite cijev iznad luer lock priključka vrećice Negative Fraction Bag. Napravite tri hermetičke brtve na cijevi. Odvojite središnji šav da odspojite vrećicu Negative Fraction Bag.
6. Na isti način odspojite vrećicu Buffer Waste Bag.
7. Uklonite vrećicu Negative Fraction Bag i vrećicu Buffer Waste Bag. Zadržite sve vrećice do dovršetka konačne analize svih stanica.



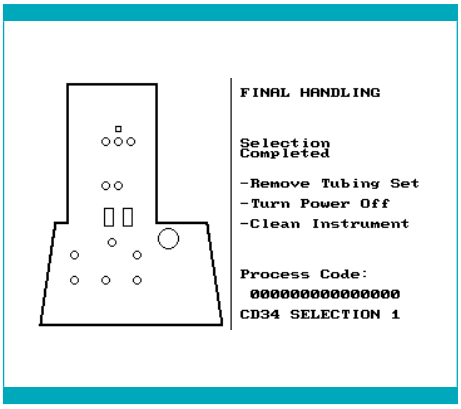
Slika 7.22: Odspajanje vrećica

Ciljne stanice se sad mogu obraditi u skladu s kliničkim protokolima.

Za nastavak pritisnite **RUN**.

Uklanjanje kompleta cijevi i isključivanje

Na prozoru se prikazuje Zaslon 7.73.



Zaslon 7.73: Uklanjanje kompleta cijevi i isključivanje

1. Uklonite komplet cijevi: započevši s ventilima br. 6, 9, 10 i 11 pa nadalje, otpustite cijev sa senzora tekućine i s ventila tako što ćete pritisnuti ventile. Otpustite kolone s držača kolone. Zbrinite komplet cijevi na otpad kao biološki opasan otpad u skladu sa standardnim bolničkim postupcima.
2. Isključite CliniMACS Plus Instrument.
3. Očistite instrument u skladu s uputama za čišćenje, pogledajte odjeljak „Čišćenje i dezinfekcija" u korisničkom priručniku za CliniMACS Plus Instrument. Pridržavajte se standardnih postupaka za postupanje sa zaraznim materijalom.

Analiza stanica

VAŽNO

- CliniMACS PBS/EDTA Buffer ne mora se ukloniti prije nanošenja razdvojenih ciljnih stanica ako volumen ne premašuje 100 mL po transplantatu pri odgovarajućoj brzini infuzije. U obzir se moraju uzeti bubrežni status pacijenta i utjecaji na krvne elektrolite. Osobito u djece, brzine infuzije treba prilagoditi na odgovarajući način.
- Ako volumen ciljane frakcije stanica premaši 100 mL, mora se smanjiti odgovarajućim sredstvima, npr. centrifugiranjem ili izmjenom pufera do infuzijske otopine odobrene u državi korisnika.

⚠ OPREZ

Rizik od smanjene kvalitete ciljnih stanica. Ciljne stanice moraju se analizirati i potvrditi da bi se ispunili zahtjevi korisnika, u suprotnom prikladnost za kliničku primjenu može biti umanjena. Pregledajte ciljne stanice u vezi kvalitete i količine s obzirom na njihovu predviđenu upotrebu.

To mora uključivati sljedeće parametre:

- ukupni broj leukocita
- vijabilnost ukupnog broja ciljnih stanica
- čistoću i ponovno dobivanje ciljnih stanica

Također se preporučuje da se odredi ukupan broj leukocita i vijabilnost neciljane frakcije stanica. Popis predstavlja primjer i druga ispitivanja trebaju biti uključena na temelju namjenske uporabe i kliničkih protokola. Zabilježite podatke analize.

7.4.2 ENRICHMENT 1.1

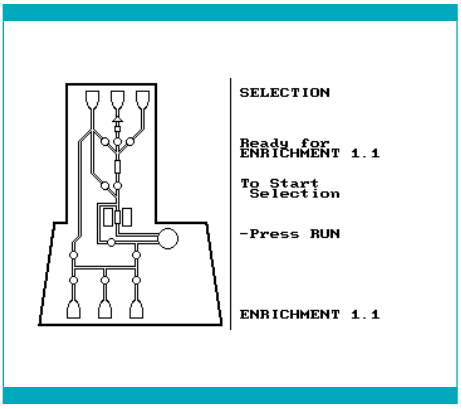
Kada se završna provjera dovrši, CliniMACS Plus Instrument spreman je za započinjanje razdvajanja. Na prozoru se prikazuje Zaslon 7.74.

Za nastavak pritisnite **RUN**.

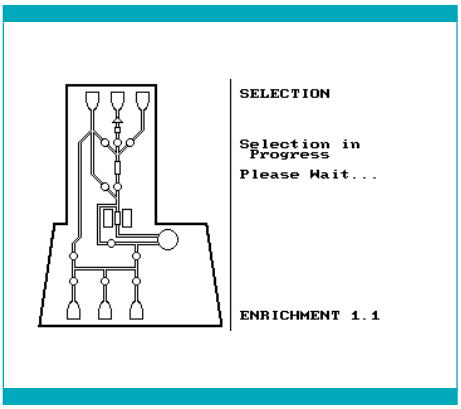
Kada se pritisne **RUN**, instrument će automatski provesti odabrani postupak razdvajanja.

U svakoj fazi rada zaslon sličan Zaslon 7.75 prikazuje se kako bi se predstavio status postupka razdvajanja.

Indikator položaja magneta prikazan je u vidu dva crna polja pored kolone za razdvajanje kada je magnet u otvorenom položaju „ON", tj. kada je pomaknut naprijed kako bi magnetizirao kolonu za razdvajanje. Ako je indikator položaja magneta proziran (npr. Zaslon 7.74), magnet je u zatvorenom položaju „OFF", tj. pomaknut je prema stražnjoj strani instrumenta. Kada se magnet izvuče, kolona za razdvajanje je izvan magnetskog polja i ne magnetizira se.



Zaslon 7.74: Pokretanje razdvajanja



Zaslon 7.75: Razdvajanje u tijeku

Postupak razdvajanja

Punjenje stanica

Postupak razdvajanja započinje s punjenjem filtra predsustava kako bi se uklonio preostali zrak iz filtra predsustava. Potom započinje razdvajanje označenih stanica. Pumpa povlači sadržaj vrećice Cell Preparation Bag u komplet cijevi i puni stanični proizvod preko predkolone u kolonu za razdvajanje. Magnetski označene stanice (ciljne stanice) zadržavaju se u koloni za razdvajanje, stavljaju se u magnetsko polje, dok neoznačene stanice (neciljne stanice) prolaze i prikupljaju se u vrećicu Negative Fraction Bag.

VAŽNO

Na početku razdvajanja pufer se pumpa nagore prema vrećici Cell Preparation Bag kako bi se napunio filtar predsustava. Lagano dodirnite bočnu stranu filtra nekoliko puta kako biste uklonili sve mjehuriće koji bi mogli biti uhvaćeni u filtru.

Napomena:

- Ako broj magnetski označenih stanica (izračunatih s pomoću CliniMACS Plus softvera) premaši kapacitet vezivanja kolone za razdvajanje, program razdvajanja automatski puni i razdvaja uzorak stanica na prikladne dijelove („punjenje u fazama").
- Punjenje će se zaustaviti kada se dostigne kapacitet kolone za razdvajanje, a program razdvajanja će prijeći na sljedeći korak razdvajanja. Nakon dovršetka posljednjeg koraka (završno eluiranje stanica) sljedeći dio uzorka bit će napunjen u kolonu i obrađen na odgovarajući način.

Ispiranje kolone I

Predkolona i kolona za razdvajanje temeljito se ispiru kako bi se uklonile sve neoznačene stanice. Pufer za ispiranje prikuplja se u vrećicu Buffer Waste Bag.

Otpuštanje stanica

Magnet se pomiče prema stražnjoj strani instrumenta (zatvoreni položaj „OFF"). Zadržane se stanice otpuštaju pri velikoj brzini, ali ostaju unutar internog ciklusa cijevi.

Ponovno punjenje stanica

Magnet se ponovno pomiče u otvoreni položaj „ON" kako bi magnetizirao kolonu za razdvajanje i stanice se ponovno primjenjuju na kolonu za razdvajanje.

Ispiranje kolone II

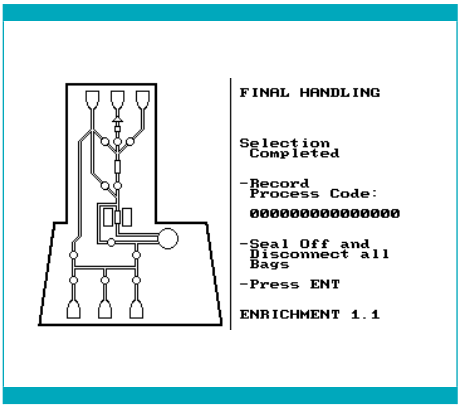
Nakon ponovnog punjenja stanica slijedi druga sekvenca ispiranja kolone kako bi se uklonile preostale neoznačene stanice. Također se sve cijevi ispiru nekoliko puta.

Završno eluiranje stanica

Magnet se pomiče u zatvoreni položaj „OFF" i magnetski označene stanice (ciljne stanice) otpuštaju se iz kolone za razdvajanje i prikupljaju u priključenu vrećicu Cell Collection Bag.

Odspajanje vrećica i bilježenje procesnog koda

Kada se rad dovrši, na prozoru se prikazuje Zaslon 7.76.

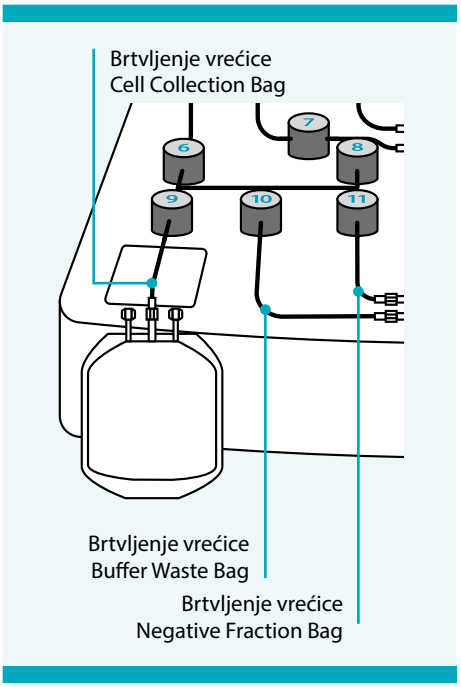


Zaslon 7.76: Odspajanje vrećica i bilježenje procesnog koda

1. Zabilježite procesni kod.
2. Stegnite ili zabrtvite cijev iznad luer lock priključka koji povezuje vrećicu Cell Collection Bag s kompletom cijevi (vidjeti Slika 7.23).

   Napravite tri hermetičke brtve na cijevi izravno ispod ventila br. 9. Pažljivo odvojite srednji šav da odspojite vrećicu Cell Collection Bag s kompleta cijevi.
3. Izvažite napunjenu vrećicu Cell Collection Bag. Zapišite težinu.

   Odredite težinu ciljane frakcije stanica tako što ćete oduzeti težinu prazne vrećice Cell Collection Bag od težine vrećice Cell Collection Bag u kojoj se nalaze ciljne stanice. Zapišite težinu.
4. Temeljito izmiješajte suspenziju ciljnih stanica rotiranjem vrećice. Uzmite prikladnu količinu, npr. 0,5 mL i zadržite za analizu.
5. Koristeći uređaj za toplinsko brtvljenje zabrtvite cijev iznad luer lock priključka vrećice Negative Fraction Bag. Napravite tri hermetičke brtve na cijevi. Odvojite središnji šav da odspojite vrećicu Negative Fraction Bag.
6. Na isti način odspojite vrećicu Buffer Waste Bag.
7. Uklonite vrećicu Negative Fraction Bag i vrećicu Buffer Waste Bag. Zadržite sve vrećice do dovršetka konačne analize svih stanica.



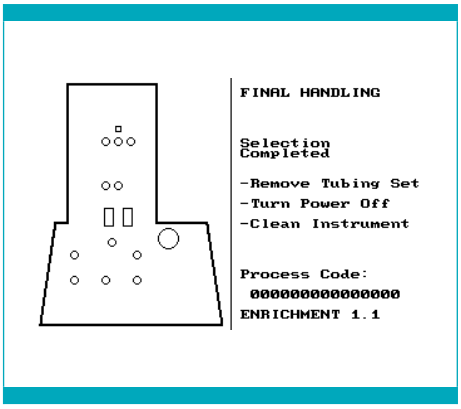
Slika 7.23: Odspajanje vrećica

Ciljne stanice se sad mogu obraditi u skladu s kliničkim protokolima.

Za nastavak pritisnite **ENT**.

