Miltenyi Biotec

CliniMACS® Plus (Aplicaciones)

Manual del usuario



Los componentes del sistema CliniMACS, incluidos los reactivos, sets de tubos, instrumentos y el tampón PBS/EDTA se han diseñado, fabricado y examinado en un sistema de calidad certificado según la norma ISO 13485. En la UE, los componentes del sistema CliniMACS están disponibles como productos sanitarios con marca CE para su uso previsto, a menos que se indique lo contrario. En EE. UU., el sistema CliniMACS CD34 Reagent, incluidos CliniMACS Plus Instrument, CliniMACS CD34 Reagent, CliniMACS Tubing Set TS y CliniMACS Tubing Set LS, así como CliniMACS PBS/EDTA Buffer, están aprobados por la FDA como instrumentos de uso en humanos (HUD, por sus siglas en inglés) y autorizados por la Ley Federal de los EE. UU. para el tratamiento de pacientes con leucemia mieloide aguda (LMA) en primera remisión completa. No se ha demostrado la eficacia del instrumento para esta indicación. Otros productos de la línea de productos CliniMACS están disponibles para su uso solo previa aprobación de una solicitud de nuevo fármaco en investigación (IND), de una exención de producto en investigación (IDE) o de una aprobación de la FDA. En Australia, los siguientes componentes del sistema CliniMACS Plus se incluyen en el Registro Australiano de Productos Terapéuticos (ARTG), por lo que se aprueba su suministro: CliniMACS Plus Instrument, CliniMACS CD34 Reagent, CliniMACS Tubing Set, CliniMACS Tubing Set LS, CliniMACS Depletion Tubing Set y CliniMACS PBS/EDTA Buffer. En Australia solo se podrán utilizar los productos incluidos en el ARTG.

A menos que se indique específicamente lo contrario, los productos y servicios de Miltenyi Biotec son solo para uso en investigación y no para uso terapéutico o diagnóstico.

Copyright © 2023 Miltenyi Biotec o sus filiales. Todos los derechos reservados.

Ninguna parte de este manual puede ser reproducida, almacenada en un sistema de recuperación, transmitida, publicada o distribuida en forma alguna o por medio alguno, ya sea electrónico, mecánico, por fotocopia, microfilm, grabación u otros, sin el consentimiento expreso por escrito de Miltenyi Biotec; no obstante, y pese a lo anterior, los propietarios del sistema CliniMACS Plus pueden hacer copias solo con el fin de formar al personal en el uso y en el servicio de la unidad dentro de su empresa u organización.

CliniMACS, MACS, MACSmix, el logotipo de Miltenyi Biotec y MiniMACS son marcas comerciales registradas o marcas comerciales de Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG y/o de sus filiales en distintos países del mundo. Todas las demás marcas comerciales mencionadas en este documento son propiedad de sus respectivos dueños y tienen únicamente fines de identificación.

CliniMACS® Plus (Aplicaciones)

Manual del usuario

Versión del software 2.4x

Edición: 2023-02
210-003-230/01

MD CE 0123

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

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

www.miltenyibiotec.com

Información esencial

Este manual del usuario proporciona información sobre CliniMACS Plus (Aplicaciones). En el manual del usuario del CliniMACS Plus se proporcionan instrucciones, advertencias, precauciones y otra información importante para el uso del CliniMACS Plus Instrument.

⚠ ADVERTENCIA

El sistema CliniMACS Plus solo lo deben utilizar operarios formados. Antes de poner el sistema en funcionamiento, lea detenidamente y comprenda la información de seguridad, las advertencias, precauciones e instrucciones para el correcto funcionamiento del CliniMACS Plus Instrument que se proporcionan en las instrucciones de uso del sistema CliniMACS Plus (incluidas, entre otras, las informaciones de seguridad en el manual del usuario del CliniMACS Plus Instrument y en el capítulo 3 «Advertencias y precauciones» en la página 27 de este manual del usuario) y en cualquier recomendación relacionada con la seguridad emitida por Miltenyi Biotec). Preste especial atención a todas las advertencias que aparecen sobre el instrumento o que se suministran con consumibles, accesorios, materiales adicionales y demás equipos. Durante el funcionamiento del instrumento, el operario debe observar en todo momento la información de seguridad, las advertencias, precauciones e instrucciones, confirmando que se respetan toda la información de seguridad, las advertencias, las precauciones e instrucciones. El incumplimiento de la información de seguridad, de las advertencias, las precauciones y las instrucciones contenidas en las instrucciones de uso podría provocar un fallo de funcionamiento del instrumento, daños materiales, pérdida de células diana, lesiones personales o la muerte.

Índice

1	**Introducción**	**11**
1.1	Información general	11
1.2	Marcaje de células con reactivos CliniMACS	12
1.3	Separación celular magnética de alto gradiente	13
1.4	Estrategias de separación	13
1.4.1	Estrategia de enriquecimiento	15
1.4.2	Estrategia de depleción	16
2	**Glosario**	**19**
2.1	Representación gráfica	19
2.2	Glosario de símbolos	19
2.3	Glosario de términos	20
3	**Advertencias y precauciones**	**27**
3.1	Relacionadas con el proceso	27
3.2	Reactivos CliniMACS y conjugados de biotina	28
3.3	Manipulación de materiales biopeligrosos	29
3.4	Producto celular inicial	30
4	**El sistema CliniMACS Plus**	**31**
4.1	CliniMACS Plus Instrument	31
4.2	Reactivos CliniMACS y conjugados de biotina	31
4.3	Sets de tubos CliniMACS	31
4.4	CliniMACS PBS/EDTA Buffer	31
4.5	Accesorios CliniMACS	32
4.6	Materiales adicionales necesarios	32
4.7	Equipo necesario	33
5	**Resumen de las aplicaciones**	**35**
5.1	Cuatro PASOS hacia sus células diana	35
5.2	Tabla sinóptica	37

6	**Resumen específico de la aplicación de los PASOS 1–4**	**41**
6.1	Enriquecimiento de células CD34 positivas	41
6.1.1	PASO 1: Preparación y marcaje magnético de las células	41
6.1.2	PASO 2: Selección del programa de separación	43
6.1.3	PASO 3: Instalación de sets de tubos CliniMACS	44
6.1.4	PASO 4: Separación CliniMACS Plus	44
6.2	Enriquecimiento de células CD14 positivas	44
6.2.1	PASO 1: Preparación y marcaje magnético de las células	44
6.2.2	PASO 2: Selección del programa de separación	47
6.2.3	PASO 3: Instalación de sets de tubos CliniMACS	47
6.2.4	PASO 4: Separación CliniMACS Plus	47
6.3	Enriquecimiento/depleción con el CliniMACS Anti-Biotin Reagent	48
6.3.1	PASO 1: Preparación y marcaje magnético de las células	48
6.3.2	PASO 2: Selección del programa de separación	52
6.3.3	PASO 3: Instalación de sets de tubos CliniMACS	52
6.3.4	PASO 4: Separación CliniMACS Plus	52
6.4	Enriquecimiento de células CD56 positivas	53
6.4.1	PASO 1: Preparación y marcaje magnético de las células	53
6.4.2	PASO 2: Selección del programa de separación	56
6.4.3	PASO 3: Instalación de sets de tubos CliniMACS	56
6.4.4	PASO 4: Separación CliniMACS Plus	56
6.5	Depleción de células CD3 positivas	57
6.5.1	PASO 1: Preparación y marcaje magnético de las células	57
6.5.2	PASO 2: Selección del programa de separación	61
6.5.3	PASO 3: Instalación de sets de tubos CliniMACS	61
6.5.4	PASO 4: Separación CliniMACS Plus	61
6.6	Depleción de células CD19 positivas	62
6.6.1	PASO 1: Preparación y marcaje magnético de las células	62
6.6.2	PASO 2: Selección del programa de separación	64
6.6.3	PASO 3: Instalación de sets de tubos CliniMACS	64
6.6.4	PASO 4: Separación CliniMACS Plus	64

6.7	Depleción de células CD3 positivas y CD19 positivas	65
6.7.1	PASO 1: Preparación y marcaje magnético de las células	65
6.7.2	PASO 2: Selección del programa de separación	68
6.7.3	PASO 3: Instalación de sets de tubos CliniMACS	68
6.7.4	PASO 4: Separación CliniMACS Plus	68
6.8	Enriquecimiento/depleción de células CD8 positivas	69
6.8.1	PASO 1: Preparación y marcaje magnético de las células	69
6.8.2	PASO 2: Selección del programa de separación	72
6.8.3	PASO 3: Instalación de sets de tubos CliniMACS	72
6.8.4	PASO 4: Separación CliniMACS Plus	73
6.9	Enriquecimiento/depleción de células CD25 positivas	73
6.9.1	PASO 1: Preparación y marcaje magnético de las células	73
6.9.2	PASO 2: Selección del programa de separación	78
6.9.3	PASO 3: Instalación de sets de tubos CliniMACS	78
6.9.4	PASO 4: Separación CliniMACS Plus	78
6.10	Enriquecimiento/depleción de células CD4 positivas	79
6.10.1	PASO 1: Preparación y marcaje magnético de las células	79
6.10.2	PASO 2: Selección del programa de separación	83
6.10.3	PASO 3: Instalación de sets de tubos CliniMACS	83
6.10.4	PASO 4: Separación CliniMACS Plus	83
6.11	Depleción de células CD4 y CD8 positivas	83
6.11.1	PASO 1: Preparación y marcaje magnético de las células	84
6.11.2	PASO 2: Selección del programa de separación	87
6.11.3	PASO 3: Instalación de sets de tubos CliniMACS	87
6.11.4	PASO 4: Separación CliniMACS Plus	87
6.12	Enriquecimiento de células CD1c (BDCA-1) positivas – Parte 1: Depleción de células CD19 positivas y marcaje de células CD1c (BDCA-1) positivas	88
6.12.1	PASO 1: Preparación y marcaje magnético de las células	88
6.12.2	PASO 2: Selección del programa de separación	90
6.12.3	PASO 3: Instalación de sets de tubos CliniMACS	90
6.12.4	PASO 4: Separación CliniMACS Plus	90

6.13 Enriquecimiento de células CD1c (BDCA-1) positivas – Parte 2: Flexible Labeling System 91
6.13.1 PASO 1: Preparación y marcaje magnético de las células 91
6.13.2 PASO 2: Selección del programa de separación 93
6.13.3 PASO 3: Instalación de sets de tubos CliniMACS 93
6.13.4 PASO 4: Separación CliniMACS Plus 93
6.14 Enriquecimiento de células CD304 (BDCA-4) positivas 94
6.14.1 PASO 1: Preparación y marcaje magnético de las células 94
6.14.2 PASO 2: Selección del programa de separación 96
6.14.3 PASO 3: Instalación de sets de tubos CliniMACS 96
6.14.4 PASO 4: Separación CliniMACS Plus 97
6.15 Depleción de células TCRα/β positivas 97
6.15.1 PASO 1: Preparación y marcaje magnético de las células 97
6.15.2 PASO 2: Selección del programa de separación 100
6.15.3 PASO 3: Instalación de sets de tubos CliniMACS 100
6.15.4 PASO 4: Separación CliniMACS Plus 100
6.16 Depleción de células CD45RA positivas 101
6.16.1 PASO 1: Preparación y marcaje magnético de las células 101
6.16.2 PASO 2: Selección del programa de separación 103
6.16.3 PASO 3: Instalación de sets de tubos CliniMACS 104
6.16.4 PASO 4: Separación CliniMACS Plus 104
6.17 Enriquecimiento de células humanas secretoras de IFN γ con el CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma) 104
6.17.1 PASO 1: Preparación y marcaje magnético de las células 104
6.17.2 PASO 2: Selección del programa de separación 117
6.17.3 PASO 3: Instalación de sets de tubos CliniMACS 117
6.17.4 PASO 4: Separación CliniMACS Plus 117

7 Explicación detallada de los PASOS 1–4 119

7.1 PASO 1: Preparación y marcaje magnético de las células 119
7.1.1 Primeras acciones necesarias 119
7.1.2 Marcaje magnético de las células 120
7.2 PASO 2: Selección del programa de separación 132
7.2.1 Encender el CliniMACS Plus Instrument 132

7.2.2 CD34 SELECTION 1/2 132
7.2.3 ENRICHMENT 1.1 134
7.2.4 ENRICHMENT 3.2 139
7.2.5 DEPLETION 2.1 141
7.2.6 DEPLETION 3.1 146
7.3 PASO 3: Instalación de sets de tubos CliniMACS 152
7.3.1 CliniMACS Tubing Set y CliniMACS Tubing Set LS 152
7.3.2 Instalación alternativa de los sets de tubos CliniMACS 167
7.3.3 CliniMACS Depletion Tubing Set 172
7.4 PASO 4: Separación CliniMACS Plus 187
7.4.1 CD34 SELECTION 1/2 187
7.4.2 ENRICHMENT 1.1 191
7.4.3 ENRICHMENT 3.2 195
7.4.4 DEPLETION 2.1 199
7.4.5 DEPLETION 3.1 203

8 Solución de problemas 207

8.1 Miltenyi Biotec Technical Support 207
8.2 Preparación del producto de leucaféresis 207
8.3 CliniMACS Plus Instrument y sets de tubos CliniMACS 208
8.3.1 Mensajes de error 208
8.3.2 Carga y cebado del set de tubos 209
8.4 Separación celular automatizada 210
8.4.1 Mensajes de advertencia 210
8.4.2 Incidentes inesperados: Todos los programas de separación 210
8.4.3 Incidentes inesperados: Solo programas de enriquecimiento 213
8.4.4 Incidentes inesperados: CD34 SELECTION 1/2 214
8.4.5 Incidentes inesperados: ENRICHMENT 1.1 215
8.4.6 Incidentes inesperados: ENRICHMENT 3.2 216
8.4.7 Programa de emergencia (solo se debe utilizar con programas de enriquecimiento) 217
8.4.8 Incidentes inesperados: DEPLETION 2.1 218
8.4.9 Incidentes inesperados: DEPLETION 3.1 218
8.5 Rendimiento de la separación celular 221

8.5.1 Incidentes inesperados: Solo programas de enriquecimiento 221
8.5.2 Incidentes inesperados: CD34 SELECTION 1/2, ENRICHMENT 1.1 223
8.5.3 Incidentes inesperados: CD34 SELECTION 1/2 223
8.5.4 Incidentes inesperados: ENRICHMENT 1.1 224
8.5.5 Incidentes inesperados: DEPLETION 2.1 y DEPLETION 3.1 224

9 Aviso legal 225

9.5.1 Garantía limitada 225
9.5.2 Marcas comerciales 226

1 Introducción

1.1 Información general

El sistema CliniMACS Plus ofrece un kit de herramientas que permite realizar separaciones celulares estándar de alta calidad para aplicaciones terapéuticas.

El sistema CliniMACS Plus se basa en la tecnología de separación magnética de células (tecnología MACS®) desarrollada por Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG. Miltenyi Biotec proporciona estos productos para aplicaciones clínicas que cumplen los requisitos de las normas reguladoras europeas.

Los reactivos y conjugados de biotina CliniMACS están destinados exclusivamente para el uso *in vitro* y no se han diseñado para el uso terapéutico ni la infusión directa en pacientes.

Los reactivos CliniMACS en combinación con el sistema CliniMACS Plus están destinados a separar células humanas.

Miltenyi Biotec, como fabricante del sistema CliniMACS Plus, no da ninguna recomendación sobre el uso de las células separadas con fines terapéuticos y no hace ninguna afirmación sobre un beneficio clínico.

Para la fabricación y el uso de las células diana en seres humanos se debe observar la legislación y la normativa nacionales, por ejemplo, para la UE la Directiva 2004/23/CE (células y tejidos humanos) o la Directiva 2002/98/CE (sangre humana y hemoderivados). Cualquier aplicación clínica de las células diana es responsabilidad exclusiva del usuario de un sistema CliniMACS Plus.

GARANTÍA LIMITADA
Si el sistema CliniMACS Plus se utiliza de una manera no descrita explícitamente en este manual, todas las garantías quedarán anuladas.

IMPORTANTE
Antes de utilizar el sistema CliniMACS Plus o cualquier componente fuera del Espacio Económico Europeo, debe confirmarse la aprobación reglamentaria del sistema CliniMACS Plus o de cualquier componente CliniMACS en el país.

1.2 Marcaje de células con reactivos CliniMACS

La clasificación celular magnética MACS es una potente herramienta de eficacia probada para la separación de numerosos tipos de células, tanto en laboratorios de investigación como en aplicaciones clínicas. Las mezclas de células se separan en un campo magnético utilizando un marcador inmunomagnético específico para el tipo de célula de interés, p. ej., células progenitoras hematopoyéticas humanas CD34 positivas de poblaciones celulares hematológicas heterogéneas.

Con el sistema CliniMACS Plus las células se pueden marcar magnéticamente de tres maneras diferentes:

- Directamente en un procedimiento de marcaje de un solo paso mediante anticuerpos específicos del antígeno conjugados con esferas superparamagnéticas de hierro-dextrano (ver Figura 1.1).
- Indirectamente en un procedimiento de marcaje de dos pasos llamado sistema de marcaje flexible. En un primer paso, las células se marcan con anticuerpos específicos del antígeno conjugados con biotina. En un segundo paso, estos anticuerpos se marcan con anticuerpos específicos de biotina conjugados con esferas superparamagnéticas de hierro-dextrano (ver Figura 1.2).
- Indirectamente en un procedimiento de marcaje de dos pasos llamado CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma). En primer lugar, las células se vuelven a estimular *in vitro* para que secreten la citocina (p. ej., IFN γ). En un primer paso de marcaje, las células reestimuladas se marcan con una molécula híbrida formada por un anticuerpo específico de leucocitos y un anticuerpo específico de citocinas, denominado CliniMACS IFN-gamma Catchmatrix Reagent. A continuación, las células se incuban para permitir la secreción de la citocina, que es «capturada» por la matriz de captura de la superficie celular.

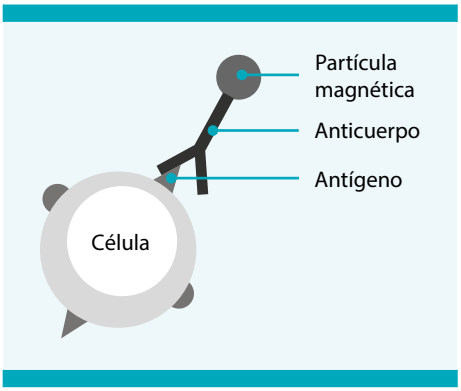


Figura 1.1: Marcaje magnético de células

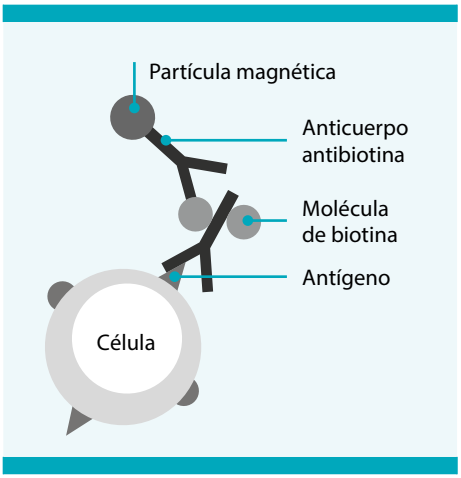


Figura 1.2: Flexible Labeling System

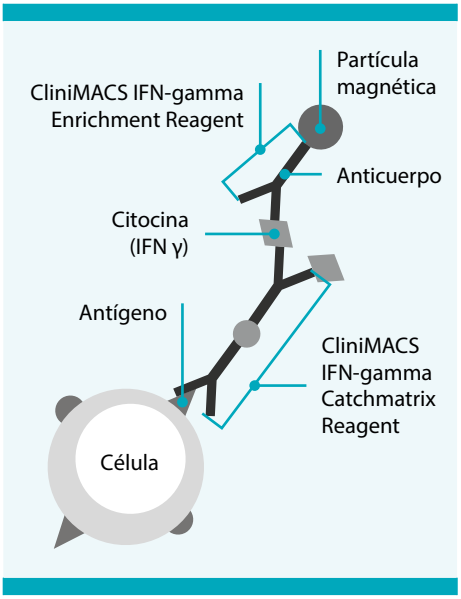


Figura 1.3: CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma)

Posteriormente, en un segundo paso de marcaje, las células secretoras de citocinas se marcan con anticuerpos específicos de citocinas conjugados con esferas superparamagnéticas de hierro-dextrano (CliniMACS IFN-gamma Enrichment Reagent), (ver Figura 1.3)

1.3 Separación celular magnética de alto gradiente

La suspensión celular marcada magnéticamente se carga en el CliniMACS Plus Instrument preparado con un set de tubos. Esta unidad de separación celular magnética de alto gradiente consta de un potente imán permanente de diseño específico y de una columna de separación con una matriz ferromagnética.

El campo de alto gradiente permite generar fuerzas magnéticas fuertes y una desmagnetización rápida. Al introducir en el campo magnético las pequeñas estructuras ferromagnéticas, como la matriz de la columna, estas alteran la homogeneidad del campo. Se generarán gradientes magnéticos elevados. En su entorno inmediato, las estructuras ferromagnéticas generan fuerzas magnéticas 10 000 veces más fuertes que en las geometrías convencionales. El campo de alto gradiente atrae las células marcadas a la matriz y las retiene eficazmente. Tras retirar la columna del imán, la rápida desmagnetización de la matriz de la columna permite descargar las células retenidas.
w

1.4 Estrategias de separación

El sistema CliniMACS Plus ofrece al usuario diferentes programas de separación. En general, los programas de separación se pueden dividir en estrategias de enriquecimiento (CD34 SELECTION 1 y 2, ENRICHMENT 1.1 y ENRICHMENT 3.2) y estrategias de depleción (DEPLETION 2.1 y DEPLETION 3.1).

Enriquecimiento de células marcadas magnéticamente

Al elegir una estrategia de enriquecimiento, las células marcadas magnéticamente (marcadas primeramente con un CliniMACS CD8 Reagent) se retienen en la columna de separación y las células no marcadas la atraviesan. Las células marcadas (células diana) se recogen en la Cell Collection Bag y las células no marcadas (células no diana) en la Negative Fraction Bag (ver Figura 1.4).

Depleción de las células marcadas magnéticamente

La tecnología MACS también es muy eficaz para reducir poblaciones celulares específicas. Las células indeseadas se marcan específicamente con partículas superparamagnéticas y se separan de las células diana al pasar por la columna magnética de alto gradiente. A diferencia de la estrategia de enriquecimiento, las

células no marcadas (células diana) se recogen en la Cell Collection Bag y las células marcadas (células no diana) se recogen en la Negative Fraction Bag (ver Figura 1.5) o en la Non-Target Cell Bag (ver Figura 1.6 y Figura 1.7), respectivamente.

1.4.1 Estrategia de enriquecimiento

Enriquecimiento de células con el CliniMACS Tubing Set o el CliniMACS Tubing Set LS

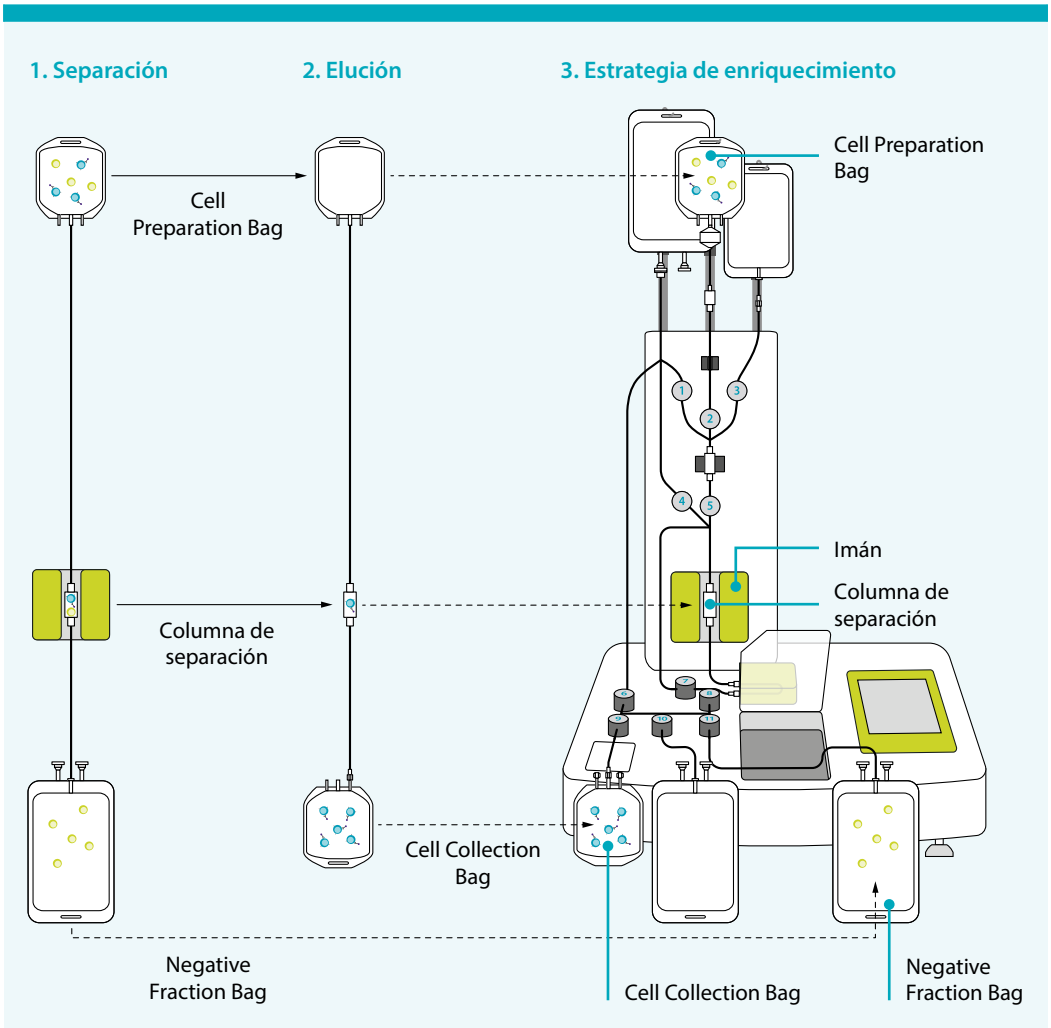


Figura 1.4: Estrategia de los programas de enriquecimiento con el CliniMACS Tubing Set o el CliniMACS Tubing Set LS

1. El imán está en posición «ON». Las células marcadas magnéticamente se mantienen en la columna de separación, mientras que las demás células no marcadas (células no diana) fluyen a través de la columna y se recogen en la Negative Fraction Bag.
2. El imán está en posición «OFF». Las células marcadas magnéticamente (células diana) se descargan de la columna de separación y se recogen en la Cell Collection Bag.
3. El programa de enriquecimiento retiene las células marcadas magnéticamente en la columna de separación. Las células no marcadas (células no diana) fluyen a través de la columna y se recogen en la Negative Fraction Bag. Al desplazar el imán a la posición «OFF», las células marcadas magnéticamente (células diana) se descargan de la columna y se recogen en la Cell Collection Bag. **Nota:** La fracción de células diana se recoge siempre en la Cell Collection Bag.

1.4.2 Estrategia de depleción

Depleción de células con el CliniMACS Tubing Set LS: DEPLETION 2.1

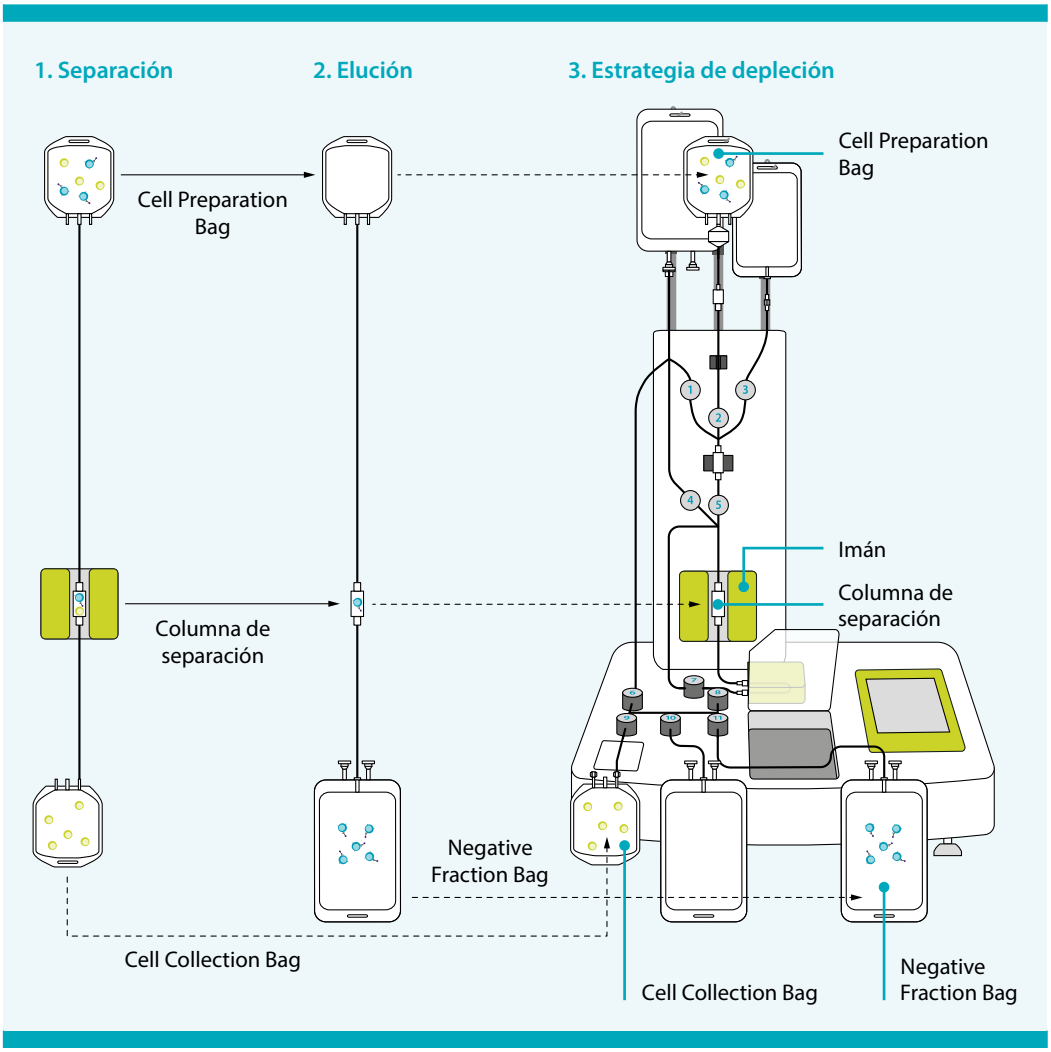


Figura 1.5: Estrategia del programa de depleción DEPLETION 2.1 con el CliniMACS Tubing Set LS

1. El imán está en posición «ON». Las células marcadas magnéticamente se mantienen en la columna de separación, mientras que las demás células no marcadas (células diana) fluyen a través de la columna y se recogen en la Cell Collection Bag.
2. El imán está en posición «OFF». Las células marcadas magnéticamente (células no diana) se descargan de la columna de separación y se recogen en la Negative Fraction Bag.
3. El programa de depleción (DEPLETION 2.1) retiene las células marcadas magnéticamente en la columna de separación. Las células no marcadas (células diana) fluyen a través de la columna y se recogen en la Cell Collection Bag. Al desplazar el imán a la posición «OFF», las células marcadas magnéticamente (células no diana) se descargan de la columna y se recogen en la Negative Fraction Bag. **Nota:** La fracción de células diana se recoge siempre en la Cell Collection Bag.

Depleción de células con el CliniMACS Depletion Tubing Set: DEPLETION 3.1 (Parte 1: Staged Cell Loading [Bulk Loading Stage])

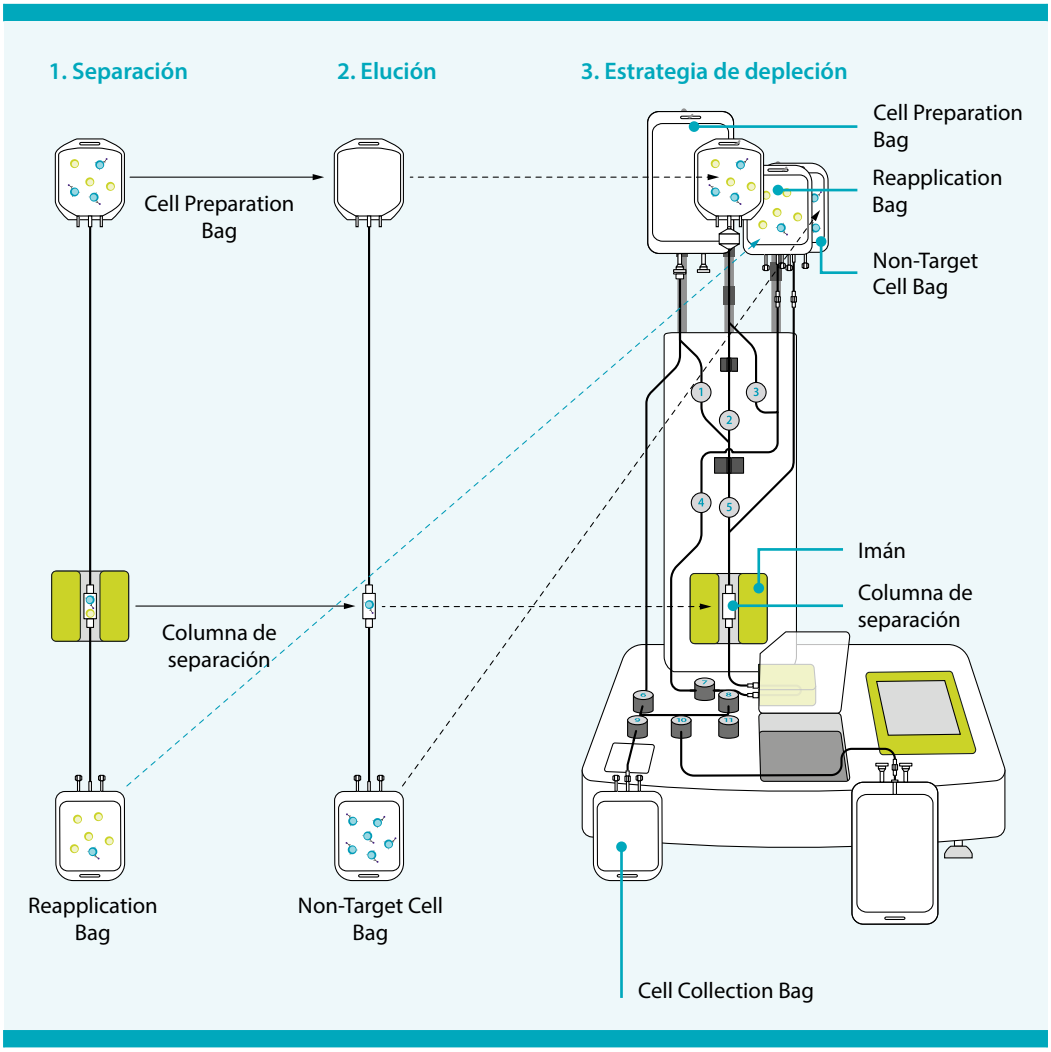


Figura 1.6: Estrategia del programa de depleción DEPLETION 3.1 con el CliniMACS Depletion Tubing Set (Parte 1)

1. Staged Cell Loading (Bulk Loading Stage): El imán está en posición «ON». Las células marcadas magnéticamente se mantienen en la columna de separación, mientras que las demás células no marcadas (células diana) fluyen a través de ella y se recogen en la Reapplication Bag.
2. El imán está en posición «OFF». Las células marcadas magnéticamente (células no diana) se descargan de la columna de separación y se recogen en la Non-Target Cell Bag.
3. El programa de depleción (DEPLETION 3.1) retiene las células marcadas magnéticamente en la columna de separación; las células no marcadas (células diana) fluyen a través de la columna y se recogen en la Reapplication Bag para recargarlas en la columna de separación en un segundo paso de depleción (ver Figura 1.7). Al desplazar el imán a la posición «OFF», las células marcadas magnéticamente (células no diana) se descargan de la columna y se recogen en la Non-Target Cell Bag.

Depleción de células con el CliniMACS Depletion Tubing Set: DEPLETION 3.1 (Parte 2: Sensitive Sample Loading [Sensitive Loading Stage])

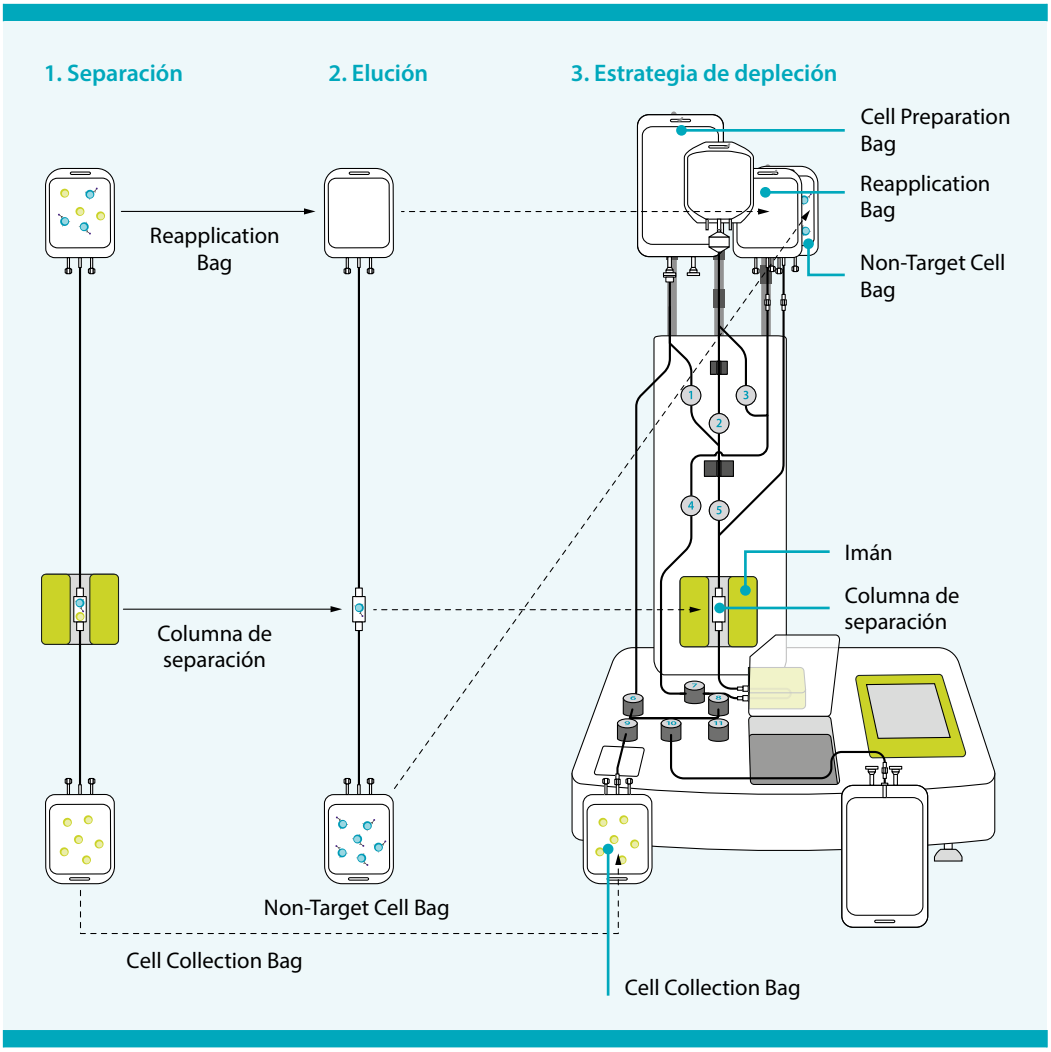


Figura 1.7: Estrategia del programa de depleción DEPLETION 3.1 con el CliniMACS Depletion Tubing Set (Parte 2)

4. Sensitive Sample Loading (Sensitive Loading Stage): El imán está en posición «ON». Las células de la Reapplication Bag se vuelven a cargar en la columna de separación. Las pocas células marcadas magnéticamente restantes se mantienen en la columna de separación, mientras que las células no marcadas (células diana) fluyen a través de la columna y se recogen en la Cell Collection Bag.
5. El imán está en posición «OFF». Las células marcadas magnéticamente (células no diana) se descargan de la columna de separación y se recogen en la Non-Target Cell Bag.
6. Al final de la separación, las células marcadas (células no diana) se encuentran en la Non-Target Cell Bag y las células no marcadas (células diana) se encuentran en la Cell Collection Bag. **Nota:** La fracción de células diana se recoge siempre en la Cell Collection Bag.

2 Glosario

2.1 Representación gráfica

El siguiente diagrama representa los paneles utilizados en este manual del usuario para informar al usuario sobre los posibles riesgos si no se siguen las advertencias y precauciones indicadas. El nivel de riesgo clasifica el riesgo, como se describe a continuación. A continuación se indican el nivel, el tipo y la fuente del riesgo, así como las posibles consecuencias, prohibiciones y medidas. Los iconos de la izquierda especifican el riesgo.

⚠ ADVERTENCIA

Indica una situación peligrosa que, si no se evita, puede provocar la muerte o lesiones graves.

⚠ ATENCIÓN

Indica una situación peligrosa que, si no se evita, puede provocar lesiones leves o moderadas.

AVISO

Indica información que se considera importante, pero no relacionada con el peligro (p. ej., mensajes relacionados con daños materiales).

IMPORTANTE

Advierte al usuario de prácticas o información importantes no relacionadas con daños personales ni materiales.

2.2 Glosario de símbolos

En el manual del usuario del CliniMACS Plus Instrument se ofrece una visión general de los símbolos utilizados en el sistema CliniMACS Plus. El glosario de símbolos muestra los símbolos utilizados en los manuales del usuario y el etiquetado de los productos CliniMACS.

2.3 Glosario de términos

Aféresis	Método de recogida de sangre en el que se extrae la sangre entera, se selecciona y retiene un componente deseado y se devuelve el resto de la sangre al donante.
Agitador orbital	Dispositivo utilizado para mezclar el producto celular durante la reacción con los reactivos CliniMACS
Albúmina sérica humana	Se requiere HSA de calidad farmacéutica aprobada en el país del usuario como complemento tampón si se va a utilizar con el sistema CliniMACS Plus.
Anillo de retención	Parte de un set de tubos que permite que el tubo de la bomba permanezcan en la posición correcta
Anticuerpo antibiotina	Este anticuerpo reconoce las células que se han marcado previamente con un anticuerpo o ligando biotinilado adecuado.
Anticuerpo magnético	Un anticuerpo marcado superparamagnéticamente
Anticuerpos monoclonales	Un tipo único de anticuerpo dirigido contra un epítopo específico (antígeno, determinante antigénico) y producido por un único clon de linfocitos B o un único hibridoma, que se forma por la fusión de un linfocito con una célula de mieloma. Determinadas células de mieloma sintetizan anticuerpos únicos de forma natural.
Antígeno CD14	El antígeno CD14 es una glucoproteína de la membrana celular de 53-55 kD que se expresa en los monocitos. El antígeno CD14 se conoce como receptor para el complejo de lipopolisacáridos (LPS) y la proteína fijadora de los lipopolisacáridos (LBP).
Antígeno CD19	El antígeno CD19 es una molécula de transducción de señales esencial que regula el desarrollo, la activación y la diferenciación de los linfocitos B. Como marcador del linaje de los linfocitos B, el CD19 se expresa desde el estadio temprano de los linfocitos pro-B hasta el estadio de linfoblastos de los linfocitos B, pero la expresión se regula a la baja cuando los linfocitos B maduran hasta convertirse en células plasmáticas. El antígeno CD19 se expresa además en la mayoría de los linfocitos B malignos y en un subconjunto de células dendríticas foliculares.

Antígeno CD1c (BDCA-1)	CD1c forma parte del complejo génico CD1 que se cree está relacionado con el CPH. Los genes CD1 se agrupan en una región de 170 000 pb del cromosoma humano 1q23.1. Las proteínas codificadas por ellos (CD1a-e) se expresan como heterodímeros compuestos por la cadena pesada de CD1 emparejada de forma no covalente con la microglobulina ß2. CD1c está implicado en la presentación de antígenos de glucolípidos microbianos o antígenos lipopeptídicos a los linfocitos T. En la sangre periférica humana, CD1c (BDCA-1) se expresa en las células dendríticas mieloides de tipo 1 (MDC1) y en un subconjunto de linfocitos B. Se localizan en los ganglios linfáticos, zonas del manto y centros germinales, en la zona marginal del bazo y en la sangre periférica humana fetal y adulta.
Antígeno CD25	El antígeno CD25, la cadena α del receptor de interleucina 2 de baja afinidad (IL-2Rα), se expresa en los linfocitos T y B activados, las células NK y los monocitos, así como en los linfocitos T reguladores CD4 positivos. El antígeno CD25 presenta tres regiones epitópicas A, B y C. El anticuerpo del CliniMACS CD25 Reagent reconoce el epítopo A de la molécula CD25.
Antígeno CD3	El antígeno CD3 está presente en los linfocitos T humanos maduros, en los timocitos y en un subconjunto de células NK. Se asocia con el receptor de linfocitos T (TCR) y es responsable de la transducción de señales del TCR. El antígeno CD3 es un complejo de cinco cadenas invariables: γ, δ, ε, ζ y η. El antígeno CD3 reconoce todos los linfocitos T, es decir, reacciona con el 70-80% de los linfocitos de la sangre periférica humana y con el 65-85% de los timocitos. El epítopo reconocido por el anticuerpo está localizado en la cadena ε del complejo CD3.
Antígeno CD304 (BDCA-4)	El antígeno CD304 (BDCA-4) es una glucoproteína de superficie celular de 130-140 kDa expresada exclusivamente en células dendríticas plasmacitoides en sangre fresca y médula ósea.
Antígeno CD34	El antígeno CD34 es una proteína de membrana integral de 115 kDa de tipo 1, altamente glicosilada y de función desconocida, que se expresa en el 1 al 4% de las células normales de la médula ósea y en menos del 0,2% de los leucocitos normales de la sangre periférica, en subconjuntos de células estromales de la médula ósea y en el endotelio de pequeños vasos de diversos tejidos.
Antígeno CD4	El antígeno CD4 se expresa en la mayoría de los timocitos y en aproximadamente dos tercios de los linfocitos T de la sangre periférica; también se expresa en monocitos y macrófagos. CD4 es una molécula accesoria en el reconocimiento de antígenos extraños en asociación con el CPH de clase II. Además, CD4 es un receptor para VIH-1.

Antígeno CD45RA	El antígeno CD45RA se expresa en linfocitos T indiferenciados CD4 y CD8 positivos, así como en subconjuntos de linfocitos B, células NK y monocitos. Se trata de un isómero del antígeno leucocitario común CD45, una proteína transmembrana tirosina fosfatasa.
Antígeno CD56	El antígeno CD56 pertenece a la familia NCAM (familia de moléculas de adhesión celular neural) que se expresa en el sistema hematopoyético, en las células NK y NKT.
Antígeno CD8	El antígeno CD8 es un dímero ligado a disulfuro que existe como homodímero CD8 α o como heterodímero CD8 α/β. CD8 se expresa fuertemente en linfocitos T CD8 positivos y en los timocitos, así como en un subconjunto de células NK y en los linfocitos T γ/δ CD8 positivos. CD8 actúa como correceptor con los receptores de linfocitos T con restricción CPH de clase I en el reconocimiento de antígenos.
Antígeno TCRα/β	El TCRα/β es el heterodímero del receptor de los linfocitos T compuesto por dos cadenas glucoprotéicas, α y β. Ambas cadenas pertenecen a la superfamilia Ig y están formadas por una región constante y otra polimórfica variable. La región variable del TCRα/β participa en el reconocimiento de los péptidos antigénicos presentados por el complejo MHC de las células presentadoras de antígenos. El antígeno TCRα/β se expresa en la mayoría de los linfocitos T de la sangre periférica.
BDCA	Antígeno de células dendríticas en sangre
Bolsa de transferencia	Bolsa con un tubo y un punzón en el extremo
Bomba peristáltica	Bomba de tubos utilizada en el CliniMACS Plus Instrument para controlar el caudal del líquido en el interior del set de tubos
Buffer Waste Bag	Bolsa de desechos para recoger la solución tampón durante la separación de células con el CliniMACS Plus Instrument
Cell Collection Bag	Bolsa en la que se acumulan las células diana purificadas tras la separación
Cell Preparation Bag	Bolsa a la que se transfiere el producto celular y en la que se realizan el marcaje magnético y el lavado de las células
CliniMACS Anti-Biotin Reagent	Reactivo para el marcaje magnético de células previamente marcadas con anticuerpos o ligandos biotinilados.
CliniMACS CD14 Reagent	Reactivo para el marcaje magnético de las células que expresan el antígeno CD14

CliniMACS CD19 Reagent	Reactivo para el marcaje magnético de las células que expresan el antígeno CD19
CliniMACS CD1c (BDCA-1)-Biotin	Anticuerpo biotinilado para el marcaje de células humanas que expresan el antígeno CD1c (BDCA-1) antes del marcaje magnético con el CliniMACS Anti-Biotin Reagent.
CliniMACS CD25 Reagent	Reactivo para el marcaje magnético de las células que expresan el antígeno CD25
CliniMACS CD3 Reagent	Reactivo para el marcaje magnético de las células que expresan el antígeno CD3
CliniMACS CD304 (BDCA-4) Reagent	Reactivo para el marcaje magnético de las células que expresan el antígeno CD304 (BDCA-4)
CliniMACS CD34 Reagent	Reactivo para el marcaje magnético de las células que expresan el antígeno CD34
CliniMACS CD4 Reagent	Reactivo para el marcaje magnético de las células que expresan el antígeno CD4
CliniMACS CD45RA Reagent	Reactivo para el marcaje magnético de las células que expresan el antígeno CD45RA
CliniMACS CD56 Reagent	Reactivo para el marcaje magnético de las células que expresan el antígeno CD56
CliniMACS CD8 Reagent	Reactivo para el marcaje magnético de las células que expresan el antígeno CD8
CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma)	Combinación de reactivos, compuesta por el CliniMACS IFN-gamma Catchmatrix Reagent y el CliniMACS IFN-gamma Enrichment Reagent. Con el CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma) se pueden enriquecer las células secretoras de IFN γ tras la reestimulación *in vitro*.
CliniMACS Depletion Tubing Set	Set de tubos, conectores, columnas y bolsas especialmente diseñado para los requisitos específicos de la depleción, con el que se procesa la suspensión de células marcadas magnéticamente y en el que tiene lugar la separación magnética de las células
CliniMACS IFN-gamma Enrichment Reagent	Componente del CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma) para el marcaje magnético de IFN γ unido al CliniMACS IFN-gamma Catchmatrix Reagent en las células secretoras de IFN γ

CliniMACS IFN-gamma de Catchmatrix Reagent	Componente del CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma) para el marcaje superficial de leucocitos con anticuerpos específicos de IFN γ
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	Solución tampón utilizada para la preparación y la separación de células con el sistema CliniMACS Plus: PBS (solución salina tampón fosfato), enriquecida con 1 mM de EDTA, pH 7,2. Antes de utilizarlo, CliniMACS PBS/EDTA Buffer se debe complementar con HSA de calidad farmacéutica a una concentración final del 0,5% (peso/volumen, es decir, 5 g de HSA por litro de solución tampón).
CliniMACS Plus Instrument	Instrumento para la separación magnética de células basado en la tecnología MACS
CliniMACS TCRα/β-Biotin	Anticuerpo biotinilado para el marcaje de células humanas que expresan el antígeno TCRα/β antes del marcaje magnético con el CliniMACS Anti-Biotin Reagent
CliniMACS Tubing Set, CliniMACS Tubing Set LS	Set de tubos, conectores, columnas y bolsas con el que se procesa la suspensión de células marcada magnéticamente y en el que tiene lugar la separación magnética de las células
Columna de selección	Ver «Columna de separación».
Columna de separación	Columna en la que las células marcadas magnéticamente se separan cuando se exponen al campo magnético
Compartimento de bolsa	Compartimento del CliniMACS Plus Instrument, donde se colocan la Negative Fraction Bag y la Buffer Waste Bag
Conector de Luer	Acoplamiento roscado, parte del set de tubos
Conector de T	Conector en forma de T en un set de tubos donde se juntan tres tubos
Células progenitoras hematopoyéticas	Células progenitoras de linaje linfoide, mieloide y eritroide
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
Extractor de plasma	Dispositivo utilizado para extraer líquido de la Cell Preparation Bag después del lavado de las células
Gancho	Soporte en el CliniMACS Plus Instrument para montar la Cell Preparation Bag, la Non-Target Cell Bag, la Priming Waste Bag, la Reapplication Bag y la bolsa de solución tampón

HSA	Albúmina sérica humana
MDC	Células dendríticas mieloides
IgG	Inmunoglobulina G
Interruptor de seguridad de la bomba	Sensor que impide el funcionamiento de la bomba si la puerta de la bomba está abierta
Leucaféresis	Aféresis para recoger leucocitos
Luer/Spike Interconnector	Kit de transferencia con perforador (punzón) y adaptador de jeringa (conector de Luer hembra) para plasma o líquidos
Marcaje	Reacción de las células con reactivo de marcaje magnético, p. ej., CliniMACS CD34 Reagent para células CD34 positivas
Negative Fraction Bag	Bolsa del CliniMACS Tubing Set y del CliniMACS Tubing Set LS que contiene la fracción de células no diana
Non-Target Cell Bag	Bolsa del CliniMACS Depletion Tubing Set que contiene la fracción de células no diana
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
Plasma Waste Bag	Bolsa de desechos para recoger el exceso de plasma antes del marcaje
Pre-filtro	Dispositivo de filtrado de 40 µm entre la Cell Preparation Bag y la pre-columna utilizado para atrapar aglutinados y restos celulares
Pre-columna	Primera columna del CliniMACS Tubing Set y del CliniMACS Tubing Set LS; sirve de filtro para atrapar las células que tienen interacciones inespecíficas con la matriz de la columna
Prelavado	Paso previo a la separación celular, en el que la solución tampón se hace pasar por el set de tubos
Priming Waste Bag	Bolsa en la que se recoge la solución tampón del paso de cebado
Procedimiento en bolsa	Procesamiento y transferencia estériles de las células en el entorno cerrado de las bolsas de transferencia
Producto celular inicial	Producto que contiene células y que se utiliza como material de partida para el proceso de Separación CliniMACS Plus, p. ej., recolección por leucaféresis, PBMC o médula ósea

Programa de separación	Programa diseñado para el enriquecimiento o la depleción de subconjuntos celulares marcados magnéticamente a partir de una población celular mixta. En función de la separación deseada, realice su selección en un menú de programas de separación.
Reactivo de separación	Reactivo para el marcaje magnético de las células, p. ej., CliniMACS CD34 Reagent
Reapplication Bag	Bolsa del CliniMACS Depletion Tubing Set en la que se recogen temporalmente las células no marcadas durante la separación. Las células no marcadas de la Reapplication Bag se aplican en la columna de separación dos veces, para asegurar una pureza elevada de las células diana.
Sampling Site Coupler	Vía de inyección, p. ej., para extraer muestras o añadir reactivos CliniMACS a la Cell Preparation Bag
Sellador térmico	Dispositivo de calentamiento utilizado para el sellado estéril de tubos de PVC
Sensor de líquido	Componente del CliniMACS Plus Instrument que detecta líquido en el tubo
Set de transferencia de plasma	Set de transferencia con dos perforadores (punzones) para plasma o líquidos
Soporte de columna de selección	Ver «Soporte de columna de separación».
Soporte de columna de separación	Guías moldeadas en la carcasa del imán que mantienen la columna de separación en posición
Soporte de pre-columna	Soporte montado en el CliniMACS Plus Instrument que mantiene la pre-columna en posición
Tampón de selección	Ver «CliniMACS PBS/EDTA Buffer».
WBC	Siglas inglesas para «leucocitos»
Wash Waste Bag	Bolsa de recogida en la que se recoge el sobrenadante de lavado por separación de la suspensión celular sedimentada tras los pasos de centrifugación, durante la preparación de la muestra
rpm	Revoluciones por minuto
×g	Múltiplos de la aceleración gravitatoria terrestre

3 Advertencias y precauciones

En este capítulo se explican los posibles riesgos asociados a la utilización del sistema CliniMACS Plus. En todo momento se deben observar las indicaciones de seguridad del área de trabajo local, las políticas y las normas relativas a las prácticas correctas de fabricación, la salud, la seguridad y la prevención de accidentes. Para las instrucciones de uso, p. ej., advertencias y precauciones, relativas a la manipulación de materiales biopeligrosos y del producto celular inicial, así como de los componentes del sistema CliniMACS Plus, consulte las secciones correspondientes en las instrucciones de uso de cada componente. Las instrucciones de uso detalladas del CliniMACS Plus Instrument se describen en el manual del usuario del CliniMACS Plus Instrument.

Cualquier incidente grave que se haya producido en relación con este producto deberá ser comunicado a Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG - mediante la información de contacto proporcionada - y a la autoridad competente del estado miembro en el que esté establecido el usuario de este producto.

3.1 Relacionadas con el proceso

⚠ ADVERTENCIA

Riesgo de fallo del proceso o daños en el instrumento. Riesgo de fallo del proceso o daños en el instrumento si los procedimientos los realizan operarios no formados. Todos los procedimientos de procesamiento los deben realizar únicamente operarios formados. La formación para operarios la imparte un representante cualificado de Miltenyi Biotec.

⚠ ATENCIÓN

Riesgo de reducción del rendimiento del proceso. Las temperaturas inferiores o superiores a la temperatura ambiente pueden reducir la viabilidad, la pureza y el rendimiento de las células diana. Realice la preparación de la muestra y la separación celular a temperatura ambiente (+19 °C a +25 °C [+66 °F a +77 °F]).

⚠ ATENCIÓN

La seguridad del equipo puede verse comprometida. La seguridad del equipo puede verse comprometida si el instrumento no se utiliza de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Lea detenidamente y comprenda la información de seguridad, las advertencias, las precauciones y las instrucciones para el correcto funcionamiento del sistema CliniMACS Plus que se proporcionan en las instrucciones de uso de CliniMACS Plus y en cualquier recomendación relacionada con la seguridad emitida por Miltenyi Biotec.

- Para la fabricación y el uso de las células diana en seres humanos se debe observar la legislación y la normativa nacionales, por ejemplo, para la UE la Directiva 2004/23/CE (células y tejidos humanos) o la Directiva 2002/98/CE (sangre humana y hemoderivados). Cualquier aplicación clínica de las células diana es responsabilidad exclusiva del usuario de un sistema CliniMACS Plus.

- Todos los materiales que hayan entrado en contacto con sangre y hemoderivados se deben tratar como material infeccioso. Por tanto, se deben seguir las normas para la manipulación de materiales infecciosos.
- Durante la etapa de cebado se deben revisar minuciosamente todos los tubos, los conectores, las válvulas, la pre-columna y la columna de separación para detectar posibles fugas.
- Todas las bolsas, incluidas las utilizadas en la preparación de la muestra, se deben conservar hasta que haya finalizado el análisis final de las células recogidas y se haya confirmado la separación satisfactoria de las células diana.

3.2 Reactivos CliniMACS y conjugados de biotina

- Al infundir o inyectar la fracción de células diana, los pacientes pueden recibir trazas de anticuerpos murinos y hierro-dextrano.
- Las esferas de hierro-dextrano o los anticuerpos murinos pueden provocar reacciones alérgicas o anafilácticas en los pacientes. Se recomienda tener a mano un equipo de cuidados intensivos y medicamentos.
- La separación de las células con los reactivos CliniMACS y conjugados de biotina la deben realizar exclusivamente operarios debidamente formados.
- Los operarios que utilicen los reactivos CliniMACS y los conjugados de biotina deben tener experiencia en la separación de células procedentes de la médula ósea o de la sangre periférica.
- Las células no diana no están destinadas a un uso terapéutico y no se pueden reinfundir en pacientes.
- Los reactivos y conjugados de biotina CliniMACS están destinados exclusivamente al uso *in vitro* y no se han diseñado para el uso terapéutico ni la infusión directa en pacientes.
- No se recomienda utilizar los reactivos CliniMACS ni los conjugados de biotina en pacientes que se sabe o se sospecha tienen sensibilidad frente a las inmunoglobulinas murinas o el hierro-dextrano.
- Los pacientes pueden desarrollar anticuerpos·anti-murinos·humanos (HAMA).
- No utilizar después de la fecha de caducidad impresa en la etiqueta del producto.
- No utilizar si el embalaje está dañado. Utilice el reactivo solo si el vial está intacto y sellado.

3.3 Manipulación de materiales biopeligrosos

⚠ ADVERTENCIA

Riesgo de lesiones graves o de muerte. Según el material biológico utilizado, el contacto pueden provocar lesiones personales graves o la muerte. Utilice siempre el equipo de seguridad personal de acuerdo con las advertencias y precauciones, en particular si se utiliza o se ha utilizado material de riesgo biológico.

- Para evitar la contaminación del producto celular inicial, todos los pasos de la preparación se deberán realizar en condiciones estériles utilizando técnicas asépticas (p. ej., en la campana de flujo de aire laminar).
- El operario que realice la separación celular debe estar formado en el uso correcto del equipo y en la manipulación de hemoderivados y del aspirado de médula ósea.
- El operario que realice la separación celular debe llevar ropa adecuada (p. ej., bata de laboratorio, guantes y gafas de protección) cuando trabaje con muestras de pacientes y manipule material potencialmente biopeligroso.
- Todos los hemoderivados se deben tratar como si fueran potencialmente biopeligrosos. El producto de leucaféresis, el hemoderivado, el aspirado de médula ósea, las células recogidas, la solución tampón utilizada, el set de tubos usado y otros materiales que hayan estado en contacto con estos líquidos se deben tratar como materiales de riesgo biológico conforme a los requisitos habituales del hospital o del centro.
- El CliniMACS Plus Instrument debe considerarse un posible riesgo biológico después de cada ciclo de separación y se deberá limpiar con un detergente biocida acuoso (p. ej., Bacillol® plus o Meliseptol®, consulte también la sección «Limpieza y mantenimiento» del manual del usuario del CliniMACS Plus Instrument) de acuerdo con los requisitos habituales del hospital o del centro.
- Los materiales desechables deben ser tratados como materiales biopeligrosos de acuerdo con los requisitos habituales del hospital o del centro.

3.4 Producto celular inicial

IMPORTANTE

El marcaje y la separación de las células debe comenzar lo antes posible tras la recogida del producto celular inicial. El producto no debe tener más de 24 horas cuando se inicie el procedimiento de marcaje y separación.

- El producto celular inicial (p. ej., el producto de leucaféresis) se debe recoger, de acuerdo con los procedimientos habituales del hospital o del centro, en bolsas de recogida estándar.
- El recipiente que contenga el producto celular inicial debe estar rotulado con la identificación del paciente, la hora, la fecha y el lugar de recogida, de acuerdo con los procedimientos especificados para el uso en el protocolo clínico.
- Para el transporte, el producto celular inicial se debe envasar en recipientes aislados y mantener a temperatura ambiente controlada (+19 °C a +25 °C [+66 °F a +77 °F]) de acuerdo con los procedimientos de extracción de sangre habituales del hospital o del centro aprobados para el uso con el protocolo clínico. No refrigerar. La concentración de células no debe superar los $0{,}2\times10^9$ células por mL durante el transporte.
- Evite mezclar intensamente el material celular inicial.
- Si el producto celular inicial se debe conservar, p. ej., durante la noche, se deberá mantener a temperatura ambiente controlada (+19 °C a +25 °C [+66 °F a +77 °F]). Durante la conservación, la concentración de leucocitos nunca debe superar $0{,}2\times10^9$ células por mL.
- Las células se deben conservar en plasma autólogo. Si la concentración celular es superior a $0{,}2\times10^9$ células por mL, diluya el producto celular inicial con plasma autólogo.

4 El sistema CliniMACS Plus

El sistema CliniMACS Plus, compuesto por el CliniMACS Plus Instrument, reactivo(s) CliniMACS, el CliniMACS Tubing Set, el CliniMACS PBS/EDTA Buffer y otros accesorios que se deben usar en combinación con él, está destinado a la separación *in vitro* de células humanas específicas para aplicaciones clínicas.

IMPORTANTE
Para las instrucciones de uso, por ejemplo, advertencias y precauciones relativas a los componentes del sistema CliniMACS Plus, consulte las instrucciones de uso proporcionadas para el componente respectivo.

4.1 CliniMACS Plus Instrument

El CliniMACS Plus Instrument es un dispositivo electromecánico que incorpora un imán permanente, una bomba peristáltica, válvulas de estrangulamiento, componentes electrónicos y software.

4.2 Reactivos CliniMACS y conjugados de biotina

Los reactivos CliniMACS son soluciones coloidales de color oscuro, no viscosas, que contienen los conjugados de anticuerpos específicos de las células en solución tampón. Los reactivos contienen el anticuerpo acoplado químicamente a partículas superparamagnéticas.

Los conjugados de biotina CliniMACS son soluciones transparentes e incoloras que contienen anticuerpos enlazados covalentemente a la biotina en solución tampón. Los anticuerpos son altamente específicos, lo que permite el marcaje *in vitro* de células diana poco frecuentes.

4.3 Sets de tubos CliniMACS

Los sets de tubos CliniMACS son artículos desechables estériles, diseñados para utilizarse en combinación con el CliniMACS Plus Instrument para el enriquecimiento o la depleción *in vitro* de células humanas de poblaciones celulares hematológicas heterogéneas.

4.4 CliniMACS PBS/EDTA Buffer

El CliniMACS PBS/EDTA Buffer es un líquido de lavado y de transporte que permite la separación *in vitro* de células humanas.

4.5 Accesorios CliniMACS

- **set de transferencia de plasma:**
  set de transferencia con dos punzones para plasma o líquidos, Transfer Set Coupler/Coupler (REF 200-073-902) o equivalente
- **Luer/Spike Interconnector:**
  kit de transferencia con punzón y adaptador de jeringa (conector de Luer hembra) para plasma o líquidos, Luer/Spike Interconnector (REF 200-073-903) o equivalente

4.6 Materiales adicionales necesarios

Además de los productos CliniMACS, pueden ser necesarios materiales adicionales para una Separación CliniMACS Plus.

- **bolsas de cultivo celular, permeables a los gases:**
  bolsa de diferenciación celular MACS GMP – 100 mL o equivalente
- **bolsas de transferencia aptas para el centrifugado:**
  bolsa de transferencia de 150 mL, Terumo o equivalente
  bolsa de transferencia de 600 mL, Terumo o equivalente
  bolsa de transferencia de 1000 mL, Terumo o equivalente
- **sampling site coupler:**
  sampling site coupler, Terumo o equivalente
- **pre-filtro:**
  filtro para transfusión de sangre, Haemonetics® o equivalente
- **jeringas y agujas:**
  jeringas adecuadas (5 mL, 10 mL, 20 mL, 50 mL) y agujas hipodérmicas de calibre 20
- **pinzas de cierre**
- **tubos de muestras**
- **albúmina de suero humano (HSA):**
  use solamente HSA de calidad farmacéutica disponible como producto aprobado en el país del usuario.
- **inmunoglobulina G de grado clínico:**
  utilice únicamente IgG de calidad farmacéutica disponible como fármaco aprobado en el país del usuario, p. ej., para Alemania: Gamunex® 10% o equivalente.
- **medio de cultivo celular:**
  p. ej., RPMI 1640 o equivalente
- **materiales específicos de la aplicación:**
  anticuerpo o ligando individual biotinilado específico de las células; suero AB o, en su defecto, suero autólogo

4.7 Equipo necesario

- **sistema de alimentación ininterrumpida:**
  SAI recomendado: APC Smart-UPS 1500VA USB & Serial 230 V, fabricado por APC (American Power Conversion) o equivalente.
- **campana de flujo de aire laminar**
- **conector de tubos estéril:**
  Terumo Sterile Connection Device (TSCD®) o equivalente
- **agitador orbital:**
  agitadores de plataforma, Heidolph Instruments o equivalente
- **centrífuga:**
  Centrífuga, Sorvall o equivalente, y cubetas para centrifugación con tapas herméticas a los aerosoles
- **extractor de plasma:**
  soporte de separación de plasma, equipo Terumo Equipment o equivalente
- **balanza de mesa:**
  balanza de laboratorio, Mettler Toledo o equivalente, con capacidad de 1 kg; resolución de 0,1 g
- **sellador térmico de tubos:**
  sellador manual Hematron III, Baxter o equivalente
- **tubing stripper:**
  Tube Stripper, Baxter o equivalente
- **contenedores para materiales infecciosos**

Equipamiento adicional necesario para el CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma):

- placa de cultivo de 24 pocillos Corning™ Costar™, Sigma Aldrich o equivalente
- MiniMACS™ Separation Unit, Miltenyi Biotec, (REF 130-042-102)
- MS Columns, Miltenyi Biotec, (REF 130-042-201)
- Pre-Separation Filter, Miltenyi Biotec, (REF 130-041-407)
- MACSmix™ Tube Rotator, Miltenyi Biotec, (REF 130-090-753)

5 Resumen de las aplicaciones

5.1 Cuatro PASOS hacia sus células diana

En este capítulo se presenta una visión general de la separación CliniMACS Plus. La separación CliniMACS Plus se lleva a cabo en cuatro PASOS. En el primer paso, las células se preparan y marcan magnéticamente. En el segundo paso se selecciona un programa de separación adecuado. En un tercer paso se instala el set de tubos en el CliniMACS Plus Instrument y en el cuarto paso se separan las células automáticamente.

Puede ser necesario registrar los datos del proceso relacionados con la aplicación. Para solicitar fichas de apoyo, póngase en contacto con el Miltenyi Biotec Technical Support.

El manual del usuario del CliniMACS Plus (Aplicaciones) incluye diferentes opciones para cada paso (diferentes reactivos, sets de tubos y programas). Antes de iniciar una aplicación, se deben elegir los capítulos específicos de la aplicación (capítulo 6) y la explicación detallada de los PASOS 1-4 (capítulo 7) por medio de la tabla sinóptica que comienza en la página siguiente. La tabla sinóptica contiene información sobre las secciones aplicables del manual del usuario. La tabla sinóptica se basa en el tipo y el número de reactivos, el número de células, el tipo de set de tubos y el programa de separación pertinente necesario para la separación.

PASO 1: Preparación y marcaje magnético de las células

El PASO 1 describe la preparación del producto celular y el marcaje magnético de las células específicas, que expresan el antígeno correspondiente. Observe las instrucciones de la sección aplicable. Continúe con el PASO 2.

PASO 2: Selección del programa de separación

El PASO 2 describe la selección de un programa de separación del CliniMACS Plus Instrument. En función del tipo y número de células a separar, se deben seleccionar diferentes programas. Para determinar qué programa es aplicable, vaya a la tabla sinóptica de la página siguiente. Lea la sección correspondiente al programa de separación seleccionado. Observe las instrucciones que figuran en la sección aplicable. Continúe con el PASO 3.

PASO 3: Instalación de sets de tubos CliniMACS

El PASO 3 explica la instalación del set de tubos en el CliniMACS Plus Instrument. Observe las instrucciones de la sección aplicable. Continúe con el PASO 4.

PASO 4: Separación CliniMACS Plus

El PASO 4 describe la separación automatizada CliniMACS Plus. El CliniMACS Plus Instrument realiza la separación celular automatizada (seleccionada en el PASO 2). Observe las instrucciones de la sección aplicable.

IMPORTANTE

La tabla sinóptica de las páginas siguientes resume la información sobre las aplicaciones características de los reactivos CliniMACS. Si debe realizar la separación de un número diferente de células diana, consulte las instrucciones del resumen específico de la aplicación para localizar información sobre la capacidad máxima de la aplicación correspondiente. Observe las instrucciones de las secciones específicas de la aplicación y las explicaciones detalladas de los PASOS 1 a 4. Consulte la Tabla sinóptica.

5.2 Tabla sinóptica

Capacidad de la aplicación	Viales de reactivos	Set de tubos	Programa de separación	Sección específica de la aplicación	Explicación detallada de las secciones de los PASOS 1–4			
					PASO 1	PASO 2	PASO 3	PASO 4
Antibiotina (REF 173-01) – Enriquecimiento								
Máx. ≤40×10^9 células totales	1× reactivo antibiotina	1× CliniMACS Tubing Set (REF 161-01)	ENRICHMENT 1.1	6.3	7.1	7.2.3	7.3.1	7.4.2
Antibiotina (REF 173-01) – Depleción (aplicación a escala normal)								
Máx. ≤40×10^9 células totales	1× reactivo antibiotina	1× CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01)	DEPLETION 2.1	6.3	7.1	7.2.5	7.3.1	7.4.4
Antibiotina (REF 173-01) – Depleción (aplicación a gran escala)								
Máx. >40–80×10^9 células totales	2× reactivo antibiotina	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) – Enriquecimiento								
Células secretoras de IFN de ≤1×10^9 células totales	1 kit (2 viales de reactivos)	1× CliniMACS Tubing Set (REF 161-01)	ENRICHMENT 3.2	6.17	7.1	7.2.4	7.3.1	7.4.3
Biotina CD1c (BDCA-1) (REF 277-01) – Depleción - Parte 1 de 2								
≤5×10^9 células CD19 positivas de ≤40×10^9 células totales (WBC)	1× reactivo CD19 y 1× biotina CD1c (BDCA-1)	1× CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01)	DEPLETION 2.1	6.12	7.1	7.2.5	7.3.1	7.4.4
Biotina CD1c (BDCA-1) (REF 277-01) – Enriquecimiento - Parte 2 de 2								
≤0,2×10^9 células CD1c (BDCA-1) positivas de 40×10^9 células totales (WBC)	1× reactivo antibiotina	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) – Depleción (aplicación a escala normal)								
≤15×10^9 células CD3 positivas de ≤40×10^9 células totales	1× reactivo CD3	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) – Depleción (aplicación a gran escala)								
>15–20×10^9 células CD3 positivas de >40–80×10^9 células totales	2× reactivo CD3	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) – Depleción (aplicación a escala normal)								
≤15×10^9 células CD3 positivas de ≤40×10^9 células totales	1× reactivo CD3	1× CliniMACS Depletion Tubing Set (REF 261-01)	DEPLETION 3.1	6.5	7.1	7.2.6	7.3.3	7.4.5

Capacidad de la aplicación	Viales de reactivos	Set de tubos	Programa de separación	Sección específica de la aplicación	Explicación detallada de las secciones de los PASOS 1–4			
					PASO 1	PASO 2	PASO 3	PASO 4
CD3 (REF 273-01) – Depleción (aplicación a gran escala)								
>15–30×10^9 células CD3 positivas de >40–80×10^9 células totales	2× reactivo CD3	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) – Enriquecimiento								
≤5×10^9 células CD4 positivas de ≤40×10^9 células totales	1× reactivo CD4	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) – Depleción								
≤12×10^9 células CD4 positivas de ≤40×10^9 células totales	1× reactivo CD4	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) – Enriquecimiento								
≤4×10^9 células CD8 positivas de ≤40×10^9 células totales	1× reactivo CD8	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) – Depleción								
≤4×10^9 células CD8 positivas de ≤40×10^9 células totales	1× reactivo CD8	1× CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01)	DEPLETION 2.1	6.8	7.1	7.2.5	7.3.1	7.4.4
Combinación de CD4/CD8 (REF 276-01/REF 275-01) – Depleción								
≤12×10^9 células CD4 positivas y ≤4×10^9 células CD8 positivas de ≤40×10^9 células totales	1× reactivo CD4 y 1× reactivo CD8	1× CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01)	DEPLETION 2.1	6.11	7.1	7.2.5	7.3.1	7.4.4
CD14 (REF 272-01) – Enriquecimiento								
≤4×10^9 células CD14 positivas de ≤20×10^9 células totales	1× reactivo CD14	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) – Depleción								
≤5×10^9 células CD19 positivas de ≤40×10^9 células totales	1× reactivo CD19	1× CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01)	DEPLETION 2.1	6.6	7.1	7.2.5	7.3.1	7.4.4

Capacidad de la aplicación	Viales de reactivos	Set de tubos	Programa de separación	Sección específica de la aplicación	Explicación detallada de las secciones de los PASOS 1–4			
					PASO 1	PASO 2	PASO 3	PASO 4
Combinación de CD3/CD19 (REF 273-01/REF 179-01) – Depleción								
≤15×10^9 células CD3 positivas y ≤5×10^9 células CD19 positivas de ≤40×10^9 células totales	1× reactivo CD3 y 1× reactivo CD19	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) – Enriquecimiento								
≤0,6×10^9 células CD25 positivas de ≤40×10^9 células totales (WBC)	1× reactivo CD25	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) – Enriquecimiento								
>6–12×10^9 células CD25 positivas de alta expresión de >40–80×10^9 células totales (WBC)	1× reactivo CD25	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) – Depleción (aplicación a escala normal)								
≤6×10^9 células CD25 positivas de ≤40×10^9 células totales (WBC)	1× reactivo CD25	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) – Depleción (aplicación a gran escala)								
>6–12×10^9 células CD25 positivas de >40–80×10^9 células totales (WBC)	2× reactivo CD25	1× CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01)	DEPLETION 2.1	6,9	7.1	7.2.5	7.3.1	7.4.4
CD34 (REF 171-01) – Enriquecimiento (aplicación a escala normal)								
≤0,6×10^9 células CD34 positivas de ≤60×10^9 células totales	1× reactivo CD34	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) – Enriquecimiento (aplicación a gran escala)								
≤0,6×10^9 células CD34 positivas de >60–120×10^9 células totales	2× reactivo CD34	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) – Depleción								
≤20×10^9 células CD45RA positivas de ≤50×10^9 células totales	1× reactivo CD45RA	1× CliniMACS Depletion Tubing Set (REF 261-01)	DEPLETION 3.1	6.16	7.1	7.2.6	7.3.3	7.4.5

Capacidad de la aplicación	Viales de reactivos	Set de tubos	Programa de separación	Sección específica de la aplicación	Explicación detallada de las secciones de los PASOS 1–4			
					PASO 1	PASO 2	PASO 3	PASO 4
CD56 (REF 271-01) – Enriquecimiento								
≤5×10^9 células CD56 positivas de ≤40×10^9 células totales	1× reactivo CD56	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) – Enriquecimiento								
≤0,2×10^9 células CD304 (BDCA-4) positivas de ≤40×10^9 células totales	1× reactivo CD304 (BDCA-4)	1× CliniMACS Tubing Set (REF 161-01)	ENRICHMENT 3.2	6.14	7.1	7.2.4	7.3.1	7.4.3
Biotina TCRα/β (REF 701-48/REF 173-01) – Depleción								
≤24×10^9 células TCRα/β de ≤60×10^9 células totales	1× biotina TCRα/β y 2× reactivo antibiotina	1× CliniMACS Depletion Tubing Set (REF 261-01)	DEPLETION 3.1	6.15	7.1	7.2.6	7.3.3	7.4.5

Tabla 5.1: Resumen de las aplicaciones disponibles con los correspondientes sets de tubos y programas de separación

6 Resumen específico de la aplicación de los PASOS 1–4

6.1 Enriquecimiento de células CD34 positivas

El CliniMACS Plus CD34 System con el CliniMACS Plus Instrument, el CliniMACS CD34 Reagent, el CliniMACS Tubing Set o el CliniMACS Tubing Set LS, y el CliniMACS PBS/EDTA Buffer están destinados al enriquecimiento *in vitro* de células progenitoras hematopoyéticas humanas CD34 positivas de poblaciones celulares hematológicas heterogéneas.

6.1.1 PASO 1: Preparación y marcaje magnético de las células

Primeras acciones necesarias

Capacidad de la aplicación

- Aplicación a escala normal: hasta $0{,}6\times10^9$ células CD34 positivas de hasta 60×10^9 células totales (WBC)
- Aplicación a gran escala: más de $0{,}6\times10^9$ y hasta $1{,}2\times10^9$ células CD34 positivas de hasta 120×10^9 células totales (WBC)

⚠ ATENCIÓN

Riesgo de rendimiento insuficiente de separación de células marcadas. Si se superan las especificaciones de la aplicación, hay riesgo de que el marcaje específico sea insuficiente. Utilice la cantidad necesaria de células y de reactivo según lo descrito para la aplicación correspondiente.

Materiales CliniMACS necesarios

Material	Número de catálogo	Cantidad	Programa de separación
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1	–
CliniMACS CD34 Reagent	171-01	• 1 vial (escala normal) • 2 viales (gran escala)	–
CliniMACS Tubing Set	161-01	1 set de tubos	CD34 SELECTION 1
CliniMACS Tubing Set LS	162-01	1 set de tubos	CD34 SELECTION 2
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	3 bolsas de 1000 mL[1]	–

1 Antes del uso, enriquezca el CliniMACS PBS/EDTA Buffer con HSA hasta una concentración final del 0,5% (p/v).

Tabla 6.1: Materiales CliniMACS necesarios para enriquecer células CD34 positivas

Materiales adicionales necesarios

- **Cell Preparation Bag:**
  una bolsa de transferencia de 600 mL, apta para la centrifugación, así como un Sampling Site Coupler y dos sets de transferencia de plasma, para el uso durante la preparación celular
- **Plasma Waste Bag y Wash Waste Bags:**
  tres bolsas de transferencia de 600 mL, aptas para el centrifugado
- **Cell Collection Bag:**
  una bolsa de transferencia de 150 mL en combinación con un Luer/Spike Interconnector para conectar la Cell Collection Bag al set de tubos
- un pre-filtro
- pinzas de cierre
- jeringas adecuadas (diferentes tamaños) y agujas hipodérmicas de calibre 20
- albúmina de suero humana (HSA) para añadirla al CliniMACS PBS/EDTA Buffer hasta una concentración final del 0,5% (p/v)
- tubos de muestras

▶ Preparación de las bolsas

Determine el peso de la Cell Collection Bag y de la Cell Preparation Bag vacías como se describe en la sección 7.1.1 en la página 119.

Marcaje magnético de las células

Para una descripción detallada de los pasos siguientes, consulte la sección 7.1 «PASO 1: Preparación y marcaje magnético de las células» en la página 119.

▶ Análisis del producto celular inicial

▶ Transferencia del producto celular inicial a la Cell Preparation Bag

Si el peso del producto celular inicial es superior a 200 g, pero el número de células es inferior a 120×10^9 células totales y $1{,}2\times10^9$ células CD34 positivas, centrifugar la muestra para reducir el volumen a 200 g como máximo y proceder a continuación con los pasos siguientes.

▶ Dilución del producto celular inicial

Añada solución tampón: Peso de solución tampón a añadir = peso del producto celular inicial × 2

▶ Centrifugado

Centrifugue a 200×g, sin freno, 15 minutos, a temperatura ambiente (TA: +19 °C a +25 °C [+66 °F a +77 °F]).

▶ Ajuste de volumen: volumen de marcaje 95 g (±5 g) (aplicación a escala normal) o 190 g (±5 g) (aplicación a gran escala)

1. Elimine el sobrenadante para ajustar la muestra mediante la siguiente ecuación: Peso del sobrenadante a eliminar = peso del producto celular diluido – volumen de marcaje
2. Resuspenda el precipitado celular.

▶ Incubación con CliniMACS CD34 Reagent

1. Añada 1 o 2 viales de CliniMACS CD34 Reagent (consulte la Tabla 6.1). Mezcle los contenidos suavemente.
2. Incube en un agitador orbital (25 rpm) durante 30 minutos a temperatura ambiente.

▶ Eliminación del exceso de reactivo

1. Llene la Cell Preparation Bag con solución tampón.
2. Centrifugue (200×g, sin freno, 15 minutos, TA).
3. Elimine la mayor cantidad posible de sobrenadante. **Nota:** Elimine al menos 500 g de sobrenadante. Si el sobrenadante eliminado es inferior a estos valores, se recomienda realizar un total de tres lavados (en lugar de solo dos). De lo contrario, la eliminación del reactivo no unido puede ser insuficiente.
4. Resuspenda el precipitado celular.
5 Llene la Cell Preparation Bag con solución tampón.
6. Centrifugue (200×g, sin freno, 15 minutos, TA).
7. Elimine la mayor cantidad posible de sobrenadante.
8. Resuspenda el precipitado celular.
9. Ajuste el volumen de carga de la muestra a 150 g (aplicación a escala normal) o 275 g (aplicación a gran escala).

Nota: Extraiga una muestra después de eliminar el exceso de reactivo para el análisis posterior (opcional).

6.1.2 PASO 2: Selección del programa de separación

▶ Encender el CliniMACS Plus Instrument

▶ Selección del programa de separación CD34 SELECTION 1/2

(utilizando 1 vial: CD34 SELECTION 1, o utilizando 2 viales: CD34 SELECTION 2)

Consulte la sección 7.2.2 en la página 132.

6.1.3 PASO 3: Instalación de sets de tubos CliniMACS

- **CliniMACS Tubing Set y CliniMACS Tubing Set LS**

Consulte la sección 7.3.1 en la página 152.

6.1.4 PASO 4: Separación CliniMACS Plus

- **Procedimiento de separación**
- **Desconexión de las bolsas y registro del código del proceso**
- **Descarga del set de tubos y apagado**
- **Análisis celular**

Consulte la sección 7.4.1 en la página 187.

6.2 Enriquecimiento de células CD14 positivas

El CliniMACS Plus CD14 System con el CliniMACS Plus Instrument, el CliniMACS CD14 Reagent, el CliniMACS Tubing Set y el CliniMACS PBS/EDTA Buffer están destinados al enriquecimiento *in vitro* de células humanas CD14 positivas de poblaciones celulares hematológicas heterogéneas.

6.2.1 PASO 1: Preparación y marcaje magnético de las células

Primeras acciones necesarias

Capacidad de la aplicación

Hasta 4×10^9 células CD14 positivas de hasta 20×10^9 células totales (WBC)

⚠ ATENCIÓN

Riesgo de rendimiento insuficiente de separación de células marcadas. Si se superan las especificaciones de la aplicación, hay riesgo de que el marcaje específico sea insuficiente. Utilice la cantidad necesaria de células y de reactivo según lo descrito para la aplicación correspondiente.

Materiales CliniMACS necesarios

Material	Número de catálogo	Cantidad
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS CD14 Reagent	272-01	1 vial
CliniMACS Tubing Set	161-01	1 set de tubos
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	3 bolsas de 1000 mL[1]

1 Consulte la Tabla 6.3 y la Tabla 6.4. Antes del uso, enriquezca el CliniMACS PBS/EDTA Buffer con HSA hasta una concentración final del 0,5% (p/v).

Tabla 6.2: Materiales CliniMACS necesarios para enriquecer células CD14 positivas

Materiales adicionales necesarios

- **Cell Preparation Bag:**
  una bolsa de transferencia de 600 mL, apta para la centrifugación, así como un Sampling Site Coupler y un set de transferencia de plasma, para el uso durante la preparación celular
- **Plasma Waste Bag y Wash Waste Bag:**
  dos bolsas de transferencia de 600 mL, aptas para el centrifugado
- **Cell Collection Bag:**
  una bolsa de transferencia de 150 mL o una de 600 mL en combinación con un Luer/Spike Interconnector para conectar la Cell Collection Bag al set de tubos (consulte la Tabla 6.4).
- **Si fuera necesario sustituir la Negative Fraction Bag y la Buffer Waste Bag:**
  dos bolsas de transferencia de 1000 mL en combinación con dos Luer/Spike Interconnector para conectar las bolsas al set de tubos (consulte la Tabla 6.4).
- **Si fuera necesario más de un litro de solución tampón para la separación:**
  un set de transferencia de plasma para conectar las bolsas de solución tampón (consulte la Tabla 6.4)
- un pre-filtro
- pinzas de cierre
- jeringas adecuadas (diferentes tamaños) y agujas hipodérmicas de calibre 20

Resumen de los materiales necesarios

Preparación celular	
Células totales (WBC)	$\leq 20\times10^9$
Células marcadas	$\leq 4\times10^9$
Número de viales de reactivo	1–2
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 mL
Set de transferencia de plasma	1

Tabla 6.3: Material necesario para la preparación de células CD14 positivas

Separación		
Células marcadas	≤2×10^9	>2–4×10^9
Negative Fraction Bag	–	Sustituya las bolsas originales del set de tubos por bolsas de transferencia de 1000 mL
Buffer Waste Bag	–	
Priming Waste Bag	–	–
Cell Collection Bag	150 mL	600 mL
Luer/Spike Interconnector	1	3
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 mL	2000 mL
Set de transferencia de plasma	–	1

Tabla 6.4: Material necesario para enriquecer células CD14 positivas

▶ Preparación de las bolsas

Determine el peso de la Cell Collection Bag y de la Cell Preparation Bag vacías como se describe en la sección 7.1.1 en la página 119.