Uklanjanje kompleta cijevi i isključivanje

Na prozoru se prikazuje Zaslon 7.77.



Zaslon 7.77: Uklanjanje kompleta cijevi i isključivanje

1. Uklonite komplet cijevi: započevši s ventilima br. 6, 9, 10 i 11 pa nadalje, otpustite cijev sa senzora tekućine i s ventila tako što ćete pritisnuti ventile. Otpustite kolone s držača kolone. Zbrinite komplet cijevi na otpad kao biološki opasan otpad u skladu sa standardnim bolničkim postupcima.
2. Isključite CliniMACS Plus Instrument.
3. Očistite instrument u skladu s uputama za čišćenje, pogledajte odjeljak „Čišćenje i dezinfekcija" u korisničkom priručniku za CliniMACS Plus Instrument. Pridržavajte se standardnih postupaka za postupanje sa zaraznim materijalom.

Analiza stanica

VAŽNO

- CliniMACS PBS/EDTA Buffer ne mora se ukloniti prije nanošenja razdvojenih ciljnih stanica ako volumen ne premašuje 100 mL po transplantatu pri odgovarajućoj brzini infuzije. U obzir se moraju uzeti bubrežni status pacijenta i utjecaji na krvne elektrolite. Osobito u djece, brzine infuzije treba prilagoditi na odgovarajući način.
- Ako volumen ciljane frakcije stanica premaši 100 mL, mora se smanjiti odgovarajućim sredstvima, npr. centrifugiranjem ili izmjenom pufera do infuzijske otopine odobrene u državi korisnika.

⚠ OPREZ

Rizik od smanjene kvalitete ciljnih stanica. Ciljne stanice moraju se analizirati i potvrditi da bi se ispunili zahtjevi korisnika, u suprotnom prikladnost za kliničku primjenu može biti umanjena. Pregledajte ciljne stanice u vezi kvalitete i količine s obzirom na njihovu predviđenu upotrebu.

To mora uključivati sljedeće parametre:

- ukupni broj leukocita
- vijabilnost ukupnog broja ciljnih stanica
- čistoću (učinkovitost iscrpljivanja) i ponovno dobivanje ciljnih stanica

Također se preporučuje da se odredi ukupan broj leukocita i vijabilnost neciljane frakcije stanica. Popis predstavlja primjer i druga ispitivanja trebaju biti uključena na temelju namjenske uporabe i kliničkih protokola. Zabilježite podatke analize.

7.4.3 ENRICHMENT 3.2

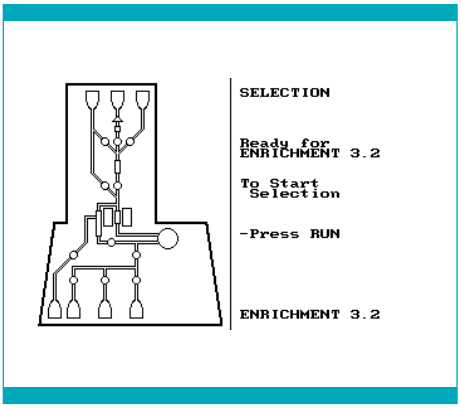
Kada se završna provjera dovrši, CliniMACS Plus Instrument spreman je za započinjanje razdvajanja. Na prozoru se prikazuje Zaslon 7.78.

Za nastavak pritisnite **RUN**.

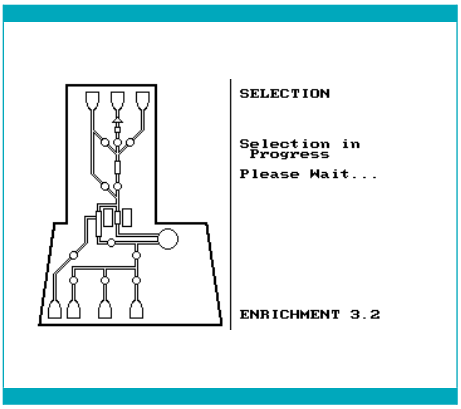
Kada se pritisne **RUN**, instrument će automatski provesti odabrani postupak razdvajanja.

U svakoj fazi rada zaslon sličan Zaslon 7.79 prikazuje se kako bi se predstavio status postupka razdvajanja.

Indikator položaja magneta prikazan je u vidu dva crna polja pored kolone za razdvajanje kada je magnet u otvorenom položaju „ON", tj. kada je pomaknut naprijed kako bi magnetizirao kolonu za razdvajanje. Ako je indikator položaja magneta proziran (npr. Zaslon 7.78), magnet je u zatvorenom položaju „OFF", tj. pomaknut je prema stražnjoj strani instrumenta. Kada se magnet izvuče, kolona za razdvajanje je izvan magnetskog polja i ne magnetizira se.



Zaslon 7.78: Pokretanje razdvajanja



Zaslon 7.79: Razdvajanje u tijeku

Postupak razdvajanja

Punjenje stanica

Postupak razdvajanja započinje s punjenjem filtra predsustava kako bi se uklonio preostali zrak iz filtra predsustava. Potom započinje razdvajanje označenih stanica. Pumpa povlači sadržaj vrećice Cell Preparation Bag u komplet cijevi i puni stanični proizvod preko predkolone u kolonu za razdvajanje. Magnetski označene stanice (ciljne stanice) zadržavaju se u koloni za razdvajanje, stavljaju se u magnetsko polje, dok neoznačene stanice (neciljne stanice) prolaze i prikupljaju se u vrećicu Negative Fraction Bag. Kada je vrećica Cell Preparation Bag prazna (otkriva se automatskim senzorom tekućine), filtar predsustava dvaput se ispire puferom.

VAŽNO

Na početku razdvajanja pufer se pumpa nagore prema vrećici Cell Preparation Bag kako bi se napunio filtar predsustava. Lagano dodirnite bočnu stranu filtra nekoliko puta kako biste uklonili sve mjehuriće koji bi mogli biti uhvaćeni u filtru.

Ispiranje kolone I

Predkolona i kolona za razdvajanje temeljito se ispiru kako bi se uklonile sve neoznačene stanice. Pufer za ispiranje prikuplja se u vrećicu Buffer Waste Bag.

Otpuštanje stanica I

Magnet se pomiče prema stražnjoj strani instrumenta (zatvoreni položaj „OFF"). Zadržane se stanice otpuštaju pri velikoj brzini, ali stanice ostaju unutar internog ciklusa cijevi.

Ponovno punjenje stanica I

Magnet se ponovno pomiče u otvoreni položaj „ON" kako bi magnetizirao kolonu za razdvajanje i stanice se ponovno primjenjuju na kolonu za razdvajanje.

Ispiranje kolone II

Nakon ponovnog punjenja stanica slijedi drugi korak ispiranja kako bi se uklonile preostale neoznačene stanice. Također se sve cijevi ispiru nekoliko puta.

Otpuštanje stanica II, ponovno punjenje stanica II, ispiranje kolone III

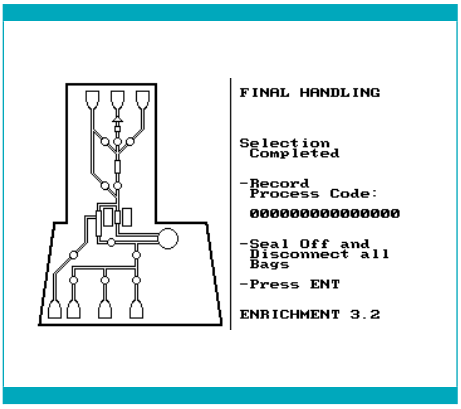
Stanice se otpuštaju i još jednom primjenjuju na kolonu za razdvajanje kako bi se uklonile sve neoznačene stanice koje su se nespecifično zalijepile za matricu kolone. Nakon toga kolona za razdvajanje još se jednom ispire.

Završno eluiranje stanica

Magnet se pomiče u zatvoreni položaj „OFF" i magnetski označene stanice (ciljne stanice) otpuštaju se i prikupljaju u vrećicu Cell Collection Bag.

Odspajanje vrećica i bilježenje procesnog koda

Kada se rad dovrši, na prozoru se prikazuje Zaslon 7.80.

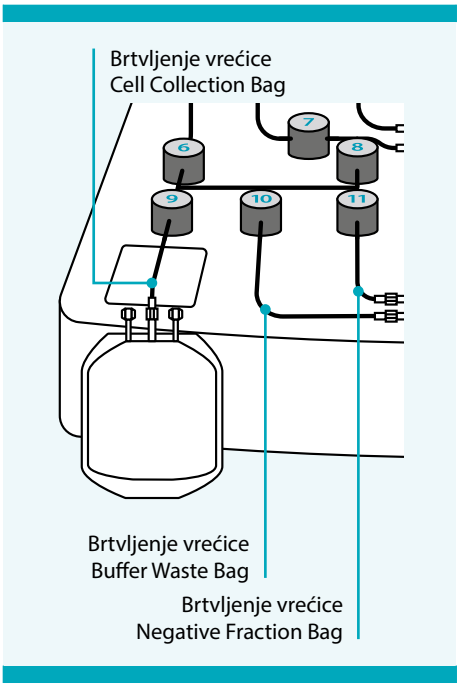


Zaslon 7.80: Odspajanje vrećica i bilježenje procesnog koda

1. Zabilježite procesni kod.
2. Stegnite ili zabrtvite cijev iznad luer lock priključka koji povezuje vrećicu Cell Collection Bag s kompletom cijevi (vidjeti Slika 7.24).

   Napravite tri hermetičke brtve na cijevi izravno ispod ventila br. 9. Pažljivo odvojite srednji šav da odspojite vrećicu Cell Collection Bag s kompleta cijevi.
3. Izvažite napunjenu vrećicu Cell Collection Bag. Zapišite težinu.

   Odredite težinu ciljane frakcije stanica tako što ćete oduzeti težinu prazne vrećice Cell Collection Bag od težine vrećice Cell Collection Bag u kojoj se nalaze ciljne stanice. Zapišite težinu.
4. Temeljito izmiješajte suspenziju ciljnih stanica rotiranjem vrećice. Uzmite prikladnu količinu, npr. 0,5 mL i zadržite za analizu.
5. Koristeći uređaj za toplinsko brtvljenje zabrtvite cijev iznad luer lock priključka vrećice Negative Fraction Bag. Napravite tri hermetičke brtve na cijevi. Odvojite središnji šav da odspojite vrećicu Negative Fraction Bag.
6. Na isti način odspojite vrećicu Buffer Waste Bag.
7. Uklonite vrećicu Negative Fraction Bag i vrećicu Buffer Waste Bag. Zadržite sve vrećice do dovršetka konačne analize svih stanica.



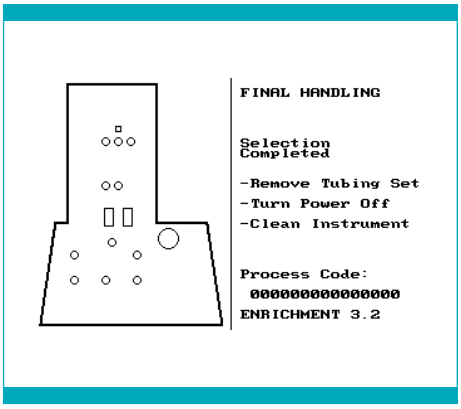
Slika 7.24: Odspajanje vrećica

Ciljne stanice se sad mogu obraditi u skladu s kliničkim protokolima.

Za nastavak pritisnite **ENT**.

Uklanjanje kompleta cijevi i isključivanje

Na prozoru se prikazuje Zaslon 7.81.



Zaslon 7.81: Uklanjanje kompleta cijevi i isključivanje

1. Uklonite komplet cijevi: započevši s ventilima br. 6, 9, 10 i 11 pa nadalje, otpustite cijev sa senzora tekućine i s ventila tako što ćete pritisnuti ventile. Otpustite kolone s držača kolone. Zbrinite komplet cijevi na otpad kao biološki opasan otpad u skladu sa standardnim bolničkim postupcima.
2. Isključite CliniMACS Plus Instrument.
3. Očistite instrument u skladu s uputama za čišćenje, pogledajte odjeljak „Čišćenje i dezinfekcija" u korisničkom priručniku za CliniMACS Plus Instrument. Pridržavajte se standardnih postupaka za postupanje sa zaraznim materijalom.

Analiza stanica

VAŽNO

- CliniMACS PBS/EDTA Buffer ne mora se ukloniti prije nanošenja razdvojenih ciljnih stanica ako volumen ne premašuje 100 mL po transplantatu pri odgovarajućoj brzini infuzije. U obzir se moraju uzeti bubrežni status pacijenta i utjecaji na krvne elektrolite. Osobito u djece, brzine infuzije treba prilagoditi na odgovarajući način.
- Ako volumen ciljane frakcije stanica premaši 100 mL, mora se smanjiti odgovarajućim sredstvima, npr. centrifugiranjem ili izmjenom pufera do infuzijske otopine odobrene u državi korisnika.