Marcaje magnético de las células

Para una descripción detallada de los pasos siguientes, consulte la sección 7.1 «PASO 1: Preparación y marcaje magnético de las células» en la página 119.

▶ Análisis del producto celular inicial

▶ Transferencia del producto celular inicial a la Cell Preparation Bag

▶ Dilución del producto celular inicial

Añada solución tampón: Peso de solución tampón a añadir = 600 g – peso del producto celular inicial

▶ Centrifugado

Centrifugue a 300×g, sin freno, 15 minutos, a temperatura ambiente (TA: +19 °C a +25 °C [+66 °F a +77 °F]).

▶ Ajuste de volumen: volumen de marcaje 50 g (±5 g)

1. Elimine el sobrenadante para ajustar la muestra mediante la siguiente ecuación: Peso del sobrenadante a eliminar = peso del producto celular inicial diluido – volumen de marcaje
2. Resuspenda el precipitado celular.

▶ Incubación con CliniMACS CD14 Reagent

1. Añada 1 vial de CliniMACS CD14 Reagent. Mezcle los contenidos suavemente.
2. Incube en un agitador orbital (25 rpm) durante 15 minutos a temperatura ambiente.

▶ **Eliminación del exceso de reactivo**

1. Llene la Cell Preparation Bag con solución tampón.
2. Centrifugue (300×g, sin freno, 15 minutos, TA).
3. Elimine la mayor cantidad posible de sobrenadante. **Nota:** Elimine al menos 500 g de sobrenadante. Si el sobrenadante eliminado es inferior a 500 g, se recomienda realizar un total de dos lavados (en lugar de solo uno). De lo contrario, la eliminación del reactivo no unido puede ser insuficiente.
4. Resuspenda el precipitado celular.
5. Ajuste el volumen de carga de la muestra a 100 g.

Nota: Extraiga una muestra después de eliminar el exceso de reactivo para el análisis posterior (opcional).

6.2.2 PASO 2: Selección del programa de separación

▶ **Encender el CliniMACS Plus Instrument**

▶ **Selección del programa de separación ENRICHMENT 1.1.**

▶ **Introducción de los parámetros de la muestra**

Consulte la sección 7.2.3 en la página 134.

6.2.3 PASO 3: Instalación de sets de tubos CliniMACS

▶ **CliniMACS Tubing Set y CliniMACS Tubing Set LS**

Consulte la sección 7.3.1 en la página 152.

6.2.4 PASO 4: Separación CliniMACS Plus

▶ **Procedimiento de separación**

▶ **Desconexión de las bolsas y registro del código del proceso**

▶ **Descarga del set de tubos y apagado**

▶ **Análisis celular**

Consulte la sección 7.4.2 en la página 191.

6.3 Enriquecimiento/depleción con el CliniMACS Anti-Biotin Reagent

El CliniMACS Plus Anti-Biotin System con el CliniMACS Plus Instrument, el CliniMACS Anti-Biotin Reagent, el CliniMACS Tubing Set o el CliniMACS Tubing Set LS y el CliniMACS PBS/EDTA Buffer están destinados al enriquecimiento o a la depleción *in vitro* de células humanas previamente marcadas con anticuerpos biotinilados.

6.3.1 PASO 1: Preparación y marcaje magnético de las células

Primeras acciones necesarias

Capacidad de la aplicación

- **Enriquecimiento:** hasta 40×10^9 células totales (WBC)
- **Depleción:**
  Aplicación a escala normal: hasta 40×10^9 células totales (WBC)
  Aplicación a gran escala: más de 40 y hasta 80×10^9 células totales (WBC)

⚠ ATENCIÓN

Riesgo de rendimiento insuficiente de separación de células marcadas. Si se superan las especificaciones de la aplicación, hay riesgo de que el marcaje específico sea insuficiente. Utilice la cantidad necesaria de células y de reactivo según lo descrito para la aplicación correspondiente.

Materiales CliniMACS necesarios

Material	Número de catálogo	Cantidad	Programa de separación
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1	–
CliniMACS Anti-Biotin Reagent	173-01	• 1 vial (escala normal) • 2 viales (gran escala)	–
CliniMACS Tubing Set	161-01	1 set de tubos	ENRICHMENT 1.1
CliniMACS Tubing Set LS	162-01	1 set de tubos	DEPLETION 2.1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	• 3 bolsas de 1000[1] mL (escala normal) • 4 bolsas de 1000[1] mL (gran escala)	–

1 La cantidad de solución tampón varía en función del programa de separación seleccionado y el número de células marcadas (consulte Tabla 6.6 a Tabla 6.9). Antes del uso, enriquezca el CliniMACS PBS/EDTA Buffer con HSA hasta una concentración final del 0,5% (p/v).

Tabla 6.5: Materiales CliniMACS necesarios para el enriquecimiento/la depleción con el CliniMACS Anti-Biotin Reagent

Materiales adicionales necesarios

- **Cell Preparation Bag:**
  una bolsa de transferencia de 600 mL, aptas para la centrifugación, así como un Sampling Site Coupler y dos sets de transferencia de plasma, para el uso durante la preparación celular
- **Plasma Waste Bag y Wash Waste Bag:**
  dos bolsas de transferencia de 600 mL, aptas para el centrifugado
- **Cell Collection Bag:**
  una bolsa de transferencia de 600 mL o una de 1000 mL en combinación con un Luer/Spike Interconnector para conectar la Cell Collection Bag al set de tubos (consulte la Tabla 6.7 y la Tabla 6.9)
- **Si fuera necesario sustituir la Negative Fraction Bag, la Buffer Waste Bag o la Priming Waste Bag:**
  dos o tres bolsas de transferencia de 1000 mL en combinación con dos Luer/Spike Interconnector para conectar las bolsas al set de tubos (consulte la Tabla 6.7 y la Tabla 6.9). Sustituya el Priming Waste Bag utilizando el conector de tubos estéril.
- **Si fuera necesario más de un litro de solución tampón para la separación:**
  uno o dos sets de transferencia de plasma para conectar las bolsas de solución tampón (consulte la Tabla 6.7 y la Tabla 6.9)
- un pre-filtro
- pinzas de cierre
- jeringas adecuadas (diferentes tamaños) y agujas hipodérmicas de calibre 20
- albúmina de suero humana (HSA) para añadirla al CliniMACS PBS/EDTA Buffer hasta una concentración final del 0,5% (p/v)
- tubos de muestras
- anticuerpo o ligando individual biotinilado específico de la célula

Resumen de materiales

Preparación celular (ENRICHMENT 1.1)	
Células totales (WBC)	$\leq 40\times10^{9}$
Número de viales de reactivo	1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	2000 mL
Set de transferencia de plasma	2

Tabla 6.6: Materiales necesarios para la preparación celular (ENRICHMENT 1.1)

Separación (ENRICHMENT 1.1)		
Células marcadas	≤2×10^9	>2–5×10^9
Negative Fraction Bag	–	Sustituya las bolsas originales del set de tubos por bolsas de transferencia de 1000 mL
Buffer Waste Bag	–	
Priming Waste Bag	–	–
Cell Collection Bag	600 mL	600 mL
Luer/Spike Interconnector	1	3
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 mL	2000 mL
Set de transferencia de plasma	–	1

Tabla 6.7: Materiales necesarios para el enriquecimiento (ENRICHMENT 1.1)

Preparación celular (DEPLETION 2.1)		
Células totales (WBC)	≤40×10^9	>40–80×10^9
Número de viales de reactivo	1	2
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	2000 mL	2000 mL
Set de transferencia de plasma	2	2

Tabla 6.8: Materiales necesarios para la preparación celular (DEPLETION 2.1)

Separación (DEPLETION 2.1)			
Células marcadas	<5×10^9	5–13×10^9	>13–20×10^9
Negative Fraction Bag	–	Sustituya las bolsas originales del set de tubos por bolsas de transferencia de 1000 mL	Sustituya las bolsas originales del set de tubos por bolsas de transferencia de 1000 mL
Buffer Waste Bag	–		
Priming Waste Bag	–	–	
Cell Collection Bag	600 mL	1000 mL	1000 mL
Luer/Spike Interconnector	1	3	4
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 mL	2000 mL	3000 mL
Set de transferencia de plasma	–	1	2

Tabla 6.9: Materiales necesarios para la depleción (DEPLETION 2.1)

▶ Preparación de las bolsas

Determine el peso de la Cell Collection Bag y de la Cell Preparation Bag vacías como se describe en la sección 7.1.1 en la página 119.

Marcaje magnético de las células

Para una descripción detallada de los pasos siguientes, consulte la sección 7.1 «PASO 1: Preparación y marcaje magnético de las células» en la página 119.

▶ Análisis del producto celular inicial

▶ Transferencia del producto celular inicial a la Cell Preparation Bag

Dilución del producto celular inicial

Añada solución tampón: Peso de solución tampón a añadir = peso del producto celular inicial × 2

Centrifugado

1. Centrifugue a 300×g, sin freno, 15 minutos, a temperatura ambiente (TA: +19 °C a +25 °C [+66 °F a +77 °F]).
2. Elimine el sobrenadante a fin de ajustar el volumen para el marcaje del anticuerpo primario según las recomendaciones del fabricante del anticuerpo primario.
3. Resuspenda el precipitado celular.

Marcaje de las células: incubación con el anticuerpo primario

Observe las instrucciones de uso proporcionadas por el fabricante del anticuerpo primario.

Eliminación del exceso de conjugado (1er lavado)

1. Añada solución tampón: Peso de solución tampón a añadir = 600 g – peso del producto celular
2. Centrifugue a 300×g, sin freno, 15 minutos, a temperatura ambiente (TA: +19 °C a +25 °C [+66 °F a +77 °F]).

Ajuste de volumen: volumen de marcaje 95 g (±5 g) (aplicación a escala normal) o 190 g (±5 g) (aplicación a gran escala)

1. Elimine el sobrenadante para ajustar la muestra mediante la siguiente ecuación: Peso de sobrenadante a eliminar = peso del producto celular diluido - volumen de marcaje
   Nota: Elimine al menos 500 g de sobrenadante. Si el sobrenadante eliminado es inferior a 500 g, se recomienda realizar un total de dos lavados (en lugar de solo uno). De lo contrario, la eliminación del reactivo no unido puede ser insuficiente.
2. Resuspenda el precipitado celular.

Marcaje magnético de las células: incubación con CliniMACS Anti-Biotin Reagent

1. Añada 1 o 2 viales de CliniMACS Anti-Biotin Reagent (consulte la Tabla 6.6 y la Tabla 6.8). Mezcle los contenidos suavemente.
2. Incube en un agitador orbital (25 rpm) durante 30 minutos a temperatura ambiente.

- **Eliminación del exceso de reactivo (2.° lavado)**

1. Llene la Cell Preparation Bag con solución tampón.
2. Centrifugue (300×g, sin freno, 15 minutos, TA).
3. Elimine la mayor cantidad posible de sobrenadante. **Nota:** Elimine al menos 500 g de sobrenadante. Si el sobrenadante eliminado es inferior al valor arriba indicado, se recomienda realizar un total de dos lavados (en lugar de solo uno). De lo contrario, la eliminación del reactivo no unido puede ser insuficiente.
4. Resuspenda el precipitado celular.
5. Ajuste el volumen de carga de la muestra a 100 g (aplicación a escala normal) o 200 g (aplicación a gran escala).

Nota: Extraiga una muestra después de eliminar el exceso de reactivo para el análisis posterior (opcional).

6.3.2 PASO 2: Selección del programa de separación

- **Encender el CliniMACS Plus Instrument**
- **Selección del programa de separación ENRICHMENT 1.1. o DEPLETION 2.1**
- **Introducción de los parámetros de la muestra**

Consulte la sección 7.2.3 en la página 134 o 7.2.5 en la página 141.

6.3.3 PASO 3: Instalación de sets de tubos CliniMACS

- **CliniMACS Tubing Set y CliniMACS Tubing Set LS**

Consulte la sección 7.3.1 en la página 152.

6.3.4 PASO 4: Separación CliniMACS Plus

- **Procedimiento de separación**
- **Desconexión de las bolsas y registro del código del proceso**
- **Descarga del set de tubos y apagado**
- **Análisis celular**

Consulte la sección 7.4.2 en la página 191 y 7.4.4 en la página 199.

6.4 Enriquecimiento de células CD56 positivas

El CliniMACS Plus CD56 System con el CliniMACS Plus Instrument, el CliniMACS CD56 Reagent, el CliniMACS Tubing Set y el CliniMACS PBS/EDTA Buffer están destinados al enriquecimiento *in vitro* de células humanas CD56 positivas de poblaciones celulares hematológicas heterogéneas.

6.4.1 PASO 1: Preparación y marcaje magnético de las células

Primeras acciones necesarias

Capacidad de la aplicación

Hasta 5×10^9 células CD56 positivas de hasta 40×10^9 células totales (WBC)

⚠ ATENCIÓN

Riesgo de rendimiento insuficiente de separación de células marcadas. Si se superan las especificaciones de la aplicación, hay riesgo de que el marcaje específico sea insuficiente. Utilice la cantidad necesaria de células y de reactivo según lo descrito para la aplicación correspondiente.

Materiales CliniMACS necesarios

Material	Número de catálogo	Cantidad
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS CD56 Reagent	271-01	1 vial
CliniMACS Tubing Set	161-01	1 set de tubos
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	3 bolsas de 1000 mL[1]

1 Consulte la Tabla 6.11 y la Tabla 6.12. Antes del uso, enriquezca el CliniMACS PBS/EDTA Buffer con HSA hasta una concentración final del 0,5% (p/v).

Tabla 6.10: Materiales CliniMACS necesarios para enriquecer células CD56 positivas

Materiales adicionales necesarios

- **Cell Preparation Bag:**
  una bolsa de transferencia de 600 mL, apta para la centrifugación, así como un Sampling Site Coupler y un set de transferencia de plasma, para el uso durante la preparación celular
- **Plasma Waste Bag y Wash Waste Bag:**
  dos bolsas de transferencia de 600 mL, aptas para el centrifugado
- **Cell Collection Bag:**
  una bolsa de transferencia de 150 mL o de 600 mL en combinación con un Luer/Spike Interconnector para conectar la Cell Collection Bag al set de tubos (consulte la Tabla 6.12).

- **Si fuera necesario sustituir la Negative Fraction Bag y la Buffer Waste Bag:** dos bolsas de transferencia de 1000 mL en combinación con dos Luer/Spike Interconnector para conectar las bolsas al set de tubos (consulte la Tabla 6.12).
- **Si fuera necesario más de un litro de solución tampón para la separación:** un set de transferencia de plasma para conectar las bolsas de solución tampón (consulte la Tabla 6.12)
- un pre-filtro
- pinzas de cierre
- jeringas (diferentes tamaños) y agujas hipodérmicas de calibre 20
- albúmina de suero humana (HSA) para añadirla al CliniMACS PBS/EDTA Buffer hasta una concentración final del 0,5% (p/v)
- tubos de muestras

Resumen de los materiales necesarios

Preparación celular	
Células totales (WBC)	≤40×10^9
Número de viales de reactivo	1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 mL
Set de transferencia de plasma	1

Tabla 6.11: Materiales necesarios para la preparación de células CD56 positivas

Separación		
Células marcadas	≤2×10^9	>2–5×10^9
Negative Fraction Bag	–	Sustituya las bolsas originales del set de tubos por bolsas de transferencia de 1000 mL
Buffer Waste Bag	–	
Priming Waste Bag	–	–
Cell Collection Bag	150 mL	600 mL
Luer/Spike Interconnector	1	3
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 mL	2000 mL
Set de transferencia de plasma	–	1

Tabla 6.12: Materiales necesarios para enriquecer células CD56 positivas

▶ Preparación de las bolsas

Determine el peso de la Cell Collection Bag y de la Cell Preparation Bag vacías como se describe en la sección 7.1.1 en la página 119.

Marcaje magnético de las células

Para una descripción detallada de los pasos siguientes, consulte la sección 7.1 «PASO 1: Preparación y marcaje magnético de las células» en la página 119.

▶ Análisis del producto celular inicial

▶ Transferencia del producto celular inicial a la Cell Preparation Bag

▶ Dilución del producto celular inicial

Añada solución tampón: Peso de solución tampón a añadir = 600 g – peso del producto celular inicial

▶ Centrifugado

Centrifugue a 200×g, sin freno, 15 minutos, a temperatura ambiente (TA: +19 °C a +25 °C [+66 °F a +77 °F]).

▶ Ajuste de volumen: volumen de marcaje 95 g (±5 g)

1. Elimine completamente el sobrenadante, prestando atención de no resuspender el precipitado celular.
2. Resuspenda el precipitado celular con cuidado tras eliminar el sobrenadante.
3. Ajuste el peso de la Cell Preparation Bag (CPB) añadiendo solución tampón y utilizando la siguiente ecuación: Peso objetivo de la CPB llena = 95 g + peso de la CPB vacía
4. Resuspenda las células.

▶ Incubación con CliniMACS CD56 Reagent

1. Añada 1 vial de CliniMACS CD56 Reagent. Mezcle los contenidos suavemente.
2. Incube en un agitador orbital (25 rpm) durante 30 minutos a temperatura ambiente.

▶ Eliminación del exceso de reactivo

1. Llene la Cell Preparation Bag con solución tampón.
2. Centrifugue (300×g, sin freno, 15 minutos, TA).
3. Elimine la mayor cantidad posible de sobrenadante. **Nota:** Elimine al menos 500 g de sobrenadante. Si el sobrenadante eliminado es inferior a 500 g, se recomienda realizar un total de dos lavados (en lugar de solo uno). De lo contrario, la eliminación del reactivo no unido puede ser insuficiente.
4. Resuspenda el precipitado celular con cuidado tras eliminar el sobrenadante.

5. Ajuste el volumen de carga de la muestra a 150 g.

Nota: Extraiga una muestra después de eliminar el exceso de reactivo para el análisis posterior (opcional).

6.4.2 PASO 2: Selección del programa de separación

- **Encender el CliniMACS Plus Instrument**
- **Selección del programa de separación ENRICHMENT 1.1.**
- **Introducción de los parámetros de la muestra**

Consulte la sección 7.2.3 en la página 134.

6.4.3 PASO 3: Instalación de sets de tubos CliniMACS

- **CliniMACS Tubing Set y CliniMACS Tubing Set LS**

Consulte la sección 7.3.1 en la página 152.

6.4.4 PASO 4: Separación CliniMACS Plus

- **Procedimiento de separación**
- **Desconexión de las bolsas y registro del código del proceso**
- **Descarga del set de tubos y apagado**
- **Análisis celular**

Consulte la sección 7.4.2 en la página 191.

6.5 Depleción de células CD3 positivas

El CliniMACS Plus CD3 System con el CliniMACS Plus Instrument, el CliniMACS CD3 Reagent, el CliniMACS Tubing Set LS o el CliniMACS Depletion Tubing Set y el CliniMACS PBS/EDTA Buffer están destinados a la depleción *in vitro* de células humanas CD3 positivas de poblaciones celulares hematológicas heterogéneas.

6.5.1 PASO 1: Preparación y marcaje magnético de las células

Primeras acciones necesarias

Capacidad de la aplicación

- Aplicación a escala normal: hasta 15×10^9 células CD3 positivas de hasta 40×10^9 células totales (WBC) utilizando el CliniMACS Tubing Set LS o el CliniMACS Depletion Tubing Set
- Aplicación a gran escala: más de 15×10^9 y hasta 20×10^9 células CD3 positivas de más de 40×10^9 y hasta 80×10^9 células totales (WBC) utilizando el CliniMACS Tubing Set LS, o más de 15×10^9 y hasta 30×10^9 células CD3 positivas de más de 40×10^9 y hasta 80×10^9 células totales (WBC) utilizando el CliniMACS Depletion Tubing Set

⚠ ATENCIÓN

Riesgo de rendimiento insuficiente de separación de células marcadas. Si se superan las especificaciones de la aplicación, hay riesgo de que el marcaje específico sea insuficiente. Utilice la cantidad necesaria de células y de reactivo según lo descrito para la aplicación correspondiente.

Materiales CliniMACS necesarios

Material	Número de catálogo	Cantidad	Programa de separación
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1	
CliniMACS CD3 Reagent	273-01	• 1 vial (escala normal) • 2 viales (gran escala)	
CliniMACS Tubing Set LS	162-01	1 set de tubos	DEPLETION 2.1
CliniMACS Depletion Tubing Set	261-01	1 set de tubos	DEPLETION 3.1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	Hasta 5 bolsas de 1000 mL[1]	

1 Consulte Tabla 6.14 a Tabla 6.16. Antes del uso, enriquezca el CliniMACS PBS/EDTA Buffer con HSA hasta una concentración final del 0,5% (p/v).

2 **Nota:** Para un número elevado de células marcadas se recomienda utilizar un CliniMACS Depletion Tubing Set, para ahorrar tiempo de procesamiento (p. ej., 20×10 células marcadas se procesarán en cinco horas utilizando el CliniMACS Tubing Set LS frente a dos horas utilizando un CliniMACS Depletion Tubing Set).

Tabla 6.13: Materiales CliniMACS necesarios para la depleción de células CD3 positivas

Materiales adicionales necesarios

- **Cell Preparation Bag:**
  una bolsa de transferencia de 600 mL, aptas para la centrifugación, así como un Sampling Site Coupler y dos sets de transferencia de plasma, para el uso durante la preparación celular
- **Plasma Waste Bag y Wash Waste Bag:**
  dos bolsas de transferencia de 600 mL, aptas para el centrifugado
- **Cell Collection Bag:**
  una a dos bolsas de transferencia de 600 mL en combinación con un Luer/Spike Interconnector para conectar la Cell Collection Bag al set de tubos

  Si se necesitan dos Cell Collection Bag para la separación, utilice un set de transferencia de plasma para conectar ambas bolsas. Una bolsa de transferencia de 600 mL ya está conectada al CliniMACS Depletion Tubing Set (consulte la Tabla 6.15 y la Tabla 6.16).
- **Si fuera necesario sustituir la Negative Fraction Bag, la Buffer Waste Bag o la Priming Waste Bag:**
  dos o tres bolsas de transferencia de 1000 mL en combinación con dos Luer/Spike Interconnector para conectar las bolsas al set de tubos (consulte la Tabla 6.15 y la Tabla 6.16)

  Sustituya el Priming Waste Bag utilizando el conector de tubos estéril.
- **Si fuera necesario más de un litro de solución tampón para la separación:**
  uno o dos sets de transferencia de plasma para conectar las bolsas de solución tampón (consulte la Tabla 6.15 y la Tabla 6.16)
- un pre-filtro
- pinzas de cierre
- jeringas (diferentes tamaños) y agujas hipodérmicas de calibre 20
- albúmina de suero humana (HSA) para añadirla al CliniMACS PBS/EDTA Buffer hasta una concentración final del 0,5% (p/v)
- inmunoglobulina G de grado clínico
- tubos de muestras

IMPORTANTE

Después de la introducción de los parámetros de la muestra (PASO 2), el software CliniMACS Plus calculará los volúmenes que se recogerán en la Reapplication Bag, la Cell Collection Bag, la Non-Target Cell Bag y la Buffer Waste Bag. Si el volumen de líquido calculado supera el volumen predeterminado de 500 mL, será necesario sustituir las bolsas.

Resumen de los materiales necesarios

Preparación celular		
Células totales (WBC)	≤40×10^9	>40–80×10^9
Células marcadas	≤15×10^9	>15–30×10^9
Número de viales de reactivo	1	2
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	2000 mL	2000 mL
Set de transferencia de plasma	2	2
Volumen de carga de la muestra	150 mL	250–300 mL

Tabla 6.14: Materiales necesarios para la preparación de células CD3 positivas

Separación (DEPLETION 2.1)			
Células marcadas	≤5×10^9	>5–13×10^9	>13–20×10^9
Negative Fraction Bag	–	Sustituya las bolsas originales del set de tubos por bolsas de transferencia de 1000 mL	Sustituya las bolsas originales del set de tubos por bolsas de transferencia de 1000 mL
Buffer Waste Bag	–		
Priming Waste Bag	–	–	
Cell Collection Bag	600 mL	1–2×600 mL	2×600 mL
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 mL	2000 mL	3000 mL
Luer/Spike Interconnector	1	3	3
Set de transferencia de plasma	–	1–2	3

Tabla 6.15: Materiales necesarios para la depleción de células CD3 positivas (DEPLETION 2.1)

Separación (DEPLETION 3.1)		
Células marcadas	≤29×10^9	>29–30×10^9
Non-Target Cell Bag	No es necesario sustituir la bolsa	
Buffer Waste Bag		
Reapplication Bag		
Cell Collection Bag	–	1×600 mL (adicionales)
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 mL	
Set de transferencia de plasma	–	1

Tabla 6.16: Materiales necesarios para la depleción de células CD3 positivas (DEPLETION 3.1)

Nota: Los materiales necesarios para la separación también se pueden determinar encendiendo el CliniMACS Plus Instrument, seleccionando el programa de separación que se desee utilizar (DEPLETION 2.1 para el CliniMACS Tubing Set LS y DEPLETION 3.1 para el CliniMACS Depletion Tubing Set) e introduciendo los parámetros de la muestra. El software CliniMACS Plus calculará los tamaños necesarios de las bolsas que se deben conectar al set de tubos y el peso necesario de la solución tampón.

▶ Preparación de las bolsas

Determine el peso de la Cell Collection Bag y de la Cell Preparation Bag vacías como se describe en la sección 7.1.1 en la página 119.

Marcaje magnético de las células

Para una descripción detallada de los pasos siguientes, consulte la sección 7.1 «PASO 1: Preparación y marcaje magnético de las células» en la página 119.

▶ Análisis del producto celular inicial

Determine el número de todas las células marcadas con CD3 (incluyendo uniones CD3 inespecíficas, no solo linfocitos T reales). Considere este número para las especificaciones de la aplicación y la introducción de parámetros de muestra (ver PASO 2).

▶ Transferencia del producto celular inicial a la Cell Preparation Bag

▶ Dilución del producto celular inicial

Añada solución tampón: Peso de solución tampón a añadir = 600 g – peso del producto celular inicial

▶ Centrifugado

Centrifugue a 200×g, sin freno, 15 minutos, a temperatura ambiente (TA: +19 °C a +25 °C [+66 °F a +77 °F]).

▶ Ajuste de volumen: volumen de marcaje 95 g (±5 g) (aplicación a escala normal) o 190 g (±5 g) (aplicación a gran escala)

1. Elimine completamente el sobrenadante, prestando atención de no resuspender el precipitado celular.
2. Resuspenda el precipitado celular con cuidado tras eliminar el sobrenadante.
3. Ajuste el peso de la Cell Preparation Bag (CPB) añadiendo solución tampón y utilizando la siguiente ecuación (considere el peso de la IgG): Peso objetivo de la CPB llena = volumen de marcaje – peso de la IgG + peso de la CPB vacía
4. Resuspenda el precipitado celular.

▶ Incubación con inmunoglobulina G de grado clínico

1. Añada IgG (1,5 mg/mL).
2. Incube en un agitador orbital (25 rpm) durante 5 minutos a temperatura ambiente.

▶ Incubación con CliniMACS CD3 Reagent

1. Añada 1 o 2 viales de CliniMACS CD3 Reagent (consulte la Tabla 6.14). Mezcle los contenidos suavemente.
2. Incube en un agitador orbital (25 rpm) durante 30 minutos a temperatura ambiente.

▶ **Eliminación del exceso de reactivo**

1. Llene la Cell Preparation Bag con solución tampón.
2. Centrifugue (300×g, sin freno, 15 minutos, TA).
3. Elimine la mayor cantidad posible de sobrenadante. **Nota:** Elimine al menos 500 g de sobrenadante. Si el sobrenadante eliminado es inferior a 500 g, se recomienda realizar un total de dos lavados (en lugar de solo uno). De lo contrario, la eliminación del reactivo no unido puede ser insuficiente.
4. Resuspenda el precipitado celular.
5. Ajuste el volumen de carga de la muestra a 150 g (aplicación a escala normal) o 250–300 g (aplicación a gran escala).

6.5.2 PASO 2: Selección del programa de separación

▶ **Encender el CliniMACS Plus Instrument**

▶ **Selección del programa de separación DEPLETION 2.1. o DEPLETION 3.1**
(si utiliza el CliniMACS Tubing Set LS o el CliniMACS Depletion Tubing Set, respectivamente)

▶ **Introducción de los parámetros de la muestra**
(de acuerdo con el análisis del producto celular inicial [ver PASO 1])

Consulte la sección 7.2.5 en la página 141 o 7.2.6 en la página 146.

6.5.3 PASO 3: Instalación de sets de tubos CliniMACS

▶ **CliniMACS Tubing Set y CliniMACS Tubing Set LS**
o bien
▶ **CliniMACS Depletion Tubing Set**

Consulte la sección 7.3.1 en la página 152 o 7.3.3 en la página 172.

6.5.4 PASO 4: Separación CliniMACS Plus

▶ **Procedimiento de separación**

▶ **Desconexión de las bolsas y registro del código del proceso**

▶ **Descarga del set de tubos y apagado**

▶ **Análisis celular**

Consulte la sección 7.4.4 en la página 199 y 7.4.5 en la página 203.

6.6 Depleción de células CD19 positivas

El CliniMACS Plus CD19 System con el CliniMACS Plus Instrument, el CliniMACS CD19 Reagent, el CliniMACS Tubing Set LS y el CliniMACS PBS/EDTA Buffer están destinados a la depleción *in vitro* de células humanas CD19 positivas de poblaciones celulares hematológicas heterogéneas.

6.6.1 PASO 1: Preparación y marcaje magnético de las células

Primeras acciones necesarias

Capacidad de la aplicación

Hasta 5×10^9 células CD19 positivas de hasta 40×10^9 células totales (WBC)

⚠ ATENCIÓN

Riesgo de rendimiento insuficiente de separación de células marcadas. Si se superan las especificaciones de la aplicación, hay riesgo de que el marcaje específico sea insuficiente. Utilice la cantidad necesaria de células y de reactivo según lo descrito para la aplicación correspondiente.

Materiales CliniMACS necesarios

Material	Número de catálogo	Cantidad
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS CD19 Reagent	179-01	1 vial
CliniMACS Tubing Set LS	162-01	1 set de tubos
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	2 bolsas de 1000 mL[1]

1 Antes del uso, enriquezca el CliniMACS PBS/EDTA Buffer con HSA hasta una concentración final del 0,5% (p/v).

Tabla 6.17: Materiales CliniMACS necesarios para la depleción de células CD19 positivas

Materiales adicionales necesarios

- **Cell Preparation Bag:**
  una bolsa de transferencia de 600 mL, aptas para la centrifugación, así como un Sampling Site Coupler y un set de transferencia de plasma, para el uso durante la preparación celular
- **Plasma Waste Bag y Wash Waste Bag:**
  dos bolsas de transferencia de 600 mL, aptas para el centrifugado
- **Cell Collection Bag:**
  una bolsa de transferencia de 600 mL en combinación con un Luer/Spike Interconnector para conectar la Cell Collection Bag al set de tubos
- un pre-filtro

- pinzas de cierre
- jeringas (diferentes tamaños) y agujas hipodérmicas de calibre 20
- albúmina de suero humana (HSA) para añadirla al CliniMACS PBS/EDTA Buffer hasta una concentración final del 0,5% (p/v)
- tubos de muestras

▶ Preparación de las bolsas

Determine el peso de la Cell Collection Bag y de la Cell Preparation Bag vacías como se describe en la sección 7.1.1 en la página 119.

Marcaje magnético de las células

Para una descripción detallada de los pasos siguientes, consulte la sección 7.1 «PASO 1: Preparación y marcaje magnético de las células» en la página 119.

▶ Análisis del producto celular inicial

▶ Transferencia del producto celular inicial a la Cell Preparation Bag

▶ Dilución del producto celular inicial

Añada solución tampón: Peso de solución tampón a añadir = 600 g – peso del producto celular inicial

▶ Centrifugado

Centrifugue a 200×g, sin freno, 15 minutos, a temperatura ambiente (TA: +19 °C a +25 °C [+66 °F a +77 °F]).

▶ Ajuste de volumen: volumen de marcaje 95 g (±5 g)

1. Elimine completamente el sobrenadante, prestando atención de no resuspender el precipitado celular.
2. Resuspenda el precipitado celular con cuidado tras eliminar el sobrenadante.
3. Ajuste el peso de la Cell Preparation Bag (CPB) añadiendo solución tampón y utilizando la siguiente ecuación: Peso objetivo de la CPB llena = 95 g + peso de la CPB vacía
4. Resuspenda el precipitado celular.

▶ Incubación con CliniMACS CD19 Reagent

1. Añada 1 vial de CliniMACS CD19 Reagent. Mezcle los contenidos suavemente.
2. Incube en un agitador orbital (25 rpm) durante 30 minutos a temperatura ambiente.

▶ **Eliminación del exceso de reactivo**

1. Llene la Cell Preparation Bag con solución tampón.
2. Centrifugue (300×g, sin freno, 15 minutos, TA).
3. Elimine la mayor cantidad posible de sobrenadante. **Nota:** Elimine al menos 500 g de sobrenadante. Si el sobrenadante eliminado es inferior a 500 g, se recomienda realizar un total de dos lavados (en lugar de solo uno). De lo contrario, la eliminación del reactivo no unido puede ser insuficiente.
4. Resuspenda el precipitado celular.
5. Ajuste el volumen de carga de la muestra a 100 g.

6.6.2 PASO 2: Selección del programa de separación

▶ **Encender el CliniMACS Plus Instrument**

▶ **Selección del programa de separación DEPLETION 2.1.**

▶ **Introducción de los parámetros de la muestra**

Consulte la sección 7.2.5 en la página 141.

6.6.3 PASO 3: Instalación de sets de tubos CliniMACS

▶ **CliniMACS Tubing Set y CliniMACS Tubing Set LS**

Consulte la sección 7.3.1 en la página 152.

6.6.4 PASO 4: Separación CliniMACS Plus

▶ **Procedimiento de separación**

▶ **Desconexión de las bolsas y registro del código del proceso**

▶ **Descarga del set de tubos y apagado**

▶ **Análisis celular**

Consulte la sección 7.4.4 en la página 199.

6.7 Depleción de células CD3 positivas y CD19 positivas

El CliniMACS Plus CD3/CD19 System con el CliniMACS Plus Instrument, el CliniMACS CD3 Reagent, el CliniMACS CD19 Reagent, el CliniMACS Depletion Tubing Set y el CliniMACS PBS/EDTA Buffer están destinados a la depleción simultánea *in vitro* de células CD3 positivas y CD19 positivas humanas de poblaciones celulares hematológicas heterogéneas.

6.7.1 PASO 1: Preparación y marcaje magnético de las células

Primeras acciones necesarias

Capacidad de la aplicación

Hasta 15×10^9 células CD3 positivas y hasta 5×10^9 células CD19 positivas de hasta 40×10^9 células totales (WBC)

⚠ ATENCIÓN

Riesgo de rendimiento insuficiente de separación de células marcadas. Si se superan las especificaciones de la aplicación, hay riesgo de que el marcaje específico sea insuficiente. Utilice la cantidad necesaria de células y de reactivo según lo descrito para la aplicación correspondiente.

Materiales CliniMACS necesarios

Material	Número de catálogo	Cantidad
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS CD3 Reagent	273-01	1 vial
CliniMACS CD19 Reagent	179-01	1 vial
CliniMACS Depletion Tubing Set	261-01	1 set de tubos
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	4 bolsas de 1000 mL[1]

1 Antes del uso, enriquezca el CliniMACS PBS/EDTA Buffer con HSA hasta una concentración final del 0,5% (p/v).

Tabla 6.18: Materiales CliniMACS necesarios para la depleción de células CD3 positivas y CD19 positivas

Materiales adicionales necesarios

- **Cell Preparation Bag:**
  una bolsa de transferencia de 600 mL, aptas para la centrifugación, así como un Sampling Site Coupler y dos sets de transferencia de plasma, para el uso durante la preparación celular
- **Plasma Waste Bag y Wash Waste Bag:**
  dos bolsas de transferencia de 600 mL, aptas para el centrifugado
- **Cell Collection Bag:**
  una a dos bolsas de transferencia de 600 mL en combinación con un Luer/Spike Interconnector para conectar la Cell Collection Bag al set de tubos
- un pre-filtro
- pinzas de cierre
- jeringas (diferentes tamaños) y agujas hipodérmicas de calibre 20
- albúmina de suero humana (HSA) para añadirla al CliniMACS PBS/EDTA Buffer hasta una concentración final del 0,5% (p/v)
- inmunoglobulina G de grado clínico
- tubos de muestras

IMPORTANTE
Después de la introducción de los parámetros de la muestra (PASO 2), el software CliniMACS Plus calculará los volúmenes que se recogerán en la Reapplication Bag, la Cell Collection Bag, la Non-Target Cell Bag y la Buffer Waste Bag. Si el volumen de líquido calculado supera el volumen predeterminado de 500 mL, será necesario sustituir las bolsas correspondientes.

▶ Preparación de las bolsas

Determine el peso de la Cell Collection Bag y de la Cell Preparation Bag vacías como se describe en la sección 7.1.1 en la página 119.

Marcaje magnético de las células

Para una descripción detallada de los pasos siguientes, consulte la sección 7.1 «PASO 1: Preparación y marcaje magnético de las células» en la página 119.

▶ Análisis del producto celular inicial

Determine el número de todas las células marcadas con CD3 y CD19 (incluyendo uniones CD3 y CD19 inespecíficas, no solo linfocitos B y T reales). Considere este número para las especificaciones de la aplicación y la introducción de parámetros de muestra (ver PASO 2).

▶ Transferencia del producto celular inicial a la Cell Preparation Bag

Dilución del producto celular inicial

Añada solución tampón: Peso de solución tampón a añadir = 600 g – peso del producto celular inicial

Centrifugado

Centrifugue a 200×g, sin freno, 15 minutos, a temperatura ambiente (TA: +19 °C a +25 °C [+66 °F a +77 °F]).

Ajuste de volumen: volumen de marcaje 87,5 g (±5 g)

1. Elimine completamente el sobrenadante, prestando atención de no resuspender el precipitado celular.
2. Resuspenda el precipitado celular con cuidado tras eliminar el sobrenadante.
3. Ajuste el peso de la Cell Preparation Bag (CPB) añadiendo solución tampón y utilizando la siguiente ecuación (considere el peso de la IgG): Peso objetivo de la CPB llena = 87,5g – peso de la IgG + peso de la CPB vacía
4. Resuspenda el precipitado celular.

Incubación con inmunoglobulina G de grado clínico

1. Añada IgG (1,5 mg/mL).
2. Incube en un agitador orbital (25 rpm) durante 5 minutos a temperatura ambiente.

Incubación con CliniMACS CD3 Reagent y CliniMACS CD19 Reagent

1. Añada 1 vial de CliniMACS CD3 Reagent y 1 vial de CliniMACS CD19 Reagent. Mezcle los contenidos suavemente.
2. Incube en un agitador orbital (25 rpm) durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Eliminación del exceso de reactivo

1. Llene la Cell Preparation Bag con solución tampón.
2. Centrifugue (300×g, sin freno, 15 minutos, TA).
3. Elimine la mayor cantidad posible de sobrenadante. **Nota:** Elimine al menos 500 g de sobrenadante. Si el sobrenadante eliminado es inferior a 500 g, se recomienda realizar un total de dos lavados (en lugar de solo uno). De lo contrario, la eliminación del reactivo no unido puede ser insuficiente.
4. Resuspenda el precipitado celular.
5. Ajuste el volumen de carga de la muestra a 150 g.

6.7.2 PASO 2: Selección del programa de separación

- **Encender el CliniMACS Plus Instrument**
- **Selección del programa de separación DEPLETION 3.1.**
- **Introducción de los parámetros de la muestra**
  (de acuerdo con el análisis del producto celular inicial [ver PASO 1])

Consulte la sección 7.2.6 en la página 146.

6.7.3 PASO 3: Instalación de sets de tubos CliniMACS

- **CliniMACS Depletion Tubing Set**

Consulte la sección 7.3.3 en la página 172.

6.7.4 PASO 4: Separación CliniMACS Plus

- **Procedimiento de separación**
- **Desconexión de las bolsas y registro del código del proceso**
- **Descarga del set de tubos y apagado**
- **Análisis celular**

Consulte la sección 7.4.5 en la página 203.

6.8 Enriquecimiento/depleción de células CD8 positivas

El CliniMACS Plus CD8 System con el CliniMACS Plus Instrument, el CliniMACS CD8 Reagent, el CliniMACS Tubing Set o el CliniMACS Tubing Set LS y el CliniMACS PBS/EDTA Buffer están destinados al enriquecimiento o a la depleción *in vitro* de células humanas CD8 positivas de poblaciones celulares hematológicas heterogéneas.

6.8.1 PASO 1: Preparación y marcaje magnético de las células

Primeras acciones necesarias

Capacidad de la aplicación

- **Enriquecimiento:** hasta 4×10^9 células marcadas de hasta 40×10^9 células totales (WBC) utilizando el CliniMACS Tubing Set
- **Depleción:** hasta 4×10^9 células marcadas de hasta 40×10^9 células totales (WBC) utilizando el CliniMACS Tubing Set LS

⚠ ATENCIÓN

Riesgo de rendimiento insuficiente de separación de células marcadas. Si se superan las especificaciones de la aplicación, hay riesgo de que el marcaje específico sea insuficiente. Utilice la cantidad necesaria de células y de reactivo según lo descrito para la aplicación correspondiente.

Materiales CliniMACS necesarios

Material	Número de catálogo	Cantidad	Programa de separación
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1	–
CliniMACS CD8 Reagent	275-01	1 vial	–
CliniMACS Tubing Set	161-01	1 set de tubos	ENRICHMENT 1.1
CliniMACS Tubing Set LS	162-01	1 set de tubos	DEPLETION 2.1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	Hasta 3 bolsas de 1000 mL[1]	–

1 Consulte Tabla 6.20 a Tabla 6.22. Antes del uso, enriquezca el CliniMACS PBS/EDTA Buffer con HSA hasta una concentración final del 0,5% (p/v).

Tabla 6.19: Materiales CliniMACS necesarios para el enriquecimiento/la depleción de células CD8 positivas

Materiales adicionales necesarios

- **Cell Preparation Bag:**
  una bolsa de transferencia de 600 mL, aptas para la centrifugación, así como un Sampling Site Coupler y un set de transferencia de plasma, para el uso durante la preparación celular

- **Plasma Waste Bag y Wash Waste Bag:**
  dos bolsas de transferencia de 600 mL, aptas para el centrifugado
- **Cell Collection Bag:**
  una bolsa de transferencia de 600 mL en combinación con un Luer/Spike Interconnector para conectar la Cell Collection Bag al set de tubos (consulte la Tabla 6.21 y la Tabla 6.22)
- **Si fuera necesario sustituir la Negative Fraction Bag y la Buffer Waste Bag:**
  Dos o tres bolsas de transferencia de 1000 mL en combinación con dos Luer/Spike Interconnector para conectar las bolsas al set de tubos (consulte la Tabla 6.21 y la Tabla 6.22).
- **Si fuera necesario más de un litro de solución tampón para la separación:**
  un set de transferencia de plasma para conectar las bolsas de solución tampón (consulte la Tabla 6.21 y la Tabla 6.22)
- un pre-filtro
- pinzas de cierre
- jeringas (diferentes tamaños) y agujas hipodérmicas de calibre 20
- albúmina de suero humana (HSA) para añadirla al CliniMACS PBS/EDTA Buffer hasta una concentración final del 0,5% (p/v)
- tubos de muestras

IMPORTANTE

Después de introducir los parámetros de la muestra (PASO 2), el software CliniMACS Plus calculará los volúmenes que se recogerán en la Priming Waste Bag, la Cell Collection Bag, la Negative Fraction Bag y la Buffer Waste Bag. Si el volumen de líquido calculado supera el volumen predeterminado de 500 mL, será necesario sustituir las bolsas de acuerdo con el siguiente resumen de materiales necesarios.

Resumen de los materiales necesarios

Preparación celular	
Células totales	$\leq 40\times10^9$
Células marcadas	$\leq 4\times10^9$
Número de viales de reactivo	1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 mL
Set de transferencia de plasma	1
Volumen de carga de la muestra	100 mL

Tabla 6.20: Materiales necesarios para la preparación de células CD8 positivas

Separación (ENRICHMENT 1.1)		
Células marcadas	<2×10^9	2–4×10^9
Negative Fraction Bag	–	Sustituya las bolsas originales del set de tubos por bolsas de transferencia de 1000 mL
Buffer Waste Bag	–	
Priming Waste Bag	–	–
Cell Collection Bag	600 mL	600 mL
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 mL	2000 mL
Luer/Spike Interconnector	1	3
Set de transferencia de plasma	–	1

Tabla 6.21: Materiales necesarios para enriquecer células CD8 positivas

Separación (DEPLETION 2.1)	
Células marcadas	≤4×10^9
Negative Fraction Bag	No es necesario sustituir la bolsa
Buffer Waste Bag	
Priming Waste Bag	
Cell Collection Bag	600 mL
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 mL
Luer/Spike Interconnector	1

Tabla 6.22: Materiales necesarios para la depleción de células CD8 positivas

▶ Preparación de las bolsas

Determine el peso de la Cell Collection Bag y de la Cell Preparation Bag vacías como se describe en la sección 7.1.1 en la página 119.

Marcaje magnético de las células

Para una descripción detallada de los pasos siguientes, consulte la sección 7.1 «PASO 1: Preparación y marcaje magnético de las células» en la página 119.

▶ Análisis del producto celular inicial

▶ Transferencia del producto celular inicial a la Cell Preparation Bag

▶ Dilución del producto celular inicial

Añada solución tampón: Peso de solución tampón a añadir = Peso del producto celular inicial × 2

▶ Centrifugado

Centrifugue a 300×g, sin freno, 15 minutos, a temperatura ambiente (TA: +19 °C a +25 °C [+66 °F a +77 °F]).

▶ Ajuste de volumen: volumen de marcaje 95 g (±5 g)

1. Elimine completamente el sobrenadante, prestando atención de no resuspender el precipitado celular.
2. Resuspenda el precipitado celular con cuidado tras eliminar el sobrenadante.
3. Ajuste el peso de la Cell Preparation Bag (CPB) añadiendo solución tampón. Calcule el peso objetivo de la CPB llena de producto celular diluido utilizando la ecuación: Peso objetivo de la CPB llena = 95 g – peso de la CPB vacía
4. Resuspenda el precipitado celular.

▶ Incubación con CliniMACS CD8 Reagent

1. Añada 1 vial de CliniMACS CD8 Reagent. Mezcle los contenidos suavemente.
2. Incube en un agitador orbital (25 rpm) durante 30 minutos a temperatura ambiente.

▶ Eliminación del exceso de reactivo

1. Llene la Cell Preparation Bag con solución tampón.
2. Centrifugue (300×g, sin freno, 15 minutos, TA).
3. Elimine la mayor cantidad posible de sobrenadante. **Nota:** Elimine al menos 500 g de sobrenadante. Si el sobrenadante eliminado es inferior a 500 g, se recomienda realizar un total de dos lavados (en lugar de solo uno). De lo contrario, la eliminación del reactivo no unido puede ser insuficiente.
4. Resuspenda el precipitado celular.
5. Ajuste el volumen de carga de la muestra a 100 g.

6.8.2 PASO 2: Selección del programa de separación

▶ Encender el CliniMACS Plus Instrument

▶ Selección del programa de separación ENRICHMENT 1.1. o DEPLETION 2.1

▶ Introducción de los parámetros de la muestra

Consulte la sección 7.2.3 en la página 134 o 7.2.5 en la página 141.

6.8.3 PASO 3: Instalación de sets de tubos CliniMACS

▶ CliniMACS Tubing Set y CliniMACS Tubing Set LS

Consulte la sección 7.3.1 en la página 152.

6.8.4 PASO 4: Separación CliniMACS Plus

- **Procedimiento de separación**
- **Desconexión de las bolsas y registro del código del proceso**
- **Descarga del set de tubos y apagado**
- **Análisis celular**

Consulte la sección 7.4.2 en la página 191 o 7.4.4 en la página 199.

6.9 Enriquecimiento/depleción de células CD25 positivas

El CliniMACS Plus CD25 System con el CliniMACS Plus Instrument, el CliniMACS CD25 Reagent, el CliniMACS Tubing Set o el CliniMACS Tubing Set LS y el CliniMACS PBS/EDTA Buffer están destinados al enriquecimiento o a la depleción *in vitro* de células humanas CD25 positivas –preferentemente células con alta expresión de CD25– de poblaciones celulares hematológicas heterogéneas.

6.9.1 PASO 1: Preparación y marcaje magnético de las células

Primeras acciones necesarias

Capacidad de la aplicación

- **Enriquecimiento:** células CD25 positivas o con alta expresión de CD25: hasta $0{,}6\times10^9$ células marcadas de hasta 40×10^9 células totales (WBC) utilizando el CliniMACS Tubing Set
- **Depleción:**
  Aplicación a escala normal: hasta 6×10^9 células CD25 positivas de hasta 40×10^9 células totales (WBC) utilizando el CliniMACS Tubing Set LS
  Aplicación a gran escala: más de 6×10^9 y hasta 12×10^9 células CD25 positivas de más de 40×10^9 y hasta 80×10^9 células totales (WBC) utilizando el CliniMACS Tubing Set LS

⚠ ATENCIÓN

Riesgo de rendimiento insuficiente de separación de células marcadas. Si se superan las especificaciones de la aplicación, hay riesgo de que el marcaje específico sea insuficiente. Utilice la cantidad necesaria de células y de reactivo según lo descrito para la aplicación correspondiente.

Materiales CliniMACS necesarios

Material	Número de catálogo	Cantidad	Programa de separación
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1	–
CliniMACS CD25 Reagent	274-01	• 1 vial (escala normal) • 2 viales (gran escala)	–
CliniMACS Tubing Set	161-01	1 set de tubos	ENRICHMENT 3.2
CliniMACS Tubing Set LS	162-01	1 set de tubos	DEPLETION 2.1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	Hasta 4 bolsas de 1000 mL[1]	–

1 Consulte Tabla 6.24 a Tabla 6.27. Antes del uso, enriquezca el CliniMACS PBS/EDTA Buffer con HSA hasta una concentración final del 0,5% (p/v).

Tabla 6.23: Materiales CliniMACS necesarios para el enriquecimiento/la depleción de células CD25 positivas

Materiales adicionales necesarios

- **Cell Preparation Bag:**
  una bolsa de transferencia de 600 mL, aptas para la centrifugación, así como un Sampling Site Coupler y uno o dos sets de transferencia de plasma, para el uso durante la preparación celular
- **Plasma Waste Bag y Wash Waste Bag:**
  dos bolsas de transferencia de 600 mL (o dos de 1000 mL), aptas para el centrifugado
- **Cell Collection Bag:**
  una bolsa de transferencia de 150 mL o una o dos bolsas de transferencia de 600 mL en combinación con un Luer/Spike Interconnector para conectar la Cell Collection Bag al set de tubos

  Si fueran necesarias dos Cell Collection Bags para la separación, use un set de transferencia de plasma para conectar ambas bolsas (consulte la Tabla 6.25 y la Tabla 6.27).
- **Si fuera necesario sustituir la Negative Fraction Bag y la Buffer Waste Bag:**
  dos bolsas de transferencia de 1000 mL en combinación con dos Luer/Spike Interconnector para conectar las bolsas al set de tubos (consulte la Tabla 6.25 y la Tabla 6.27).
- **Si fuera necesario más de un litro de solución tampón para la separación:**
  un set de transferencia de plasma para conectar las bolsas de solución tampón (consulte la Tabla 6.25 y la Tabla 6.27)
- un pre-filtro
- pinzas de cierre
- jeringas (diferentes tamaños) y agujas hipodérmicas de calibre 20
- albúmina de suero humana (HSA) para añadirla al CliniMACS PBS/EDTA Buffer hasta una concentración final del 0,5% (p/v)
- tubos de muestras

IMPORTANTE

Después de introducir los parámetros de la muestra (PASO 2), el software CliniMACS Plus calculará los volúmenes que se recogerán en la Priming Waste Bag, la Cell Collection Bag, la Negative Fraction Bag y la Buffer Waste Bag. Si el volumen de líquido calculado supera el volumen predeterminado de 500 mL, será necesario sustituir las bolsas de acuerdo con el siguiente resumen de materiales necesarios.

Resumen de los materiales necesarios

Preparación celular (ENRICHMENT 3.2)		
Aplicación	**Enriquecimiento de células CD25 positivas**	**Enriquecimiento de células con alta expresión de CD25**
Células totales (WBC)	$\leq 40\times10^9$	$\leq 40\times10^9$
Células marcadas	$\leq 0{,}6\times10^9$	$\leq 0{,}6\times10^9$
Número de viales de reactivo	1	1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000–2000 mL	2000 mL
Set de transferencia de plasma	1–2	2
Volumen de marcaje	190 mL	380 mL
Temperatura de marcaje	Temperatura ambiente	+4 °C a +8 °C (+39 °F a +46 °F)

Tabla 6.24: Materiales necesarios para la preparación de células CD25/de alta expresión (ENRICHMENT 3.2)

Separación (ENRICHMENT 3.2)		
Aplicación	**Enriquecimiento de células CD25 positivas**	**Enriquecimiento de células con alta expresión de CD25**
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 mL	1000 mL
Negative Fraction Bag	No es necesario sustituir la bolsa	
Buffer Waste Bag		
Priming Waste Bag		
Cell Collection Bag	150 mL	150 mL
Luer/Spike Interconnector	1	1

Tabla 6.25: Materiales necesarios para el enriquecimiento de células CD25 positivas/de alta expresión (ENRICHMENT 3.2)

Preparación celular (DEPLETION 2.1)		
Células totales (WBC)	≤40×10^9	>40–80×10^9
Células marcadas	≤6×10^9	>6–12×10^9
Número de viales de reactivo	1	2
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000–2000 mL	1000–2000 mL
Set de transferencia de plasma	1–2	1–2
Volumen de marcaje	95 mL	190 mL
Temperatura de marcaje	Temperatura ambiente	Temperatura ambiente

Tabla 6.26: Materiales necesarios para la preparación de células CD25 positivas (DEPLETION 2.1)

Separación (DEPLETION 2.1)		
Células totales (WBC)	≤40×10^9	>40–80×10^9
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 mL para <5×10^9 células marcadas	2000 mL para 5–12×10^9 células marcadas
Negative Fraction Bag	–	Sustituya las bolsas originales del set de tubos por bolsas de transferencia de 1000 mL
Buffer Waste Bag	–	
Priming Waste Bag	–	–
Cell Collection Bag	600 mL	2×600 mL
Luer/Spike Interconnector	1	3
Set de transferencia de plasma	–	2

Tabla 6.27: Materiales necesarios para la depleción de células CD25 positivas (DEPLETION 2.1)

▶ Preparación de las bolsas

Determine el peso de la Cell Collection Bag y de la Cell Preparation Bag vacías como se describe en la sección 7.1.1 en la página 119.

Marcaje magnético de las células

Para una descripción detallada de los pasos siguientes, consulte la sección 7.1 «PASO 1: Preparación y marcaje magnético de las células» en la página 119.

IMPORTANTE

- *Almacene la solución tampón para la preparación celular, el enriquecimiento o la depleción de células CD25 positivas, a una temperatura de +19 °C a +25 °C (+66 °F a +77 °F).*
- *El marcaje magnético durante la preparación celular para el enriquecimiento de células con alta expresión de CD25 se debe realizar con solución tampón fría (+4 °C a +8 °C [+39 °F a +46 °F]). Las temperaturas inferiores pueden reducir la pureza y el rendimiento de las células diana.*

Análisis del producto celular inicial

Transferencia del producto celular inicial a la Cell Preparation Bag

Dilución del producto celular inicial

Añada solución tampón: Peso de solución tampón a añadir = peso del producto celular inicial × 2

Centrifugado

Centrifugue a 300×g, sin freno, 15 minutos, a temperatura ambiente (TA: +19 °C a +25 °C [+66 °F a +77 °F]).

Ajuste de volumen: volumen de marcaje para

el enriquecimiento de células CD25 positivas: 190 g (±5 g)
el enriquecimiento de células con alta expresión de CD25: 380 g (±5 g)[1]
la depleción de células CD25 positivas (aplicación a escala normal): 95 g
la depleción de células CD25 positivas (aplicación a gran escala): 190 g

1. Elimine completamente el sobrenadante, prestando atención de no resuspender el precipitado celular.
2. Resuspenda el precipitado celular con cuidado tras eliminar el sobrenadante.
3. Ajuste el peso de la Cell Preparation Bag (CPB) añadiendo solución tampón y utilizando la siguiente ecuación: Peso objetivo de la CPB llena = volumen de marcaje + peso de la CPB vacía
4. Resuspenda el precipitado celular.

Incubación con CliniMACS CD25 Reagent

1. Añada 1 o 2 viales de CliniMACS CD25 Reagent (consulte la Tabla 6.24 y la Tabla 6.26). Mezcle los contenidos suavemente.
2. Incube en un agitador orbital (25 rpm):
   a) enriquecimiento o depleción de células CD25 positivas: 30 minutos a TA
   b) enriquecimiento de células con alta expresión de CD25: 15 minutos a una temperatura de +4 °C a +8 °C (+39 °F a +46 °F)

Eliminación del exceso de reactivo

1. Llene la Cell Preparation Bag con solución tampón.
2. Centrifugue (300×g, sin freno, 15 minutos, TA).
3. Elimine la mayor cantidad posible de sobrenadante. **Nota:** Elimine al menos 500 g de sobrenadante. Si el sobrenadante eliminado es inferior a 500 g, se recomienda realizar un total de dos lavados (en lugar de solo uno). De lo contrario, la eliminación del reactivo no unido puede ser insuficiente.

1 El marcaje magnético para el enriquecimiento de células con alta expresión de CD25 se debe realizar con solución tampón fría (+4°C a +8°C [+39 °F a +46 °F]).

4. Resuspenda el precipitado celular.
5. Ajuste el volumen de carga de la muestra a 100 g (aplicación a escala normal) o 200 g (aplicación a gran escala).

6.9.2 PASO 2: Selección del programa de separación

- **Encender el CliniMACS Plus Instrument**
- **Selección del programa de separación ENRICHMENT 3.2. o DEPLETION 2.1**
- **Introducción de los parámetros de la muestra**
  (no para ENRICHMENT 3.2)

Consulte la sección 7.2.4 en la página 139 o 7.2.5 en la página 141.

6.9.3 PASO 3: Instalación de sets de tubos CliniMACS

- **CliniMACS Tubing Set y CliniMACS Tubing Set LS**

Consulte la sección 7.3.1 en la página 152.

6.9.4 PASO 4: Separación CliniMACS Plus

- **Procedimiento de separación**
- **Desconexión de las bolsas y registro del código del proceso**
- **Descarga del set de tubos y apagado**
- **Análisis celular**

Consulte la sección 7.4.3 en la página 195 o 7.4.4 en la página 199.

6.10 Enriquecimiento/depleción de células CD4 positivas

El CliniMACS Plus CD4 System con el CliniMACS Plus Instrument, el CliniMACS CD4 Reagent, el CliniMACS Tubing Set o el CliniMACS Tubing Set LS y el CliniMACS PBS/EDTA Buffer están destinados al enriquecimiento o a la depleción *in vitro* de células humanas CD4 positivas de poblaciones celulares hematológicas heterogéneas.

6.10.1 PASO 1: Preparación y marcaje magnético de las células

Primeras acciones necesarias

Capacidad de la aplicación

- **Enriquecimiento:** hasta 5×10^9 células marcadas de hasta 40×10^9 células totales (WBC) utilizando el CliniMACS Tubing Set
- **Depleción:** hasta 12×10^9 células marcadas de hasta 40×10^9 células totales (WBC) utilizando el CliniMACS Tubing Set LS

Nota: Si el número de células calculadas supera la capacidad de la aplicación, divida la muestra y continúe con cada muestra por separado, utilizando un nuevo set de tubos para cada ciclo del CliniMACS Plus Instrument.

⚠ ATENCIÓN

Riesgo de rendimiento insuficiente de separación de células marcadas. Si se superan las especificaciones de la aplicación, hay riesgo de que el marcaje específico sea insuficiente. Utilice la cantidad necesaria de células y de reactivo según lo descrito para la aplicación correspondiente.

Materiales CliniMACS necesarios

Material	Número de catálogo	Cantidad	Programa de separación
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1	–
CliniMACS CD4 Reagent	276-01	1 vial	–
CliniMACS Tubing Set	161-01	1 set de tubos	ENRICHMENT 1.1
CliniMACS Tubing Set LS	162-01	1 set de tubos	DEPLETION 2.1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	Hasta 4 bolsas de 1000 mL[1]	–

1 Consulte Tabla 6.29 a Tabla 6.32. Antes del uso, enriquezca el CliniMACS PBS/EDTA Buffer con HSA hasta una concentración final del 0,5% (p/v).

Tabla 6.28: Materiales CliniMACS necesarios para el enriquecimiento/la depleción de células CD4 positivas

Materiales adicionales necesarios

- **Cell Preparation Bag:**
  una bolsa de transferencia de 600 mL, aptas para la centrifugación, así como un Sampling Site Coupler y un set de transferencia de plasma, para el uso durante la preparación celular
- **Plasma Waste Bag y Wash Waste Bag:**
  dos bolsas de transferencia de 600 mL (o dos de 1000 mL), aptas para el centrifugado
- **Cell Collection Bag:**
  una bolsa de transferencia de 150 mL o una o dos bolsas de transferencia de 600 mL en combinación con un Luer/Spike Interconnector para conectar la Cell Collection Bag al set de tubos

  Si fueran necesarias dos Cell Collection Bags para la separación, use un set de transferencia de plasma para conectar ambas bolsas (consulte la Tabla 6.30 y la Tabla 6.32).
- **Si fuera necesario sustituir la Negative Fraction Bag, la Buffer Waste Bag o la Priming Waste Bag:**
  hasta tres bolsas de transferencia de 1000 mL en combinación con dos Luer/Spike Interconnector para conectar las bolsas al set de tubos (consulte la Tabla 6.30 y la Tabla 6.32)

  Sustituya el Priming Waste Bag utilizando el conector de tubos estéril.
- **Si fuera necesario más de un litro de solución tampón para la separación:**
  uno o dos sets de transferencia de plasma para conectar las bolsas de solución tampón (consulte la Tabla 6.30 y la Tabla 6.32)
- un pre-filtro
- pinzas de cierre
- jeringas (diferentes tamaños) y agujas hipodérmicas de calibre 20
- albúmina de suero humana (HSA) para añadirla al CliniMACS PBS/EDTA Buffer hasta una concentración final del 0,5% (p/v)
- tubos de muestras

IMPORTANTE

Después de introducir los parámetros de la muestra (PASO 2), el software CliniMACS Plus calculará los volúmenes que se recogerán en la Priming Waste Bag, la Cell Collection Bag, la Negative Fraction Bag y la Buffer Waste Bag. Si el volumen de líquido calculado supera el volumen predeterminado de 500 mL, será necesario sustituir las bolsas de acuerdo con el siguiente resumen de materiales necesarios.

Resumen de los materiales necesarios

Preparación celular (ENRICHMENT 1.1)	
Células totales (WBC)	≤40×10^9
Células marcadas	≤5×10^9
Número de viales de reactivo	1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 mL
Set de transferencia de plasma	1

Tabla 6.29: Materiales necesarios para preparación de células CD4 positivas (ENRICHMENT 1.1)

Separación (ENRICHMENT 1.1)		
Células marcadas	≤2×10^9	>2–5×10^9
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 mL	2000 mL
Negative Fraction Bag	–	Sustituya las bolsas originales del set de tubos por bolsas de transferencia de 1000 mL
Buffer Waste Bag	–	
Priming Waste Bag	–	–
Cell Collection Bag	150 mL	600 mL
Luer/Spike Interconnector	1	3
Set de transferencia de plasma	–	1

Tabla 6.30: Materiales necesarios para el enriquecimiento de células CD4 positivas (ENRICHMENT 1.1)

Preparación celular (DEPLETION 2.1)	
Células totales (WBC)	≤40×10^9
Células marcadas	≤12×10^9
Número de viales de reactivo	1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 mL
Set de transferencia de plasma	1

Tabla 6.31: Materiales necesarios para la preparación de células CD4 positivas (DEPLETION 2.1)

Separación (DEPLETION 2.1)		
Células marcadas	<5×10^9	5–12×10^9
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 mL	2000 mL
Negative Fraction Bag	–	Sustituya las bolsas originales del set de tubos por bolsas de transferencia de 1000 mL
Buffer Waste Bag	–	
Priming Waste Bag	–	–
Cell Collection Bag	1×600 mL	1–2×600 mL
Luer/Spike Interconnector	1	3
Set de transferencia de plasma	–	1–2

Tabla 6.32: Materiales necesarios para la depleción de células CD4 positivas (DEPLETION 2.1)

▶ Preparación de las bolsas

Determine el peso de la Cell Collection Bag y de la Cell Preparation Bag vacías como se describe en la sección 7.1.1 en la página 119.

Marcaje magnético de las células

Para una descripción detallada de los pasos siguientes, consulte la sección 7.1 «PASO 1: Preparación y marcaje magnético de las células» en la página 119.

▶ Análisis del producto celular inicial

▶ Transferencia del producto celular inicial a la Cell Preparation Bag

▶ Dilución del producto celular inicial

Añada solución tampón: Peso de solución tampón a añadir = peso del producto celular inicial × 2

▶ Centrifugado

Centrifugue a 300×g, sin freno, 15 minutos, a temperatura ambiente (TA: +19 °C a +25 °C [+66 °F a +77 °F]).

▶ Ajuste de volumen: volumen de marcaje 95 g (±5 g)

1. Elimine el sobrenadante para ajustar la muestra mediante la siguiente ecuación: Peso del sobrenadante a eliminar = peso del producto celular diluido – 95 g
2. Resuspenda el precipitado celular.

▶ Incubación con CliniMACS CD4 Reagent

1. Añada 1 vial de CliniMACS CD4 Reagent. Mezcle los contenidos suavemente.
2. Incube en un agitador orbital (25 rpm) durante 30 minutos a temperatura ambiente.

▶ Eliminación del exceso de reactivo

1. Llene la Cell Preparation Bag con solución tampón.
2. Centrifugue (300×g, sin freno, 15 minutos, TA).
3. Elimine la mayor cantidad posible de sobrenadante. **Nota:** Elimine al menos 500 g de sobrenadante. Si el sobrenadante eliminado es inferior a 500 g, se recomienda realizar un total de dos lavados (en lugar de solo uno). De lo contrario, la eliminación del reactivo no unido puede ser insuficiente.
4. Resuspenda el precipitado celular.
5. Ajuste el volumen de carga de la muestra a 100 g.

6.10.2 PASO 2: Selección del programa de separación

- **Encender el CliniMACS Plus Instrument**
- **Selección del programa de separación ENRICHMENT 1.1. o DEPLETION 2.1**
- **Introducción de los parámetros de la muestra**

Consulte la sección 7.2.3 en la página 134 y 7.2.5 en la página 141.

6.10.3 PASO 3: Instalación de sets de tubos CliniMACS

- **CliniMACS Tubing Set y CliniMACS Tubing Set LS**

Consulte la sección 7.3.1 en la página 152.

6.10.4 PASO 4: Separación CliniMACS Plus

- **Procedimiento de separación**
- **Desconexión de las bolsas y registro del código del proceso**
- **Descarga del set de tubos y apagado**
- **Análisis celular**

Consulte la sección 7.4.2 en la página 191 o 7.4.4 en la página 199.

6.11 Depleción de células CD4 y CD8 positivas

El CliniMACS Plus CD4/CD8 System con el CliniMACS Plus Instrument, el CliniMACS CD4 Reagent, el CliniMACS CD8 Reagent, el CliniMACS Tubing Set LS y el CliniMACS PBS/EDTA Buffer están destinados a la depleción simultánea *in vitro* de células CD4 y CD8 positivas de poblaciones celulares hematológicas heterogéneas.

6.11.1 PASO 1: Preparación y marcaje magnético de las células

Primeras acciones necesarias

Capacidad de la aplicación

Hasta 12×10^9 células CD4 positivas y hasta 4×10^9 células CD8 positivas de hasta 40×10^9 células totales (WBC)

Nota: Si el número de células calculadas supera la capacidad de la aplicación, divida la muestra y continúe con cada muestra por separado, utilizando un nuevo set de tubos para cada ciclo del CliniMACS Plus Instrument.

⚠ ATENCIÓN

Riesgo de rendimiento insuficiente de separación de células marcadas. Si se superan las especificaciones de la aplicación, hay riesgo de que el marcaje específico sea insuficiente. Utilice la cantidad necesaria de células y de reactivo según lo descrito para la aplicación correspondiente.

Materiales CliniMACS necesarios

Material	Número de catálogo	Cantidad
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS CD4 Reagent	276-01	1 vial
CliniMACS CD8 Reagent	275-01	1 vial
CliniMACS Tubing Set LS	162-01	1 set de tubos
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	Hasta 4 bolsas de 1000 mL[1]

1 Consulte la Tabla 6.34 y la Tabla 6.35. Antes del uso, enriquezca el CliniMACS PBS/EDTA Buffer con HSA hasta una concentración final del 0,5% (p/v).

Tabla 6.33: Materiales CliniMACS necesarios para la depleción de células CD4 y CD8 positivas

Materiales adicionales necesarios

- **Cell Preparation Bag:**
  una bolsa de transferencia de 600 mL, aptas para la centrifugación, así como un Sampling Site Coupler y un set de transferencia de plasma, para el uso durante la preparación celular
- **Plasma Waste Bag y Wash Waste Bag:**
  dos bolsas de transferencia de 600 mL (o dos de 1000 mL), aptas para el centrifugado
- **Cell Collection Bag:**
  una bolsa de transferencia de 600 mL en combinación con un Luer/Spike Interconnector para conectar la Cell Collection Bag al set de tubos

Si fueran necesarias dos Cell Collection Bags para la separación, use un set de transferencia de plasma para conectar ambas bolsas (consulte la Tabla 6.35).

- **Si fuera necesario sustituir la Negative Fraction Bag, la Buffer Waste Bag o la Priming Waste Bag:**
  hasta tres bolsas de transferencia de 1000 mL en combinación con dos Luer/Spike Interconnector para conectar las bolsas al set de tubos (consulte la Tabla 6.35)

  Sustituya el Priming Waste Bag utilizando el conector de tubos estéril.
- **Si fuera necesario más de un litro de solución tampón para la separación:**
  uno o dos sets de transferencia de plasma para conectar las bolsas de solución tampón (consulte la Tabla 6.35)
- un pre-filtro
- pinzas de cierre
- jeringas (diferentes tamaños) y agujas hipodérmicas de calibre 20
- albúmina de suero humana (HSA) para añadirla al CliniMACS PBS/EDTA Buffer hasta una concentración final del 0,5% (p/v)
- tubos de muestras

IMPORTANTE

Después de introducir los parámetros de la muestra (PASO 2), el software CliniMACS Plus calculará los volúmenes que se recogerán en la Priming Waste Bag, la Cell Collection Bag, la Negative Fraction Bag y la Buffer Waste Bag. Si el volumen de líquido calculado supera el volumen predeterminado de 500 mL, será necesario sustituir las bolsas de acuerdo con el siguiente resumen de materiales necesarios.

Resumen de los materiales necesarios

Preparación celular	
Células totales (WBC)	$\leq 40\times10^9$
Células marcadas	$\leq 12\times10^9$ células CD4 positivas y $\leq 4\times10^9$ células CD8 positivas
Número de viales de reactivo	1 vial de CliniMACS CD4 Reagent y 1 vial de CliniMACS CD8 Reagent
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 mL
Set de transferencia de plasma	1

Tabla 6.34: Materiales necesarios para la preparación de células CD4 y CD8 positivas

Separación			
Células marcadas	<5×10^9	5–13×10^9	>13–16×10^9
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1000 mL	2000 mL	3000 mL
Negative Fraction Bag	–	Sustituya las bolsas originales del set de tubos por bolsas de transferencia de 1000 mL	Sustituya las bolsas originales del set de tubos por bolsas de transferencia de 1000 mL
Buffer Waste Bag	–		
Priming Waste Bag	–	–	
Cell Collection Bag	1× 600 mL	1–2× 600 mL	2× 600 mL
Luer/Spike Interconnector	1	3	3
Set de transferencia de plasma	–	1–2	3

Tabla 6.35: Materiales necesarios para la depleción de células CD4 y CD8 positivas

▶ Preparación de las bolsas

Determine el peso de la Cell Collection Bag y de la Cell Preparation Bag vacías como se describe en la sección 7.1.1 en la página 119.

Marcaje magnético de las células

Para una descripción detallada de los pasos siguientes, consulte la sección 7.1 «PASO 1: Preparación y marcaje magnético de las células» en la página 119.

▶ Análisis del producto celular inicial

▶ Transferencia del producto celular inicial a la Cell Preparation Bag

▶ Dilución del producto celular inicial

Añada solución tampón: Peso de solución tampón a añadir = peso del producto celular inicial × 2

▶ Centrifugado

Centrifugue a 300×g, sin freno, 15 minutos, a temperatura ambiente (TA: +19 °C a +25 °C [+66 °F a +77 °F])

▶ Ajuste de volumen: volumen de marcaje 88 g (±5 g)

1. Elimine el sobrenadante para ajustar la muestra mediante la siguiente ecuación: Peso del sobrenadante a eliminar = peso del producto celular diluido – volumen de marcaje
2. Resuspenda el precipitado celular.

▶ Incubación con CliniMACS CD4 Reagent y CliniMACS CD8 Reagent

1. Añada 1 vial de CliniMACS CD4 Reagent y 1 vial de CliniMACS CD8 Reagent. Mezcle los contenidos suavemente.
2. Incube en un agitador orbital (25 rpm) durante 30 minutos a temperatura ambiente.

▶ **Eliminación del exceso de reactivo**

1. Llene la Cell Preparation Bag con solución tampón.
2. Centrifugue (300×g, sin freno, 15 minutos, TA).
3. Elimine la mayor cantidad posible de sobrenadante. **Nota:** Elimine al menos 500 g de sobrenadante. Si el sobrenadante eliminado es inferior a 500 g, se recomienda realizar un total de dos lavados (en lugar de solo uno). De lo contrario, la eliminación del reactivo no unido puede ser insuficiente.
4. Resuspenda el precipitado celular.
5. Ajuste el volumen de carga de la muestra a 100 g.

6.11.2 PASO 2: Selección del programa de separación

▶ **Encender el CliniMACS Plus Instrument**

▶ **Selección del programa de separación DEPLETION 2.1.**

▶ **Introducción de los parámetros de la muestra**

Consulte la sección 7.2.5 en la página 141.

6.11.3 PASO 3: Instalación de sets de tubos CliniMACS

▶ **CliniMACS Tubing Set y CliniMACS Tubing Set LS**

Consulte la sección 7.3.1 en la página 152.

6.11.4 PASO 4: Separación CliniMACS Plus

▶ **Procedimiento de separación**

▶ **Desconexión de las bolsas y registro del código del proceso**

▶ **Descarga del set de tubos y apagado**

▶ **Análisis celular**

Consulte la sección 7.4.4 en la página 199.

6.12 Enriquecimiento de células CD1c (BDCA-1) positivas – Parte 1: Depleción de células CD19 positivas y marcaje de células CD1c (BDCA-1) positivas

El CliniMACS Plus CD1c (BDCA-1)-Biotin System con el CliniMACS Plus Instrument, el CliniMACS CD1c (BDCA-1)-Biotin, el CliniMACS CD19 Reagent, el CliniMACS Anti-Biotin Reagent, el CliniMACS Tubing Set LS, el CliniMACS Tubing Set y el CliniMACS PBS/EDTA Buffer están destinados al enriquecimiento *in vitro* de células humanas CD1c (BDCA-1) positivas de poblaciones celulares hematológicas heterogéneas tras la depleción de células CD19 positivas.

6.12.1 PASO 1: Preparación y marcaje magnético de las células

Primeras acciones necesarias

Capacidad de la aplicación

Depleción de hasta 5×10^9 células CD19 positivas y marcaje de hasta $0{,}2\times10^9$ células Cd1c (BDCA-1) positivas de hasta 40×10^9 células totales (WBC)

⚠ ATENCIÓN

Riesgo de rendimiento insuficiente de separación de células marcadas. Si se superan las especificaciones de la aplicación, hay riesgo de que el marcaje específico sea insuficiente. Utilice la cantidad necesaria de células y de reactivo según lo descrito para la aplicación correspondiente.

Materiales CliniMACS necesarios

Material	Número de catálogo	Cantidad
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS CD1c (BDCA-1)-Biotin	277-01	1 vial
CliniMACS CD19 Reagent	179-01	1 vial
CliniMACS Tubing Set LS	162-01	1 set de tubos
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	2 bolsas de 1000 mL[1]

1 Antes del uso, enriquezca la solución tampón con HSA hasta una concentración final del 0,5% (p/v).

Tabla 6.36: Materiales CliniMACS necesarios para enriquecer células CD1c (BDCA-1) positivas (Parte 1)

Materiales adicionales necesarios (para Parte 1 y Parte 2)

- **Cell Preparation Bag:**
  dos bolsas de transferencia de 600 mL, aptas para la centrifugación, así como dos Sampling Site Coupler y tres sets de transferencia de plasma, para el uso durante la preparación celular
- **Plasma Waste Bags y Wash Waste Bags:**
  cinco bolsas de transferencia de 600 mL aptas para el centrifugado
  Cell Collection Bag (Parte 1):
  una bolsa de transferencia de 600 mL apta para el centrifugado en combinación con un Luer/Spike Interconnector, para conectar la Cell Collection Bag al set de tubos
- **Cell Collection Bag (Parte 2):**
  una bolsa de transferencia de 150 mL apta para el centrifugado en combinación con un Luer/Spike Interconnector, para conectar la bolsa de transferencia al set de tubos
- dos pre-filtros
- pinzas de cierre
- jeringas (diferentes tamaños) y agujas hipodérmicas de calibre 20
- albúmina de suero humana (HSA) para añadirla al CliniMACS PBS/EDTA Buffer hasta una concentración final del 0,5% (p/v)
- tubos de muestras

Marcaje magnético de las células (Parte 1)

Para una descripción detallada de los pasos siguientes, consulte la sección 7.1 «PASO 1: Preparación y marcaje magnético de las células» en la página 119.

▶ Análisis del producto celular inicial

▶ Transferencia del producto celular inicial a la Cell Preparation Bag

▶ Dilución del producto celular inicial

Añada solución tampón: Peso de solución tampón a añadir = peso del producto celular inicial × 2

▶ Centrifugado

Centrifugue a 200×g, sin freno, 15 minutos, a temperatura ambiente (TA: +19 °C a +25 °C [+66 °F a +77 °F]).

▶ Ajuste de volumen: volumen de marcaje 90 g (±5 g)

1. Resuspenda el precipitado celular con cuidado tras eliminar el sobrenadante.

2. Ajuste el peso de la Cell Preparation Bag Parte 1 (CPB) añadiendo solución tampón y utilizando la siguiente ecuación: Peso objetivo de la CPB llena Parte 1 = 90 g+ peso de la CPB vacía
3. Resuspenda el precipitado celular.

▶ **Incubación con CliniMACS CD19 Reagent y CliniMACS CD1c (BDCA-1)-Biotin**

1. Añada 1 vial de CliniMACS CD19 Reagent y 1 vial de CliniMACS CD1c (BDCA-1)-Biotin. Mezcle los contenidos suavemente.
2. Incube en un agitador orbital (25 rpm) durante 30 minutos a temperatura ambiente.

▶ **Eliminación del exceso de reactivo**

1. Llene la Cell Preparation Bag Parte 1 con solución tampón.
2. Centrifugue (300×g, sin freno, 15 minutos, TA).
3. Elimine la mayor cantidad posible de sobrenadante. **Nota:** Elimine al menos 500 g de sobrenadante. Si el sobrenadante eliminado es inferior a 500 g, se recomienda realizar un total de dos lavados (en lugar de solo uno). De lo contrario, la eliminación del reactivo no unido puede ser insuficiente.
4. Resuspenda el precipitado celular.
5. Ajuste el volumen de carga de la muestra a 100 g.

6.12.2 PASO 2: Selección del programa de separación

▶ **Encender el CliniMACS Plus Instrument**

▶ **Selección del programa de separación DEPLETION 2.1.**

▶ **Introducción de los parámetros de la muestra**

Consulte la sección 7.2.5 en la página 141.

6.12.3 PASO 3: Instalación de sets de tubos CliniMACS

▶ **CliniMACS Tubing Set y CliniMACS Tubing Set LS**

Consulte la sección 7.3.1 en la página 152.

6.12.4 PASO 4: Separación CliniMACS Plus

▶ **Procedimiento de separación**

▶ **Desconexión de las bolsas y registro del código del proceso**

- **Descarga del set de tubos y apagado**
- **Análisis celular**

Consulte la sección 7.4.4 en la página 199.

6.13 Enriquecimiento de células CD1c (BDCA-1) positivas – Parte 2: Flexible Labeling System

El CliniMACS Plus CD1c (BDCA-1)-Biotin System con el CliniMACS Plus Instrument, el CliniMACS CD1c (BDCA-1)-Biotin, el CliniMACS CD19 Reagent, el CliniMACS Anti-Biotin Reagent, el CliniMACS Tubing Set LS, el CliniMACS Tubing Set y el CliniMACS PBS/EDTA Buffer están destinados al enriquecimiento *in vitro* de células humanas CD1c (BDCA-1) positivas de poblaciones celulares hematológicas heterogéneas tras la depleción de células CD19 positivas.

6.13.1 PASO 1: Preparación y marcaje magnético de las células

Primeras acciones necesarias

Capacidad de la aplicación

Hasta $0{,}2\times10^9$ células Cd1c (BDCA-1) positivas desde un total de hasta 40×10^9 células (WBC)

⚠ ATENCIÓN

Riesgo de rendimiento insuficiente de separación de células marcadas. Si se superan las especificaciones de la aplicación, hay riesgo de que el marcaje específico sea insuficiente. Utilice la cantidad necesaria de células y de reactivo según lo descrito para la aplicación correspondiente.

Materiales CliniMACS necesarios

Material	Número de catálogo	Cantidad
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS Anti-Biotin Reagent	173-01	1 vial
CliniMACS Tubing Set	161-01	1 set de tubos
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	3 bolsas de 1000 mL[1]

1 Antes del uso, enriquezca la solución tampón con HSA hasta una concentración final del 0,5% (p/v).

Tabla 6.37: Materiales CliniMACS necesarios para enriquecer células CD1c (BDCA-1) positivas (Parte 2)

Materiales adicionales necesarios

Consulte los materiales adicionales necesarios en la Parte 1.

▶ Preparación de las bolsas

Determine el peso de la Cell Collection Bag y de la Cell Preparation Bag vacías como se describe en la sección 7.1.1 en la página 119.

Marcaje magnético de las células (producto celular reducido en CD19 [Parte 2])

Para una descripción detallada de los pasos siguientes, consulte la sección 7.1 «PASO 1: Preparación y marcaje magnético de las células» en la página 119.

▶ Transferencia del producto celular inicial reducido en CD19 a la Cell Preparation Bag Parte 2

▶ Dilución del producto celular inicial reducido en CD19

Añada solución tampón: Peso de solución tampón a añadir = 600 g – peso del producto celular inicial reducido en CD19

▶ Centrifugado

Centrifugue a 300×g, sin freno, 15 minutos, a temperatura ambiente (TA: +19 °C a +25 °C [+66 °F a +77 °F]).

▶ Ajuste de volumen: volumen de marcaje 95 g (±5 g)

1. Elimine el sobrenadante para ajustar la muestra mediante la siguiente ecuación: Peso del sobrenadante a eliminar = peso del producto celular diluido – volumen de marcaje
2. Resuspenda el precipitado celular.

▶ Incubación con CliniMACS Anti-Biotin Reagent

1. Añada 1 vial de CliniMACS Anti-Biotin Reagent. Mezcle los contenidos suavemente.
2. Incube en un agitador orbital (25 rpm) durante 30 minutos a temperatura ambiente.

- **Eliminación del exceso de reactivo**

1. Llene la Cell Preparation Bag Parte 2 con solución tampón.
2. Centrifugue (300×g, sin freno, 15 minutos, TA).
3. Elimine la mayor cantidad posible de sobrenadante.
4. Resuspenda el precipitado celular.
5. Llene la Cell Preparation Bag Parte 2 con solución tampón.
6. Centrifugue (300×g, sin freno, 15 minutos, TA).
7. Elimine la mayor cantidad posible de sobrenadante.
8. Resuspenda el precipitado celular.
9. Ajuste el volumen de carga de la muestra a 100 g.

6.13.2 PASO 2: Selección del programa de separación

- **Encender el CliniMACS Plus Instrument**
- **Selección del programa de separación ENRICHMENT 3.2.**

Consulte la sección 7.2.4 en la página 139.

6.13.3 PASO 3: Instalación de sets de tubos CliniMACS

- **CliniMACS Tubing Set y CliniMACS Tubing Set LS**

Consulte la sección 7.3.1 en la página 152.

6.13.4 PASO 4: Separación CliniMACS Plus

- **Procedimiento de separación**
- **Desconexión de las bolsas y registro del código del proceso**
- **Descarga del set de tubos y apagado**
- **Análisis celular**

Consulte la sección 7.4.3 en la página 195.

6.14 Enriquecimiento de células CD304 (BDCA-4) positivas

El CliniMACS Plus CD304 (BDCA-4) System con el CliniMACS Plus Instrument, el CliniMACS CD304 (BDCA-4) Reagent, el CliniMACS Tubing Set y el CliniMACS PBS/EDTA Buffer están destinados al enriquecimiento *in vitro* de células humanas CD304 (BDCA-4) positivas de poblaciones celulares hematológicas heterogéneas.

6.14.1 PASO 1: Preparación y marcaje magnético de las células

Primeras acciones necesarias

Capacidad de la aplicación

Hasta $0{,}2\times10^9$ células CD304 (BDCA-4) positivas desde un total de hasta 40×10^9 células (WBC)

⚠ ATENCIÓN

Riesgo de rendimiento insuficiente de separación de células marcadas. Si se superan las especificaciones de la aplicación, hay riesgo de que el marcaje específico sea insuficiente. Utilice la cantidad necesaria de células y de reactivo según lo descrito para la aplicación correspondiente.

Materiales CliniMACS necesarios

Material	Número de catálogo	Cantidad
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS CD304 (BDCA-4) Reagent	278-01	1 vial
CliniMACS Tubing Set	161-01	1 set de tubos
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	4 bolsas de 1000 mL[1]

1 Antes del uso, enriquezca el CliniMACS PBS/EDTA Buffer con HSA hasta una concentración final del 0,5% (p/v).

Tabla 6.38: Materiales CliniMACS necesarios para enriquecer células CD304 (BDCA-4) positivas

Materiales adicionales necesarios

- **Cell Preparation Bag:**
  una bolsa de transferencia de 600 mL apta para la centrifugación, así como un Sampling Site Coupler y tres sets de transferencia de plasma, para el uso durante la preparación celular
- **Plasma Waste Bags y Wash Waste Bags:**
  cinco bolsas de transferencia de 600 mL aptas para el centrifugado

Cell Collection Bag:
una bolsa de transferencia de 150 mL en combinación con un Luer/Spike Interconnector para conectar la Cell Collection Bag al set de tubos

- un pre-filtro
- pinzas de cierre
- jeringas (diferentes tamaños) y agujas hipodérmicas de calibre 20
- albúmina de suero humana (HSA) para añadirla al CliniMACS PBS/EDTA Buffer hasta una concentración final del 0,5% (p/v)
- tubos de muestras

▶ Preparación de las bolsas

Determine el peso de la Cell Collection Bag y de la Cell Preparation Bag vacías como se describe en la sección 7.1.1 en la página 119.