⚠ OPREZ

Rizik od smanjene kvalitete ciljnih stanica. Ciljne stanice moraju se analizirati i potvrditi da bi se ispunili zahtjevi korisnika, u suprotnom prikladnost za kliničku primjenu može biti umanjena. Pregledajte ciljne stanice u vezi kvalitete i količine s obzirom na njihovu predviđenu upotrebu.

To mora uključivati sljedeće parametre:

- ukupni broj leukocita
- vijabilnost ukupnog broja ciljnih stanica
- čistoću i ponovno dobivanje ciljnih stanica

Također se preporučuje da se odredi ukupan broj leukocita i vijabilnost neciljane frakcije stanica. Popis predstavlja primjer i druga ispitivanja trebaju biti uključena na temelju namjenske uporabe i kliničkih protokola. Zabilježite podatke analize.

7.4.4 DEPLETION 2.1

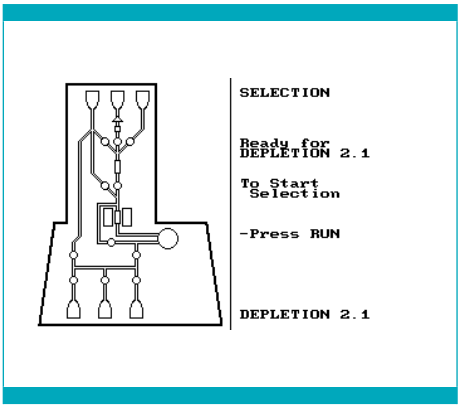
Kada se završna provjera dovrši, CliniMACS Plus Instrument spreman je za započinjanje razdvajanja. Na prozoru se prikazuje Zaslon 7.82.

Za nastavak pritisnite **RUN**.

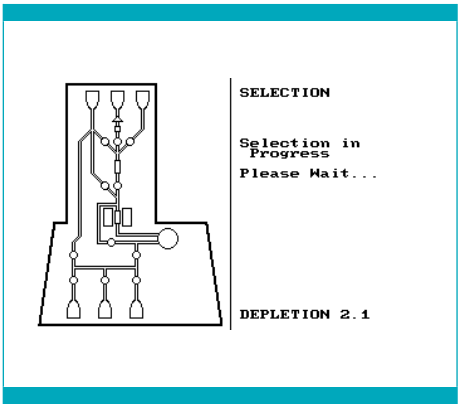
Kada se pritisne **RUN**, instrument će automatski provesti odabrani postupak razdvajanja.

U svakoj fazi rada zaslon sličan Zaslon 7.83 prikazuje se kako bi se predstavio status postupka razdvajanja.

Indikator položaja magneta prikazan je u vidu dva crna polja pored kolone za razdvajanje kada je magnet u otvorenom položaju „ON", tj. kada je pomaknut naprijed kako bi magnetizirao kolonu za razdvajanje. Ako je indikator položaja magneta proziran (npr. Zaslon 7.82), magnet je u zatvorenom položaju „OFF", tj. pomaknut je prema stražnjoj strani instrumenta. Kada se magnet izvuče, kolona za razdvajanje je izvan magnetskog polja i ne magnetizira se.



Zaslon 7.82: Pokretanje razdvajanja



Zaslon 7.83: Razdvajanje u tijeku

Postupak razdvajanja

Punjenje stanica

Postupak razdvajanja započinje s punjenjem filtra predsustava kako bi se završila priprema sustava. Potom započinje razdvajanje označenih stanica. Pumpa povlači sadržaj vrećice Cell Preparation Bag u komplet cijevi. Magnetski označene stanice (neciljne stanice) zadržavaju se u koloni za razdvajanje, stavljaju se u magnetsko polje, dok neoznačene stanice (ciljne stanice) prolaze i prikupljaju se u vrećicu Cell Collection Bag.

VAŽNO

Na početku razdvajanja pufer se pumpa nagore prema vrećici Cell Preparation Bag kako bi se napunio filtar predsustava. Lagano dodirnite bočnu stranu filtra nekoliko puta kako biste uklonili sve mjehuriće koji bi mogli biti uhvaćeni u filtru.

Ispiranje filtra predsustava

Nakon što se uzorak stanica u potpunosti napuni u komplet cijevi, filtar predsustava dvaput se ispire s puferom kako bi se smanjio gubitak stanica u filtru.

Napomena:

- Ako broj magnetski označenih stanica (izračunatih s pomoću CliniMACS Plus softvera) premaši kapacitet vezivanja kolone za razdvajanje, program razdvajanja automatski puni i razdvaja uzorak stanica na manje dijelove („punjenje u fazama").
- Punjenje će se zaustaviti kada se dostigne kapacitet kolone za razdvajanje, a program razdvajanja će prijeći na sljedeći korak razdvajanja. Nakon dovršetka posljednjeg koraka (završno eluiranje stanica) sljedeći dio uzorka bit će napunjen u kolonu.

Ispiranje kolone

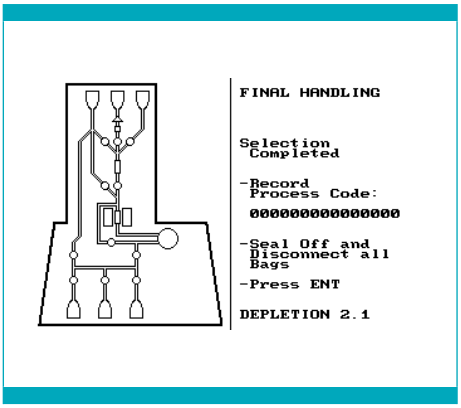
Predkolona i kolona za razdvajanje temeljito se ispiru kako bi se uklonile sve neoznačene stanice. Pufer za ispiranje prikuplja se u vrećicu Buffer Waste Bag.

Završno eluiranje stanica

Magnet se pomiče u zatvoreni položaj „OFF". Najprije se magnetski označene stanice eluiraju do vrećice Priming Waste Bag. Tek nakon što se dovrši posljednja faza punjenja, sve magnetski označene stanice (neciljne stanice) otpuštaju se iz kolone za razdvajanje i prikupljaju u vrećicu Negative Fraction Bag kako bi se smanjio prijenos s označenim stanicama u cijev pumpe.

Odspajanje vrećica i bilježenje procesnog koda

Kada se rad dovrši, na prozoru se prikazuje Zaslon 7.84.

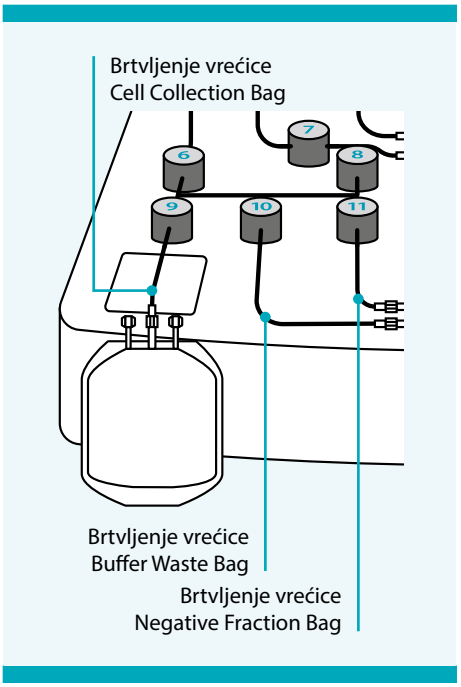


Zaslon 7.84: Odspajanje vrećica i bilježenje procesnog koda

1. Zabilježite procesni kod.
2. Stegnite ili zabrtvite cijev iznad luer lock priključka koji povezuje vrećicu Cell Collection Bag s kompletom cijevi (vidjeti Slika 7.25).

   Napravite tri hermetičke brtve na cijevi izravno ispod ventila br. 9. Pažljivo odvojite srednji šav da odspojite vrećicu Cell Collection Bag s kompleta cijevi.
3. Izvažite napunjenu vrećicu Cell Collection Bag. Zapišite težinu.

   Odredite težinu ciljane frakcije stanica tako što ćete oduzeti težinu prazne vrećice Cell Collection Bag od težine vrećice Cell Collection Bag u kojoj se nalaze ciljne stanice. Zapišite težinu.
4. Temeljito izmiješajte suspenziju ciljnih stanica rotiranjem vrećice. Uzmite prikladnu količinu, npr. 0,5 mL i zadržite za analizu.
5. Koristeći uređaj za toplinsko brtvljenje zabrtvite cijev iznad luer lock priključka vrećice Negative Fraction Bag. Napravite tri hermetičke brtve na cijevi. Odvojite središnji šav da odspojite vrećicu Negative Fraction Bag.
6. Na isti način odspojite vrećicu Buffer Waste Bag.
7. Uklonite vrećicu Negative Fraction Bag i vrećicu Buffer Waste Bag. Zadržite sve vrećice do dovršetka konačne analize svih stanica.



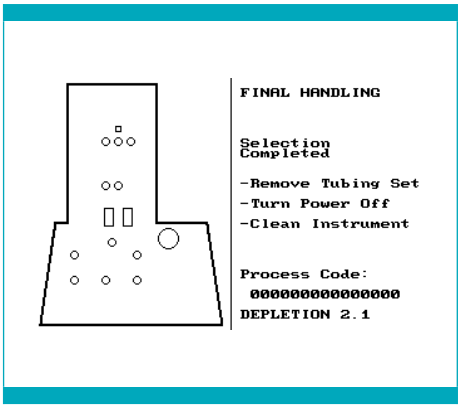
Slika 7.25: Odspajanje vrećica

Ciljne stanice se sad mogu obraditi u skladu s kliničkim protokolima.

Za nastavak pritisnite **ENT**.

Uklanjanje kompleta cijevi i isključivanje

Na prozoru se prikazuje Zaslon 7.85.



Zaslon 7.85: Uklanjanje kompleta cijevi i isključivanje

1. Uklonite komplet cijevi: započevši s ventilima br. 6, 9 i 10 pa nadalje, otpustite cijev sa senzora tekućine i s ventila tako što ćete pritisnuti ventile. Otpustite kolonu s držača kolone. Zbrinite komplet cijevi na otpad kao biološki opasan otpad u skladu sa standardnim bolničkim postupcima.
2. Isključite CliniMACS Plus Instrument.
3. Očistite instrument u skladu s uputama za čišćenje, pogledajte odjeljak „Čišćenje i dezinfekcija" u korisničkom priručniku za CliniMACS Plus Instrument. Pridržavajte se standardnih postupaka za postupanje sa zaraznim materijalom.

Analiza stanica

VAŽNO

- CliniMACS PBS/EDTA Buffer ne mora se ukloniti prije nanošenja razdvojenih ciljnih stanica ako volumen ne premašuje 100 mL po transplantatu pri odgovarajućoj brzini infuzije. U obzir se moraju uzeti bubrežni status pacijenta i utjecaji na krvne elektrolite. Osobito u djece, brzine infuzije treba prilagoditi na odgovarajući način.
- Ako volumen ciljane frakcije stanica premaši 100 mL, mora se smanjiti odgovarajućim sredstvima, npr. centrifugiranjem ili izmjenom pufera do infuzijske otopine odobrene u državi korisnika.

⚠ OPREZ

Rizik od smanjene kvalitete ciljnih stanica. Ciljne stanice moraju se analizirati i potvrditi da bi se ispunili zahtjevi korisnika, u suprotnom prikladnost za kliničku primjenu može biti umanjena. Pregledajte ciljne stanice u vezi kvalitete i količine s obzirom na njihovu predviđenu upotrebu.

To mora uključivati sljedeće parametre:

- ukupni broj leukocita
- vijabilnost ukupnog broja ciljnih stanica
- učinkovitost iscrpljivanja

Također se preporučuje da se odredi ukupan broj leukocita i vijabilnost neciljane frakcije stanica. Popis predstavlja primjer i druga ispitivanja trebaju biti uključena na temelju namjenske uporabe i kliničkih protokola. Zabilježite podatke analize.

7.4.5 DEPLETION 3.1

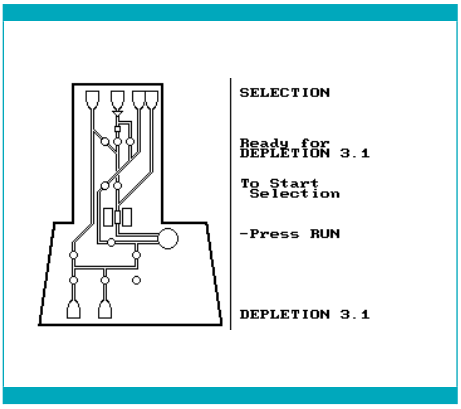
Kada se završna provjera dovrši, CliniMACS Plus Instrument spreman je za započinjanje razdvajanja. Na prozoru se prikazuje Zaslon 7.86.