Marcaje magnético de las células

Para una descripción detallada de los pasos siguientes, consulte la sección 7.1 «PASO 1: Preparación y marcaje magnético de las células» en la página 119.

▶ Análisis del producto celular inicial

▶ Transferencia del producto celular inicial a la Cell Preparation Bag

▶ Dilución del producto celular inicial reducido

Añada solución tampón: Peso de solución tampón a añadir = 600 g – peso del producto celular inicial

▶ Centrifugado

Centrifugue a 200×g, sin freno, 15 minutos, a temperatura ambiente (TA: +19 °C a +25 °C [+66 °F a +77 °F]).

▶ Repetir dos veces los pasos «Dilución del producto celular inicial» y «Centrifugado»

1. Llene una bolsa de transferencia hasta alcanzar 600 g
2. Centrifugue a 300×g, sin freno, 15 minutos, a temperatura ambiente (TA: +19 °C a +25 °C [+66 °F a +77 °F]).
3. Elimine el sobrenadante.

▶ Ajuste de volumen: volumen de marcaje 95 g (±5 g)

1. Elimine completamente el sobrenadante, prestando atención de no resuspender el precipitado celular.
2. Resuspenda el precipitado celular con cuidado tras eliminar el sobrenadante.
3. Ajuste el peso de la Cell Preparation Bag (CPB) añadiendo solución tampón y utilizando la siguiente ecuación: Peso objetivo de la CPB llena = 95 g + peso de la CPB vacía.
4. Resuspenda el precipitado celular.

▶ Incubación con CliniMACS CD304 (BDCA-4) Reagent

1. Añada 1 vial de CliniMACS CD304 (BDCA-4) Reagent. Mezcle los contenidos suavemente.
2. Incube en un agitador orbital (25 rpm) durante 30 minutos a temperatura ambiente.

▶ Eliminación del exceso de reactivo

1. Llene la Cell Preparation Bag con solución tampón.
2. Centrifugue (300×g, sin freno, 15 minutos, TA).
3. Elimine la mayor cantidad posible de sobrenadante.
4. Resuspenda el precipitado celular.
5. Ajuste el volumen de carga de la muestra a 100 g.

6.14.2 PASO 2: Selección del programa de separación

▶ Encender el CliniMACS Plus Instrument

▶ Selección del programa de separación ENRICHMENT 3.2.

Consulte la sección 7.2.4 en la página 139.

6.14.3 PASO 3: Instalación de sets de tubos CliniMACS

▶ CliniMACS Tubing Set y CliniMACS Tubing Set LS

Consulte la sección 7.3.1 en la página 152.

6.14.4 PASO 4: Separación CliniMACS Plus

- **Procedimiento de separación**
- **Desconexión de las bolsas y registro del código del proceso**
- **Descarga del set de tubos y apagado**
- **Análisis celular**

Consulte la sección 7.4.3 en la página 195.

6.15 Depleción de células TCRα/β positivas

El CliniMACS Plus TCRα/β-Biotin System con el CliniMACS Plus Instrument, el CliniMACS TCRα/β-Biotin, el CliniMACS Anti-Biotin Reagent, el CliniMACS Depletion Tubing Set y el CliniMACS PBS/EDTA Buffer están destinados a la depleción *in vitro* de células TCRα/β positivas de poblaciones celulares hematológicas heterogéneas.

6.15.1 PASO 1: Preparación y marcaje magnético de las células

Primeras acciones necesarias

Capacidad de la aplicación

Hasta 24×10^9 células TCRα/β positivas desde un total de hasta 60×10^9 células (WBC)

⚠ ATENCIÓN

Riesgo de rendimiento insuficiente de separación de células marcadas. Si se superan las especificaciones de la aplicación, hay riesgo de que el marcaje específico sea insuficiente. Utilice la cantidad necesaria de células y de reactivo según lo descrito para la aplicación correspondiente.

Materiales CliniMACS necesarios

Material	Número de catálogo	Cantidad
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS TCRα/β-Biotin	701-48	1 vial
CliniMACS Anti-Biotin Reagent	173-01	2 viales
CliniMACS Depletion Tubing Set	261-01	1 set de tubos
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	Hasta 4 bolsas de 1000 mL[1]

1 Antes del uso, enriquezca el CliniMACS PBS/EDTA Buffer con HSA hasta una concentración final del 0,5% (p/v).

Tabla 6.39: Materiales CliniMACS necesarios para la depleción de células TCRα/β positivas

Materiales adicionales necesarios

- **Cell Preparation Bag:**
  una bolsa de transferencia de 600 mL, aptas para la centrifugación, así como un Sampling Site Coupler y dos sets de transferencia de plasma, para el uso durante la preparación celular
- **Plasma Waste Bags y Wash Waste Bags:**
  cuatro bolsas de transferencia de 600 mL (o de 1000 mL) aptas para el centrifugado
- **Cell Collection Bag:**
  una Cell Collection Bag de 600 mL ya está conectada al CliniMACS Depletion Tubing Set.
- un pre-filtro
- pinzas de cierre
- jeringas (diferentes tamaños) y agujas hipodérmicas de calibre 20
- albúmina de suero humana (HSA) para añadirla al CliniMACS PBS/EDTA Buffer hasta una concentración final del 0,5% (p/v)
- tubos de muestras

▶ Preparación de las bolsas

Determine el peso de la Cell Collection Bag y de la Cell Preparation Bag vacías como se describe en la sección 7.1.1 en la página 119.

Marcaje magnético de las células

Para una descripción detallada de los pasos siguientes, consulte la sección 7.1 «PASO 1: Preparación y marcaje magnético de las células» en la página 119.

▶ Análisis del producto celular inicial

Determine el porcentaje/número total de todas las células TCRα/β marcadas (incluyendo uniones TCRα/β inespecíficas, no solo células TCRα/β positivas reales). Considere este número para las especificaciones de la aplicación y la introducción de parámetros de muestra (ver PASO 2).

▶ Transferencia del producto celular inicial a la Cell Preparation Bag

▶ Dilución del producto celular inicial

Añada solución tampón: Peso de solución tampón a añadir = peso del producto celular inicial × 2

▶ Centrifugado

1. Centrifugue a 200×g, sin freno, 15 minutos, a temperatura ambiente (TA: +19 °C a +25 °C [+66 °F a +77 °F]).
2. Elimine el sobrenadante.

▶ Ajuste de volumen: volumen de marcaje 95 g (±5 g)

1. Elimine completamente el sobrenadante, prestando atención de no resuspender el precipitado celular.
2. Resuspenda el precipitado celular con cuidado tras eliminar el sobrenadante.
3. Ajuste el peso de la Cell Preparation Bag (CPB) añadiendo solución tampón y utilizando la siguiente ecuación: Peso objetivo de la CPB llena = 95 g + peso de la CPB vacía
4. Resuspenda el precipitado celular.

▶ Marcaje de las células: incubación con CliniMACS TCRα/β-Biotin

1. Añada 1 vial de CliniMACS TCRα/β-Biotin. Mezcle los contenidos suavemente.
2. Incube en un agitador orbital (25 rpm) durante 30 minutos a temperatura ambiente.

▶ Eliminación del exceso de conjugado: repita este paso

1. Llene la Cell Preparation Bag con solución tampón.
2. Centrifugue (300×g, sin freno, 15 minutos, TA).
3. Elimine la mayor cantidad posible de sobrenadante.
4. Resuspenda el precipitado celular y ajuste el volumen a 190 g después del segundo lavado.

▶ Marcaje magnético de las células: incubación con CliniMACS Anti-Biotin Reagent

1. Añada 2 viales de CliniMACS Anti-Biotin Reagent. Mezcle los contenidos suavemente.
2. Incube en un agitador orbital (25 rpm) durante 30 minutos a temperatura ambiente.

▶ **Eliminación del exceso de reactivo**

1. Llene la Cell Preparation Bag con solución tampón.
2. Centrifugue (300×g, sin freno, 15 minutos, TA).
3. Elimine la mayor cantidad posible de sobrenadante. **Nota:** Elimine al menos 500 g de sobrenadante. Si el sobrenadante eliminado es inferior a 500 g, se recomienda realizar un total de dos lavados (en lugar de solo uno). De lo contrario, la eliminación del reactivo no unido puede ser insuficiente.
4. Resuspenda el precipitado celular.
5. Ajuste el volumen de carga de la muestra a 150 g. Se recomienda una concentración máxima de $0{,}4\times10^9$ WBC/mL.

6.15.2 PASO 2: Selección del programa de separación

▶ **Encender el CliniMACS Plus Instrument**

▶ **Selección del programa de separación DEPLETION 3.1.**

▶ **Introducción de los parámetros de la muestra**

Consulte la sección 7.2.6 en la página 146.

6.15.3 PASO 3: Instalación de sets de tubos CliniMACS

▶ **CliniMACS Depletion Tubing Set**

Consulte la sección 7.3.3 en la página 172.

6.15.4 PASO 4: Separación CliniMACS Plus

▶ **Procedimiento de separación**

▶ **Desconexión de las bolsas y registro del código del proceso**

▶ **Descarga del set de tubos y apagado**

▶ **Análisis celular**

Consulte la sección 7.4.5 en la página 203.

6.16 Depleción de células CD45RA positivas

El CliniMACS Plus CD45RA System con el CliniMACS Plus Instrument, el CliniMACS CD45RA Reagent, el CliniMACS Depletion Tubing Set y el CliniMACS PBS/EDTA Buffer están destinados a la depleción *in vitro* de células humanas CD45RA positivas de poblaciones celulares hematológicas heterogéneas.

6.16.1 PASO 1: Preparación y marcaje magnético de las células

Primeras acciones necesarias

Capacidad de la aplicación

Hasta 20×10^9 células CD45RA positivas desde un total de hasta 50×10^9 células (WBC)

⚠ ATENCIÓN

Riesgo de rendimiento insuficiente de separación de células marcadas. Si se superan las especificaciones de la aplicación, hay riesgo de que el marcaje específico sea insuficiente. Utilice la cantidad necesaria de células y de reactivo según lo descrito para la aplicación correspondiente.

Materiales CliniMACS necesarios

Material	Número de catálogo	Cantidad
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS CD45RA Reagent	701-46	1 vial
CliniMACS Depletion Tubing Set	261-01	1 set de tubos
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	3 bolsas de 1000 mL[1]

1 Antes del uso, enriquezca el CliniMACS PBS/EDTA Buffer con HSA hasta una concentración final del 0,5% (p/v).

Tabla 6.40: Materiales CliniMACS necesarios para la depleción de células CD45RA positivas

Materiales adicionales necesarios

- **Cell Preparation Bags:**
  una bolsa de transferencia de 600 mL, aptas para la centrifugación, así como un Sampling Site Coupler y dos sets de transferencia de plasma, para el uso durante la preparación celular
- **Plasma Waste Bags y Wash Waste Bags:**
  dos bolsas de transferencia de 600 mL aptas para el centrifugado
- **Cell Collection Bag:**
  una Cell Collection Bag de 600 mL ya está conectada al CliniMACS Depletion Tubing Set.
- un pre-filtro

- pinzas de cierre
- jeringas (diferentes tamaños) y agujas hipodérmicas de calibre 20
- albúmina de suero humana (HSA) para añadirla al CliniMACS PBS/EDTA Buffer hasta una concentración final del 0,5% (p/v)
- tubos de muestras

IMPORTANTE

Una fuente alternativa de células iniciales puede ser la fracción de células no diana de una separación CliniMACS® CD34. La utilización del CliniMACS CD45RA Reagent solo se recomienda para productos celulares iniciales que contengan células CD45RA positivas dentro del intervalo de frecuencias normal (hasta un 80%). Se han observado frecuencias mayores en unos pocos donantes, en los que CD45RA se expresa por casi todas las PBMC debido a una rara mutación dentro del gen CD45. En estos casos, la eficiencia de depleción o la recuperación pueden resultar inadecuadas.

▶ Preparación de las bolsas

Determine el peso de la Cell Collection Bag y de la Cell Preparation Bag vacías como se describe en la sección 7.1.1 en la página 119.

Marcaje magnético de las células

Para una descripción detallada de los pasos siguientes, consulte la sección 7.1 «PASO 1: Preparación y marcaje magnético de las células» en la página 119.

▶ Análisis del producto celular inicial

Determine el porcentaje/número total de todas las células marcadas con CD45RA (incluyendo uniones CD45RA inespecíficas, no solo células CD45RA positivas reales). Considere este número para las especificaciones de la aplicación y la introducción de parámetros de muestra (ver PASO 2).

▶ Transferencia del producto celular inicial a la Cell Preparation Bag

▶ Dilución del producto celular inicial reducido

Añada solución tampón: Peso de solución tampón a añadir = peso del producto celular inicial × 2

▶ Centrifugado

Centrifugue a 200×g, sin freno, 15 minutos, a temperatura ambiente (TA: +19 °C a +25 °C [+66 °F a +77 °F]).

Si se utiliza la fracción de células no diana de una separación CliniMACS CD34 como fuente celular inicial alternativa, se puede omitir el paso de dilución. Continué con el paso de centrifugado y centrifugue las células a 300×g (sin freno) durante 15 minutos a TA.

▶ Ajuste de volumen: volumen de marcaje 95 g (±5 g)

1. Elimine completamente el sobrenadante, prestando atención de no resuspender el precipitado celular.
2. Resuspenda el precipitado celular con cuidado tras eliminar el sobrenadante.
3. Ajuste el peso de la Cell Preparation Bag (CPB) añadiendo solución tampón y utilizando la siguiente ecuación: Peso objetivo de la CPB llena = 95 g + peso de la CPB vacía
4. Resuspenda el precipitado celular.

▶ Incubación con CliniMACS CD45RA Reagent

1. Añada 1 vial de CliniMACS CD45RA Reagent. Mezcle los contenidos suavemente.
2. Incube en un agitador orbital (25 rpm) durante 30 minutos a temperatura ambiente.

▶ Eliminación del exceso de reactivo

1. Llene la Cell Preparation Bag con solución tampón.
2. Centrifugue (300×g, sin freno, 15 minutos, TA).
3. Elimine la mayor cantidad posible de sobrenadante. **Nota:** Elimine al menos 500 g de sobrenadante. Si el sobrenadante eliminado es inferior a 500 g, se recomienda realizar un total de dos lavados (en lugar de solo uno). De lo contrario, la eliminación del reactivo no unido puede ser insuficiente.
4. Resuspenda el precipitado celular.
5. Ajuste el volumen de carga de la muestra. Calcule el peso necesario de la solución tampón para ajustar el peso de la suspensión celular a aproximadamente 125 g. La concentración celular no debe superar $0{,}4\times10^9$ WBC/mL: Peso de solución tampón a añadir (g) = 125 g – peso del producto celular tras el lavado (g)

6.16.2 PASO 2: Selección del programa de separación

▶ Encender el CliniMACS Plus Instrument

▶ Selección del programa de separación DEPLETION 3.1.

▶ Introducción de los parámetros de la muestra

Consulte la sección 7.2.6 en la página 146.

6.16.3 PASO 3: Instalación de sets de tubos CliniMACS

- **CliniMACS Depletion Tubing Set**

Consulte la sección 7.3.3 en la página 172.

6.16.4 PASO 4: Separación CliniMACS Plus

- **Procedimiento de separación**
- **Desconexión de las bolsas y registro del código del proceso**
- **Descarga del set de tubos y apagado**
- **Análisis celular**

Consulte la sección 7.4.5 en la página 203.

6.17 Enriquecimiento de células humanas secretoras de IFN γ con el CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma)

El CliniMACS Plus CCS (IFN-gamma) System con el CliniMACS Plus Instrument, el CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma), el CliniMACS Tubing Set y el CliniMACS PBS/EDTA Buffer están destinados al enriquecimiento *in vitro* de células humanas secretoras de IFN γ de poblaciones celulares hematológicas heterogéneas.

6.17.1 PASO 1: Preparación y marcaje magnético de las células

Primeras acciones necesarias

Capacidad de la aplicación

Células secretoras de IFN γ desde un total de hasta 1×10^9 células (WBC)

⚠ ATENCIÓN

Riesgo de rendimiento insuficiente de separación de células marcadas. Si se superan las especificaciones de la aplicación, hay riesgo de que el marcaje específico sea insuficiente. Utilice la cantidad necesaria de células y de reactivo según lo descrito para la aplicación correspondiente.

Materiales CliniMACS necesarios

Material	Número de catálogo	Cantidad
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma)	279-01	1 set
CliniMACS Tubing Set	161-01	1 set de tubos
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	3 bolsas de 1000 mL[1]

1 Antes del uso, enriquezca el CliniMACS PBS/EDTA Buffer con HSA hasta una concentración final del 0,5% (p/v).

Tabla 6.41: Materiales CliniMACS necesarios para enriquecer células humana secretoras de IFN γ

IMPORTANTE

Conserve la solución tampón para la preparación celular refrigerada a entre +2 y +8 °C (+36 °F a +46 °F). Las temperaturas ambiente inferiores o superiores pueden reducir la pureza y el rendimiento de las células diana.

Materiales adicionales necesarios

- **Cell Preparation Bags:**
  dos bolsas de transferencia de 600 mL aptas para la centrifugación, así como dos Sampling Site Coupler y dos sets de transferencia de plasma, para el uso durante la preparación celular
- **Plasma Waste Bags y Wash Waste Bags:**
  nueve bolsas de transferencia de 600 mL aptas para el centrifugado
- **Medium Bag:**
  ocho bolsas de transferencia de 600 mL aptas para el centrifugado
- **Cell Collection Bag (Parte 2):**
  una bolsa de transferencia de 150 mL apta para el centrifugado en combinación con un Luer/Spike Interconnector, para conectar la bolsa de transferencia al set de tubos
- una bolsa de cultivo celular de 100 mL permeable a gases
- un pre-filtro
- pinzas de cierre
- jeringas (diferentes tamaños) y agujas hipodérmicas de calibre 20
- albúmina de suero humana (HSA) para añadirla al CliniMACS PBS/EDTA Buffer hasta una concentración final del 0,5% (p/v)
- tubos de muestras
- 120 mL de suero AB o, en su defecto, suero autólogo, como complemento de los medios utilizados
- 1000 mL de medio de cultivo celular (RPMI 1640), +4 °C (+39 °F)
- 1100 mL de medio de cultivo celular (RPMI 1640), +37 °C (+99 °F) enriquecido con 10% (v/v) de suero AB o, en su defecto, suero autólogo

- 500 mL de medio de cultivo celular (RPMI 1640), +4 °C (+39 °F) enriquecido con 2% (v/v) de suero AB o, en su defecto, suero autólogo

▶ Equipo necesario

Encontrará información relativa al equipo necesario para una separación CliniMACS Plus en la sección 4.7.

Equipamiento adicional necesario para una aplicación utilizando el CliniMACS Plus CCS (IFN-gamma) System:

- Placa de cultivo de 24 pocillos
- Unidad de separación MiniMACS
- MS Columns
- Filtro de preseparación (solo para MS Columns)
- MACSmix Tube Rotator

▶ Preparación de las bolsas

Determine el peso de la Cell Collection Bag y de la Cell Preparation Bag vacías como se describe en la sección 7.1.1 en la página 119.

Nota: Enfríe previamente la centrífuga a +4 °C (+39 °F). Después de la fase de secreción, es necesaria una tercera Cell Preparation Bag para recombinar las suspensiones celulares. Por lo tanto, rotule una de las cuatro bolsas de transferencia de 600 mL (preparada con 125 mL de medio [RPMI] enriquecido con 10% de suero AB) con **Preparación celular n.° 3 (separación)**.

Preparación del producto celular inicial

Las siguientes secciones describen el procedimiento recomendado en bolsa para la preparación del producto celular inicial utilizando el conector de tubos estéril.

- El operario debe estar familiarizado con el funcionamiento y el uso del conector de tubos estéril.
- Antes de iniciar el marcaje y la separación celular, asegúrese de tener a mano todos los suministros y equipos necesarios.

Transferencia del producto celular inicial a la Cell Preparation Bag n.° 1

1. Anote la fecha y la hora de inicio antes de comenzar a preparar el producto celular inicial.
2. Determine el volumen del producto inicial celular original calculando 1 mL de producto original como equivalente a 1 g (1 g ≙ 1 mL).
3. Sujete la bolsa que contiene el producto celular inicial con ambas manos y mezcle bien el contenido mediante un suave movimiento de rotación.

4. Conecte la Cell Preparation Bag n.° 1 con el conector de tubo estéril a la bolsa que contiene el producto celular inicial.

5. Abra las pinzas de cierre para transferir el peso adecuado del producto celular inicial (que contiene un máximo de 1×10^9 células, según la frecuencia de leucocitos determinada anteriormente) a la Cell Preparation Bag n.° 1. Compruebe visualmente (mediante la balanza) que se haya transferido el peso adecuado. Cierre las pinzas de cierre de la Cell Preparation Bag.

6. Selle el tubo y separe las bolsas, dejando al menos 15 cm de tubo en la Cell Preparation Bag n.° 1 para posteriores conexiones. (ver Figura 6.1). Utilice el sellador térmico para crear tres selladuras adyacentes en el tubo. Asegúrese de que las selladuras sean estancas. Corte por la selladura central. Conserve la bolsa con el producto celular inicial hasta que hayan concluido la separación y el análisis final de todas las células.

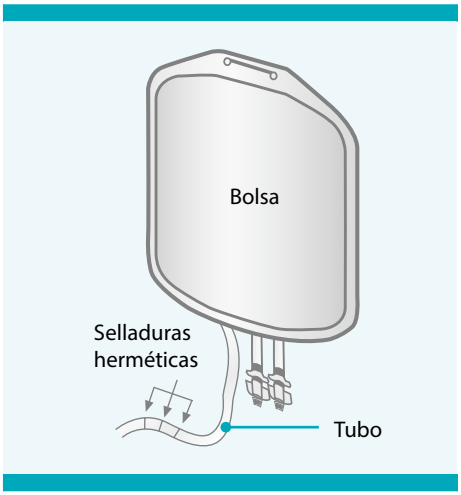


Figura 6.1: Sellado de una bolsa

7. Tare la balanza. Coloque la Cell Preparation Bag n. 1 llena sobre la balanza y deje el tubo sobre la mesa. Anote el peso de la Cell Preparation Bag n.° 1 llena.

8. Determine el peso del producto celular inicial restando el peso de la Cell Preparation Bag n.° 1 vacía del peso de la Cell Preparation Bag n.° 1 llena con el producto celular inicial original. Anote el peso calculado.

Peso del producto celular inicial (g)	=	Peso de la Cell Preparation Bag n.° 1 llena	–	Peso de la Cell Preparation Bag n.° 1 vacía

Dilución del producto celular inicial

El producto celular inicial se debe diluir con medio de cultivo. Diluya el producto con medio frío (+2 °C a +8 °C [+36 °F a +46 °F]) hasta un volumen total de 500 mL. Calcule el peso del medio que se debe añadir con la siguiente ecuación y anótelo.

Peso del medio a añadir (g)	=	500 g	–	Peso del producto celular inicial diluido (g)

1. Tome una de las Medium Bags y conéctela a la Cell Preparation Bag n.° 1 con el conector de tubos estéril.

2. Coloque la Cell Preparation Bag n.° 1 en la balanza y tare la balanza. Cuelgue la Medium Bag en un gancho.

3. Abra las pinzas de cierre de la Cell Preparation Bag n.° 1. Transfiera el peso calculado del medio a la Cell Preparation Bag n.° 1 al tiempo que controla visualmente la indicación de la balanza.

4. Una vez transferido el peso adecuado de medio, cierre las pinzas de cierre de la Cell Preparation Bag n.° 1 para detener el flujo de líquido.
5. Selle el tubo con el sellador térmico, dejando al menos 15 cm de tubo en la Cell Preparation Bag n.° 1 para posteriores conexiones. Desconecte la Medium Bag.
6. Sujete la Cell Preparation Bag n.° 1 con ambas manos y mezcle bien el contenido mediante un suave movimiento de rotación. Evite mezclar intensamente las células.
7. Tare la balanza y pese la Cell Preparation Bag n.° 1 llena. Anote el peso.
8. Determine el peso del producto celular inicial diluido restando el peso de la Cell Preparation Bag n.° 1 vacía del peso de la Cell Preparation Bag n.° 1 llena. Anote el peso calculado.

Peso del producto celular inicial diluido (g)	=	Peso de la Cell Preparation Bag n.° 1 llena (g)	–	Peso de la Cell Preparation Bag n.° 1 vacía (g)

⚠ ADVERTENCIA

Riesgo de contaminación. Si las bolsas no son adecuadas para la preparación celular o no se colocan correctamente en la cubeta de la centrífuga, hay riesgo de contaminación por daños de la bolsa. Utilice bolsas adecuadas, pliegue las partes sueltas de las bolsas o los tubos hacia abajo, prestando atención de no afectar la integridad de la bolsa e introduzca las bolsas firmemente en la cubeta de la centrífuga.

⚠ ATENCIÓN

Riesgo de un menor rendimiento de separación celular. Si las bolsas no se introducen correctamente en la cubeta de la centrífuga, hay riesgo de pérdida celular durante la eliminación del sobrenadante. Pliegue las partes sueltas de las bolsas o de los tubos hacia abajo e introduzca las bolsas firmemente en la cubeta de la centrífuga.

Centrifugado

1. Conecte la Plasma Waste Bag n.° 1 vacía a la Cell Preparation Bag n.° 1 con el conector de tubos estéril.
2. Pliegue las partes sueltas de la Cell Preparation Bag n.° 1 o del tubo hacia abajo. Introduzca las dos bolsas firmemente en la cubeta de la centrífuga.
3. Equilibre la cubeta cargada con una cubeta de peso adecuado. Es esencial que la centrífuga esté equilibrada con precisión.
4. Centrifugue las células a 200×g (sin freno) durante 10 minutos a temperatura ambiente (+19 °C a +25 °C [+66 °F a +77 °F]).
5. Retire las bolsas de la centrífuga, prestando atención de no resuspender el precipitado celular. Cargue la Cell Preparation Bag n.° 1 en el extractor de plasma.

6. Abra las pinzas de cierre de la Cell Preparation Bag n.° 1. Elimine completamente el sobrenadante prestando atención de no resuspender el precipitado celular. Una vez eliminado el sobrenadante, cierre las pinzas de cierre de la Cell Preparation Bag n.° 1 para detener el flujo de líquido.
7. Selle el tubo con el sellador térmico, dejando al menos 15 cm de tubo en la Cell Preparation Bag n.° 1 para posteriores conexiones. Desconecte la Plasma Waste Bag n.° 1.
8. Repita la dilución y el centrifugado utilizando la segunda Medium Bag preparada con medio frío y la Plasma Waste Bag n.° 2.
9. Conserve todas las Plasma Waste Bags hasta que hayan concluido la separación y el análisis final de todas las células.

Ajuste de volumen

1. Para la reestimulación de las células *in vitro*, el volumen de la muestra celular se debe ajustar a 100 mL. Una vez eliminado el sobrenadante, resuspenda el precipitado con cuidado.
2. Ajuste el peso de la Cell Preparation Bag n.° 1 añadiendo medio de cultivo. Calcule el peso del medio que se debe añadir utilizando la siguiente ecuación.

Peso de la Cell Preparation Bag n.° 1 llena tras el ajuste de volumen (g)	=	100 g	+	Peso de la Cell Preparation Bag n.° 1 vacía (g)

3. Conecte con el conector de tubos estéril la Cell Preparation Bag n.° 1 a la Medium Bag 10% preparada (que contiene 600 mL de medio de cultivo precalentado enriquecido con 10% de suero AB). Cuelgue la Medium Bag 10% en un gancho.
4. Tare la balanza. Coloque la Cell Preparation Bag n.° 1 con el precipitado celular en la balanza.
5. Abra las pinzas de cierre de la Cell Preparation Bag n.° 1. Llene la Cell Preparation Bag n.° 1 con medio hasta alcanzar el «Peso de la Cell Preparation Bag n. 1 llena tras el ajuste de volumen». Cierre las pinzas de cierre de la Cell Preparation Bag n.° 1 para detener el flujo de líquido.
6. Selle el tubo con el sellador térmico, dejando al menos 15 cm de tubo en la Cell Preparation Bag para posteriores conexiones. Desconecte la Medium Bag 10%.
7. Conecte la Cell Preparation Bag n.° 1 con el conector de tubo estéril a una bolsa de cultivo de 100 mL permeable a los gases. Abra las pinzas de cierre de la Cell Preparation Bag n.° 1 y transfiera completamente el contenido.

⚠ ATENCIÓN

Riesgo de rendimiento menor. Si las bolsas no son adecuadas para la preparación celular, hay riesgo de contaminación por daños de la bolsa. Utilice bolsas de cultivo permeables a los gases, adecuadas para la preparación celular.

Marcaje de células

Un CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma), que consta de dos viales (7,5 mL cada uno), está listo para el uso y es suficiente para una aplicación como se describe a continuación. Los reactivos no son para la administración parenteral.

Muestra objetivo y muestra de control

El protocolo describe el procedimiento de marcaje de la «muestra objetivo» y de la «muestra de control». Ambas muestras se procesan en paralelo; la muestra de control se trata exactamente igual que la muestra objetivo, pero sin adición de antígeno. Por lo tanto, el análisis de la muestra de control proporciona información sobre la secreción espontánea de citocinas.

Reestimulación *in vitro*

IMPORTANTE

- *Para determinar la secreción espontánea de citocinas, se deberá incluir una pequeña muestra de control negativo (muestra de control), tratada exactamente igual que la muestra objetivo estimulada con antígeno pero sin adición de antígeno.*
- *Para la reestimulación in vitro, la densidad celular óptima es de 0,5-1×10^9 células/cm^2 y 1×10^9 células/mL.*

1. Con una jeringa estéril (1 mL) y una aguja de calibre 20, extraiga una pequeña cantidad (p. ej., 1 mL = aprox. 1×10^9 células) de las células para utilizarla como **muestra de control (sin estimular)**.
2. Cultive esta muestra en condiciones óptimas en un pocillo de una placa de cultivo de 24 pocillos.
3. Inyecte con una jeringa y por medio de una de las conexiones el antígeno en las células de la bolsa de cultivo celular permeable a los gases **(muestra objetivo)**, a una concentración predeterminada.
4. Incube ambas muestras a +37 °C (+99 °F) y con un 5–7,5% de CO^2 durante un tiempo adecuado en el incubador. Si se utilizan proteínas o lisados celulares como antígenos, el tiempo de incubación es de entre 4 y 16 horas. Para los péptidos, el tiempo de incubación es de 3 a 6 horas. Como las características específicas del antígeno afectan el tiempo de estimulación óptimo, Miltenyi Biotec recomienda llevar a cabo procedimientos de validación específicos a fin de obtener los mejores resultados.

Marcaje con el CliniMACS IFN-gamma Catchmatrix Reagent

Anote el número de lote y la fecha de caducidad del CliniMACS IFN-gamma Catchmatrix Reagent.

Muestra objetivo

IMPORTANTE

Para la fase de secreción, el recipiente elegido debe ser de tamaño adecuado para permitir la adición de al menos 1 volumen de solución tampón fría al final de la fase de secreción. La densidad celular no debe superar 1×10^6 células/mL. Por lo tanto, se deben incubar 1×10^9 células para la secreción en un total de 1000 mL de medio de cultivo caliente.

1. Conecte la bolsa de cultivo con el conector de tubos estéril a la Cell Preparation Bag n.° 2 (secreción) y transfiera las células. Asegúrese de que las células se hayan transferido completamente a la Cell Preparation Bag n.° 2. Cierre las pinzas de cierre de la Cell Preparation Bag n.° 2 para detener el flujo de líquido.
2. Selle el tubo con el sellador térmico, dejando al menos 15 cm de tubo en la Cell Preparation Bag n.° 2 para posteriores conexiones. Desconecte la bolsa de cultivo vacía.
3. Conecte la Medium Bag 2% (que contiene 500 mL de medio de cultivo frío [+2 a +8 °C (+36 °F a +46 °F)] enriquecido con 2% de suero AB) con el conector de tubos estéril a la Cell Preparation Bag n.° 2.
4. Abra las pinzas de cierre de la Cell Preparation Bag n.° 2. Rellene la Cell Preparation Bag n.° 2 hasta 600 mL. Una vez transferido el peso adecuado de medio, cierre las pinzas de cierre de la Cell Preparation Bag n.° 2 para detener el flujo de líquido.
5. Selle el tubo con el sellador térmico, dejando al menos 15 cm de tubo en la Cell Preparation Bag n.° 2 para posteriores conexiones. Desconecte la Medium Bag 2%.
6. Utilice el sellador térmico para conectar la Wash Waste Bag n.° 1 vacía a la Cell Preparation Bag n.° 2.
7. Pliegue todas las partes sueltas de la bolsa o del tubo hacia abajo. Introduzca las dos bolsas firmemente en la cubeta de la centrífuga.
8. Equilibre la cubeta cargada con una cubeta de peso adecuado. Es esencial que la centrífuga esté equilibrada con precisión.
9. Centrifugue las células a 300×g (sin freno) durante 10 minutos a una temperatura de +4 °C a +8 °C (+39 °F a +46 °F).
10. Coloque la Cell Preparation Bag n.° 2 en el extractor de plasma. Abra las pinzas de cierre de la Cell Preparation Bag n.° 2. Elimine completamente el sobrenadante prestando atención de no alterar el precipitado celular. Cierre las pinzas de cierre de la Cell Preparation Bag n.° 2 para detener el flujo de líquido.
11. Selle el tubo con el sellador térmico, dejando al menos 15 cm de tubo en la Cell Preparation Bag n.° 2 para posteriores conexiones. Desconecte la Wash Waste Bag n.° 1.
12. Resuspenda el precipitado celular con el volumen residual tras eliminar el sobrenadante.

13. Conecte un Sampling Site Coupler a la Cell Preparation Bag n.° 2 y desinfecte la membrana de goma. Utilice una jeringa y una aguja estériles adecuadas para extraer 7,425 mL del vial de CliniMACS IFN-gamma Catchmatrix Reagent. Basta con una jeringa de 10 mL para extraer el contenido de un vial de reactivo. La jeringa debe disponer de una aguja de calibre 20.
14. Sujete la Cell Preparation Bag n.° 2 con ambas manos y mezcle bien el contenido mediante un suave movimiento de rotación.
15. Inyecte por la conexión del Sampling Site Coupler todo el volumen del reactivo en la Cell Preparation Bag n.° 2. Asegúrese de no perforar la bolsa.
16. Resuspenda las células e incúbelas durante 5 minutos en hielo. Anote el tiempo de incubación.

Muestra de control (no estimulada)

1. Transfiera las células a un tubo de 15 mL con tapón.
2. Añada medio de cultivo frío (+2 °C a +8 °C [+36 °F a +46 °F]) enriquecido con 2% de suero AB hasta los 15 mL.
3. Centrifugue las células a 300×g (sin freno) durante 10 minutos a una temperatura de +4 °C a +8 °C (+39 °F a +46 °F) y elimine con cuidado todo el sobrenadante.
4. Resuspenda el precipitado celular en 100 µL de medio de cultivo (+2 °C a +8 °C [+36 °F a +46 °F]) enriquecido con 2% de suero AB .
5. Añada los 75 µL restantes del CliniMACS IFN-gamma Catchmatrix Reagent e incube la suspensión durante 5 minutos en hielo.

Fase de secreción

Muestra objetivo

1. Tome las cuatro bolsas de transferencia llenadas previamente (incluida la Cell Preparation Bag n.° 3 rotulada) que contienen 125 mL de medio de cultivo templado (+37 °C [+99 °F]) enriquecido con 10% de suero AB.
2. Conecte la Cell Preparation Bag n.° 2 con el conector de tubos estéril a la Medium Bag 10% preparada (que contiene de medio de cultivo precalentado (+37 °C [+99 °F]) enriquecido con 10% de suero AB).
3. Añada 500 mL del medio de cultivo precalentado a la muestra de células de la Cell Preparation Bag n.° 2. Comience a contar inmediatamente el tiempo de incubación de 45 minutos.
4. Distribuya 125 mL de la suspensión celular resultante en cada una de las cuatro bolsas de transferencia, uniéndolas en serie a la Cell Preparation Bag n.° 2 con el conector de tubos estéril. Transfiera el peso adecuado de la suspensión celular al tiempo que controla la indicación de la balanza. Este procedimiento produce un total de 250 g de suspensión celular en cada una de las cuatro bolsas de transferencia. Después de la transferencia, selle los tubos con el sellador térmico para desconectar las bolsas de transferencia.

5. Incube las células a +37 °C (+99 °F) durante el resto de los 45 minutos con una rotación lenta continua (máximo 50 rpm) hasta que finalice el tiempo de incubación. Anote el tiempo de incubación.
6. Tome un set de transferencia de plasma y asegúrese de que la pinza esté cerrada. Inserte el punzón del set de transferencia de plasma en una conexión de la bolsa de solución tampón.
7. Una vez transcurridos los 45 minutos, conecte la bolsa de solución tampón con el conector de tubos estéril a la Cell Preparation Bag n.° 3. Añada solución tampón fría (+2 °C a +8 °C [+36 °F a +46 °F]) a cada una de las cuatro bolsas de transferencia (al menos un volumen, es decir, 250 mL cada una), conectándolas en serie a la bolsa de solución tampón. Deje que las células se enfríen, introduciendo las bolsas en hielo durante 10 minutos.
8. Utilizando el conector de tubos estériles, conecte una Wash Waste Bag (Wash Waste Bag núms. 2 a 5) a cada una de las cuatro bolsas de transferencia.
9. Centrifugue las células a 300×g, (sin freno) durante 10 minutos a +4 °C (+39 °F). Elimine completamente el sobrenadante de todas las bolsas con el extractor de plasma.
10. Utilice el sellador térmico para sellar el tubo de cada bolsa. Desconecte las Wash Waste Bags.
11. Tome un set de transferencia de plasma y asegúrese de que la pinza esté cerrada. Inserte el punzón del set de transferencia de plasma en una conexión de una bolsa de solución tampón.
12. Conecte la bolsa de solución tampón con el conector de tubos estéril a la Cell Preparation Bag n.° 3.
13. Abra la pinza del set de transferencia de plasma y llene la Cell Preparation Bag n.° 3 con 200 mL de solución tampón.
14. Una vez transferido el peso adecuado de solución tampón, cierre la pinza del set de transferencia de plasma para detener el flujo de líquido.
15. Selle el tubo con el sellador térmico, dejando al menos 15 cm de tubo en la Cell Preparation Bag n.° 3. Desconecte la bolsa de solución tampón.
16. Conecte con el conector de tubos estéril una de las otras tres bolsas de transferencia que contienen las células a la Cell Preparation Bag n.° 3 y recombine ambas suspensiones.

    IMPORTANTE
    Las muestras divididas se deben recombinar en la Cell Preparation Bag n.° 3 antes de centrifugarlas.
17. Repita este procedimiento hasta que las suspensiones celulares de las cuatro bolsas de transferencia se unan en la Cell Preparation Bag n.° 3.
18. Una vez unidas las células, conecte la bolsa de solución tampón con el conector de tubos estéril a la Cell Preparation Bag n.° 3.
19. Abra la pinza del set de transferencia de plasma. Rellene la Cell Preparation Bag con solución tampón hasta 500 mL.

20. Una vez transferido el peso adecuado de solución tampón, cierre la pinza del set de transferencia de plasma para detener el flujo de líquido. Cierre las pinzas de cierre de la Cell Preparation Bag n.° 3.
21. Selle el tubo con el sellador térmico entre las dos pinzas, dejando al menos 15 cm de tubo en la Cell Preparation Bag n.° 3 para posteriores conexiones. Desconecte la bolsa de solución tampón.
22. Conecte la Wash Waste Bag n.° 6 vacía a la Cell Preparation Bag n.° 3 con el conector de tubos estéril.
23. Pliegue las partes sueltas de la Cell Preparation Bag n.° 3 o del tubo hacia abajo. Introduzca las dos bolsas firmemente en la cubeta de la centrífuga.
24. Equilibre la cubeta cargada con una cubeta de peso adecuado. Es esencial que la centrífuga esté equilibrada con precisión.
25. Centrifugue las células a 300×g, (sin freno) durante 10 minutos a +4 °C (+39 °F).

Muestra de control (no estimulada)

1. Añada medio de cultivo templado (+37 °C [+99 °F °F]) enriquecido con 10% de suero AB para diluir la muestra a un máximo de 1×10^6 células/mL, es decir, se debe utilizar un volumen total de 10 mL para 1×10^9 células.
2. Incube las células en un tubo cerrado durante 45 minutos a +37 °C (+99 °F) con una rotación lenta y continua mediante el MACSmix Tube Rotator (máx. 50 rpm).
3. Transcurridos 45 minutos, llene el tubo con solución tampón fría (+4 °C [+39 °F]) e introduzca el tubo en hielo durante 5–10 minutos.
4. Centrifugue las células a 300×g (sin freno) durante 10 minutos a una temperatura de +4 °C a +8 °C (+39 °F a +46 °F).

Marcaje magnético con el CliniMACS IFN-gamma ENRICHMENT Reagent

Anote el número de lote y la fecha de caducidad del CliniMACS IFN-gamma Enrichment Reagent.

Muestra objetivo

1. Tras el paso de centrifugado, elimine cuidadosamente el sobrenadante con el extractor de plasma, como se ha descrito anteriormente y resuspenda la muestra en el volumen residual. Cierre las pinzas de cierre de la Cell Preparation Bag n.° 3 tras la eliminación.
2. Selle el tubo con el sellador térmico, dejando al menos 15 cm de tubo en la Cell Preparation Bag n.° 3 para posteriores conexiones. Desconecte la Wash Waste Bag n.° 6.

3. Conecte un Sampling Site Coupler a la Cell Preparation Bag n.° 3 y desinfecte la membrana de goma. Utilice una jeringa y una aguja estériles adecuadas para extraer 7,425 mL del vial de CliniMACS IFN-gamma Enrichment Reagent. Basta con una jeringa de 10 mL para extraer el contenido de un vial de reactivo. La jeringa debe disponer de una aguja de calibre 20.
4. Inyecte por la conexión del Sampling Site Coupler el reactivo en la Cell Preparation Bag n.° 3. Asegúrese de no perforar la bolsa. Comience a contar inmediatamente el tiempo de incubación de 15 minutos. Anote la hora de inicio de la incubación.
5. Sujete la Cell Preparation Bag con ambas manos y mezcle bien el contenido mediante un suave movimiento de rotación.
6. Incube las células durante 15 minutos en hielo. Anote la hora final de la incubación.
7. Conecte la bolsa de solución tampón con el conector de tubos estéril a la Cell Preparation Bag n.° 3.
8. Abra las pinzas de cierre de la Cell Preparation Bag n.° 3. Abra la pinza del set de transferencia de plasma. Llene la Cell Preparation Bag n.° 3 hasta 500 mL con solución tampón (+2 °C a +8 °C [+36 °F a +46 °F]).
9. Una vez transferido el peso adecuado de solución tampón, cierre la pinza del set de transferencia de plasma. Cierre las pinzas de cierre de la Cell Preparation Bag n.° 3. Utilice el sellador térmico para sellar el tubo entre las dos pinzas. Desconecte la bolsa de solución tampón.
10. Conecte la Wash Waste Bag n.° 7 vacía a la Cell Preparation Bag n.° 3 con el conector de tubos estéril.
11. Pliegue todas las partes sueltas de la bolsa o del tubo hacia abajo. Introduzca las dos bolsas firmemente en la cubeta de la centrífuga.
12. Equilibre la cubeta cargada con una cubeta de peso adecuado. Es esencial que la centrífuga esté equilibrada con precisión.
13. Centrifugue a 300×g, (sin freno) durante 10 minutos a +4 °C (+39 °F).
14. Elimine con cuidado el sobrenadante como se ha descrito anteriormente y resuspenda las células en 100 mL de solución tampón fría (+2 °C a +8 °C [+36 °F a +46 °F]).
15. Desinfecte la membrana de goma del Sampling Site Coupler. Inserte una jeringa adecuada con una aguja en el Sampling Site Coupler de la Cell Preparation Bag y extraiga un volumen de 0,5 mL del producto marcado. Asegúrese de no perforar la bolsa. Transfiera la muestra a un tubo de muestras. Rotule el tubo con «MUESTRA OBJETIVO ORIGINAL» (debe incluir la identificación del paciente).