Za nastavak pritisnite **RUN**.

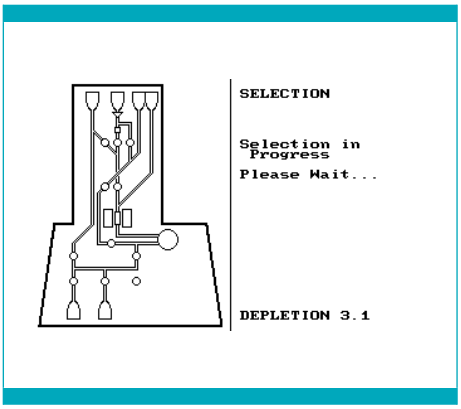
Kada se pritisne **RUN**, instrument će automatski provesti odabrani postupak razdvajanja.

U svakoj fazi rada zaslon sličan Zaslon 7.87 prikazuje se kako bi se predstavio status postupka razdvajanja.

Indikator položaja magneta prikazan je u vidu dva crna polja pored kolone za razdvajanje kada je magnet u otvorenom položaju „ON", tj. kada je pomaknut naprijed kako bi magnetizirao kolonu za razdvajanje. Ako je indikator položaja magneta proziran (npr. Zaslon 7.86), magnet je u zatvorenom položaju „OFF", tj. pomaknut je prema stražnjoj strani instrumenta. Kada se magnet izvuče, kolona za razdvajanje je izvan magnetskog polja i ne magnetizira se.



Zaslon 7.86: Pokretanje razdvajanja



Zaslon 7.87: Razdvajanje u tijeku

Postupak razdvajanja

Depletion 3.1 je program iscrpljivanja u dva koraka, tj. stanice se dvaput primjenjuju na kolonu za razdvajanje.

U prvom se dijelu procesa iscrpljuje skupina označenih stanica (Staged Cell Loading [Bulk Loading Stage]). U drugom se dijelu procesa iscrpljuje nekoliko preostalih označenih stanica (Sensitive Sample Loading [Sensitive Loading Stage]).

VAŽNO
Na početku razdvajanja pufer se pumpa nagore prema vrećici Cell Preparation Bag kako bi se napunio filtar predsustava. Lagano dodirnite bočnu stranu filtra nekoliko puta kako biste uklonili sve mjehuriće koji bi mogli biti uhvaćeni u filtru.

Napomena: ako broj magnetski označenih stanica (izračunatih s pomoću CliniMACS Plus softvera) premaši kapacitet vezivanja kolone za razdvajanje, program razdvajanja automatski puni i razdvaja uzorak stanica na manje dijelove („punjenje u fazama"). Između svake faze punjenja kolona za razdvajanje se ispire kako bi se uklonile sve označene stanice. Označene će stanice biti eluirane i zadržane u vrećici Non-Target Cell Bag. Pufer za ispiranje prikuplja se u vrećicu Reapplication Bag.

Staged cell loading (Bulk Loading Stage)

Postupak razdvajanja započinje s punjenjem filtra predsustava kako bi se završila priprema sustava. Potom započinje razdvajanje označenih stanica. Pumpa povlači sadržaj vrećice Cell Preparation Bag u komplet cijevi. Magnetski označene stanice (neciljne stanice) zadržavaju se u koloni za razdvajanje, stavljaju se u magnetsko polje, dok neoznačene stanice (ciljne stanice) prolaze i prikupljaju se u vrećicu Reapplication Bag.

Sensitive sample loading (Sensitive Loading Stage)

Za daljnje iscrpljivanje stanice iz vrećice Reapplication Bag ponovno se pune u kolonu za razdvajanje pri manjoj brzini. Dok je nekoliko preostalih označenih stanica sad zadržano u koloni za razdvajanje, neoznačene stanice (ciljne stanice) prolaze kroz magnetsko polje i prikupljaju se u vrećicu Cell Collection Bag.

Ispiranje filtra predsustava i vrećice Reapplication Bag

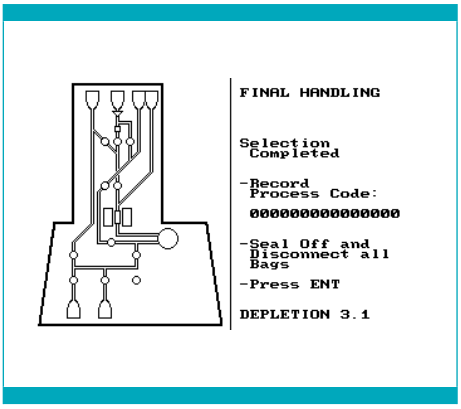
Nakon što je dovršeno i skupno i osjetljivo iscrpljivanje uzorka stanica, filtar predsustava i vrećica Reapplication Bag dvaput se ispiru s puferom kako bi se smanjio gubitak stanica u sustavu.

Uklanjanje neciljnih stanica

Magnet se pomiče u zatvoreni položaj „OFF". Magnetski označene stanice (neciljne stanice) otpuštaju se iz kolone za razdvajanje i prikupljaju se u vrećicu Non-Target Cell Bag nakon svake faze punjenja.

Odspajanje vrećica i bilježenje procesnog koda

Kada se rad dovrši, na prozoru se prikazuje Zaslon 7.88.

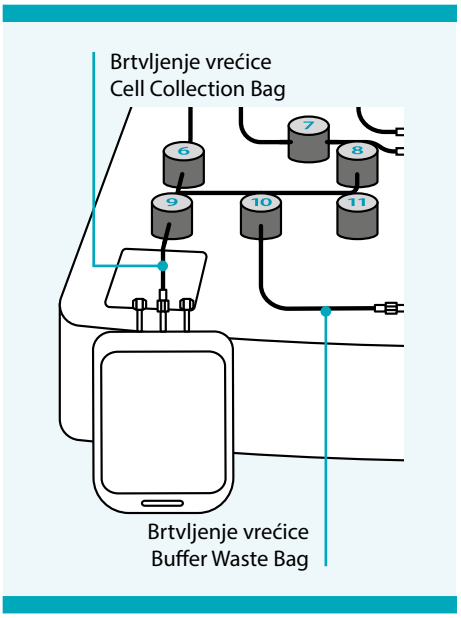


Zaslon 7.88: Odspajanje vrećica i bilježenje procesnog koda

1. Zabilježite procesni kod.
2. Stegnite ili zabrtvite cijev iznad luer lock priključka koji povezuje vrećicu Cell Collection Bag s kompletom cijevi (vidjeti Slika 7.26).

   Napravite tri hermetičke brtve na cijevi izravno ispod ventila br. 9. Pažljivo odvojite srednji šav da odspojite vrećicu Cell Collection Bag s kompleta cijevi.
3. Izvažite napunjenu vrećicu Cell Collection Bag. Zapišite težinu.

   Odredite težinu ciljane frakcije stanica tako što ćete oduzeti težinu prazne vrećice Cell Collection Bag od težine vrećice Cell Collection Bag u kojoj se nalaze ciljne stanice. Zapišite težinu.
4. Temeljito izmiješajte suspenziju ciljnih stanica rotiranjem vrećice. Uzmite prikladnu količinu, npr. 0,5 mL i zadržite za analizu.
5. Koristeći uređaj za toplinsko brtvljenje zabrtvite cijev iznad luer lock priključka vrećice Buffer Waste Bag. Napravite tri hermetičke brtve na cijevi. Presijecite središnji šav da odspojite vrećicu Buffer Waste Bag.
6. Na isti način odspojite vrećicu Non-Target Cell Bag.



Slika 7.26: Odspajanje vrećica

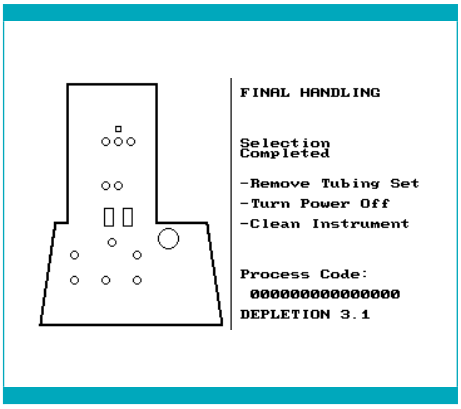
7. Uklonite vrećice Non-Target Cell Bag i Buffer Waste Bag. Zadržite sve vrećice do dovršetka konačne analize svih stanica.

Ciljne stanice se sad mogu obraditi u skladu s kliničkim protokolima.

Za nastavak pritisnite **ENT**.

Uklanjanje kompleta cijevi i isključivanje

Na prozoru se prikazuje Zaslon 7.89.



Zaslon 7.89: Uklanjanje kompleta cijevi i isključivanje

1. Uklonite komplet cijevi: započevši s ventilima br. 6, 9 i 10 pa nadalje, otpustite cijev sa senzora tekućine i s ventila tako što ćete pritisnuti ventile. Otpustite kolonu s držača kolone. Zbrinite komplet cijevi na otpad kao biološki opasan otpad u skladu sa standardnim bolničkim postupcima.
2 Isključite CliniMACS Plus Instrument.
3. Očistite instrument u skladu s uputama za čišćenje, pogledajte odjeljak „Čišćenje i dezinfekcija" u korisničkom priručniku za CliniMACS Plus Instrument. Pridržavajte se standardnih postupaka za postupanje sa zaraznim materijalom.

Analiza stanica

Važno

- CliniMACS PBS/EDTA Buffer ne mora se ukloniti prije nanošenja razdvojenih ciljnih stanica ako volumen ne premašuje 100 mL po transplantatu pri odgovarajućoj brzini infuzije. U obzir se moraju uzeti bubrežni status pacijenta i utjecaji na krvne elektrolite. Osobito u djece, brzine infuzije treba prilagoditi na odgovarajući način.
- Ako volumen ciljane frakcije stanica premaši 100 mL, mora se smanjiti odgovarajućim sredstvima, npr. centrifugiranjem ili izmjenom pufera do infuzijske otopine odobrene u državi korisnika.

⚠ OPREZ

Rizik od smanjene kvalitete ciljnih stanica. Ciljne stanice moraju se analizirati i potvrditi da bi se ispunili zahtjevi korisnika, u suprotnom prikladnost za kliničku primjenu može biti umanjena. Pregledajte ciljne stanice u vezi kvalitete i količine s obzirom na njihovu predviđenu upotrebu.

To mora uključivati sljedeće parametre:

- ukupni broj leukocita
- vijabilnost ukupnog broja ciljnih stanica
- učinkovitost iscrpljivanja

Također se preporučuje da se odredi ukupan broj leukocita i vijabilnost neciljane frakcije stanica. Popis predstavlja primjer i druga ispitivanja trebaju biti uključena na temelju namjenske uporabe i kliničkih protokola. Zabilježite podatke analize.

8 Rješavanje problema

Ovo je poglavlje predviđeno kao uputa za pružanje informacija o mogućim neočekivanim događajima koji se mogu javiti i prijedloga za odgovarajuće korektivne radnje. Za informacije koje nisu navedene u sljedećem poglavlju što je prije moguće obratite se tehničkoj službi Miltenyi Biotec Technical Support.

Napomena: redoslijed ovog poglavlja prati stvarnu sekvencu razdvajanja.

8.1 Miltenyi Biotec Technical Support

U slučaju bilo kakvog kvara instrumenta ili neuspješne obrade koje rukovatelj ne može ispraviti (poruke o pogrešci) obratite se timu tehničke službe Miltenyi Biotec Technical Support:

+49 2204 8306-3803
technicalsupport@miltenyi.com

Posjetite www.miltenyibiotec.com kako biste pronašli informacije za kontakt lokalne službe Miltenyi Biotec Technical Support.

8.2 Priprema proizvoda leukafereze

- Primljeni se uzorak razrjeđuje

  U idealnom slučaju magnetsko označavanje se provodi u razrijeđenom proizvodu leukafereze. Prilagodite proizvod leukafereze do konačnog razrjeđivanja od približno 1 : 3. Ako se dobiveni uzorak razrijedi u omjeru većem od 1 : 3 ili ako rukovatelj ne zna točno koncentraciju plazme u uzorku, uzorku dodajte imunoglobulin prije dodavanja reagensa (preporučena koncentracija imunoglobulina u volumenu označavanja: 1,5 mg/mL). Važno je imati određenu količinu imunoglobulina u uzorku tijekom označavanja kako bi se nespecifično vezanje reagensa svelo na najmanju mjeru.

- Broj ciljnih stanica je nizak u proizvodu leukafereze

  Mobilizacija matičnih stanica bila je nedostatna. Provjerite analizu proizvoda leukafereze.

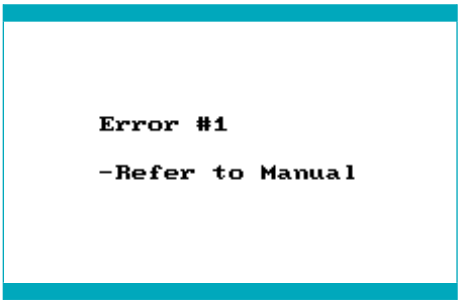
■ Loša vijabilnost stanica u proizvodu leukafereze

Proizvod leukafereze možda je prikupljen, pohranjen ili transportiran nepropisno. Radi osiguravanja bolje kvalitete uzorka priprema i razdvajanje proizvoda leukafereze moraju se provesti odmah nakon leukafereze. Držite proizvod leukafereze pri koncentraciji leukocita manjoj od $0{,}2 \times 10^9$ po mL. Ako je potrebno, razrijedite proizvod leukafereze s autolognom plazmom. Proizvod leukafereze ne smije biti stariji od 24 sata kada se započne postupak označavanja i razdvajanja. Ako se proizvod leukafereze mora pohraniti, npr. tijekom noći, on se mora čuvati na kontroliranoj sobnoj temperaturi (od +19 °C do +25 °C).

8.3 CliniMACS Plus Instrument i CliniMACS Komplet cijevi

8.3.1 Poruke o pogrešci

Postoji niz mogućih kvarova instrumenta ili softvera. Oni su označeni na odgovarajući način i bit će prikazani na zaslonu. Odnose se na interne greške koje rukovatelj ne može ispraviti. Zabilježite broj pogreške i obratite se tehničkoj službi Miltenyi Biotec Technical Support.



Zaslon 8.1: Poruka o pogrešci br. 1

Jedna moguća poruka o pogrešci prikazana je na Zaslon 8.1.

Osim poruka o pogreškama, kvarovi koje može popraviti rukovatelj označeni su kao„Poruke s upozorenjima”(vidjeti odjeljak 8.4.1).

8.3.2 Postavljanje i priprema kompleta cijevi

■ Ventil se ne otvara kada se rukovatelju naloži da uvede cijev u određeni ventil

Ventili su predviđeni da rade pravilno kada se uvede cijev. Ručno pritisnite ventil da ga otvorite. Pažljivo pratite ventil tijekom sekvence ispitivanja ventila. Ako se ventil ne vrati tijekom sekvence ispitivanja ventila, pogledajte odjeljak „Ventil se ne vraća tijekom sekvence ispitivanja ventila”.

■ Ventil se ne vraća tijekom sekvence ispitivanja ventila

Potvrdite da je cijev pravilno uvedena. Provjerite jesu li ventili temeljito očišćeni. Ventil koji je kontaminiran tekućinom mora se zamijeniti. Obratite se službi Miltenyi Biotec Technical Support.

- Pufer curi iz kompleta cijevi tijekom pripreme

  Komplet cijevi je neispravan. Isključite CliniMACS Plus Instrument i ponovno pokrenite pripremu s novim instaliranim kompletom cijevi i dostatnim novim puferom.

- Prekomjerna količina zraka pojavila se u kompletu cijevi nakon pripreme

  Vrećica za pufer nije pravilno probijena. Upotrijebite novi komplet cijevi i dostatan novi pufer i ponovno pokrenite CliniMACS Plus separaciju. Potvrdite da je septum vrećice za pufer pravilno probijen.

- Neočekivan volumen pufera u vrećicama nakon pripreme. Nakon pripreme tekućina se smije nalaziti samo u vrećicama Priming Waste Bag i Buffer Waste Bag

  Komplet cijevi nije pravilno montiran. Tekućina može curiti iza ventila ako komplet cijevi nije pravilno instaliran ili ako ventili ne funkcioniraju pravilno. Uklonite komplet cijevi i zamijenite ga novim. Ponovno pokrenite postupak pripreme s dostatnim novim puferom. Loša učinkovitost CliniMACS Plus separacije može se javiti ako komplet cijevi nije pravilno uveden.

- Motor pumpe zaustavlja se tijekom pripreme

  Cijev pumpe nije pravilno uvedena. Pritisnite **STOP** da prekinete pripremu i isključite napajanje pa ga ponovno uključite. Stegnite vod za pufer s forcepsom za zaključavanje tijekom postupka instalacije, ispravite položaj cijevi pumpe i uklonite forceps za zaključavanje prije ponovnog pokretanja sekvence za pripremu.

8.4 Automatizirano razdvajanje stanica

8.4.1 Poruke s upozorenjima

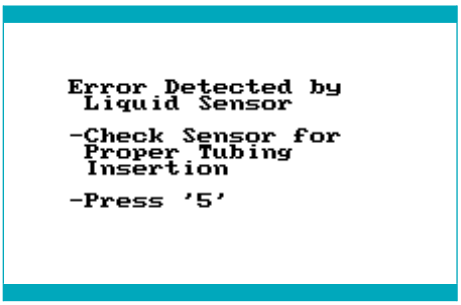
Za razliku od poruka o pogreškama (vidjeti odjeljak 8.3.1), poruke s upozorenjima prikazuju se na zaslonu kada interni kontrolni CliniMACS Plus Instrument prepozna kvar koji može popraviti rukovatelj. Obično se poruka s upozorenjem pojavljuje u kombinaciji sa zvukom („bip"). Ako se poruka s upozorenjem pojavi tijekom CliniMACS Plus separacije, pridržavajte se uputa na zaslonu da nastavite s razdvajanjem stanica. Općenito govoreći, poruke s upozorenjima pojavljuju se kada pritisnete **STOP**, kada se otvore vrata pumpe, kada se pumpa zaustavi ili kada senzor tekućine otkrije pogrešku.

S obzirom na to da se tijekom različitih programa razdvajanja mogu javiti različite vrste neočekivanih događaja, sljedeći je odjeljak podijeljen u skladu s tim.

8.4.2 Neočekivani događaji: svi programi razdvajanja

Pogreška koju je otkrio senzor tekućine

Poruka s upozorenjem br. 1. pojavit će se tijekom faze pokretanja procesa punjenja stanica ako senzor tekućine nije u stanju otkriti tekućinu u cijevi. Budući da se filtar predsustava ispire s puferom prije punjenja stanica, u tom trenutku mora biti tekućine u cijevi.



Slika 8.1: Poruka s upozorenjem br. 1

Provjerite sljedeće točke:

1. Je li cijev pravilno uvedena? U senzor tekućine? Ako nije, uvedite je.
2. Je li cijev napunjena puferom? Ako nije, pogledajte točku 3.
3. Ako cijev nije napunjena puferom, pregledajte ima li na cijevi savijenih mjesta koja blokiraju protok pufera prema gore u filtar predsustava i vrećicu Cell Preparation Bag. Prilagodite položaj kompleta cijevi. Ako je potrebno, podignite ili spustite vješalice za vrećice koristeći stezaljke za vješalice za vrećicu. Prilagodite položaj cijevi u ventilima. Za izmjenu položaja cijevi otvorite ventil tako što ćete ručno pritisnuti gumb. Potvrdite da cijev nije savijena, uvrnuta ili zategnuta.
4. Je li vrećica Cell Preparation Bag pravilno probijena? Potvrdite da je šiljak filtra predsustava probio septum na priključku vrećice Cell Preparation Bag.
5. Ako komplet cijevi nije u potpunosti napunjen puferom: je li šiljak za pufer kompleta cijevi probio vrećicu za pufer? Za ispravak pogledajte „Prekomjerna količina zraka pojavila se u kompletu cijevi nakon pripreme" u odjeljku 8.3.2.

Nakon korektivne radnje nastavite s razdvajanjem koje je u tijeku i pritisnite **5**. Ako se ponovno pojavi poruka s upozorenjem br. 1 nakon što je isključen svaki od mogućih uzroka koji su gore navedeni, senzor tekućine je možda u kvaru. Obratite se službi Miltenyi Biotec Technical Support.

Stanice se pomiču do pogrešnog dijela kompleta cijevi. Tekućina curi pored ventila

- Komplet cijevi nije pravilno umetnut. Ako je rad instrumenta u tijeku, pritisnite **STOP** i stegnite vod s forcepsom za zaključavanje. Prilagodite cijev tako što ćete najprije vratiti odgovarajući ventil. Uklonite forceps za zaključavanje i pritisnite **RUN** da nastavite razdvajanje. Razdvajanje stanica bit će prekinuto ako se **RUN** ne pritisnite unutar 600 sekundi.
- Ventil ne funkcionira pravilno. Pritisnite **STOP**. Stegnite vod s forcepsom za zaključavanje. Otpustite ventil ručno nekoliko puta da oslobodite zaglavljeni ventil. Uklonite forceps za zaključavanje i pritisnite **RUN** da nastavite.

Razdvajanje stanica bit će prekinuto ako se RUN ne pritisnite unutar 600 sekundi. Ako korisnik nije u stanju osloboditi ventil, obratite se tehničkoj službi Miltenyi Biotec Technical Support.

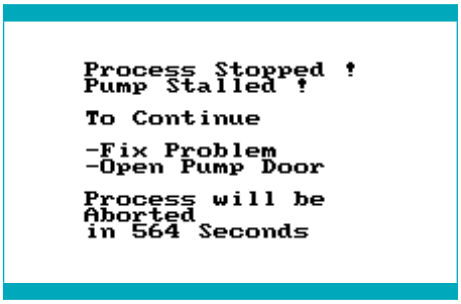
- U uporabi je pogrešan softverski program. Na zaslonu provjerite naziv programa koji se trenutno upotrebljava. Prekinite rad pritiskom na STOP i odmah se obratite tehničkoj službi Miltenyi Biotec Technical Support.

Magnet se ne pomiče

Pogon magneta ne radi. Došlo je do kvara pogona magneta. Prikazat će se poruke o pogrešci (vidjeti odjeljak 8.3.1). Zabilježite broj poruke o pogrešci i obratite se tehničkoj službi Miltenyi Biotec Technical Support.

Motor pumpe zaustavlja se tijekom razdvajanja stanica

Cijev pumpe nije pravilno uvedena tako da pumpa možda nije u stanju okretati se. U tom slučaju na prozoru sa zaslonom pojavit će se poruka s upozorenjem br. 2. Rukovatelj u tom slučaju ima 600 sekundi da ispravi položaj cijevi pumpe.



Zaslon 8.2: Poruka s upozorenjem br. 2

1. Pažljivo uklonite cijev pumpe iz pumpe.
2. Potvrdite da cijev pumpe nije oštećena nepravilnim uvođenjem. Ako cijev pumpe curi, stegnite cijev iznad i ispod kolone za razdvajanje kako biste sačuvali stanice zadržane u koloni i obratite se tehničkoj službi Miltenyi Biotec Technical Support.
3. Ako cijev pumpe nije oštećena, može se ponovno uvesti u kućište pumpe.
4. Pritisnite RUN da ponovno pokrenete razdvajanje unutar 600 sekundi ili će razdvajanje biti prekinuto.

Ako je cijev pumpe ravna i pala, to ukazuje na začepljenu kolonu. U tom se slučaju obratite tehničkoj službi Miltenyi Biotec Technical Support.

Umetanje uzorka ne zaustavlja se iako su vrećica Cell Preparation Bag i filtar predsustava prazni

Senzor tekućine ne radi pravilno, npr. zbog toga što je površina cijevi u senzoru tekućine mokra. Pritisnite STOP da prekinete razdvajanje. Uklonite cijev iz senzora tekućine. Osušite cijev i kontaktno područje papirnatim ručnikom ili upijajućim materijalom. Zamijenite cijev u senzoru tekućine i pritisnite RUN. Nemojte prekidati sekvencu tijekom dulje od 600 sekundi ili će razdvajanje stanica biti prekinuto.

Ako nije moguće aktivirati senzor tekućine na ovaj način, pritisnite STOP, potom 2 i potvrdite s ENT da preskočite umetanje uzorka i nastavite s razdvajanjem.

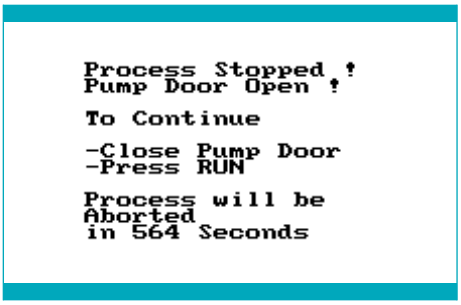
8.4.3 Neočekivani događaji: samo programi obogaćivanja

Rad je prekinut prije dovršetka program razdvajanja stanica

- Vrata pumpe otvorena: Iz sigurnosnih razloga, razdvajanje u tijeku će se automatski zaustaviti tijekom rada instrumenta ako se otvore vrata pumpe. Poruka br. 5 pojavit će se na prozoru zaslona.