   IMPORTANTE

   Asegúrese de mezclar bien las células antes de extraer la muestra. A fin de obtener una muestra representativa, utilice una jeringa con una capacidad de al menos 5 mL.

16. Conserve la muestra de células para el análisis refrigerada (+2 °C a +8 °C [+36 °F a +46 °F]).

Muestra de control (no estimulada)

1. Tras el centrifugado, elimine el sobrenadante.
2. Resuspenda las células en 100 µL de solución tampón fría (+2 °C a +8 °C [+36 °F a +46 °F]).
3. Añada 75 µL del CliniMACS IFN-gamma Enrichment Reagent restante.
4. Incube las células durante 15 minutos en hielo.
5. Llene la cubeta con solución tampón fría (+2 °C a +8 °C [+36 °F a +46 °F]) y centrifugue a 300×g (sin freno) durante 10 minutos a +4 °C (+39 °F).
6. Elimine con cuidado el sobrenadante y resuspenda las células en 1 mL de solución tampón fría (+2 °C a +8 °C [+36 °F a +46 °F]).
7. Extraiga una pequeña muestra (aprox. 100 µL) de la suspensión celular y transfiérala a un tubo rotulado con «FRACCIÓN DE MUESTRA DE CONTROL ORIGINAL» antes de proceder a la separación. Almacénela refrigerada hasta el análisis.

Separación magnética

Muestra diana

La separación magnética de la muestra diana se lleva a cabo con el CliniMACS Plus Instrument. Después del procedimiento de separación, procese la muestra de control como se describe a continuación.

Muestra de control (no estimulada)

1. Prepare dos MS Columns lavándolas con 500 µL de solución tampón fría (+2 °C a +8 °C [+36 °F a +46 °F]) y elimine el efluyente.
2. Introduzca la primera columna en el campo magnético del MiniMACS Separator.
3. Haga pasar las células por un filtro de preseparación para eliminar los aglutinados.
4. Aplique la suspensión celular sobre la columna.
5. Recoja el efluyente total (que contiene la fracción celular no marcada). Lave la columna añadiendo 500 µl de solución tampón fría a la columna. Realice un total de tres pasos de lavado aplicando sucesivamente 500 µl de solución tampón a la columna una vez que el depósito de la columna esté vacío.
6. Retire la columna del separador, introduzca la segunda columna en el separador y coloque la primera columna encima de la segunda.

7. Pipetee 1 mL de solución tampón fría en la primera columna. Eluya inmediatamente la fracción con las células marcadas magnéticamente aplicando firmemente el émbolo suministrado con la columna directamente sobre la segunda columna.
8. Recoja las células no marcadas que atraviesen la columna y lave la columna con 500 µl de solución tampón fría. Realice un total de tres pasos de lavado, aplicando sucesivamente 500 µl de solución tampón a la columna una vez que el depósito de la columna esté vacío.
9. Retire la segunda columna del separador y coloque la columna en un tubo adecuado rotulado con «Fracción positiva».
10. Pipetee 0,5 mL de solución tampón fría en la columna. Eluya inmediatamente la fracción con las células marcadas magnéticamente, aplicando firmemente el émbolo suministrado con la columna.
11. Mantenga la fracción de células diana refrigerada hasta el análisis.

6.17.2 PASO 2: Selección del programa de separación

- **Selección del programa de separación ENRICHMENT 3.2.**

Consulte la sección 7.2.4 en la página 139.

6.17.3 PASO 3: Instalación de sets de tubos CliniMACS

- **CliniMACS Tubing Set y CliniMACS Tubing Set LS**

Consulte la sección 7.3.1 en la página 152.

6.17.4 PASO 4: Separación CliniMACS Plus

- **Procedimiento de separación**
- **Desconexión de las bolsas y registro del código del proceso**
- **Descarga del set de tubos y apagado**
- **Análisis celular**

Consulte la sección 7.4.3 en la página 195.

7 Explicación detallada de los PASOS 1–4

7.1 PASO 1: Preparación y marcaje magnético de las células

En este capítulo se proporcionan explicaciones detalladas de los procedimientos necesarios para la separación celular con el sistema CliniMACS Plus.

7.1.1 Primeras acciones necesarias

Consulte los materiales necesarios para una aplicación concreta en la sección específica de la aplicación (consulte la sección 5.2 en la página 37).

Preparación del CliniMACS PBS/EDTA Buffer

Suplemente CliniMACS PBS/EDTA Buffer con HSA hasta una concentración final del 0,5% (p/v).

Preparación de las bolsas

Consulte las bolsas necesarias en la sección específica de la aplicación:

- **Cell Preparation Bag:** Inserte un Sampling Site Coupler (o equivalente) en la conexión externa de la Cell Preparation Bag. Coloque unas pinzas en el tubo de la bolsa y cierre las pinzas. Pese la Cell Preparation Bag vacía con las pinzas de cierre colocadas cerca de la bolsa y con el tubo colgando sobre la mesa, al lado de la balanza. Anote el peso.

  IMPORTANTE
  Dado que la longitud del tubo puede variar durante la preparación, preste atención al determinar el peso de la Cell Preparation Bag. Para obtener una lectura precisa, confirme que las pinzas de cierre estén siempre colocadas cerca de la bolsa y descansen sobre la balanza y que el resto de los tubos se encuentren en la mesa, al lado de la balanza.

- **Cell Collection Bag:**
  - CliniMACS Tubing Set/CliniMACS Tubing Set LS: Inserte un Luer/Spike Interconnector (o equivalente) en la conexión externa de la Cell Collection Bag. Coloque unas pinzas en el tubo de la bolsa y cierre las pinzas. Pese la Cell Collection Bag vacía con las pinzas de cierre colocadas cerca de la bolsa y el tubo colgando sobre la mesa, al lado de la balanza. Anote el peso.
  - CliniMACS Depletion Tubing Set: Ya hay conectada una Cell Collection Bag al set de tubos. Inserte un Luer/Spike Interconnector (o equivalente) en la conexión externa de la Cell Collection Bag. Coloque unas pinzas en el tubo

de la bolsa y cierre las pinzas. Pese la Cell Collection Bag vacía con las pinzas de cierre colocadas cerca de la bolsa y el tubo colgando sobre la mesa, al lado de la balanza. Anote el peso.

7.1.2 Marcaje magnético de las células

Las siguientes secciones describen el procedimiento recomendado en bolsa para la preparación del producto celular inicial con el conector de tubos estéril.

- El operario debe estar familiarizado con el funcionamiento y el uso del conector de tubos estéril.
- Antes de iniciar el marcaje y la separación celular, asegúrese de tener a mano todos los suministros y equipos necesarios.

IMPORTANTE

- *Toda manipulación de la bolsa se debe realizar en un entorno estéril (p. ej., campana de flujo de aire laminar) utilizando técnicas asépticas. La conexión de los tubos mediante el conector de tubos estéril se puede realizar fuera de la campana de flujo de aire laminar.*
- *Realice la preparación de la muestra y la separación de las células en las condiciones de temperatura definidas en la sección específica de la aplicación. Las temperaturas ambiente inferiores o superiores reducirán la pureza y el rendimiento de las células diana.*

De forma resumida, el marcaje magnético del producto celular se realiza mediante los pasos siguientes:

1. Análisis del producto celular inicial
2. Transferencia del producto celular inicial a la Cell Preparation Bag
3. Dilución del producto celular inicial
4. Centrifugado
5. Solo para el CliniMACS Plus Anti-Biotin System y el CliniMACS Plus TCRα/β-Biotin System: marcaje de las células (incubación con el anticuerpo primario/CliniMACS TCRα/β-Biotin) y eliminación del exceso de conjugado (1.er lavado)
6. Ajuste de volumen
7. Solo para los Sistemas CliniMACS Plus CD3 y CD3/CD19: inmunoglobulina de grado clínico
8. Marcaje magnético de las células (incubación con CliniMACS Reagent)
9. Eliminación del exceso de reactivo
10. Ajuste de volumen para la separación celular

Análisis del producto celular inicial

Antes de comenzar con la preparación del producto celular inicial, determine los siguientes parámetros:

- número total de leucocitos
- porcentaje de células que se debe marcar
- número total de leucocitos que se debe marcar
- viabilidad

Asegúrese de trabajar en los límites de especificación de la aplicación.

Vuelva a comprobar los parámetros después del marcaje. Esto es necesario para los programas de carga por etapas (ENRICHMENT 1.1/DEPLETION 2.1/DEPLETION 3.1), ya que se deben introducir los siguientes tres parámetros de muestra durante la configuración del CliniMACS Plus Instrument, antes de cargar el set de tubos en el instrumento:

- concentración de leucocitos por mL
- porcentaje de células que se debe marcar
- volumen final de la muestra celular (volumen de carga de la muestra)

Pueden ser necesarias otras pruebas en función del uso previsto de las células (p. ej., número de linfocitos T, fenotipo). Anote todos los datos.

Transferencia del producto celular inicial a la Cell Preparation Bag

1. Anote la fecha y la hora de inicio antes de comenzar a preparar el producto celular inicial.
2. Determine el volumen del producto inicial celular original asumiendo 1 mL de producto inicial como equivalente a 1 g (1 g ≙ 1 mL).
3. Sujete la bolsa del producto celular inicial con ambas manos y mezcle bien el contenido mediante un suave movimiento de rotación.
4. Conecte la Cell Preparation Bag con el conector de tubos estéril a la bolsa del producto celular inicial original.
5. Abra las pinzas de cierre para transferir el producto celular inicial a la Cell Preparation Bag. Utilice un tubing stripper para expulsar la sangre residual de los tubos. Cierre las pinzas de cierre del tubo lo más cerca posible de la bolsa.

6. Selle el tubo y separe las bolsas, dejando al menos 15 cm de tubo en la Cell Preparation Bag para posteriores conexiones. (ver Figura 7.1). Utilice el sellador térmico para crear tres selladuras adyacentes en el tubo. Asegúrese de que las selladuras sean estancas. Corte por la selladura central. Conserve la bolsa de leucaféresis/de producto celular inicial hasta que hayan concluido la separación y el análisis final de todas las células.

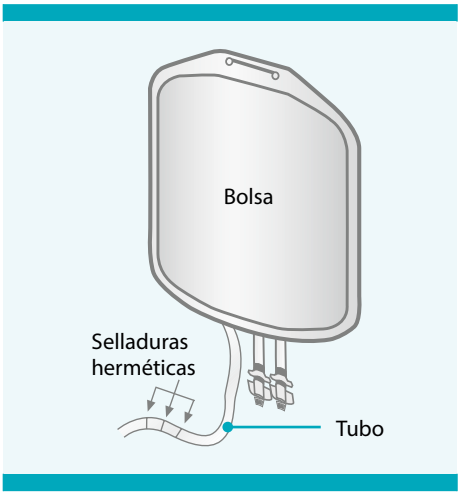


Figura 7.1: Sellado de una bolsa.

7. Para extraer una muestra, desinfecte la membrana de goma del Sampling Site Coupler. Mezcle los contenidos de la bolsa. Inserte una aguja con una jeringa adecuada en el Sampling Site Coupler de la Cell Preparation Bag y extraiga un volumen de 0,5 mL. Transfiera la muestra a un tubo de muestras. Rotule el tubo con «LEUCAFÉRESIS/PRODUCTO CELULAR INICIAL» (incluyendo la identificación del paciente) y consérvelo para el análisis celular.

   IMPORTANTE
   Asegúrese de mezclar bien el producto celular inicial antes de extraer la muestra. A fin de obtener una muestra representativa, utilice una jeringa con una capacidad de al menos 5 mL.

8. Tare la balanza. Coloque la Cell Preparation Bag llena sobre la balanza y deje el tubo sobre la mesa. Anote el peso.

9. Determine el peso del producto celular inicial restando el peso de la Cell Preparation Bag vacía del peso de la Cell Preparation Bag llena con el producto celular inicial. Anote el peso calculado.

Peso del producto celular inicial (g)	=	Peso de la Cell Preparation Bag llena (g)	–	Peso de la Cell Preparation Bag vacía (g)

Dilución del producto celular inicial

Consulte la proporción de dilución en la sección específica de la aplicación.

El producto celular inicial se debe diluir con CliniMACS PBS/EDTA Buffer (enriquecido con HSA hasta una concentración final del 0,5% [p/v]) antes del marcaje magnético. Calcule el peso de la solución tampón que se debe añadir mediante una de las ecuaciones siguientes (1 o 2), en función de la aplicación, y anótelo.

(1) Peso de solución tampón a añadir (g)	=	600 g	–	Peso del producto celular inicial (g)
(2) Peso de solución tampón a añadir (g)	=	Peso del producto celular inicial (g)	×	2

1. Tome un set de transferencia de plasma y asegúrese de que la pinza esté cerrada. Inserte el punzón del set de transferencia de plasma en una conexión de la bolsa de solución tampón.
2. Conecte la bolsa de solución tampón a la Cell Preparation Bag con el conector de tubos estéril. Cuelgue la bolsa de solución tampón en un gancho.
3. Coloque la Cell Preparation Bag en la balanza y tare la balanza.
4. Abra las pinzas de cierre de la Cell Preparation Bag. Abra la pinza del set de transferencia de plasma. Transfiera el peso calculado de la solución tampón a la Cell Preparation Bag, al tiempo que controla visualmente la indicación de la balanza.
5. Una vez transferido el peso adecuado de solución tampón, cierre la pinza del set de transferencia de plasma para detener el flujo de líquido. Cierre las pinzas de cierre del tubo lo más cerca posible de la bolsa.
6. Selle el tubo con el sellador térmico entre la pinza y las pinzas de cierre, dejando al menos 15 cm de tubo en la Cell Preparation Bag para posteriores conexiones. Desconecte la bolsa de solución tampón.
7. Sujete la Cell Preparation Bag con ambas manos y mezcle bien el contenido mediante un suave movimiento de rotación. Evite mezclar intensamente las células.
8. Tare la balanza y pese la Cell Preparation Bag llena. Anote el peso.
9. Determine el peso del producto celular inicial diluido restando el peso de la Cell Preparation Bag vacía del peso de la Cell Preparation Bag llena. Anote el peso calculado.

Peso del producto celular inicial diluido (g)	=	Peso de la Cell Preparation Bag llena (g)	–	Peso de la Cell Preparation Bag vacía (g)

Centrifugado

⚠ ADVERTENCIA

Riesgo de contaminación. Si las bolsas no son adecuadas para la preparación celular o no se colocan correctamente en la cubeta de la centrífuga, hay riesgo de contaminación por daños de la bolsa. Utilice bolsas adecuadas, pliegue las partes sueltas de las bolsas o los tubos hacia abajo, prestando atención de no afectar la integridad de la bolsa e introduzca las bolsas firmemente en la cubeta de la centrífuga.

⚠ ATENCIÓN

Riesgo de un menor rendimiento de separación celular. Si las bolsas no se introducen correctamente en la cubeta de la centrífuga, hay riesgo de pérdida celular durante la eliminación del sobrenadante. Pliegue las partes sueltas de las bolsas o de los tubos hacia abajo e introduzca las bolsas firmemente en la cubeta de la centrífuga.

1. Conecte la Plasma Waste Bag vacía con el conector de tubos estéril a la Cell Preparation Bag.
2. Pliegue las partes sueltas de la Cell Preparation Bag o del tubo hacia abajo. Introduzca las dos bolsas firmemente en la cubeta de la centrífuga.
3. Equilibre la cubeta cargada con una cubeta de peso adecuado. Es esencial que la centrífuga esté equilibrada con precisión.
4. Centrifugue las células en las condiciones definidas en la sección específica de la aplicación. Anote las condiciones de centrifugado.
5. Retire las bolsas de la centrífuga, prestando atención de no resuspender el precipitado celular. Cargue la Cell Preparation Bag en el extractor de plasma y coloque la bolsa de desechos conectada sobre la balanza de mesa.

Ajuste de volumen

Para el marcaje magnético de las células, el peso óptimo de los productos celulares varía en función de la aplicación. Consulte el volumen de marcaje en la sección específica de la aplicación.

Según la aplicación, puede ser necesario eliminar solo cierta cantidad de sobrenadante para alcanzar el volumen de marcaje (eliminación adaptada del sobrenadante) o eliminar todo el sobrenadante y añadir solución tampón para alcanzar el volumen de marcaje (eliminación completa del sobrenadante). Consulte la opción aplicable en la sección específica de la aplicación y continúe en consecuencia.

IMPORTANTE

- *Cuando utilice el extractor de plasma, controle constantemente el mango de liberación del extractor y asegúrese de que las pinzas de cierre de la Cell Preparation Bag estén abiertas antes de iniciar la transferencia. Libere el mango del extractor lentamente.*
- *Durante la eliminación del sobrenadante, preste atención de no eliminar también células.*

Eliminación adaptada del sobrenadante

Calcule el peso del sobrenadante que se debe eliminar para ajustar la muestra al volumen de marcaje con la siguiente ecuación:

Peso de sobrenadante a eliminar (g)	=	Peso del producto celular tras el lavado (g)	–	Volumen de marcaje

Anote el peso del sobrenadante que se debe eliminar.

1. Coloque la Plasma Waste Bag o la Wash Waste Bag n.° 1 vacía sobre la balanza y tare la balanza.

2. Abra las pinzas de cierre de la Cell Preparation Bag. Elimine el sobrenadante con el extractor de plasma al tiempo que controla la indicación de la balanza. Exprima con cuidado el sobrenadante hasta alcanzar el «peso de sobrenadante a eliminar» calculado.
3. Una vez eliminado el peso adecuado de sobrenadante, cierre las pinzas de cierre de la Cell Preparation Bag para detener el flujo de líquido. Anote el peso del sobrenadante eliminado.
4. Selle el tubo con el sellador térmico, dejando al menos 15 cm de tubo en la Cell Preparation Bag para posteriores conexiones. Desconecte la Plasma Waste Bag o la Wash Waste Bag n.° 1.
5. Resuspenda con cuidado las células de la Cell Preparation Bag. Evite mezclar intensamente las células. Asegúrese de que las células estén resuspendidas.
6. Tare la balanza y pese la Cell Preparation Bag llena. Anote el peso.
7. Determine el peso del producto celular tras el ajuste de volumen, restando el peso de la Cell Preparation Bag vacía del peso de la Cell Preparation Bag llena. Anote el peso calculado.

Peso del producto celular tras el ajuste de volumen (g)	=	Peso de la Cell Preparation Bag llena (g)	–	Peso de la Cell Preparation Bag vacía (g)

8. Conserve la Plasma Waste Bag o la Wash Waste Bag hasta que hayan concluido la separación final y el análisis de todas las células.

Eliminación completa del sobrenadante

Elimine completamente el sobrenadante prestando atención de no resuspender el precipitado celular durante la eliminación del sobrenadante. Una vez eliminado el sobrenadante, cierre las pinzas de cierre de la Cell Preparation Bag para detener el flujo de líquido. Selle el tubo con el sellador térmico, dejando al menos 15 cm de tubo en la Cell Preparation Bag para posteriores conexiones. Desconecte la Plasma Waste Bag. Resuspenda el precipitado con cuidado.

Ajuste el peso de la Cell Preparation Bag añadiendo solución tampón. Calcule el peso objetivo de la Cell Preparation Bag (CPB) llena de producto celular diluido con la siguiente ecuación:

Peso objetivo de la CPB llena de producto celular lavado (g)	=	Volumen de marcaje	+	Peso de la CPB vacía (g)

1. Inserte el punzón del set de transferencia de plasma en una conexión de una bolsa de solución tampón. Asegúrese de que la pinza del set de transferencia de plasma está cerrada.
2. Conecte la bolsa de solución tampón a la Cell Preparation Bag con el conector de tubos estéril. Cuelgue la bolsa de solución tampón en un gancho.
3. Tare la balanza. Coloque la Cell Preparation Bag con el precipitado celular en la balanza.

4. Abra las pinzas de cierre de la Cell Preparation Bag. Abra la pinza del set de transferencia de plasma. Llene la Cell Preparation Bag con solución tampón hasta alcanzar el «Peso objetivo de la Cell Preparation Bag llena de producto celular lavado». Cierre la pinza del set de transferencia de plasma para detener el flujo de líquido. Cierre las pinzas de cierre de la Cell Preparation Bag.
5. Selle el tubo con el sellador térmico, dejando al menos 15 cm de tubo en la Cell Preparation Bag para posteriores conexiones. Desconecte la bolsa de solución tampón.
6. Resuspenda con cuidado las células de la Cell Preparation Bag. Evite mezclar intensamente las células. Asegúrese de que las células estén resuspendidas.
7. Tare la balanza y pese la Cell Preparation Bag llena. Anote el peso.
8. Determine el peso del producto celular tras el ajuste de volumen, restando el peso de la Cell Preparation Bag vacía del peso de la Cell Preparation Bag llena. Anote el peso calculado.

Peso del producto celular tras el ajuste de volumen (g)	=	Peso de la Cell Preparation Bag llena (g)	–	Peso de la Cell Preparation Bag vacía (g)

9. Conserve la Plasma Waste Bag hasta que hayan concluido la separación y el análisis final de todas las células positivas.

Marcaje de las células (solo para el CliniMACS Plus Anti-Biotin System y el CliniMACS Plus TCRα/β-Biotin System)

Incubación con CliniMACS TCRα/β-Biotin

El vial de CliniMACS TCRα/β-Biotin está listo para usar y es suficiente para la aplicación, como se describe abajo. El conjugado no está destinado a la administración parenteral.

Conserve el conjugado a una temperatura de +2 °C a +8 °C (+36 °F a +46 °F). NO lo congele. El conjugado se debe usar frío, extraído directamente del refrigerador. No lo caliente antes del uso. El número de lote y la fecha de caducidad del conjugado están impresos en la etiqueta del vial. NO utilice el conjugado después de la fecha de caducidad.

1. Anote el número de lote y la fecha de caducidad del CliniMACS TCRα/β-Biotin.
2. Desinfecte la membrana de goma del Sampling Site Coupler. Utilice una jeringa y una aguja estériles adecuadas para extraer todo el volumen de un vial (7,5 mL). Basta con una jeringa de 10 mL para extraer el contenido de un vial. La jeringa debe disponer de una aguja de calibre 20.

3. Inyecte por la conexión del Sampling Site Coupler todo el volumen de conjugado en la Cell Preparation Bag (opcionalmente, transfiera el contenido de la Cell Preparation Bag a una nueva bolsa de transferencia para asegurar una alta eficiencia de depleción). Inicie inmediatamente el período de incubación de 30 minutos.
4. Sujete la Cell Preparation Bag con ambas manos y mezcle bien el contenido mediante un suave movimiento de rotación. Anote la hora de inicio de la incubación.
5. Coloque la Cell Preparation Bag en posición horizontal en el agitador orbital, ajuste una velocidad de aproximadamente 25 rpm y asegúrese de que la bolsa no esté arrugada ni doblada. Incube la bolsa durante un total de 30 minutos a temperatura ambiente controlada (+19 °C a +25 °C [+66 °F a +77 °F]). Anote la hora final de la incubación.

Incubación con el anticuerpo primario (anticuerpo biotinilado de otro fabricante)

1. Resuspenda el precipitado celular y márquelo con el anticuerpo primario biotinilado, indicando el tiempo y título recomendados por el fabricante del anticuerpo. Asegúrese de que las células estén resuspendidas. (El anticuerpo primario debe utilizarse con su título óptimo, es decir, con una intensidad de tinción óptima y sin tinción de fondo. Observe las instrucciones de uso proporcionadas por el fabricante del anticuerpo primario.)
2. Incube la Cell Preparation Bag en un agitador orbital a 25 rpm. Observe las instrucciones de uso proporcionadas por el fabricante del anticuerpo primario.

Eliminación del exceso de conjugado (1.er lavado) (solo para el CliniMACS Plus Anti-Biotin System y el CliniMACS Plus TCRα/β-Biotin System)

Diluya el producto celular con solución tampón hasta un peso total de 600 g. Calcule el peso de solución tampón que se debe añadir con la siguiente ecuación y anótelo.

Peso de solución tampón a añadir (g)	=	600 g	–	Peso del producto celular marcado (g)

1. Diluya el producto celular según los pasos descritos en el paso «Dilución del producto celular inicial» (pasos 1–8) a un peso total de 600 g.
2. Determine el peso del producto celular tras la eliminación del exceso de conjugado (1.er lavado) restando el peso de la Cell Preparation Bag vacía del peso de la Cell Preparation Bag llena. Anote el peso calculado.

Peso del producto celular tras la eliminación del exceso de conjugado (1.er lavado) (g)	=	Peso de la Cell Preparation Bag llena (g)	–	Peso de la Cell Preparation Bag vacía (g)

3. Conecte la Wash Waste Bag vacía con el conector de tubos estéril a la Cell Preparation Bag.
4. Pliegue las partes sueltas de la Cell Preparation Bag o del tubo hacia abajo. Introduzca las dos bolsas firmemente en la cubeta de la centrífuga.
5. Equilibre la cubeta cargada con una cubeta de peso adecuado. Es esencial que la centrífuga esté equilibrada con precisión.
6. Centrifugue las células en las condiciones definidas en la sección específica de la aplicación.
7. Retire las bolsas de la centrífuga, prestando atención de no resuspender el precipitado celular. Cargue la Cell Preparation Bag en el extractor de plasma y coloque la bolsa de desechos conectada sobre la balanza de mesa.
8. Consulte el número necesario de lavados en la sección específica de la aplicación.
9. Para el marcaje magnético de las células con el CliniMACS Anti-Biotin Reagent, ajuste el peso de la suspensión celular como se describe en la sección «Ajuste de volumen» a aproximadamente 190 g.

Incubación con inmunoglobulina de grado clínico (solo para los Sistemas CliniMACS Plus CD3 o CD3/CD19)

IMPORTANTE

Tenga en cuenta que la IgG humana no es un componente del sistema CliniMACS. Utilice únicamente IgG humana de calidad farmacéutica que esté disponible como producto autorizado en su país. Lea detenidamente el prospecto de la IgG humana utilizada, en particular la sección relativa a las reacciones de hipersensibilidad y al riesgo de infección que la IgG humana como hemoderivado entraña para todos los pacientes. El usuario deberá evaluar todos los riesgos derivados de estos materiales.

Desinfecte la membrana de goma del Sampling Site Coupler de la Cell Preparation Bag. Utilice una jeringa y una aguja estériles adecuadas para añadir 1,5 mg de IgG humana por mL de producto celular (p. ej., 1,6 mL de Gamunex 10% para 95 mL de producto celular). Mezcle bien los contenidos. Incube durante 5 minutos a temperatura ambiente controlada mediante un movimiento de rotación suave (p. ej., 25 rpm en un agitador orbital).

Marcaje magnético de las células: incubación con el CliniMACS Reagent

Los viales de reactivos CliniMACS están listos para usar y son suficientes para la aplicación, como se describe abajo. Los reactivos no son para la administración parenteral.

Conserve los reactivos a una temperatura de +2 °C a +8 °C (+36 °F a +46 °F). NO los congele. Los reactivos se deben usar fríos, extraídos directamente del refrigerador. No los caliente antes del uso. El número de lote y la fecha de caducidad de los reactivos están impresos en la etiqueta del vial. NO utilice los reactivos después de la fecha de caducidad.

1. Anote el número de lote y la fecha de caducidad de los reactivos CliniMACS.
2. Desinfecte la membrana de goma del Sampling Site Coupler. Utilice una jeringa y una aguja estériles adecuadas para extraer todo el volumen de un vial o b) dos viales de reactivo (7,5 mL cada uno). Basta con una jeringa de 10 mL para extraer el contenido de un vial, o respectivamente, una jeringa de 20 mL para extraer el contenido de dos viales de reactivo. La jeringa debe disponer de una aguja de calibre 20.
3. Inyecte por la conexión del Sampling Site Coupler todo el volumen del reactivo en la Cell Preparation Bag (opcionalmente, en aplicaciones de depleción, transfiera el contenido de la Cell Preparation Bag a una nueva bolsa de transferencia para asegurar una alta eficiencia de depleción). El tiempo de incubación comienza en este momento.
4. Sujete la Cell Preparation Bag con ambas manos y mezcle bien el contenido mediante un suave movimiento de rotación.
5. Coloque la Cell Preparation Bag en posición horizontal en el agitador orbital, ajuste una velocidad de aproximadamente 25 rpm y asegúrese de que la bolsa no esté arrugada ni doblada. Incube la bolsa en las condiciones y con el tiempo definidos en la sección específica de la aplicación.

Eliminación del exceso de reactivo

Para eliminar el reactivo no unido una vez finalizada la incubación, es necesario lavar las células. Consulte el número de lavados necesario en la sección específica de la aplicación.

1. Inserte el punzón del set de transferencia de plasma en una conexión de una bolsa de solución tampón que contenga al menos 500 mL de solución tampón. Asegúrese de que la pinza del set de transferencia de plasma está cerrada.
2. Conecte la bolsa de solución tampón a la Cell Preparation Bag con el conector de tubos estéril. Cuelgue la bolsa de solución tampón en un gancho.
3. Coloque la Cell Preparation Bag en la balanza y tare la balanza.
4. Abra las pinzas de cierre de la Cell Preparation Bag. Abra la pinza del set de transferencia de plasma. Rellene la Cell Preparation Bag con solución tampón hasta 600 mL. Cierre la pinza del set de transferencia de plasma para detener el flujo de líquido. Cierre las pinzas de cierre de la Cell Preparation Bag. Anote el peso de la Cell Preparation Bag llena.
5. Selle el tubo entre las dos pinzas, dejando al menos 15 cm de tubo en la Cell Preparation Bag para posteriores conexiones. Desconecte la bolsa de solución tampón.

6. Sujete la Cell Preparation Bag con ambas manos y mezcle bien el contenido mediante un suave movimiento de rotación.
7. Conecte la Wash Waste Bag vacía con el conector de tubos estéril a la Cell Preparation Bag.
8. Pliegue todas las partes sueltas de la bolsa o del tubo hacia abajo. Transfiera la Cell Preparation Bag y la Wash Waste Bag de forma segura a la cubeta de la centrífuga.
9. Centrifugue las células en las condiciones y con el tiempo definidos en la sección específica de la aplicación.
10. Extraiga las bolsas de la centrífuga prestando atención de no alterar el precipitado celular.
11. Cuelgue la Cell Preparation Bag con cuidado en el extractor de plasma.
12. Coloque la Wash Waste Bag en la balanza y tare la balanza.
13. Abra las pinzas de cierre de la Cell Preparation Bag. Elimine con el extractor de plasma la mayor cantidad posible de sobrenadante de la Cell Preparation Bag. Cierre las pinzas de cierre de la Cell Preparation Bag para detener el flujo de líquido.
14. Selle el tubo con el sellador térmico, dejando al menos 15 cm de tubo en la Cell Preparation Bag para posteriores conexiones. Desconecte la Wash Waste Bag.
15. Conserve la Plasma Waste Bag hasta que haya concluido el análisis final de todas las células.
16. Resuspenda el precipitado celular en la Cell Preparation Bag. Evite mezclar intensamente las células. Asegúrese de que las células estén resuspendidas.
17. Si fueran necesarios más lavados (p. ej., para el enriquecimiento de células CD34 positivas); repita los pasos 1–16.
18. Tare la balanza y pese la Cell Preparation Bag llena. Anote el peso.
19. Determine el peso del producto celular tras el lavado restando el peso de la Cell Preparation Bag vacía del peso de la Cell Preparation Bag llena. Anote el peso calculado.

Peso del producto celular tras el lavado (g)	=	Peso de la Cell Preparation Bag llena (g)	–	Peso de la Cell Preparation Bag vacía (g)

20. Ajuste el volumen de carga de la muestra: Calcule el peso necesario de la solución tampón para ajustar el peso de la suspensión celular al volumen de carga de la muestra apropiado según la aplicación, mediante la siguiente ecuación. Para cargar las células marcadas y lavadas en el set de tubos, se recomienda una concentración celular máxima de $0{,}4\times10^9$ células por mL.

Peso de solución tampón a añadir (g)	=	Volumen de carga de la muestra (según la aplicación)	–	Peso del producto celular tras el lavado (g)

21. Conecte la bolsa de solución tampón a la Cell Preparation Bag con el conector de tubos estéril. Cuelgue la bolsa de solución tampón en un gancho.
22. Coloque la Cell Preparation Bag en la balanza y tare la balanza.
23. Abra las pinzas de cierre de la Cell Preparation Bag. Abra la pinza del set de transferencia de plasma. Transfiera el peso calculado de la solución tampón a la Cell Preparation Bag, al tiempo que controla visualmente la indicación de la balanza.
24. Una vez transferido el peso adecuado de solución tampón, cierre la pinza del set de transferencia de plasma para detener el flujo de líquido. Cierre las pinzas de cierre de la Cell Preparation Bag.
25. Utilice el sellador térmico para sellar el tubo entre las dos pinzas. Desconecte la bolsa de solución tampón.
26. Resuspenda el precipitado celular en la Cell Preparation Bag. Evite mezclar intensamente las células. Asegúrese de que las células estén resuspendidas.
27. Desinfecte la membrana de goma del Sampling Site Coupler. Inserte una jeringa adecuada con una aguja en el Sampling Site Coupler de la Cell Preparation Bag y extraiga un volumen de 0,5 mL del producto marcado. Transfiera la muestra a un tubo de muestras. Rotule el tubo con «ORIGINAL» (incluyendo la identificación del paciente) y consérvelo para el análisis celular.
28. Tare la balanza y pese la Cell Preparation Bag llena. Anote el peso.
29. Determine el peso del producto celular tras la adición de solución tampón (volumen de carga de la muestra) restando el peso de la Cell Preparation Bag vacía del peso de la Cell Preparation Bag llena. Anote el peso calculado.

Peso del producto celular tras la adición de solución tampón (g)	=	Peso de la Cell Preparation Bag llena (g)	–	Peso de la Cell Preparation Bag vacía (g)

▶ **Continúe con el PASO 2.**

NO conecte la Cell Preparation Bag al set de tubos hasta que se le indique en la pantalla del instrumento.

7.2 PASO 2: Selección del programa de separación

7.2.1 Encender el CliniMACS Plus Instrument

Encienda el CliniMACS Plus Instrument con el interruptor de ENCENDIDO/APAGADO situado en el panel posterior del instrumento. Anote la hora de inicio del ciclo del instrumento.

En la ventana se muestra la pantalla principal de la sección «Instalación» del manual del usuario del CliniMACS Plus Instrument.

Para continuar con el menú de programas, pulse **ENT**.

7.2.2 CD34 SELECTION 1/2

IMPORTANTE

- *CD34 SELECTION 1 solo se debe utilizar en combinación con el CliniMACS Tubing Set (REF 161-01), mientras que CD34 SELECTION 2 solo se debe utilizar en combinación con el CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01). Antes de instalarlo, compruebe el set de tubos detenidamente.*
- *En la ventana de visualización aparecerán avisos y diagramas que sirven de guía para el procedimiento. Realice y compruebe cada uno de los pasos de acuerdo con el manual de instrucciones antes de proceder al siguiente paso. Para corregir un error durante la introducción de datos, pulse el botón «Undo» (consulte la sección «Descripción» del manual del usuario del CliniMACS Plus Instrument).*

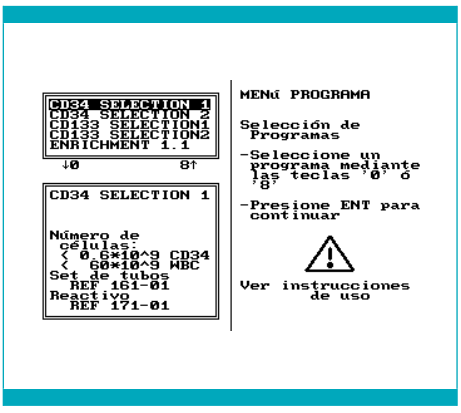
Selección del programa de separación CD34 SELECTION 1/2

La ventana muestra la Pantalla 7.1.

En función de la aplicación, seleccione CD34 SELECTION 1 o CD34 SELECTION 2.

Para seleccionar el programa de separación, resalte el nombre del programa con la barra negra. Desplace la barra hacia arriba y hacia abajo con las teclas **0** y **8**.

Para continuar con el programa resaltado, pulse **ENT**.



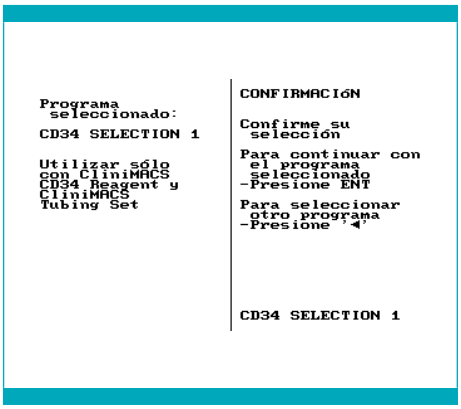
Pantalla 7.1: Selección del programa de separación

Confirmación

La ventana muestra la Pantalla 7.2.

Para confirmar el programa de separación y continuar, pulse **ENT**.

De lo contrario, pulse ◄ para volver al paso anterior y modificar la selección.



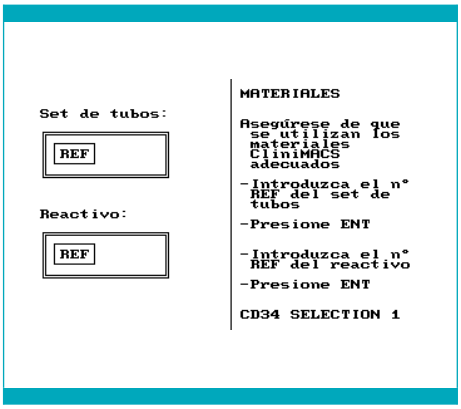
Pantalla 7.2: Confirmación

Comprobación del material

La ventana muestra la Pantalla 7.3.

CD34 SELECTION 1 y CD34 SELECTION 2 se han optimizado para el enriquecimiento de células CD34 positivas.

Para confirmar la disponibilidad del set de tubos adecuado y la utilización del reactivo apropiado para el marcaje de células, introduzca el número de catálogo (REF) correspondiente en la casilla de consulta. El software del instrumento comprobará si los materiales se pueden utilizar en combinación con el programa seleccionado.



Pantalla 7.3: Comprobación del material

1. Introduzca el número de catálogo del set de tubos que haya utilizado para la separación celular automatizada. Para confirmar y continuar, pulse **ENT**.
2. Introduzca el número de catálogo del reactivo que haya utilizado para el marcaje de las células. Para confirmar y continuar, pulse **ENT**.

Si, para el programa de separación seleccionado, ha introducido el número de catálogo de un set de tubos o de un reactivo no especificado, aparecerá un mensaje. Pulse **ENT** para confirmar y volver a introducir el número del catálogo correcto. Si el número introducido sigue siendo incorrecto, el mensaje aparecerá por segunda vez. Tras pulsar **ENT**, el programa volverá al menú de programas (ver Pantalla 7.1).

IMPORTANTE

- *CD34 SELECTION 1 solo se debe utilizar en combinación con el CliniMACS Tubing Set (REF 161-01), mientras que CD34 SELECTION 2 solo se debe utilizar en combinación con el CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01). Antes de instalarlo, compruebe el set de tubos detenidamente.*
- *Para corregir un error durante la introducción de datos, pulse el botón «Undo» (consulte la sección «Descripción» del manual del usuario del CliniMACS Plus Instrument).*

Si la comprobación del material ha sido satisfactoria, el programa continuará automáticamente con las instrucciones para instalar el set de tubos.

▶ **Continúe con el PASO 3.**

7.2.3 ENRICHMENT 1.1

IMPORTANTE

- *El programa de separación ENRICHMENT 1.1 solo se debe utilizar con el CliniMACS Tubing Set (REF 161-01).*
- *En la ventana de visualización aparecerán avisos y diagramas que sirven de guía para el procedimiento. Realice y compruebe cada uno de los pasos de acuerdo con el manual de instrucciones antes de proceder al siguiente paso. Para corregir un error durante la introducción de datos, pulse el botón «Undo» (consulte la sección «Descripción» del manual del usuario del CliniMACS Plus Instrument).*

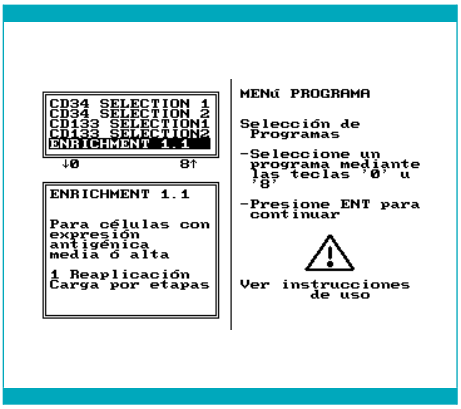
Selección del programa de separación ENRICHMENT 1.1.

La ventana muestra la Pantalla 7.4.

Seleccione ENRICHMENT 1.1.

Para seleccionar el programa de separación, resalte el nombre del programa con la barra negra. Desplace la barra hacia arriba y hacia abajo con las teclas **0** y **8**.

Para continuar con el programa resaltado, pulse **ENT**.



Pantalla 7.4: Selección del programa de separación

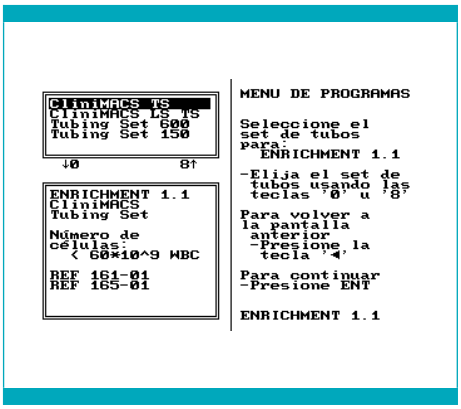
Selección del set de tubos

La ventana muestra la Pantalla 7.5.

Confirme la selección del programa correcto. De lo contrario, pulse ◄ para volver al paso anterior y modificar la selección.

Seleccione el set de tubos resaltándolo con la barra negra en el cuadro superior izquierdo. Desplace la barra hacia arriba y hacia abajo con las teclas **0** y **8**.

La ventana siguiente indica los datos pertinentes, como la capacidad y el número de catálogo del set de tubos seleccionado.



Pantalla 7.5: Selección del set de tubos

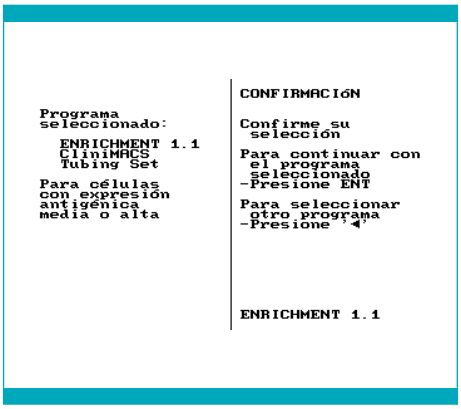
Para continuar con la combinación seleccionada de programa de separación y set de tubos, pulse **ENT**.

Confirmación

La ventana muestra la Pantalla 7.6.

Para confirmar la combinación de programa de separación y set de tubos, pulse **ENT**.

De lo contrario, pulse ◄ para volver al paso anterior y modificar la selección.



Pantalla 7.6: Confirmación

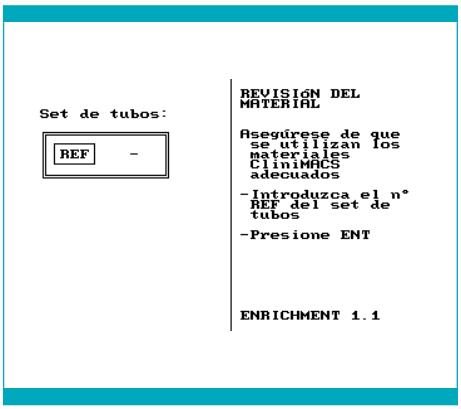
Comprobación del material

La ventana muestra la Pantalla 7.7.