  Zatvorite vrata pumpe i pritisnite **RUN**.

  Ako se, kao u ovom slučaju, **RUN** ne pritisne unutar 600 sekundi, razdvajanje će biti prekinuto, a razdvajanje stanica neće biti dovršeno. Vratite koliko je god moguće uzorka iz kompleta cijevi tako što ćete pokrenuti EMERGENCY PROGRAM.



Zaslon 8.3: Poruka s upozorenjem br. 5

- Prekid napajanja: Prekid napajanja posljedica je prekida CliniMACS Plus separacije. Razdvajanje stanica neće biti dovršeno kada se ponovno uspostavi napajanje. Vratite koliko je god moguće uzorka iz kompleta cijevi tako što ćete pokrenuti EMERGENCY PROGRAM.

8.4.4 Neočekivani događaji: CD34 SELECTION 1/2

Punjenje je prekinuto prije nego što je kompletan uzorak napunjen u kolonu

Filtar predsustava je začepljen zbog velike količine ostataka stanica ili zbog nepotpunog punjenja filtra. Zbog nastavka pumpanja stvorio se vakuum što je dovelo do stvaranja mjehurića zraka, a to je aktiviralo senzor tekućine. Stoga je proces razdvajanja nastavljen s ispiranjima kolone prije nego što se cijeli uzorak mogao napuniti. Nije moguće ponovno pokrenuti umetanje uzorka nakon što je sekvenca punjenja zaustavljena.

Pustite da CliniMACS Plus Instrument dovrši program razdvajanja. Nemojte prekidati aktualni rad, to za posljedicu može imati nepotrebni gubitak stanica. Nakon što je postupak razdvajanja dovršen, filtrirajte preostali uzorak s unutarnjim filtrom za krv od 200 µm i prenesite ga u novu vrećicu za prijenos. Odmah provedite drugo razdvajanje s novim kompletom cijevi i dostatnim novim puferom.

Cijev pumpe u kvaru i/ili se prekomjerna količina zraka pojavila u kompletu cijevi ispod predkolone tijekom punjenja stanica

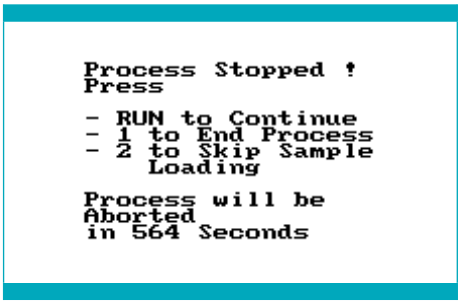
Predkolona je začepljena zbog velike količine ostataka stanica u vrećici Cell Preparation Bag. Potrebno je preskočiti ručno punjenje preostalog uzorka i nastaviti razdvajanje sa stanicama koje su već napunjene u sustav.

1. Pritisnite **STOP** da prekinete punjenje stanica. Pojavit će se poruka s upozorenjem br. 3.
2. Pritisnite **2** da preskočite proces punjenja stanica.

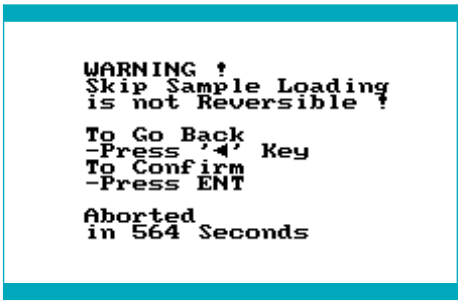
   Pojavit će se poruka s upozorenjem br. 4 i dat će rukovatelju priliku da potvrdi ili dopuni odluku jer se preskakanje umetanja uzorka ne može naknadno vratiti.
3. Pritisnite **ENT** i program razdvajanja će zaustaviti umetanje uzorka i nastaviti ispiranje kolone.

Stegnite cijev ispod filtra predsustava kako biste spriječili curenje stanica iz vrećice Cell Preparation Bag u komplet cijevi. Nakon što je postupak razdvajanja dovršen, filtrirajte preostali uzorak s unutarnjim filtrom za krv od 200 µm i prenesite ga u novu vrećicu za prijenos.

Odmah provedite drugo razdvajanje s novim kompletom cijevi i dostatnim novim puferom.



Zaslon 8.4: Poruka s upozorenjem br. 3



Zaslon 8.5: Poruka s upozorenjem br. 4

8.4.5 Neočekivani događaji: ENRICHMENT 1.1

- Punjenje je prekinuto prije nego što je kompletan uzorak napunjen u kolonu

  Filtar predsustava začepljen je zbog velike količine ostataka stanica ili zbog nepotpunog punjenja filtra. Zbog nastavka pumpanja stvorio se vakuum što je dovelo do stvaranja mjehurića zraka. To je aktiviralo senzor tekućine i proces razdvajanja nastavljen je izravno sa završnom fazom umetanja uzorka. Dio uzorka možda je zaostao u vrećici Cell Preparation Bag nakon što je razdvajanje dovršeno.

  Pustite da CliniMACS Plus Instrument dovrši program razdvajanja. Nemojte prekidati aktualni rad, to za posljedicu može imati nepotrebni gubitak stanica.

  Utvrdite ukupan broj stanica, postotak ciljnih stanica i preostali volumen umetanja uzorka u vrećici Cell Preparation Bag i unesite stvarne parametre uzorka tijekom podešavanja instrumenta (KORAK 2). Nakon što je postupak razdvajanja dovršen, filtrirajte preostali uzorak s unutarnjim filtrom za krv od 200 µm i prenesite ga u novu vrećicu za prijenos. Odmah provedite drugo razdvajanje s novim kompletom cijevi i dostatnim novim puferom.

- Unesene su pogrešne vrijednosti parametara uzorka

  Uneseni volumen umetanja uzorka bio je niži od stvarnog volumena u priključenoj vrećici Cell Preparation Bag. Nije moguće ponovno pokrenuti umetanje uzorka nakon što je zaustavljeno.

  Pustite da CliniMACS Plus Instrument dovrši program razdvajanja. Nemojte prekidati aktualni rad, to za posljedicu može imati nepotrebni gubitak stanica.

  Utvrdite ukupan broj stanica, postotak ciljnih stanica i preostali volumen umetanja uzorka u vrećici Cell Preparation Bag i unesite stvarne parametre uzorka tijekom podešavanja instrumenta (KORAK 2). Obradite preostali uzorak s novim kompletom cijevi, novim filtrom predsustava i dostatnim novim puferom.

- Motor pumpe zaustavlja se tijekom eluiranja ciljnih stanica u vrećicu Cell Collection Bag

  Forceps za zaključavanje pored vrećice Cell Collection Bag nije otvoren tijekom sekvence eluiranja. Dakle, prolaz do vrećice Cell Collection Bag je blokiran.

  Pritisnite **STOP** i otvorite forceps za zaključavanje pored vrećice Cell Collection Bag. Otvorite vrata pumpe i provjerite je li cijev pumpe pravilno uvedena. Zatvorite vrata pumpe i pritisnite **RUN** da ponovno pokrenete sekvencu eluiranja unutar 600 sekundi.

8.4.6 Neočekivani događaji: ENRICHMENT 3.2

- Punjenje je prekinuto prije nego što je kompletan uzorak napunjen u kolonu

  Filtar predsustava je začepljen zbog velike količine ostataka stanica ili zbog nepotpunog punjenja filtra. Zbog nastavka pumpanja stvorio se vakuum što je dovelo do stvaranja mjehurića zraka. Oni su aktivirali senzor tekućine i proces razdvajanja nastavljen je sa ispiranjima kolone prije nego što je sav uzorak napunjen. Nije moguće ponovno pokrenuti umetanje uzorka nakon što je sekvenca punjenja zaustavljena.

  Pustite da CliniMACS Plus Instrument dovrši program razdvajanja. Nemojte prekidati aktualni rad, to za posljedicu može imati nepotrebni gubitak stanica.

  Nakon što je postupak razdvajanja dovršen, filtrirajte preostali uzorak s unutarnjim filtrom za krv od 200 µm i prenesite ga u novu vrećicu za prijenos. Odmah provedite drugo razdvajanje s novim kompletom cijevi i dostatnim novim puferom.

- Motor pumpe zaustavlja se tijekom eluiranja ciljnih stanica u vrećicu Cell Collection Bag

  Forceps za zaključavanje pored vrećice Cell Collection Bag nije otvoren tijekom sekvence eluiranja. Dakle, prolaz do vrećice Cell Collection Bag je blokiran.

  Pritisnite **STOP** i otvorite forceps za zaključavanje pored vrećice Cell Collection Bag. Otvorite vrata pumpe i provjerite je li cijev pumpe pravilno uvedena. Zatvorite vrata pumpe i pritisnite **RUN** da ponovno pokrenete sekvencu eluiranja unutar 600 sekundi.

8.4.7 Hitni program (treba upotrijebiti samo s programima obogaćivanja)

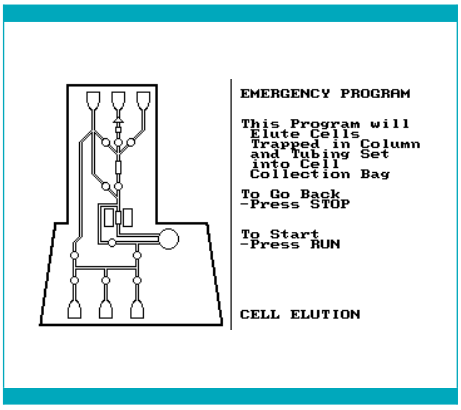
Ako se, iz bilo kojeg razloga, rad nepovratno prekine prije eluiranja ciljnih stanica iz kolone za razdvajanje, hitni program može se pokrenuti kako bi se eluirale stanice iz kolone za razdvajanje. Ovaj je program predviđen samo za uporabu sa svim programima obogaćivanja zajedno s CliniMACS Tubing Set (REF 161-01) ili CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01).

Hitni se program ne smije upotrebljavati niti sa jednim programom iscrpljivanja.

Napomena: hitni program će eluirati približno 75 mL tekućine. Potvrdite da je odgovarajuća vrećica Cell Collection Bag priključena na komplet cijevi.

1. Da biste potvrdili da kolona za razdvajanje nije magnetizirana, isključite instrument, pričekajte 5 sekundi, potom ponovno uključite instrument. Magnet će se izvući iz jedinice za magnetsko razdvajanje (vidjeti odjeljak „Opis" u korisničkom priručniku za CliniMACS Plus Instrument). Potvrdite to tako što ćete držati mali magnetizirani predmet pored jedinice za magnetsko razdvajanje. Ako se magnet ne izvuče ili ako dođe do prekida napajanja koji traje, obratite se tehničkoj službi Miltenyi Biotec Technical Support.
2. Pričekajte da se na prozoru pojavi glavni zaslon (vidjeti odjeljak „Instalacija" u korisničkom priručniku za CliniMACS Plus Instrument).

   Za pozivanje hitnog programa pritisnite **4**. Na prozoru se prikazuje Zaslon 8.6.



Zaslon 8.6: Hitni program

3. Za nastavak eluiranja uhvaćenih stanica pritisnite **RUN**.

   Napomena: za napuštanje hitnog programa bez pokretanja eluiranja uhvaćenih stanica pritisnite **STOP**.

4. Prenesite eluirane stanice prikupljene u vrećicu Cell Collection Bag u novu vrećicu od 600 mL. Na kraju preostale stanice stavite u pričuvu u vrećicu Cell Preparation Bag sa stanicama eluiranim u hitnom programu. Pokrenite novi postupak razdvajanja s novim kompletom cijevi i dostatnim novim puferom.

8.4.8 Neočekivani događaji: DEPLETION 2.1

Ciljne stanice ne dostižu do vrećice Cell Collection Bag

Pumpa nije u stanju puniti proizvod iz vrećice Cell Preparation Bag jer stezaljka pored vrećice Cell Collection Bag nije otvorena tijekom sekvence punjenja stanica. Pritisnite **STOP** i otvorite stezaljku pored vrećice Cell Collection Bag. Nastavite s procesom iscrpljivanja tako što ćete pritisnuti **RUN**.

Pustite da CliniMACS Plus Instrument dovrši program razdvajanja. Nemojte prekidati aktualni rad, to za posljedicu može imati nepotrebni gubitak stanica. Ako dio proizvoda zaostane u vrećici Cell Preparation Bag nakon što je postupak iscrpljivanja dovršen, obradite preostale stanice s novim kompletom cijevi, novim filtrom predsustava i dostatnim novim puferom.

Utvrdite ukupan broj stanica, postotak označenih stanica i volumen umetanja uzorka te unesite stvarne parametre uzorka tijekom podešavanja instrumenta (KORAK 2) i započnite novo iscrpljivanje.

Punjenje je prekinuto prije nego što je kompletan uzorak napunjen u kolonu

Mjehurići zraka iz uzorka i/ili filtra predsustava aktivirali su senzor tekućine prije nego što je sav uzorak napunjen. Prekinite aktualni rad i provjerite ukupan broj stanica i učinkovitost iscrpljivanja stanica u vrećicu Cell Collection Bag. Ako je potrebno, obradite preostali uzorak s novim kompletom cijevi, novim filtrom predsustava i dostatnim novim puferom.

Utvrdite ukupan broj stanica, postotak označenih stanica i volumen umetanja uzorka te unesite stvarne parametre uzorka tijekom podešavanja instrumenta (KORAK 2) i započnite novo iscrpljivanje.

8.4.9 Neočekivani događaji: DEPLETION 3.1

Punjenje je zaustavljeno tijekom Staged Cell Loading prije nego što je kompletan uzorak napunjen u kolone

- Filtar predsustava umetnut je pogrešno. Stoga funkcija komore za kapanje nije dostupna i mjehurići zraka mogu proći izravno kroz senzor tekućine što dovodi do prekida umetanja uzorka prije nego što se kompletan uzorak napuni. Instrument nastavlja s procesom iscrpljivanja tako što izravno započinje sa sljedećim korakom. Nije moguće ponovno pokrenuti umetanje uzorka nakon što je zaustavljeno.
- Filtar predsustava začepljen je zbog velike količine ostataka stanica ili zbog nepotpunog punjenja filtra. Zbog nastavka pumpanja stvorio se vakuum što je dovelo do stvaranja mjehurića zraka. To je aktiviralo senzor tekućine i proces razdvajanja nastavljen je izravno sa završnom fazom umetanja uzorka. Dio uzorka možda je zaostao u vrećici Cell Preparation Bag nakon što je razdvajanje dovršeno.

Prekinite aktualni rad i napravite pričuve sadržaja vrećica Reapplication Bag i Cell Preparation Bag. Obradite preostale stanice s novim kompletom cijevi, novim filtrom predsustava i dostatnim novim puferom.

Punjenje zaustavljeno tijekom postupka Sensitive Sample Loading (Sensitive Loading Stage)

Vrećica Reapplication Bag obješena je niže od vrećice Cell Preparation Bag. Tijekom koraka osjetljivog punjenja vrećica Cell Preparation Bag prazni se prije nego što se volumen vrećice Reapplication Bag u potpunosti napuni. Stoga je moguće da mjehurić zraka aktivira senzor tekućine prije nego što se uzorak u potpunosti napuni iz vrećice Reapplication Bag nakon što se postupak iscrpljivanja dovrši. Nije moguće ponovno pokrenuti umetanje uzorka nakon što je zaustavljeno.

Pustite da CliniMACS Plus Instrument dovrši program razdvajanja. Nemojte prekidati aktualni rad, to za posljedicu može imati nepotrebni gubitak stanica. Obradite preostali uzorak s novim kompletom cijevi, novim filtrom predsustava i dostatnim novim puferom.

Utvrdite ukupan broj stanica, postotak označenih stanica i volumen umetanja uzorka te unesite stvarne parametre uzorka tijekom podešavanja instrumenta (KORAK 2). U obzir uzmite to da su obavezno potrebne tri velike vješalica za vrećicu za program DEPLETION 3.1 i pogledajte upute za instalaciju kako biste odredili odgovarajuće visine vrećice (vidjeti odjeljak 7.3.3).

Ciljne stanice (neoznačene stanice) ne dospijevaju do vrećice Reapplication Bag tijekom Staged Cell Loading Bulk (Loading Stage)

Pogrešna je cijev uvedena u ventil br. 3 (desni ogranak cijevi za vrećicu Reapplication Bag umjesto lijevog ogranka (Y-komad) cijevi vrećice). Pritisnite **STOP** i uklonite pogrešnu cijev iz ventila br. 3. Ručno uvedite odgovarajuću cijev (lijevi ogranak cijevi za vrećicu Reapplication Bag) u ventil br. 3 na način opisan u uputama za instalaciju. Pritisnite **RUN** da nastavite s postupkom iscrpljivanja unutar 600 sekundi.

Pustite da CliniMACS Plus Instrument dovrši program razdvajanja. Nemojte prekidati aktualni rad, to za posljedicu može imati nepotrebni gubitak stanica. Provjerite učinkovitost iscrpljivanja frakcije ciljnih stanica u vrećicu Cell Collection Bag. Ako učinkovitost iscrpljivanja nije dostatna, ponovite postupak iscrpljivanja s novim kompletom cijevi, novim filtrom predsustava i dostatnim novim puferom.

Utvrdite ukupan broj stanica, postotak označenih stanica i volumen umetanja uzorka te unesite stvarne vrijednosti parametara uzorka tijekom podešavanja instrumenta (KORAK 2) i započnite novo iscrpljivanje.

Stanice prolaze u vrećicu za pufer tijekom koraka gravimetrijskog ispiranja

Vrećica za pufer obješena je prenisko (niže od vrećice Cell Preparation Bag). Pritisnite **STOP** i namjestite vješalicu za vrećicu za pufer u odgovarajući položaj. Potvrdite da su tri velike vješalice za vrećicu instalirane za program DEPLETION 3.1 i pogledajte upute za instalaciju kako biste odredili odgovarajuće visine vrećice (vidjeti odjeljak 7.3.3).

- Ako stanice nisu dospjele do vrećice za pufer, dovoljno je ručno otvoriti ventile br. 1 i 2 kako bi se omogućilo kratko povratno ispiranje stanica u vrećicu Cell Preparation Bag. Nakon što cijev vrećice za pufer ponovno postane čista, zatvorite ventile br. 1 i 2 i pritisnite **RUN** da nastavite s postupkom iscrpljivanja unutar 600 sekundi.

- Ako su stanice već dospjele do vrećice za pufer, zamijenite vrećicu za pufer, ručno otvorite ventile br. 1 i 2 radi kratkog ispiranja cijevi vrećice za pufer i pritisnite **RUN** da nastavite s postupkom iscrpljivanja unutar 600 sekundi. Obradite preostali uzorak u vrećici za pufer ako je potrebno (ako zapremina premašuje 300 mL, najprije prenesite uzorak u vrećicu koja se može centrifugirati radi smanjenja volumena) uz primjenu novog kompleta cijevi, novog filtra predsustava i dostatnog novog pufera.

Motor pumpe zaustavlja se tijekom prvog eluiranja označenih stanica u vrećicu Non-Target Cell Bag

- Forceps za zaključavanje nije uklonjen nakon ispitivanja cjelovitosti. Pritisnite **STOP** i uklonite forceps za zaključavanje. Otvorite vrata pumpe i provjerite je li cijev pumpe pravilno uvedena. Zatvorite vrata pumpe i pritisnite **RUN** da ponovno pokrenete sekvencu eluiranja unutar 600 sekundi.
- Pogrešna je cijev uvedena u ventil br. 3 (cijev za vrećicu Non-Target Cell Bag umjesto lijevog ogranka (Y-komad) cijevi za vrećicu Reapplication Bag). Pritisnite **STOP** i uklonite cijev za vrećicu Non-Target Cell Bag iz ventila br. 3. Ručno uvedite odgovarajuću cijev (lijevi ogranak cijevi za vrećicu Reapplication Bag) u ventil br. 3 na način opisan u uputama za instalaciju. Pritisnite **RUN** da ponovno pokrenete sekvencu eluiranja unutar 600 sekundi.

8.5 Učinkovitost razdvajanja stanica

8.5.1 Neočekivani događaji: samo programi obogaćivanja

■ Broj ciljnih stanica je nizak

- Ciljne stanice su loše označene s reagensom:
  - Rok uporabe reagensa je istekao. Provjerite rok upotrebe. Nemojte upotrebljavati reagens nakon isteka roka upotrebe.
  - Reagens nije bio propisno pohranjen. Provjerite temperaturu skladištenja. Nemojte upotrebljavati reagense koji su nepropisno pohranjeni (vidjeti upute za korištenje reagensa).
  - Preporučeni postupak označavanja nije proveden. Pogledajte odjeljke s postupcima pripreme i razdvajanja uzorka u korisničkom priručniku.
- Stanice su izgubljene tijekom koraka pripreme.
  - Stanice su uklonjene sa supernatantom u vrećice Plasma Waste Bag i Wash Waste Bag zbog nepotpune sedimentacije ili prerane resuspenzije stanica, npr. kada je vrećica uklonjena iz centrifuge. Usporedite sadržaj leukocita neoznačenog staničnog proizvoda i označenog staničnog proizvoda. Provjerite postavke centrifugiranja kako biste osigurali pravilno centrifugiranje. Utvrdite broj stanica iz svih vrećica za otpad.
  - Pufer nije sadržavao HSA. Dodajte HSA puferu do konačne koncentracije od 0,5% (m/v) (vidjeti odjeljak „Potrebni CliniMACS materijali" za odgovarajuću primjenu).
  - Postavke centrifugiranja bile su nedostatne. Provjerite postavke centrifugiranja.
  - Centrifugirajte da uklonite neravnotežu ili upotrijebite kočnicu ili asimetrično punjenje centrifuge.
- Analiza je bila netočna.
  - Došlo je do pogreške pri uzorkovanju. Provjerite ima li u staničnoj suspenziji zbijenih ili nataloženih stanica. Potvrdite da su uzeti reprezentativni uzorci i ponovite analizu.
  - Došlo je do pogreške pri bojanju. Provjerite reagense za protočnu citometriju. Ponovite bojanje.
  - Postavke protočnog citometra nisu bile ispravne. Provjerite postavke instrumenta.

■ Čistoća ciljnih stanica je niska.

- Stanični je proizvod nepropisno bio pohranjen. Priprema i razdvajanje staničnog proizvoda moraju se provesti odmah nakon leukafereze. Držite stanični proizvod u koncentraciji leukocita manjoj od $0{,}2 \times 10^9$ po mL. Ako je potrebno, razrijedite stanični proizvod s autolognom plazmom. Stanični

proizvod ne smije biti stariji od 24 sata kada se započne postupak označavanja i razdvajanja. Ako se stanični proizvod mora pohraniti, npr. tijekom noći, on se mora čuvati na kontroliranoj sobnoj temperaturi (od +19 °C do +25 °C).

- Protokol za magnetsko označavanje nije ispoštovan (npr. neodgovarajući volumeni tijekom magnetskog označavanja). Slijedite upute navedene za magnetsko označavanje (vidjeti KORAK 1 u odjeljku za odgovarajuću primjenu). Za svrhe rješavanja problema utvrdite podskupove leukocita (B-stanice, T-stanice, monocite, granulocite kao i pločice) koji kontaminiraju ciljanu frakciju stanica i obratite se tehničkoj službi Miltenyi Biotec Technical Support.
- Visoki su brojevi granulocita kontaminirali početni proizvod (neodgovarajuća postavka afereze). Granulociti koji se smanjuju potom će nespecifično vezati CliniMACS reagens što može dovesti do smanjene čistoće ciljnih stanica.
- Došlo je do kvara ventila. Eluirana ciljana frakcija stanica kontaminirana je dijelom neciljanom frakcijom stanica ili frakcijom s otpadom pufera. Provjerite kako su cijevi postavljene unutar ventila kako biste osigurali pravilno funkcioniranje. Procijenite sadržaj ciljane frakcije stanica u neciljanoj frakciji stanica i otpada pufera. Ako je potrebno, napravite pričuvu ciljane i neciljane frakcije stanica, reducirajte ih do prikladnog volumena i ponovite razdvajanje s novim kompletom cijevi i dostatnim novim puferom.

■ Nespecifično zadržavanje mrtvih stanica iz staničnog proizvoda ili gubitaka visoko nespecifičnih stanica tijekom postupka

- Pufer ne sadrži HSA. Dodajte HSA puferu do konačne koncentracije od 0,5% (m/v) (vidjeti odjeljak „Potrebni CliniMACS materijali" za odgovarajuću primjenu).
- Stanični je proizvod možda bio pohranjen nepropisno. Priprema i razdvajanje staničnog proizvoda moraju se provesti odmah nakon leukafereze. Držite stanični proizvod u koncentraciji leukocita manjoj od $0{,}2 \times 10^9$ po mL. Ako je potrebno, razrijedite leukaferezu s autolognom plazmom. Stanični proizvod ne smije biti stariji od 24 sata kada se započne postupak označavanja i razdvajanja. Ako se stanični proizvod mora pohraniti, npr. tijekom noći, on se mora čuvati na kontroliranoj sobnoj temperaturi (od +19 °C do +25 °C).
- Nepotpuno umetanje uzorka zbog začepljenja kolone za razdvajanje, filtra predsustava ili predkolone. Provjerite ukupni broj stanica i učinkovitost iscrpljivanja preostalih stanica.