La consulta del número de catálogo (REF) del set de tubos sirve de control de seguridad para garantizar que el set de tubos seleccionado se pueda utilizar con el programa seleccionado.

Introduzca el número de catálogo del set de tubos seleccionado y pulse **ENT** para continuar.

Si se ha introducido un número de catálogo que no corresponde, aparecerá un mensaje. Para confirmar, pulse **ENT** e introduzca el número de catálogo correcto. Si el número introducido sigue siendo incorrecto, el mensaje aparecerá por segunda vez. Tras pulsar **ENT**, el programa volverá al menú de programas (ver Pantalla 7.4).

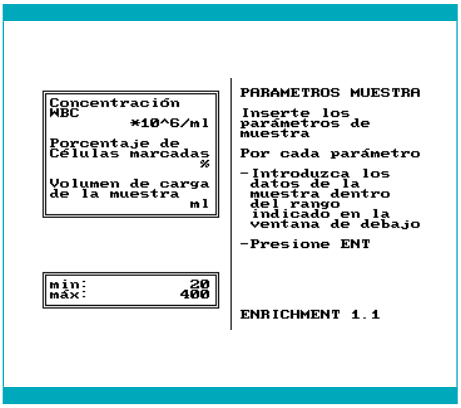


Pantalla 7.7: Comprobación del material

Introducción de los parámetros de la muestra

Si la comprobación del material ha sido satisfactoria, el programa continuará automáticamente con la consulta de los parámetros de la muestra necesarios para ajustar la separación a cada muestra individual y proporcionar al operario información importante sobre los volúmenes de solución tampón y de bolsa necesarios.

La ventana muestra la Pantalla 7.8.



Pantalla 7.8: Introducción de los parámetros de la muestra

1. Comience por introducir la concentración de WBC de la muestra. El intervalo permitido se indica en el cuadro situado en el lado inferior izquierdo. Pulse ◄ para corregir una entrada incorrecta.

   Confirme que el valor introducido corresponde al valor de la muestra. De lo contrario, el procesamiento de la muestra puede ser deficiente. Para continuar con la entrada siguiente, pulse **ENT**.

IMPORTANTE

Todos los parámetros de la muestra necesarios se refieren a la muestra después del procedimiento de marcaje y de lavado. El intervalo permitido que se muestra en el cuadro de la parte inferior izquierda siempre tiene en cuenta la entrada anterior. Después de cada introducción, el software calculará y ajustará el intervalo aceptado de la siguiente consulta.

⚠ ATENCIÓN

La especificación de parámetros incorrectos puede dar lugar a un procesamiento deficiente de la muestra y aumentar el riesgo de pérdida de células diana. La introducción de valores de concentración de WBC o de porcentaje de células marcadas inferiores a los valores reales de la muestra puede dar lugar a la pérdida de células por sobrecarga del sistema. La introducción de un volumen de muestra inferior puede provocar la pérdida de células por sobrecarga o incluso por un procesamiento incompleto de la muestra. Si la especificación de cualquiera de los tres parámetros es demasiado alta, se producirá un aumento del tiempo de procesamiento y del volumen de la fracción celular objetivo. Asegúrese siempre de introducir los parámetros correctos.

2. Introduzca el porcentaje de células marcadas. Confirme que el valor introducido corresponde al valor de la muestra. De lo contrario, el procesamiento de la muestra puede ser deficiente (consulte «Importante»). Para continuar con la entrada siguiente, pulse **ENT**.

3. Introduzca el volumen final de la muestra celular. Confirme que el valor introducido corresponde al valor de la muestra. De lo contrario, el procesamiento de la muestra puede ser deficiente (consulte «Importante»).

Para continuar, pulse **ENT**.

Cálculo

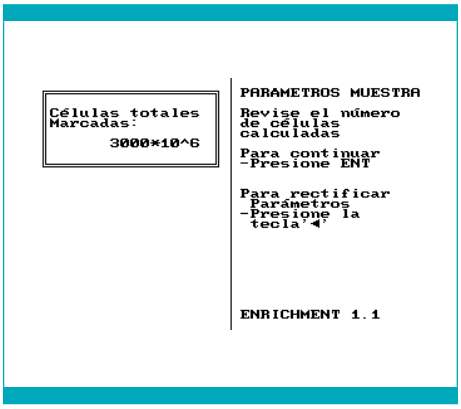
El software CliniMACS Plus calcula el número total de células marcadas para comprobar si la capacidad de separación es suficiente.

El resultado se muestra en una de de las siguientes pantallas:

- El resultado del cálculo se muestra en una pantalla similar a la Pantalla 7.9. Asegúrese de que el número de células marcadas sea correcto.

  Para continuar, pulse **ENT**.

  Los datos se pueden corregir. Pulse ◄ para volver a la pantalla anterior y realizar la corrección.

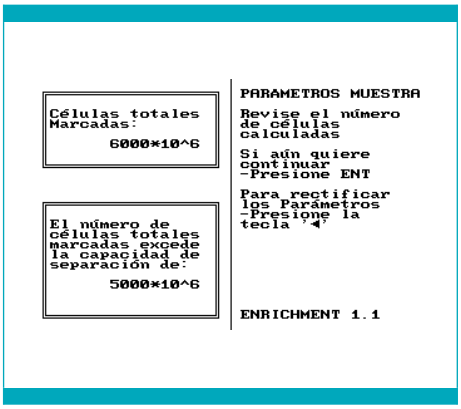


Pantalla 7.9: Cálculo

- Si el número calculado de células marcadas supera la capacidad de separación del sistema CliniMACS Plus, aparecerá una pantalla similar a la Pantalla 7.10. Asegúrese de haber introducido los parámetros correctos de la muestra y de que el número calculado de células sea correcto. Pulse ◄ para volver a la Pantalla 7.8 anterior y corregir los parámetros de la muestra.

  Para evitar la sobrecarga del sistema, divida la muestra y determine el volumen de cada porción. Pulse ◄ para volver a la Pantalla 7.8 anterior. Introduzca los parámetros de la muestra para la primera alícuota de la muestra y continúe con la separación de esta porción. Una vez finalizada la separación, inicie una segunda separación con la segunda alícuota, utilizando un nuevo set de tubos.

  Para continuar, pulse **ENT**.



Pantalla 7.10: Cálculo: El número de células supera la capacidad de separación

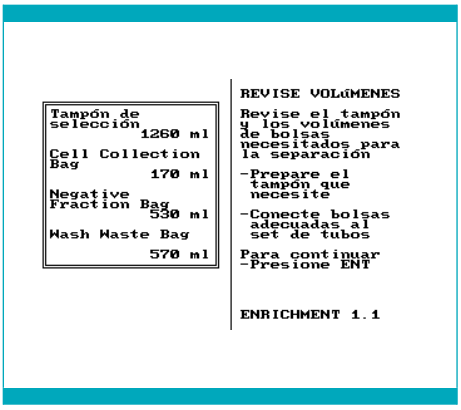
Información del volumen

A partir del número total de células marcadas (consulte la sección «Cálculo»), el software calculará el número de etapas de separación, la cantidad de solución tampón necesaria para toda la separación y los volúmenes de líquido que se recogerán en la Negative Fraction Bag, la Buffer Waste Bag y la Cell Collection Bag.

Los valores predeterminados son los siguientes:

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

Si uno de los valores calculados supera estos valores predeterminados, aparecerá la Pantalla 7.11 para informar sobre la cantidad de líquido que se necesitará y acumulará durante el proceso de separación. Si fuera necesario sustituirlas, sustituya las bolsas suministradas con el set de tubos (capacidad aproximada de 500 mL) por otras bolsas de tamaño adecuado. Las bolsas fijadas originalmente al set de tubos están conectadas mediante conexiones de Luer. Las bolsas que sustituyen a las originales deben disponer de un conector de Luer hembra. Las bolsas estándar se pueden conectar por medio de un Luer/Spike Interconnector.



Pantalla 7.11: Comprobación de los volúmenes

1. Confirme que esté disponible la cantidad de solución tampón solicitada. No cuelgue más de tres litros de solución tampón en el gancho.

   AVISO

   Riesgo de daños del instrumento. La sobrecarga de los ganchos puede dañar el instrumento. La capacidad de carga de un gancho es de 3 kg. No sobrecargue los ganchos.

2. Abra la bandeja del set de tubos en condiciones estériles y sustituya en caso necesario las bolsas originales por otras más grandes. Garantice un flujo libre a estas bolsas.

3. Conecte una Cell Collection Bag de tamaño suficiente al conector de Luer libre. Si no se especifica en la Pantalla 7.11, el volumen de elución máximo de la fracción celular objetivo es de 150 mL. Asegúrese de que el flujo libre hacia la Cell Collection Bag no esté restringido.

IMPORTANTE

- *Asegúrese de disponer de la cantidad necesaria de solución tampón y de que el volumen de las bolsas indicado en la Pantalla 7.11 sea suficiente. De lo contrario, se verá comprometido el rendimiento de la separación.*
- *Cualquier modificación de los sets de tubos CliniMACS se debe realizar en condiciones estériles, p. ej., en la campana de flujo de aire laminar.*
- *Para el análisis o el procesamiento celular posterior tenga en cuenta que los volúmenes indicados en la Pantalla 7.11 no son los volúmenes exactos, sino volúmenes que se ajustan a los requisitos de seguridad.*

4. Compruebe las conexiones de Luer de las columnas. Los conectores de Luer deben estar cerrados herméticamente.

Para continuar, pulse **ENT**.

El programa continúa automáticamente con las instrucciones para instalar el set de tubos en el instrumento.

▶ **Continúe con el PASO 3.**

7.2.4 ENRICHMENT 3.2

IMPORTANTE

- *El programa de separación ENRICHMENT 3.2 solo se debe utilizar con el CliniMACS Tubing Set (REF 161-01).*
- *En la ventana de visualización aparecerán avisos y diagramas que sirven de guía para el procedimiento. Realice y compruebe cada uno de los pasos de acuerdo con el manual de instrucciones antes de proceder al siguiente paso. Para corregir un error durante la introducción de datos, pulse el botón «Undo» (consulte la sección «Descripción» del manual del usuario del CliniMACS Plus Instrument).*

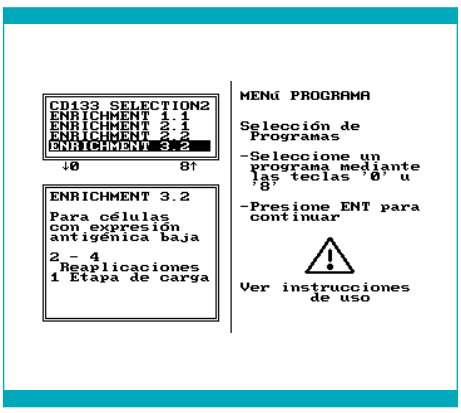
Selección del programa de separación ENRICHMENT 3.2.

La ventana muestra la Pantalla 7.12.

Seleccione ENRICHMENT 3.2.

Para seleccionar el programa de separación, resalte el nombre del programa con la barra negra. Desplace la barra hacia arriba y hacia abajo con las teclas **0** y **8**.

Para continuar con el programa resaltado, pulse **ENT**.



Pantalla 7.12: Selección del programa de separación

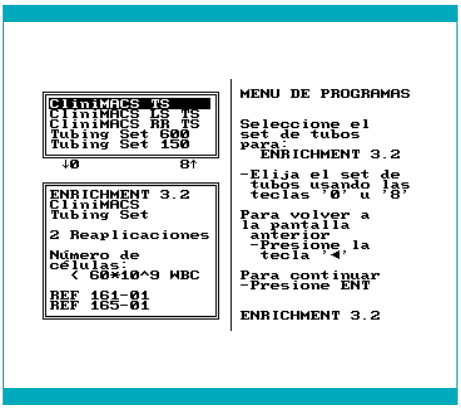
Selección del set de tubos

La ventana muestra la Pantalla 7.13.

Confirme que ha seleccionado el programa correcto. De lo contrario, pulse ◄ para volver al paso anterior y modificar la selección.

Seleccione el set de tubos resaltándolo con la barra negra en el cuadro izquierdo. Desplace la barra hacia arriba y hacia abajo con las teclas **0** y **8**.

La ventana siguiente indica los datos pertinentes, como la capacidad y el número de catálogo del set de tubos seleccionado.



Pantalla 7.13: Selección del set de tubos

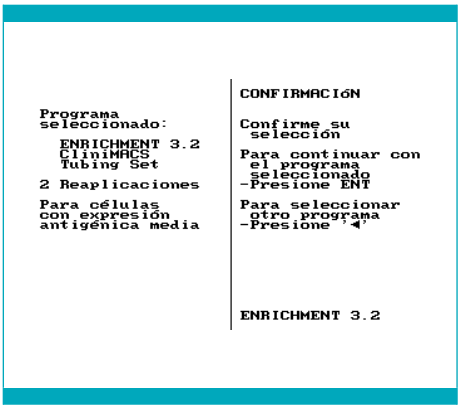
Para continuar con la combinación seleccionada de programa de separación y set de tubos, pulse **ENT**.

Confirmación

La ventana muestra la Pantalla 7.14.

Para confirmar la combinación de programa de separación y set de tubos, pulse **ENT**.

De lo contrario, pulse ◄ para volver al paso anterior y modificar la selección.



Pantalla 7.14: Confirmación

Comprobación del material

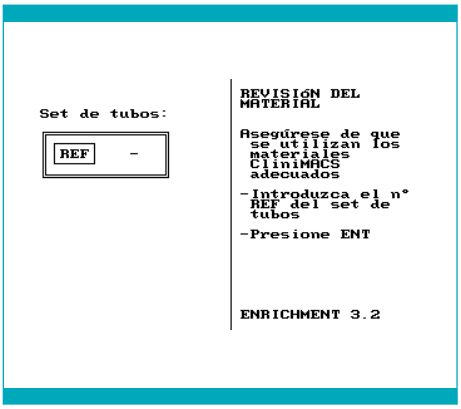
La ventana muestra la Pantalla 7.15.

La consulta del número de catálogo (REF) del set de tubos sirve de control de seguridad para garantizar que el set de tubos seleccionado se pueda utilizar con el programa seleccionado.

Introduzca el número de catálogo del set de tubos seleccionado y pulse **ENT** para continuar.

Si se ha introducido un número de catálogo que no corresponde, aparecerá un mensaje.

Para confirmar, pulse **ENT** e introduzca el número de catálogo correcto. Si el número introducido sigue siendo incorrecto, el mensaje aparecerá por segunda vez. Tras pulsar **ENT**, el programa volverá al menú de programas (ver Pantalla 7.12).



Pantalla 7.15: Comprobación del material

Si la comprobación del material ha sido satisfactoria, el programa continuará automáticamente con las instrucciones para instalar el set de tubos.

▶ **Continúe con el PASO 3.**

7.2.5 DEPLETION 2.1

IMPORTANTE

- *El programa de separación DEPLETION 2.1 solo se debe utilizar con el CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01).*
- *En la ventana de visualización aparecerán avisos y diagramas que sirven de guía para el procedimiento. Realice y compruebe cada uno de los pasos de acuerdo con el manual de instrucciones antes de proceder al siguiente paso. Para corregir un error durante la introducción de datos, pulse el botón «Undo» (consulte la sección «Descripción» del manual del usuario del CliniMACS Plus Instrument).*

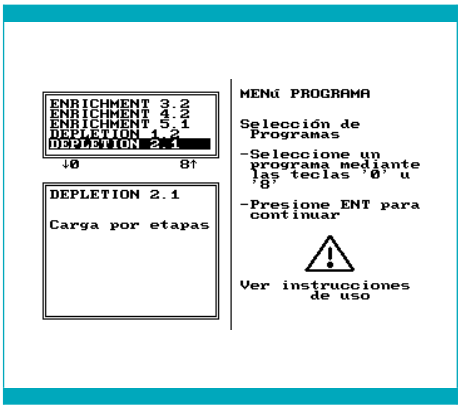
Selección del programa de separación DEPLETION 2.1.

La ventana muestra la Pantalla 7.16.

Seleccione DEPLETION 2.1.

Para seleccionar el programa de separación, resalte el nombre del programa con la barra negra. Desplace la barra hacia arriba y hacia abajo con las teclas **0** y **8**.

Para continuar con el programa resaltado, pulse **ENT**.



Pantalla 7.16: Selección del programa de separación

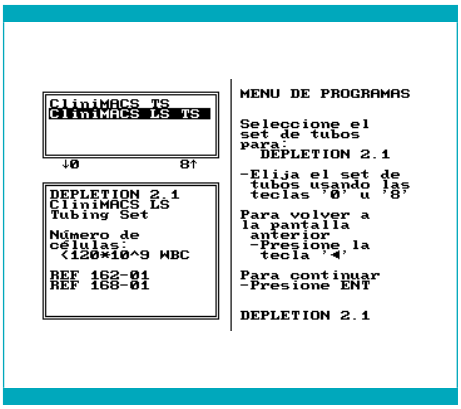
Selección del set de tubos

La ventana muestra la Pantalla 7.17.

Confirme la selección del programa correcto.

De lo contrario, pulse ◄ para volver al paso anterior y modificar la selección.

Seleccione el set de tubos resaltándolo con la barra negra en el cuadro superior izquierdo. Desplace la barra hacia arriba y hacia abajo con las teclas **0** y **8**.



Pantalla 7.17: Selección del set de tubos

La ventana siguiente indica los datos pertinentes, como la capacidad y el número de catálogo del set de tubos seleccionado.

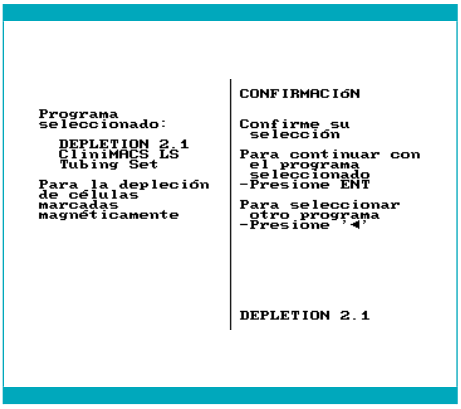
Para continuar con la combinación seleccionada de programa de separación y set de tubos, pulse **ENT**.

Confirmación

La ventana muestra la Pantalla 7.18.

Para confirmar la combinación de programa de separación y set de tubos, pulse **ENT**.

De lo contrario, pulse ◄ para volver al paso anterior y modificar la selección.



Pantalla 7.18: Confirmación

Comprobación del material

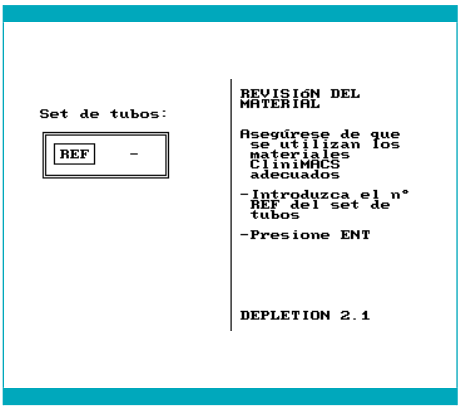
La ventana muestra la Pantalla 7.19.

La consulta del número de catálogo (REF) del set de tubos sirve de control de seguridad para garantizar que el operario pueda utilizar el set de tubos seleccionado.

Introduzca el número de catálogo del set de tubos seleccionado y pulse **ENT** para continuar.

Si se ha introducido un número de catálogo que no corresponde, aparecerá un mensaje.

Para confirmar, pulse **ENT** e introduzca el número de catálogo correcto. Si el número introducido sigue siendo incorrecto, el mensaje aparecerá por segunda vez. Tras pulsar **ENT**, el programa volverá al menú de programas (ver Pantalla 7.16).

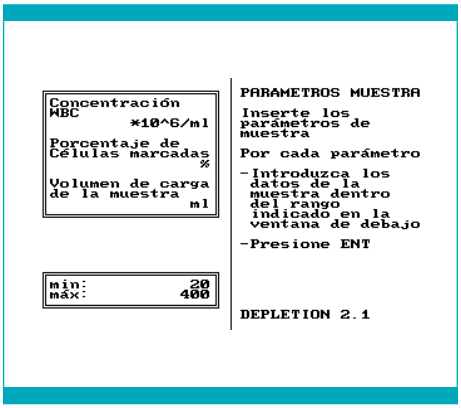


Pantalla 7.19: Comprobación del material

Introducción de los parámetros de la muestra

Si la comprobación del material ha sido satisfactoria, el programa continuará automáticamente con la consulta de los parámetros de la muestra necesarios para ajustar la separación a cada muestra individual y proporcionar al operario información importante sobre los volúmenes de solución tampón y de bolsa necesarios.

La ventana muestra la Pantalla 7.20.



Pantalla 7.20: Introducción de los parámetros de la muestra

1. Comience por introducir la concentración de WBC de la muestra. El intervalo permitido se indica en el cuadro situado en el lado inferior izquierdo. Pulse ◄ para corregir una entrada incorrecta.

   Confirme que el valor introducido corresponde al valor de la muestra. De lo contrario, el procesamiento de la muestra puede ser deficiente.

   IMPORTANTE

   Todos los parámetros de la muestra necesarios se refieren a la muestra después del procedimiento de marcaje y de lavado. El intervalo permitido que se muestra en el cuadro de la parte inferior izquierda siempre tiene en cuenta la entrada anterior. Después de cada introducción, el software calculará y ajustará el intervalo aceptado de la siguiente consulta.

   ⚠ ATENCIÓN

   La especificación de parámetros incorrectos puede dar lugar a un procesamiento deficiente de la muestra y aumentar el riesgo de pérdida de células diana. La introducción de valores de concentración de WBC o de porcentaje de células marcadas inferiores a los valores reales de la muestra puede dar lugar a la pérdida de células por sobrecarga del sistema. La introducción de un volumen de muestra inferior puede provocar la pérdida de células por sobrecarga o incluso por un procesamiento incompleto de la muestra. Si la especificación de cualquiera de los tres parámetros es demasiado alta, se producirá un aumento del tiempo de procesamiento y del volumen de la fracción celular objetivo. Asegúrese siempre de introducir los parámetros correctos.

   Para continuar con la entrada siguiente, pulse **ENT**.

2. Introduzca el porcentaje de células marcadas. Confirme que el valor introducido corresponde al valor de la muestra. De lo contrario, el procesamiento de la muestra puede ser deficiente (consulte «Importante»).

   Para continuar con la entrada siguiente, pulse **ENT**.

3. Introduzca el volumen final de la muestra celular. Confirme que el valor introducido corresponde al valor de la muestra. De lo contrario, el procesamiento de la muestra puede ser deficiente (consulte «Importante»).

Para continuar, pulse **ENT**.

Cálculo

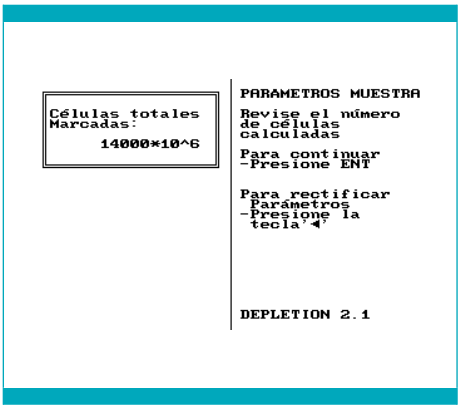
El software CliniMACS Plus calcula el número total de células marcadas para comprobar si la capacidad de separación es suficiente.

El resultado se muestra en una de de las siguientes pantallas:

- El resultado del cálculo se muestra en una pantalla similar a la Pantalla 7.21. Asegúrese de que el número de células marcadas sea correcto.

  Para continuar, pulse **ENT**.

  Los datos se pueden corregir. Pulse ◄ para volver a la pantalla anterior y realizar la corrección.

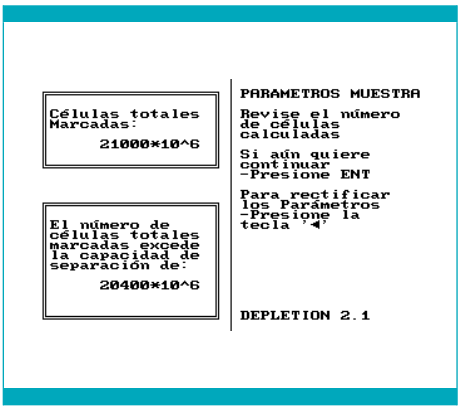


Pantalla 7.21: Cálculo

- Si el número calculado de células marcadas supera la capacidad de separación del sistema CliniMACS Plus, aparecerá una pantalla similar a la Pantalla 7.22. Asegúrese de haber introducido los parámetros correctos de la muestra y de que el número calculado de células sea correcto. Pulse ◄ para volver a la pantalla anterior y corregir los parámetros de la muestra.

  Para evitar la sobrecarga del sistema, divida la muestra y determine el volumen de cada porción. Pulse ◄ para volver a la Pantalla 7.20 anterior. Introduzca los parámetros de la muestra para la primera alícuota de la muestra y continúe con la separación de esta porción. Una vez finalizada la separación, inicie una segunda separación con la segunda alícuota, utilizando un nuevo set de tubos.

  Para continuar, pulse **ENT**.



Pantalla 7.22: Cálculo: El número de células supera la capacidad de separación

Información del volumen

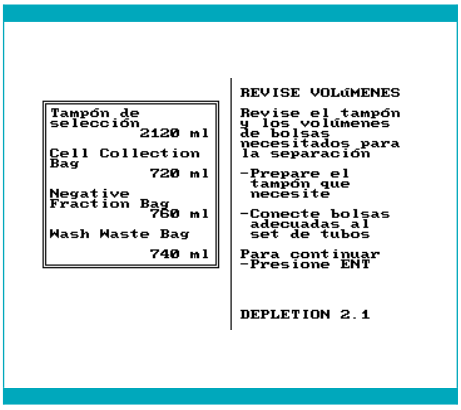
A partir del número total de células marcadas (consulte la sección «Cálculo»), el software calculará el número de etapas de separación, la cantidad de solución tampón necesaria para toda la separación y los volúmenes de líquido que se recogerán en la Negative Fraction Bag, la Buffer Waste Bag y la Cell Collection Bag.

Los valores predeterminados son los siguientes:

- CliniMACS PBS/EDTA Buffer 1000 mL

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

Si uno de los valores calculados supera estos valores predeterminados, aparecerá la Pantalla 7.23 para informar sobre la cantidad de líquido que se necesitará y acumulará durante el proceso de separación. Si fuera necesario sustituirlas, sustituya las bolsas suministradas con el set de tubos (capacidad aproximada de 500 mL) por otras bolsas de tamaño adecuado. Las bolsas fijadas originalmente al set de tubos están conectadas mediante conexiones de Luer. Las bolsas que sustituyen a las originales deben disponer de un conector de Luer hembra. Las bolsas estándar se pueden conectar por medio de un Luer/Spike Interconnector.



Pantalla 7.23: Comprobación de los volúmenes

1. Confirme que esté disponible la cantidad de solución tampón solicitada. No cuelgue más de tres litros de solución tampón en el gancho.

   AVISO

   Riesgo de daños del instrumento. La sobrecarga de los ganchos puede dañar el instrumento. La capacidad de carga de un gancho es de 3 kg. No sobrecargue los ganchos.

2. Abra la bandeja del set de tubos en condiciones estériles y sustituya en caso necesario las bolsas originales por otras más grandes. Garantice un flujo libre a estas bolsas.

3. Conecte una Cell Collection Bag de tamaño suficiente al conector de Luer libre. Si no se especifica en la Pantalla 7.23, el volumen de elución máximo de la fracción celular objetivo es de 150 mL. Asegúrese de que el flujo libre hacia la Cell Collection Bag no esté restringido.

   IMPORTANTE

   - *Asegúrese de disponer de la cantidad necesaria de solución tampón y de que el volumen de las bolsas indicado en la Pantalla 7.23 sea suficiente. De lo contrario, se verá comprometido el rendimiento de la separación.*
   - *Cualquier modificación de los sets de tubos CliniMACS se debe realizar en condiciones estériles, p. ej., en la campana de flujo de aire laminar.*
   - *Para el análisis o el procesamiento celular posterior tenga en cuenta que los volúmenes indicados en la Pantalla 7.23 no son los volúmenes exactos, sino volúmenes que se ajustan a los requisitos de seguridad.*

4. Compruebe las conexiones de Luer de las columnas. Los conectores de Luer deben estar cerrados herméticamente.

Para continuar, pulse **ENT**.

El programa continúa automáticamente con las instrucciones para instalar el set de tubos en el instrumento.

▶ **Continúe con el PASO 3.**

7.2.6 DEPLETION 3.1

IMPORTANTE

- *El programa de separación DEPLETION 3.1 solo se debe utilizar con el CliniMACS DEPLETION Tubing Set (REF 261-01).*
- *En la ventana de visualización aparecerán avisos y diagramas que sirven de guía para el procedimiento. Realice y compruebe cada uno de los pasos de acuerdo con el manual de instrucciones antes de proceder al siguiente paso. Para corregir un error durante la introducción de datos, pulse el botón «Undo» (consulte la sección «Descripción» del manual del usuario del CliniMACS Plus Instrument).*

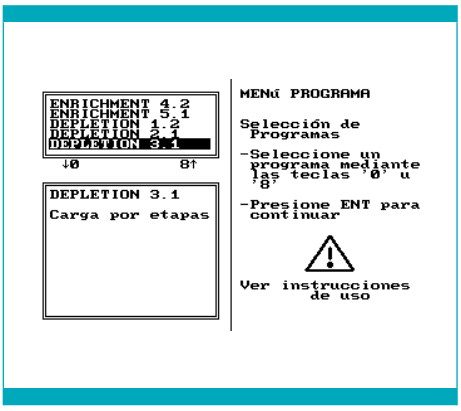
Selección del programa de separación DEPLETION 3.1.

La ventana muestra la Pantalla 7.24.

Seleccione DEPLETION 3.1.

Para seleccionar el programa de separación, resalte el nombre del programa con la barra negra. Desplace la barra hacia arriba y hacia abajo con las teclas **0** y **8**.

Para continuar con el programa resaltado, pulse **ENT**.



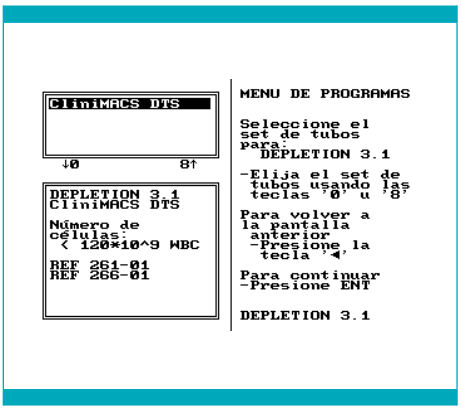
Pantalla 7.24: Selección del programa de separación

Selección del set de tubos

La ventana muestra la Pantalla 7.25.

Confirme la selección del programa correcto. De lo contrario, pulse ◄ para volver al paso anterior y modificar la selección.

Seleccione el set de tubos resaltándolo con la barra negra en el cuadro superior izquierdo. Desplace la barra hacia arriba y hacia abajo con las teclas **0** y **8**.



Pantalla 7.25: Selección del set de tubos

La ventana siguiente indica los datos pertinentes, como la capacidad y el número de catálogo del set de tubos seleccionado.

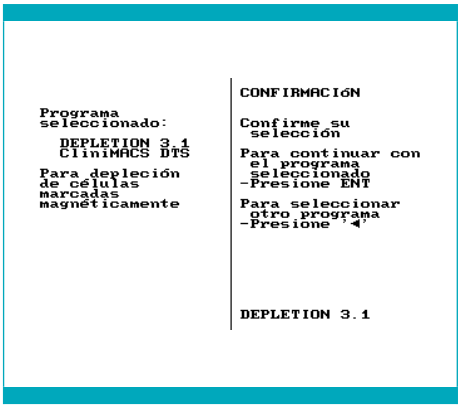
Para continuar con la combinación seleccionada de programa de separación y set de tubos, pulse **ENT**.

Confirmación

La ventana muestra la Pantalla 7.26.

Para confirmar la combinación de programa de separación y set de tubos, pulse **ENT**.

De lo contrario, pulse ◄ para volver al paso anterior y modificar la selección.



Pantalla 7.26: Confirmación

Comprobación del material

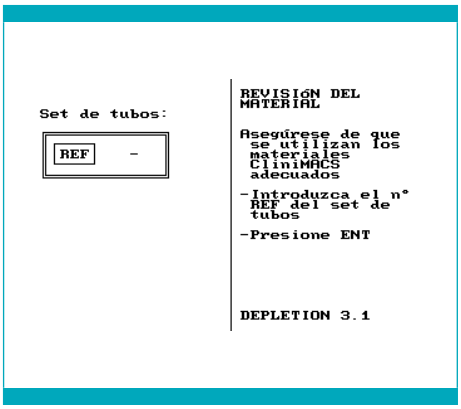
La ventana muestra la Pantalla 7.27.

La consulta del número de catálogo (REF) del set de tubos sirve de control de seguridad para garantizar que el operario pueda utilizar el set de tubos seleccionado.

Introduzca el número de catálogo del set de tubos seleccionado y pulse **ENT** para continuar.

Si se ha introducido un número de catálogo que no corresponde, aparecerá un mensaje.

Para confirmar, pulse **ENT** e introduzca el número de catálogo correcto. Si el número introducido sigue siendo incorrecto, el mensaje aparecerá por segunda vez. Tras pulsar **ENT**, el programa volverá al menú de programas (ver Pantalla 7.25).

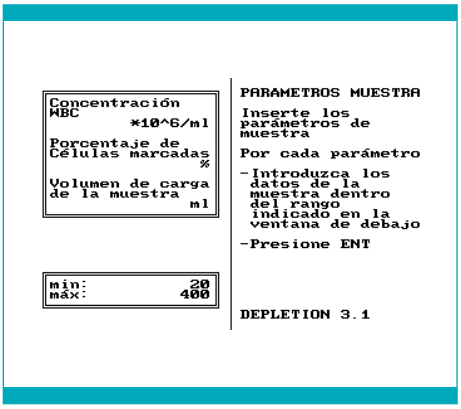


Pantalla 7.27: Comprobación del material

Introducción de los parámetros de la muestra

Si la comprobación del material ha sido satisfactoria, el programa continuará automáticamente con la consulta de algunos parámetros de la muestra necesarios para ajustar la separación a cada muestra individual y proporcionar al operario información importante sobre los volúmenes de solución tampón y de bolsa necesarios.

La ventana muestra la Pantalla 7.28.



Pantalla 7.28: Introducción de los parámetros de la muestra

1. Comience por introducir la concentración de WBC de la muestra. El intervalo permitido se indica en el cuadro situado en el lado inferior izquierdo. Pulse ◄ para corregir una entrada incorrecta.

   Confirme que el valor introducido corresponde al valor de la muestra. De lo contrario, el procesamiento de la muestra puede ser deficiente.

   IMPORTANTE
   Todos los parámetros de la muestra necesarios se refieren a la muestra después del procedimiento de marcaje y de lavado. El intervalo permitido que se muestra en el cuadro de la parte inferior izquierda siempre tiene en cuenta la entrada anterior. Después de cada introducción, el software calculará y ajustará el intervalo aceptado de la siguiente consulta.

   ⚠ ATENCIÓN

   La especificación de parámetros incorrectos puede dar lugar a un procesamiento deficiente de la muestra y aumentar el riesgo de pérdida de células diana. La introducción de valores de concentración de WBC o de porcentaje de células marcadas inferiores a los valores reales de la muestra puede dar lugar a la pérdida de células por sobrecarga del sistema. La introducción de un volumen de muestra inferior puede provocar la pérdida de células por sobrecarga o incluso por un procesamiento incompleto de la muestra. Si la especificación de cualquiera de los tres parámetros es demasiado alta, se producirá un aumento del tiempo de procesamiento y del volumen de la fracción celular objetivo. Asegúrese siempre de introducir los parámetros correctos.

   Para continuar con la entrada siguiente, pulse **ENT**.

2. Introduzca el porcentaje de células marcadas. Confirme que el valor introducido corresponde al valor de la muestra. De lo contrario, el procesamiento de la muestra puede ser deficiente (consulte «Importante»).

   Para continuar con la entrada siguiente, pulse **ENT**.

3. Introduzca el volumen final de la muestra celular. Confirme que el valor introducido corresponde al valor de la muestra. De lo contrario, el procesamiento de la muestra puede ser deficiente (consulte «Importante»).

Para continuar, pulse **ENT**.

Cálculo

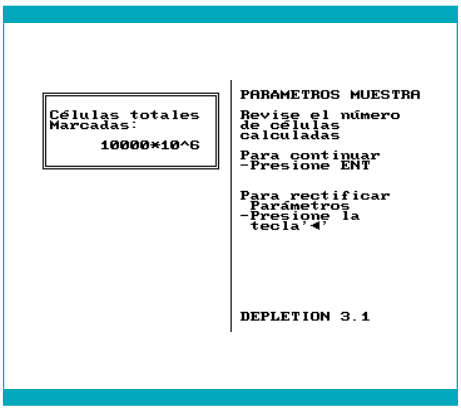
El software CliniMACS Plus calcula el número total de células marcadas para comprobar si la capacidad de separación es suficiente.

El resultado se muestra en una de de las siguientes pantallas:

- El resultado del cálculo se muestra en una pantalla similar a la Pantalla 7.29. Asegúrese de que el número de células marcadas sea correcto.

  Para continuar, pulse **ENT**.

  Los datos se pueden corregir. Pulse ◄ para volver a la pantalla anterior y realizar la corrección.

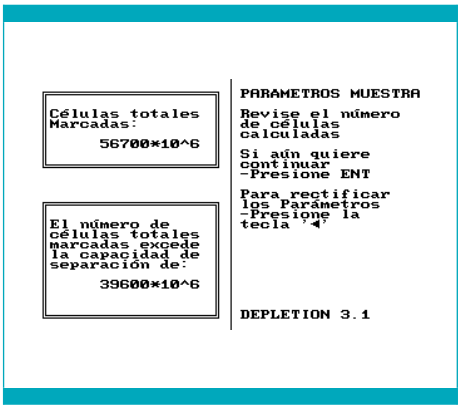


Pantalla 7.29: Selección del set de tubos

- Si el número calculado de células marcadas supera la capacidad de separación del sistema CliniMACS Plus, aparecerá una pantalla similar a la Pantalla 7.30. Asegúrese de haber introducido los parámetros correctos de la muestra y de que el número calculado de células sea correcto. Pulse ◄ para volver a la pantalla anterior y corregir los parámetros de la muestra.

  Para evitar la sobrecarga del sistema, divida la muestra y determine el volumen de cada porción. Pulse ◄ para volver a la Pantalla 7.28 anterior. Introduzca los parámetros de la muestra para la primera alícuota de la muestra y continúe con la separación de esta porción. Una vez finalizada la separación, inicie una segunda separación con la segunda alícuota, utilizando un nuevo set de tubos.

  Para continuar, pulse **ENT**.



Pantalla 7.30: Cálculo: El número de células supera la capacidad de separación

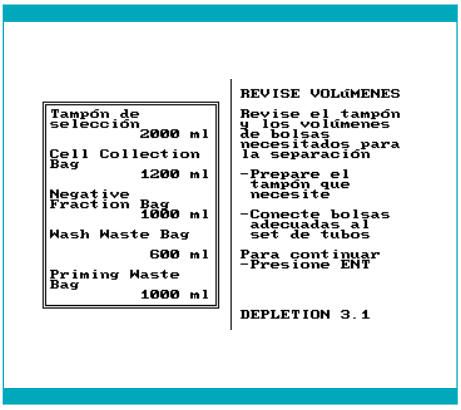
Información del volumen

A partir del número total de células marcadas (consulte la sección «Cálculo»), el software calculará el número de etapas de separación, la cantidad de solución tampón necesaria para toda la depleción y los volúmenes de líquido que se recogerán en la Cell Collection Bag, la Non-Target Cell Bag y la Reapplication Bag.

IMPORTANTE

- *La Negative Fraction Bag equivale a la Non-Target Cell Bag.*
- *La Priming Waste Bag equivale a la Reapplication Bag.*

Si uno de los valores calculados supera estos valores predeterminados, aparecerá una pantalla similar a la Pantalla 7.31 para informar sobre la cantidad de líquido que se necesitará y acumulará durante el proceso de separación. Si fuera necesario sustituirlas, sustituya las bolsas suministradas con el set de tubos por otras bolsas de tamaño adecuado. Las bolsas fijadas originalmente al set de tubos están conectadas mediante conexiones de Luer. Las bolsas que sustituyen a las originales deben disponer de un conector de Luer hembra. Las bolsas estándar se pueden conectar por medio de un Luer/Spike Interconnector.



Pantalla 7.31: Comprobación de los volúmenes

1. Confirme que esté disponible la cantidad de solución tampón solicitada. No cuelgue más de tres litros de solución tampón en el gancho.

   AVISO

   Riesgo de daños del instrumento. La sobrecarga de los ganchos puede dañar el instrumento. La capacidad de carga de un gancho es de 3 kg. No sobrecargue los ganchos.

2. Abra la bandeja del set de tubos en condiciones estériles y sustituya en caso necesario las bolsas originales por otras más grandes. Garantice un flujo libre a estas bolsas.

3. Si fuera necesaria una sustitución, sustituya la Cell Collection Bag del set de tubos con una bolsa de transferencia de un tamaño suficiente. Determine el peso de la nueva Cell Collection Bag vacía y anótelo. Asegúrese de que el flujo libre hacia la Cell Collection Bag no esté restringido. También puede conectar una bolsa de transferencia adicional de 600 mL a la primera Cell Collection Bag, p. ej., mediante un set de transferencia de plasma.

   IMPORTANTE

   - *Asegúrese de disponer de la cantidad necesaria de solución tampón y de que el volumen de las bolsas indicado en la Pantalla 7.31 sea suficiente. De lo contrario, se verá comprometido el rendimiento de la separación.*
   - *Cualquier modificación de los sets de tubos CliniMACS se debe realizar en condiciones estériles, p. ej., en la campana de flujo de aire laminar.*
   - *Para el análisis o el procesamiento celular posterior tenga en cuenta que los volúmenes indicados en la Pantalla 7.31 no son los volúmenes exactos, sino volúmenes que se ajustan a los requisitos de seguridad.*

4. Compruebe las conexiones de Luer de las columnas. Los conectores de Luer deben estar cerrados herméticamente.

Para continuar, pulse **ENT**.
El programa continúa automáticamente con las instrucciones para instalar el set de tubos en el instrumento.