8.5.2 Neočekivani događaji: CD34 SELECTION 1/2 i ENRICHMENT 1.1

■ Čistoća ciljnih stanica je niska

Eluiranje iz kolone za razdvajanje bilo je nepotpuno.

- Program razdvajanja je prekinut. Provjerite ima li na zaslonu za prikaz poruka o pogreškama. Nastavite s odabirom „Rad je prekinut prije dovršetka program razdvajanja stanica" (vidjeti odjeljak 8.4.3 na stranici 214).
- Došlo je do kvara pumpe ili kvara ventila. Vratite stanice iz kompleta cijevi nakon hitnog programa opisanog u odjeljku 8.4.7. Provjerite volumene svih frakcija. Procijenite sadržaj ciljnih stanica vrećica Buffer Waste Bag i Negative Fraction Bag.
- Cijev prema vrećici Cell Collection Bag je blokirana. Provjerite ima li u kompletu cijevi zatvorenih stezaljki, začepljenja ili savijenih mjesta.
- Kapacitet reagensa i/ili kompleta cijevi je premašen. Provjerite ograničenje kapaciteta za relevantnu primjenu.
- Cijev nije pravilno umetnuta. Provjerite jesu li cijevi na svim ventilima pravilno umetnute.

8.5.3 Neočekivani događaji: CD34 SELECTION 1/2

■ Čistoća ciljnih stanica je niska

Neciljne stanice su zadržane.

- Mobilizacija ciljnih stanica bila je loša. Dobiven je vrlo nizak broj ciljnih stanica. Stoga nizak broj kontaminirajućih neciljnih stanica (npr. granulocita, monocita, pločica) može dovesti do smanjenja čistoće.
- Nedostatna plazma ili imunoglobulini bili su prisutni tijekom magnetskog označavanja. Slijedite upute naveden za magnetsko označavanje (vidjeti KORAK 1 odgovarajuće primjene).

  Ako se završna koncentracija od pribl. 30% autologne plazme u uzorku tijekom magnetskog označavanja ne može zajamčiti, dodajte imunoglobulin u uzorak. Konačna koncentracija od 1,5 mg/mL preporučuje se za učinkovito blokiranje nespecifičnog vezivanja reagensa tijekom magnetskog označavanja.

8.5.4 Neočekivani događaji: ENRICHMENT 1.1

■ Broj ciljnih stanica je nizak

Nepravilan unos parametara uzorka. Provjerite i usporedite unos parametara s rezultatima analize.

8.5.5 Neočekivani događaji: DEPLETION 2.1 i DEPLETION 3.1

Učinkovitost iscrpljivanja je niska

Ako je učinkovitost iscrpljivanja nedostatna, obradite preostali uzorak s novim kompletom cijevi i dostatnim novim puferom. U obzir treba uzeti novo označavanje stanica koje treba iscrpiti. Odredite broj stanica i postotak stanica koje treba iscrpiti i unesite stvarne parametre uzorka tijekom podešavanja instrumenta (KORAK 2). Ako uočite vidljivo zbijanje, od pomoći može biti filtriranje stanica prije ponovnog pokretanja rada. Uzmite u obzir da se stanice mogu izgubiti zbog zbijanja ili dodatnog filtriranja.

- Kapacitet reagensa i/ili kompleta cijevi je premašen. Provjerite ograničenje kapaciteta za relevantnu primjenu.
- Nepravilno određivanje stanica koje treba označiti reagensom.
- Nepravilan unos parametara uzorka. Provjerite i usporedite unos parametara s rezultatima analize.
- Smanjena vijabilnost stanica. Mrtve se stanice mogu vezati nespecifično na kolonu za razdvajanje i time smanjiti kapacitet označavanja kolone, što potencijalno dovodi do manje učinkovitosti iscrpljivanja. Osigurajte bolju kvalitetu staničnog proizvoda i obradite proizvod po mogućnosti u što svježijem stanju. Pohranjeni proizvodi koji su stariji od 24 sata ne smiju se upotrebljavati. Ako je neophodno skladištenje, stanični se proizvod mora čuvati na kontroliranoj sobnoj temperaturi (od +19 °C do +25 °C). Koncentracija stanica ne smije premašiti 0,2 × 10^9/mL. Ako je potrebno, razrijedite stanični proizvod s autolognom plazmom kako biste postigli optimalnu koncentraciju stanica.

9 Pravne napomene

9.1 Ograničeno jamstvo

Osim kako je navedeno u odgovarajućoj izjavi o jamstvu koja može biti priložena uz ovaj proizvod ili osim ako je drugačije dogovoreno pisanim putem od strane ovlaštenog zastupnika tvrtke Milteny Biotec, jamstvo tvrtke Miltenyi Biotec za proizvode kupljene izravno od tvrtke Miltenyi Biotec podliježe uvjetima i odredbama prodaje pod kojima ih Vam je ponudila odgovarajuća prodajna organizacija tvrtke Miltenyi Biotec. Primjenjivi uvjeti i odredbe prodaje mogu se razlikovati za različite države ili područja. Ti su uvjeti i odredbe dostupni na zahtjev ili na www.miltenyibiotec.com. Ništa od ovdje navedenog ne smije se tumačiti kao dodatno jamstvo.

Za proizvode kupljene od drugih maloprodajnih trgovaca ili preprodavača (npr. kupljene od ovlaštenog lokalnog pružatelja servisnih usluga tvrtke Miltenyi Biotec) mogu biti primjenjivi drugačiji uvjeti i odredbe.

Da biste utvrdili koje je jamstvo došlo s vašim proizvodom, pogledajte pakiranje, račun, prijamnicu ili drugu prodajnu dokumentaciju. Neke komponente kombinacije proizvoda koje ste kupili mogu imati kraće jamstvo nego što je navedeno na pakiranju, računu, prijamnici ili drugoj prodajnoj dokumentaciji (npr. roba koja ima životni vijek prije otvaranja ili roba podložna zastarijevanju).

Jamstvo tvrtke Miltenyi Biotec za ovaj proizvod pokriva samo probleme s proizvodom prouzročene nedostacima u materijalu ili izradi tijekom normalne upotrebe. Ono ne pokriva probleme s proizvodom prouzročene bilo kojim drugim razlogom, uključujući, ali se ne ograničavajući na probleme s proizvodom nastale uslijed upotrebe proizvoda na neki drugi način osim kako je specifično opisano u ovom priručniku, primjerice: neodgovarajućom ili nepropisnom upotrebom, nepravilnim sastavljanjem ili ugradnjom od strane rukovatelja ili neke druge osobe, razumnim trošenjem i habanjem, nemarnim ili nepravilnim radom, rukovanjem, skladištenjem, servisiranjem ili održavanjem; nepridržavanjem uputa za rad; neovlaštenim preinačavanjem proizvoda ili bilo kojeg njegovog dijela ili upotrebom neodgovarajućih potrošnih materijala, dodatnog pribora ili radnih materijala.

Jamstvo tvrtke Miltenyi Biotec ne pokriva proizvode koji se prodaju U STANJU U KAKVOM JESU ili SA SVIM POGREŠKAMA ili potrošne materijale. Ništa od ovdje navedenog ne smije se tumačiti kao dodatno jamstvo.

Tvrtka Miltenyi Biotec odmah mora biti obaviještena ako se pojavi zahtjev vezan uz takvo jamstvo. Ako dođe do nedostatka u materijalu ili izradi unutar jamstvenog razdoblja, tvrtka Miltenyi Biotec poduzet će odgovarajuće korake kako bi se ponovno uspostavila potpuna funkcionalnost instrumenta.

Ograničenje štete: tvrtka Miltenyi Biotec neće biti odgovorna za bilo kakve slučajne ili posljedične štete zbog kršenja bilo kakvog izričitog ili impliciranog jamstva ili uvjeta vezanih uz ovaj proizvod.

Neke zemlje/države ili sudske nadležnosti ne dopuštaju isključenje ili ograničenje slučajne ili posljedične naknade štete tako da se gore navedena ograničenja ili isključenja možda neće odnositi na Vas. Ova izjava o jamstvu vam daje određena zakonska prava, a možete imati i druga prava koja se razlikuju od države do države ili od sudske nadležnosti do sudske nadležnosti.

9.2 Zaštitni znakovi

CliniMACS, MACS, MACSmix, logotip tvrtke Miltenyi Biotec i MiniMACS su registrirani zaštitni znakovi ili zaštitni znakovi tvrtke Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG i/ili njihovih podružnica u raznim zemljama širom svijeta. Svi ostali zaštitni znakovi navedeni u ovom dokumentu vlasništvo su njihovih odgovarajućih vlasnika i rabe se samo za potrebe identifikacije.

Miltenyi Biotec

Njemačka/Austrija
Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG
Friedrich-Ebert-Straße 68
51429 Bergisch Gladbach
Njemačka
+49 2204 8306-0
+49 2204 85197
macsde@miltenyi.com

SAD/Kanada
Miltenyi Biotec Inc.
2303 Lindbergh Street
Auburn, CA 95602
SAD
800 FOR MACS
+1 866 811 4466
+1 877 591 1060
macsus@miltenyi.com

Australija
Miltenyi Biotec
Australia Pty. Ltd.
Unit 11, 2 Eden Park Drive
Macquarie Park NSW 2113
Australija
+61 2 8877 7400
+61 2 9889 5044
macsau@miltenyi.com

Države Beneluksa
Miltenyi Biotec B.V.
Dellaertweg 9C
2316 WZ Leiden
Nizozemska
macsnl@miltenyi.com
Korisnička služba u Nizozemskoj
0800 4020120
0800 4020100
Korisnička služba u Belgiji
0800 94016
0800 99626
Korisnička služba u Luksemburgu
800 24971
800 24984

Kina
Miltenyi Biotec Technology &
Trading (Shanghai) Co., Ltd.
Room A401, 4/F
No. 1077, Zhangheng Road
Pudong New Area
201203 Shanghai
Narodna Republika Kina
+86 21 6235 1005-0
+86 21 6235 0953
macscn@miltenyi.com.cn

Francuska
Miltenyi Biotec SAS
10 rue Mercoeur
75011 Pariz
Francuska
+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

Italija
Miltenyi Biotec S.r.l.
Via Paolo Nanni Costa, 30
40133 Bologna
Italija
+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
Tokio 135-0041
Japan
+81 3 5646 8910
+81 3 5646 8911
macsjp@miltenyi.com

Skandinavske i baltičke države
Miltenyi Biotec Norden AB
Medicon Village
Scheeletorget 1
223 81 Lund
Švedska
macsse@miltenyi.com
Korisnička služba u Švedskoj
0200 111 800
+46 280 72 99
Korisnička služba u Danskoj
80 20 30 10
+46 46 280 72 99
Korisnička služba u Norveškoj, Finskoj, na Islandu i u baltičkim državama
+46 46 280 72 80
+46 46 280 72 99

Singapur
Miltenyi Biotec Asia Pacific Pte Ltd.
438B Alexandra Road, Block B
Alexandra Technopark
#06-01
Singapore 119968
+65 6238 8183
+65 6238 0302
macssg@miltenyi.com

Južna Koreja
Miltenyi Biotec Korea Co., Ltd.
Donggeuk 7F
562 Nonhyeon-ro
Gangnam-gu
Seoul 06136
Južna Koreja
+82 2 555 1988
+82 2 555 8890
macskr@miltenyi.com

Španjolska
Miltenyi Biotec S.L.
C/Luis Buñuel 2
Ciudad de la Imagen
28223 Pozuelo de Alarcón (Madrid)
Španjolska
+34 91 512 12 90
+34 91 512 12 91
macses@miltenyi.com

Švicarska
Miltenyi Biotec Swiss AG
Gibelinstrasse 27
4500 Solothurn
Švicarska
+41 32 623 08 47
+49 2204 85197
macsch@miltenyi.com

Ujedinjeno Kraljevstvo
Miltenyi Biotec Ltd.
Almac House, Church Lane
Bisley, Surrey GU24 9DR
Ujedinjeno Kraljevstvo
+44 1483 799 800
+44 1483 799 811
macsuk@miltenyi.com

www.miltenyibiotec.com

Tvrtka Miltenyi Biotec na raspolaganje stavlja proizvode i usluge diljem svijeta. Posjetite **www.miltenyibiotec.com/local** kako biste pronašli najbliži kontakt tvrtke Miltenyi Biotec.

CliniMACS, MACS, MACSmix, logotip tvrtke Miltenyi Biotec i MiniMACS su registrirani zaštitni znakovi ili zaštitni znakovi tvrtke Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG i/ili njihovih podružnica u raznim zemljama širom svijeta. Autorska prava © 2023 Miltenyi Biotec i/ili njihove podružnice. Sva prava pridržana.

210-003-238/01 | Izdano: 2023-11