▶ **Continúe con el PASO 3.**

7.3 PASO 3: Instalación de sets de tubos CliniMACS

7.3.1 CliniMACS Tubing Set y CliniMACS Tubing Set LS

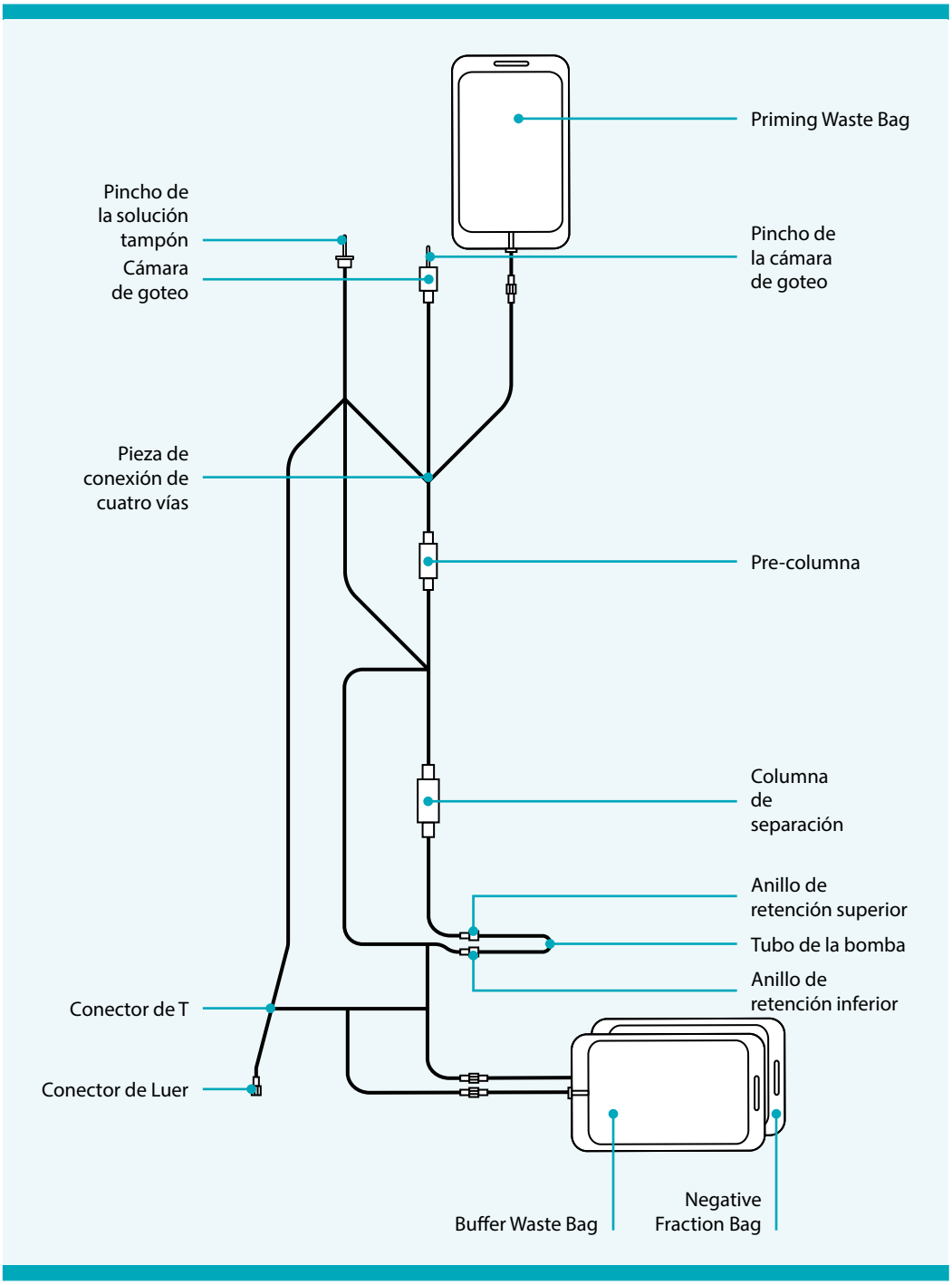


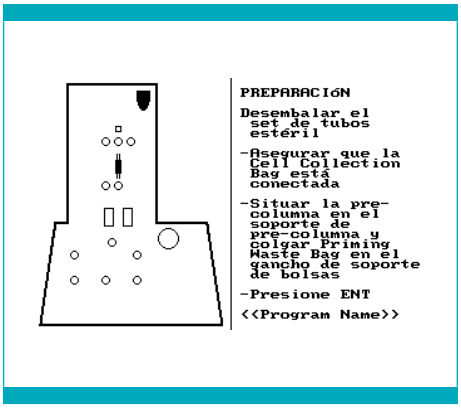
Figura 7.2: Diseño general de un CliniMACS Tubing Set (p. ej., CliniMACS Tubing Set)

Preparación para la instalación del set de tubos

La ventana muestra la Pantalla 7.32.

Las instrucciones se muestran a la derecha y un diagrama correspondiente a la instrucción a la izquierda de la pantalla. Los elementos parpadeantes de la pantalla indican las áreas a las que debe prestar atención.

El CliniMACS Tubing Set y el CliniMACS Tubing Set LS se suministran en paquetes sellados y esterilizados. Cada set tubos contiene tubos y columnas premontados para una separación celular (ver Figura 7.2). Si el envase está intacto, la vía de líquidos es estéril.



Pantalla 7.32: Desembalaje del set de tubos

⚠ ADVERTENCIA

Riesgo de contaminación. Un embalaje dañado indica que el set de tubos podría ya no ser estéril y que, en consecuencia, no se deberá utilizar. Examine cuidadosamente el envase con respecto a posibles daños, perforaciones o desgarros. Utilice el set de tubos solo si el envase está intacto y sellado.

Nota: El CliniMACS Plus Instrument indica en la línea inferior de la pantalla del instrumento el nombre del programa seleccionado, p. ej., CD34 SELECTION 1. En cualquier paso de la instalación del set de tubos, puede pulsar el botón «Undo» (consulte la sección «Descripción» del manual del usuario del CliniMACS Plus Instrument) para volver al paso anterior.

1. Anote el número de lote y la fecha de caducidad del set de tubos.

   Desembale el set de tubos estéril en condiciones estériles (p. ej., campana de flujo de aire laminar). Retire la pinza utilizada para el embalaje del CliniMACS Tubing Set LS antes de utilizar el set de tubos. La pinza está rotulada con «Retirar antes de la conexión al CliniMACS Plus Instrument».

2. Compruebe los conectores de Luer hacia las bolsas. Los conectores de Luer deben estar cerrados herméticamente.

Conexión de la Cell Collection Bag

1. Anote el peso de la Cell Collection Bag vacía.
2. En un entorno aséptico, retire los capuchones y conecte la Cell Collection Bag estéril equipada con un Luer/Spike Interconnector al set de tubos antes de cargar el set de tubos en el CliniMACS Plus Instrument. Asegúrese de que el tubo original de la Cell Collection Bag esté pinzado o sellado.

   Si necesitara más de una Cell Collection Bag para una separación, conecte las bolsas con un set de transferencia de plasma. Asegúrese de que todas las conexiones estén firmemente cerradas.
3. Asegúrese de que el flujo libre hacia la Cell Collection Bag no esté restringido.
4. Continúe con la instalación del set de tubos mediante el procedimiento que se describe abajo o según las indicaciones de «Instalación alternativa de los sets de tubos CliniMACS».

Suspensión de la Priming Waste Bag e inserción de la pre-columna

La ventana muestra la Pantalla 7.32.

1. Cuelgue la Priming Waste Bag en el gancho derecho del instrumento (ver Figura 7.3).
2. Ajuste la altura del gancho. Suba o baje el gancho para ajustar la altura al tamaño de la Priming Waste Bag. Asegúrese de que esté colocada lo suficientemente alta para evitar que el tubo se doble intensamente, lo que podría limitar el flujo, y que esté lo suficientemente baja para evitar que el tubo o las conexiones se estiren.
3. Introduzca la pre-columna en el soporte (ver Figura 7.4).

Para continuar, pulse **ENT**.

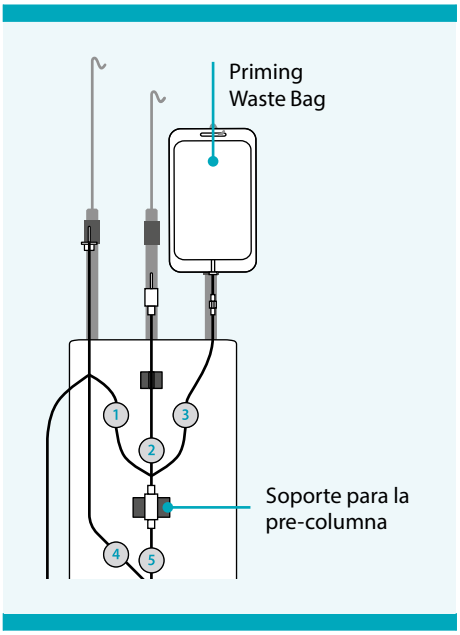


Figura 7.3: Suspensión de la Priming Waste Bag en el gancho

Inserción de la columna de separación y carga de la válvula n.° 5

La ventana muestra la Pantalla 7.33.

Las válvulas mostradas en negro en la pantalla se abrirán automáticamente para facilitar la inserción del tubo.

1. Inserte la columna de separación en el soporte de columna de separación (ver Figura 7.4).

   ⚠ ADVERTENCIA

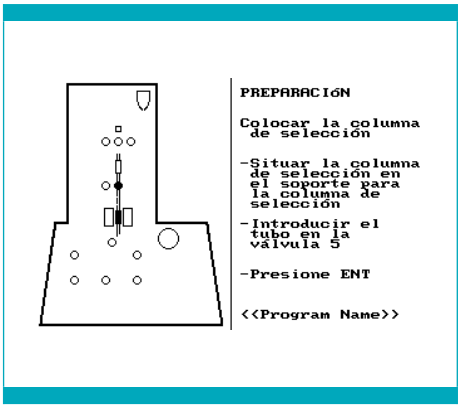
   Riesgo de lesiones. Si la columna de separación se inserta o se extrae mientras la unidad magnética está encendida, hay riesgo de lesiones personales. Inserte o extraiga la columna de separación cuando la unidad magnética esté apagada.

2. Cargue el tubo en la válvula n.° 5.

IMPORTANTE

- *A medida que se realiza cada paso, compruebe que todos los tubos y accesorios no estén acodados ni muy doblados, lo que podría limitar el flujo de líquido a través de los tubos. Compruebe todas las válvulas para asegurarse de que los tubos se ajustan firmemente.*
- *Introduzca el set de tubos solo en las válvulas abiertas (con el botón presionado hacia dentro). Los tubos no encajarán correctamente si se introducen en una válvula cerrada.*
- *Si fuera necesario ajustar un tubo después de cerrar una válvula, no tire del tubo sin pulsar el botón de la válvula para abrirla (ver Figura 7.5).*

Para continuar, pulse **ENT**.



Pantalla 7.33: Inserción de la columna de separación y carga de la válvula n.° 5

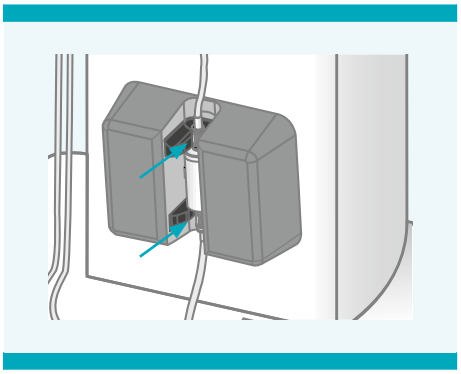


Figura 7.4: Columna de separación en el soporte de columna de separación

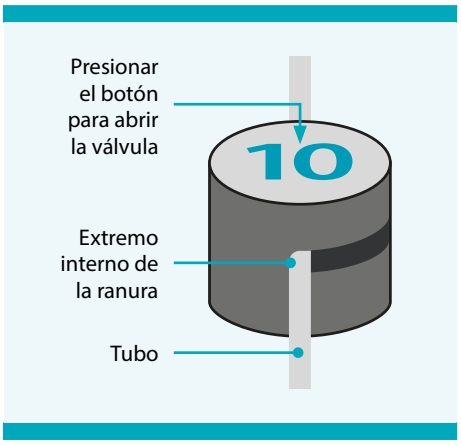
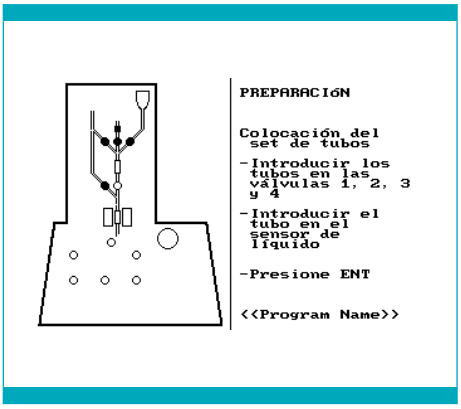


Figura 7.5: Tubo correctamente insertado

Carga de las válvulas núms. 1, 2, 3, y 4

La ventana muestra la Pantalla 7.34.



Pantalla 7.34: Carga de las válvulas núms. 1, 2, 3, 4 y sensor de líquido

1. Cargue el tubo en la válvula n.° 4. Confirme que el tubo esté correctamente introducido en la ranura de la válvula (ver Figura 7.5). Preste espacial atención a la zona entre las válvulas núms. 4 y 5 (ver Figura 7.6) y mantenga la pieza de conexión de cuatro vías en posición vertical.
2. Inserte el tubo en la válvula n.° 1.
3. Coloque la pieza de conexión de cuatro vías justo debajo de la válvula n.° 2. Preste espacial atención a la zona debajo de la válvula n.° 2.
4. Inserte los tubos en las válvulas núms. 2 y 3.
5. Monte el tubo entre la válvula n.° 2 y la cámara de goteo en el sensor de líquido. Confirme que el tubo esté correctamente introducido en el orificio del sensor.

   IMPORTANTE
   Para garantizar un funcionamiento correcto, el sensor de líquido y el tubo que esté insertando deben estar secos. Examine ambos cuidadosamente. Si presentaran líquido, seque la zona con un paño suave sin pelusas.

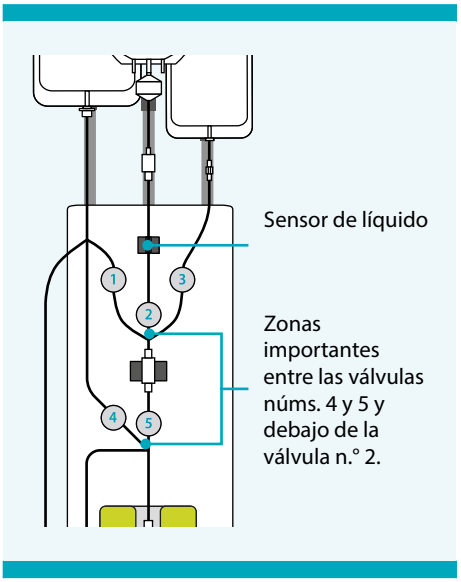
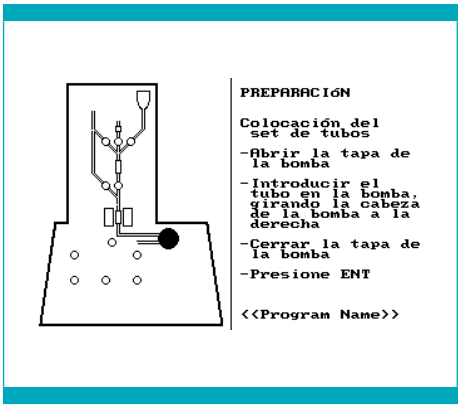


Figura 7.6: Tubos en las válvulas

Para continuar, pulse **ENT**.

Instalación del tubo de la bomba

La ventana muestra la Pantalla 7.35.



Pantalla 7.35: Instalación del tubo de la bomba

1. Abra la puerta de la bomba levantándola por el borde izquierdo.
2. Inserte el anillo de retención superior del tubo de la bomba en la ranura del anillo de retención de la carcasa de la bomba (ver Figura 7.7).
3. Gire el cabezal de la bomba en el sentido de las agujas del reloj hasta que el tubo esté enhebrado entre ambos sets de espigas de guía del tubo y el tubo quede firmemente ajustado alrededor del cabezal de la bomba. Asegúrese de no pinzar el tubo en el extremo de las espigas de guía. Si fuera necesario ajustar el tubo dentro de la bomba, se puede descargar el tubo levantando el extremo inferior y girando el cabezal de la bomba en sentido contrario al de las agujas del reloj.
4. Inserte el anillo de retención inferior del tubo de la bomba en la ranura del anillo de retención de la carcasa de la bomba.
5. Gire el cabezal de la bomba en el sentido de las agujas del reloj y en sentido contrario, para comprobar si el cabezal de la bomba se mueve libremente.
6. Cierre la puerta de bomba.

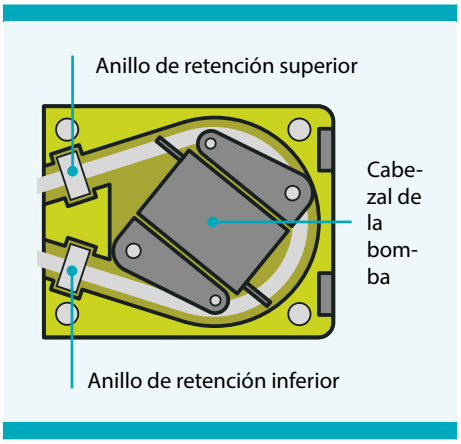


Figura 7.7: Instalación del tubo de la bomba

IMPORTANTE

Durante el programa de separación celular, la bomba interrumpirá inmediatamente el ciclo siempre que se abra la carcasa de la bomba. Si se deja abierta durante más de 600 segundos, el instrumento cancelará el ciclo en curso.

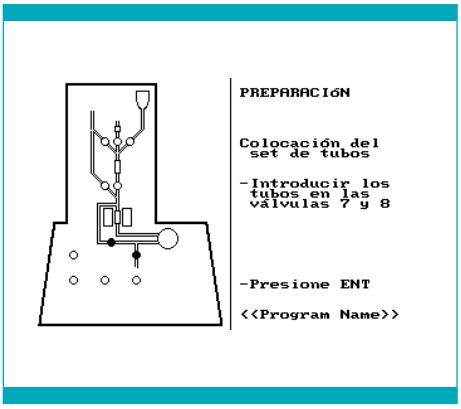
Para continuar, pulse **ENT**.

Carga de las válvulas núms. 7 y 8

La ventana muestra la Pantalla 7.36.

1. Cargue el tubo en la válvula n.° 7.
2. Cargue el tubo en la válvula n.° 8.

Para continuar, pulse **ENT**.



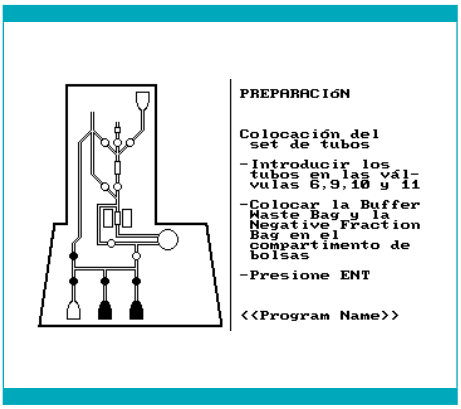
Pantalla 7.36: Carga de las válvulas núms. 7 y 8

Carga de las válvulas núms. 6, 9, 10, y 11

La ventana muestra la Pantalla 7.37.

1. Inserte los tubos en las válvulas núms. 6, 9, 10 y 11.
2. Introduzca la Negative Fraction Bag y la Buffer Waste Bag en el compartimento de bolsa. Asegúrese de que los tubos no estén comprimidos debajo de la tapa del compartimento de bolsa.

Para continuar, pulse **ENT**.



Pantalla 7.37: Carga de las válvulas núms. 6, 9, 10, y 11

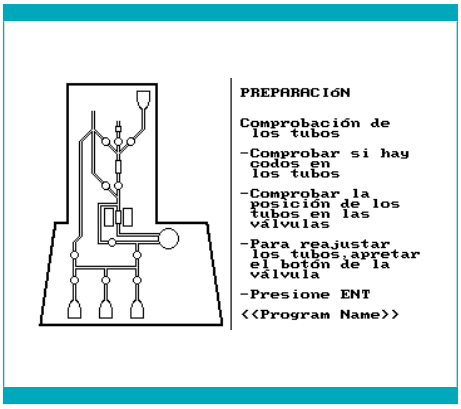
Revisión de todos los tubos y accesorios

La ventana muestra la Pantalla 7.38.

Antes de reiniciar la separación celular, revise todos los tubos y accesorios.

Nota: Compruebe si los tubos están correctamente insertados en las válvulas. Asegúrese de que las distancias entre los tubos sean uniformes y que los tubos no presenten dobleces ni zonas estiradas. Preste especial atención a la zona de la pre-columna, así como a la zona entre la bomba y las válvulas núms. 7 y 8 (ver Figura 7.8) y entre las válvulas núms. 4 y 5 (ver Figura 7.6). Si fuera necesario ajustar un tubo después de cerrar una válvula, no tire del tubo sin pulsar el botón de la válvula para abrirla. Si se ha ajustado un tubo, es imprescindible presionar dos veces con firmeza las válvulas correspondientes.

Para continuar, pulse **ENT**.



Pantalla 7.38: Revisión de todos los tubos y accesorios

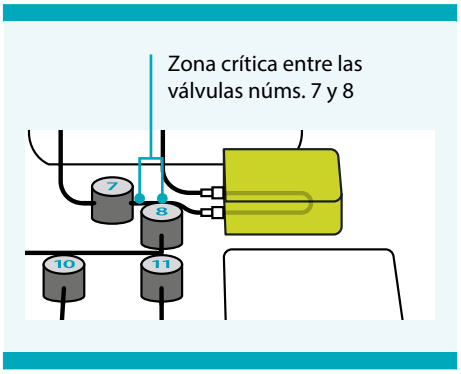


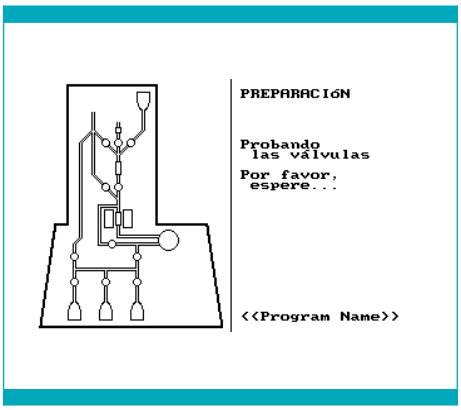
Figura 7.8: Tubos en las válvulas

Asiento de las válvulas

La ventana muestra la Pantalla 7.39.

Para garantizar el ajuste correcto de los tubos en las válvulas, el instrumento accionará todas las válvulas sucesivamente dos veces. Observe y escuche para asegurarse de que todas las válvulas funcionan correctamente. Si una válvula no funciona correctamente, consulte el capítulo 8 «Solución de problemas» en la página 207. Este paso se puede repetir pulsando ◄ seguido de **ENT** (consulte la sección «Descripción» del manual del usuario del CliniMACS Plus Instrument).

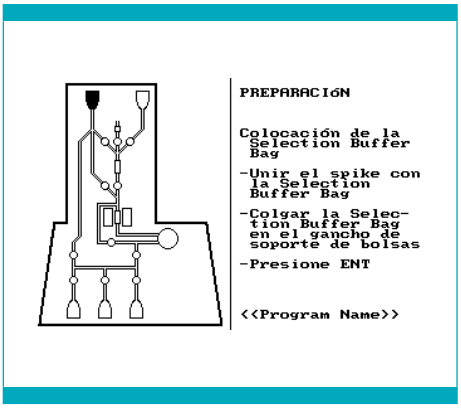
Durante esta secuencia de comprobación también se comprobará el accionamiento del imán.



Pantalla 7.39: Asiento de las válvulas

Conexión del CliniMACS PBS/EDTA Buffer

La ventana muestra la Pantalla 7.40.



Pantalla 7.40: Conexión de la bolsa de solución tampón

La solución tampón indicada para las separaciones CliniMACS Plus es CliniMACS PBS/EDTA Buffer enriquecido con HSA hasta una concentración final del 0,5% (p/v).

1. Utilizando técnicas asépticas, retire el capuchón del pincho de la solución tampón del set de tubos (ver Figura 7.2 en la página 152) y conéctelo a la bolsa de solución tampón. Asegúrese de perforar la membrana de goma para que el líquido pueda fluir libremente. Comprima suavemente la bolsa para confirmar que el pincho ha penetrado en ella.

   Si necesitara más de un litro de solución tampón para una separación, conecte dos bolsas de solución tampón con un set de transferencia de plasma.

2. Cuelgue la bolsa de solución tampón en el gancho para bolsas de solución tampón (ver Figura 7.9).

3. Ajuste la altura del gancho para bolsas de solución tampón. Suba o baje el gancho para ajustar la altura al tamaño de la bolsa de solución tampón. Asegúrese de que esté colocada lo suficientemente alta para evitar que el tubo se doble intensamente, lo que podría limitar el flujo, y que esté lo suficientemente baja para evitar que el tubo o las conexiones se estiren.

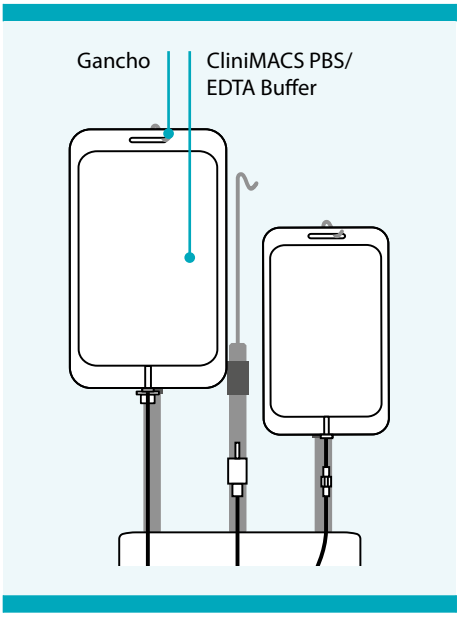


Figura 7.9: Conexión de la bolsa de solución tampón

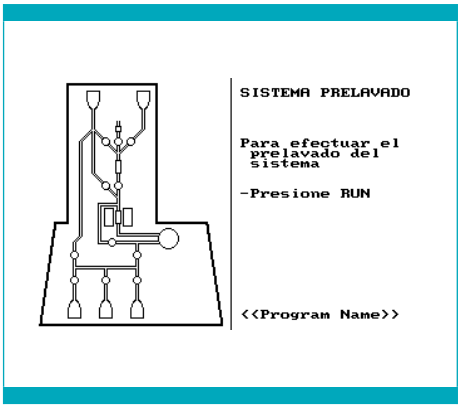
AVISO

Riesgo de daños del instrumento. La sobrecarga de los ganchos puede dañar el instrumento. La capacidad de carga de un gancho es de 3 kg. No sobrecargue los ganchos.

Para continuar, pulse **ENT**.

Inicio del cebado

La ventana muestra la Pantalla 7.41.



Pantalla 7.41: Inicio del cebado

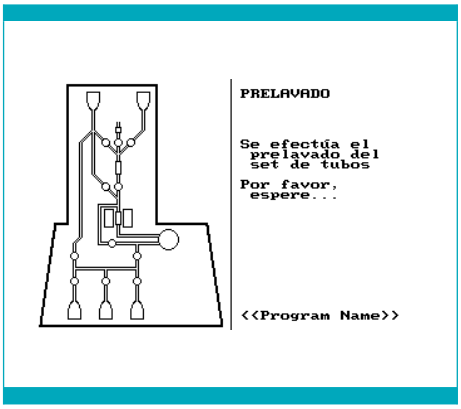
Para iniciar el cebado, pulse **RUN**.

La ventana muestra la Pantalla 7.42.

Durante la fase de cebado, el set de tubos se llena con solución tampón. La solución tampón circulará por el set de tubos, incluidas la pre-columna y la columna de separación. Los residuos del cebado se recogen en la Priming Waste Bag y la Buffer Waste Bag (ver Figura 7.2 en la página 152). Los ciclos de cebado continuarán; se repetirán una serie de pasos. La fase de cebado tardará aproximadamente 1 minuto. El estado del cebado se actualizará en la pantalla.

Comprobación durante el cebado

Durante la fase de cebado, compruebe todos los tubos, accesorios, válvulas y columnas para detectar posibles fugas o la presencia de pliegues que puedan bloquear el flujo de líquido.



Pantalla 7.42: Cebado en curso

Si se observan fugas o fallos de funcionamiento, pulse **STOP** para detener el ciclo.

El operario tendrá 600 segundos para resolver el problema.

Pulse **RUN** para continuar el proceso.

Transcurridos 600 segundos se cancelará la separación. Si el operario no puede resolver el problema o si el set de tubos está defectuoso, retire el set de tubos y sustitúyalo por uno nuevo.

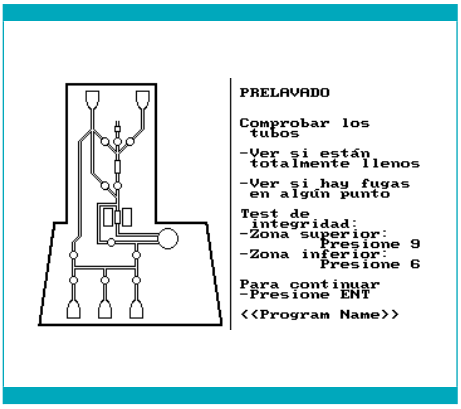
Nota: Una vez iniciado el cebado, no podrá volver al procedimiento de configuración del instrumento.

Comprobación final de todos los tubos y accesorios

La ventana muestra la Pantalla 7.43.

Antes de continuar con el programa, compruebe lo siguiente:

- que hay líquido en todos los componentes del set de tubos (excepto en el pre-filtro)
- no haya aire en el set de tubos
- que hay líquido en la Priming Waste Bag y la Buffer Waste Bag
- ausencia de líquido en la Negative Fraction Bag o la Cell Collection Bag



Pantalla 7.43: Comprobación final de los tubos

No pulse todavía ENT.

Test de integridad

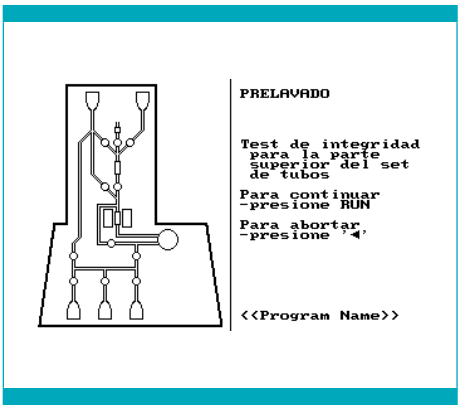
Para mayor seguridad, debe realizarse un test de integridad para verificar la ausencia de fugas en el set tubos. La secuencia del test consta de dos subsecuencias automatizadas, que permiten presurizar y observar por separado las partes superior e inferior del set de tubos.

Test de integridad de la parte superior del set de tubos

1. Cuando el operario lleve a cabo la «Comprobación final de todos los tubos y accesorios», la ventana indicará Pantalla 7.43.
2. Tras realizar la «Comprobación final de todos los tubos y accesorios», continúe con la ejecución del test de integridad. **No** pulse ENT.
3. Para ejecutar el test de integridad de la parte superior, pulse **9**.

   La ventana muestra la Pantalla 7.44.
4. Para iniciar la secuencia de test, pulse **RUN**.

   Para volver a la Pantalla 7.43, pulse ◄.



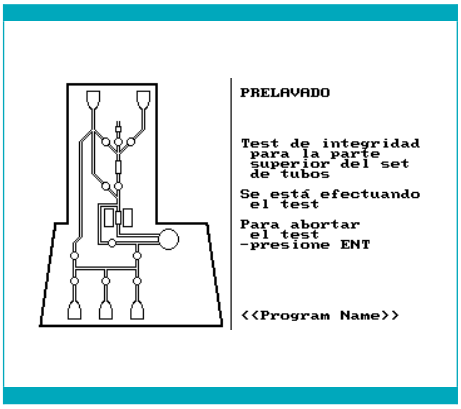
Pantalla 7.44: Inicio del test de integridad para la parte superior

5. Una vez haya pulsado **RUN**, el instrumento iniciará la secuencia de test automatizada de la parte superior del set de tubos

   La ventana muestra la Pantalla 7.45.

   Se creará y mantendrá una sobrepresión durante dos minutos. Durante este tiempo, el operario debe vigilar todas las conexiones situadas encima de la conexión del tubo superior de la bomba.

   La secuencia del test se puede finalizar en cualquier punto pulsando **ENT**.



Pantalla 7.45: Test de integridad para la parte superior en curso

6. Transcurridos dos minutos, la presión se reducirá automáticamente y la ventana indicará Pantalla 7.43.

   Compruebe si se han producido fugas durante la secuencia del test. Si se observan fugas en alguna de las conexiones del set de tubos, deberá desconectar el set de tubos y sustituirlo por uno nuevo. Póngase en contacto con el Miltenyi Biotec Technical Support para obtener instrucciones sobre la devolución del set de tubos defectuoso.

7. Si no se observan fugas, continúe con el test de integridad de la parte inferior del set de tubos.

Test de integridad de la parte inferior del set de tubos

La ventana muestra la Pantalla 7.46.

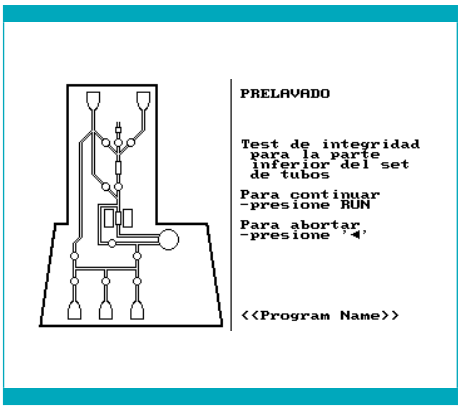
1. Para comenzar el test de integridad de la parte inferior, pulse **6**.
   No pulse ENT.

   La ventana muestra la Pantalla 7.46.

2. Para iniciar la secuencia del test, pulse **RUN**.

   Para volver a la Pantalla 7.43, pulse ◄.

3. Una vez haya pulsado **RUN**, el instrumento iniciará la secuencia de test automatizada de la parte inferior del set de tubos

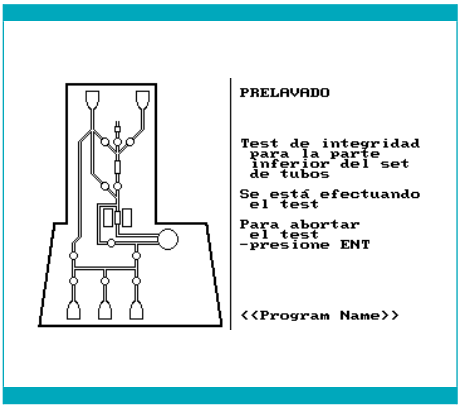


Pantalla 7.46: Inicio del test de integridad para la parte inferior

La ventana muestra la Pantalla 7.47.

Se creará y mantendrá una sobrepresión durante 30 segundos. Durante este tiempo, el operario debe vigilar la conexión del tubo inferior de la bomba y los conectores de T entre las válvulas núms. 6, 8, 9, 10 y 11.

La secuencia del test se puede finalizar en cualquier punto pulsando **ENT**.



Pantalla 7.47: Test de integridad para la parte inferior en curso

4. Transcurridos 30 segundos, la presión se reducirá automáticamente y la ventana indicará Pantalla 7.43.

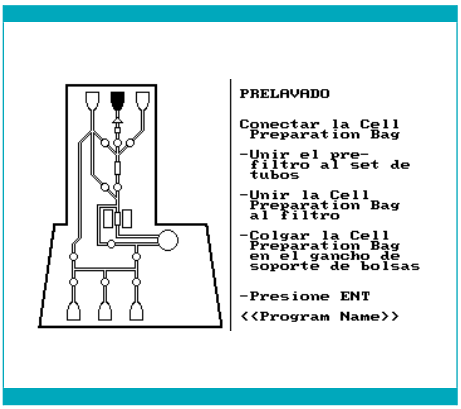
   Compruebe si se han producido fugas durante la secuencia del test. Si se observan fugas en alguna de las conexiones del set de tubos, deberá desconectar el set de tubos y sustituirlo por uno nuevo. Póngase en contacto con el Miltenyi Biotec Technical Support para obtener instrucciones sobre la devolución del set de tubos defectuoso.

5. Si no se detectan fugas, el operario puede continuar con el siguiente paso pulsando **ENT**.

Conexión de la Cell Preparation Bag

La ventana muestra la Pantalla 7.48.

Conecte la Cell Preparation Bag que contiene el producto celular marcado:



Pantalla 7.48: Conexión de la Cell Preparation Bag

1. Retire el capuchón del pincho de la cámara de goteo del set de tubos (ver Figura 7.2).
2. Retire el capuchón del extremo romo del pre-filtro (ver Figura 7.10). Inserte firmemente el punzón en el pre-filtro.
3. Retire el capuchón del pincho del pre-filtro de sistema.
4. Inserte el pre-filtro en una conexión no utilizada de la Cell Preparation Bag, asegurándose de haber perforado la membrana de goma para permitir el flujo libre de líquido. Comprima suavemente la bolsa para confirmar que el pincho ha penetrado en ella.
5. Compruebe cuidadosamente la conexión entre el pre-filtro y el set de tubos para confirmar que la conexión sea segura.
6. Cuelgue la Cell Preparation Bag en el gancho central.

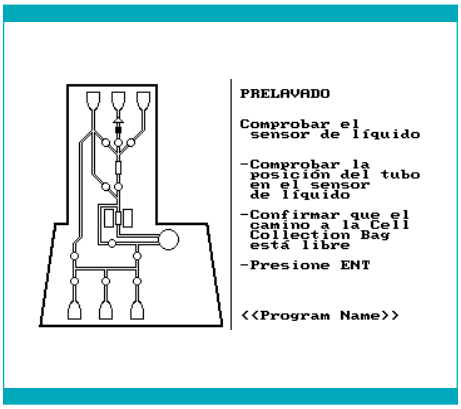
7. Ajuste el gancho para sujetar la Cell Preparation Bag en posición vertical.

Para continuar, pulse **ENT**.

Comprobación final del sensor de líquido

La ventana muestra la Pantalla 7.49.

1. Compruebe el tubo del sensor de líquido. Asegúrese de que el tubo esté correctamente insertado, de que no contenga líquido externo y que no se haya desprendido durante el procedimiento de carga.
2. Confirme que es posible un flujo sin restricciones a la Cell Collection Bag (p. ej., abrazadera abierta debajo de la válvula 9).



Pantalla 7.49: Comprobación final del sensor de líquido

Para continuar, pulse **ENT**.

▶ **Continúe con el PASO 4.**

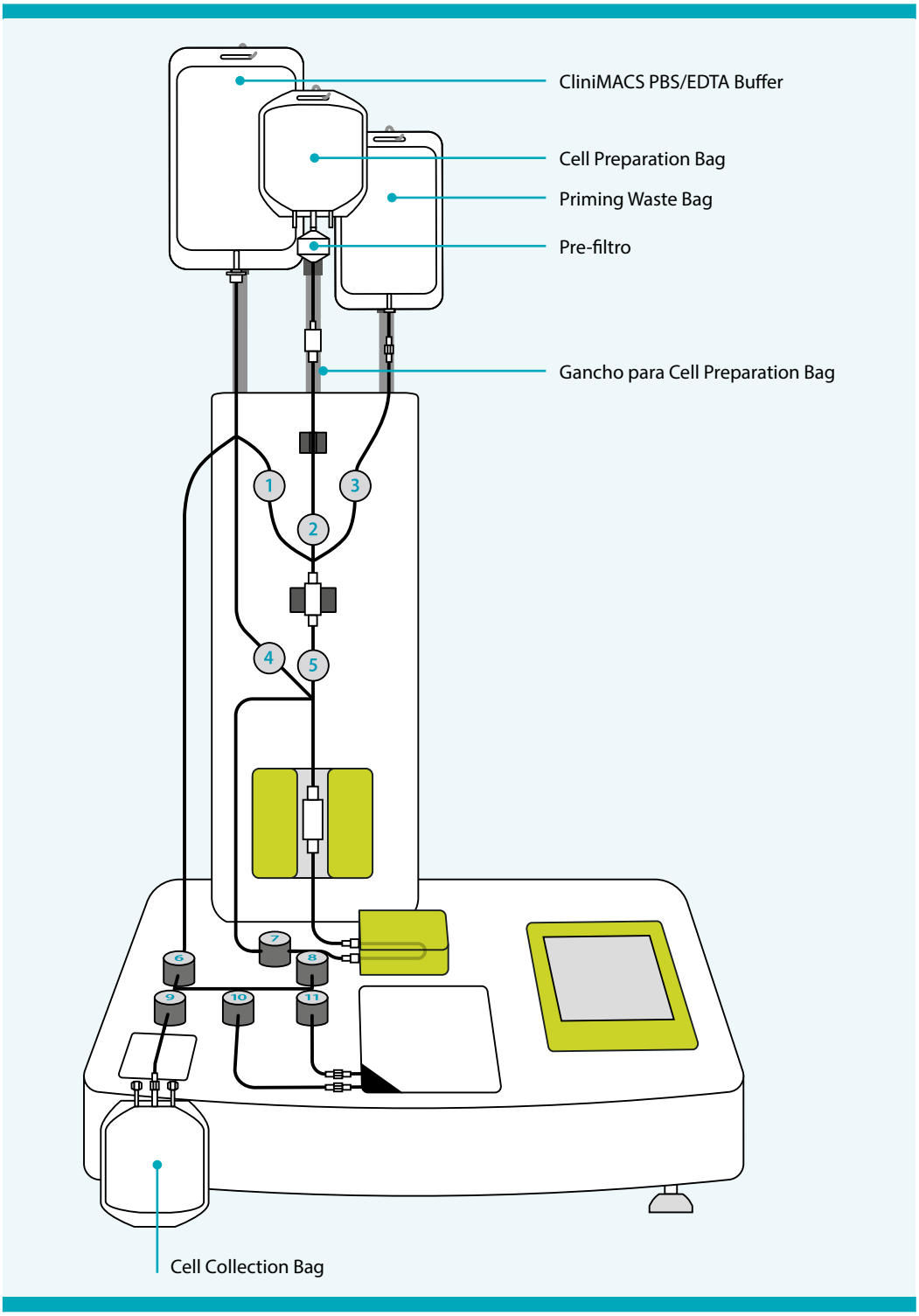


Figura 7.10: CliniMACS Plus Instrument con CliniMACS Tubing Set, CliniMACS PBS/EDTA Buffer, Cell Preparation Bag y Cell Collection Bag

7.3.2 Instalación alternativa de los sets de tubos CliniMACS

Las instrucciones del PASO 3 y las pantallas mostradas por el instrumento CliniMACS Plus describen la instalación de los sets de tubos CliniMACS en condiciones estériles (sala blanca).

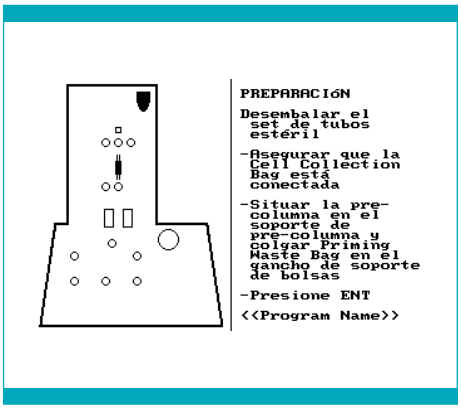
El propio sistema CliniMACS Plus es un sistema cerrado que no necesariamente se debe utilizar en una sala blanca. Sin embargo, si se utiliza fuera de una sala blanca, será necesario adaptar el procedimiento de instalación del set de tubos para garantizar la esterilidad del proceso de separación celular.

La esterilidad del proceso de separación celular puede verse comprometida durante la colocación de la Cell Collection Bag, el CliniMACS PBS/EDTA Buffer, el pre-filtro y la Cell Preparation Bag. Para garantizar que el sistema permanezca estéril, estos componentes se deben conectar al set de tubos en condiciones estériles (p. ej., campana de flujo de aire laminar). Al conectar los componentes al set de tubos antes de la instalación en el CliniMACS Plus Instrument, será necesario cambiar el orden de las instrucciones proporcionadas por el instrumento y las instrucciones del PASO 3, y se deberán tomar otras medidas.

Si utiliza el CliniMACS Plus Instrument fuera de una sala blanca, observe las siguientes instrucciones adicionales que modifican las instrucciones del PASO 3.

Preparación para la instalación del set de tubos

La ventana muestra la Pantalla 7.50.



Pantalla 7.50: Desembalaje del set de tubos

Como se ha descrito, la Cell Collection Bag, el CliniMACS PBS/EDTA Buffer, el pre-filtro y la Cell Preparation Bag se deben fijar al set de tubos antes de instalarlo en el instrumento en condiciones estériles.

Desembale el set de tubos y conecte los siguientes componentes en condiciones estériles:

- **Conexión de la Cell Collection Bag**

  Consulte la página 154.

Conexión del CliniMACS PBS/EDTA Buffer

IMPORTANTE

Antes de conectar el CliniMACS PBS/EDTA Buffer al set de tubos; pince el tubo debajo del pincho de la solución tampón con unas pinzas de cierre para evitar que la solución tampón fluya al set de tubos antes de la instalación (ver pinza 1, Figura 7.11 en la página 171).

Utilizando técnicas asépticas, retire el capuchón del pincho de la solución tampón del set de tubos y conéctelo a la bolsa de solución tampón. Asegúrese de perforar la membrana de goma para que el líquido pueda fluir libremente. Comprima suavemente la bolsa para asegurarse de que el pincho haya penetrado en ella.

Conexión del pre-filtro

Retire el capuchón del punzón de la cámara de goteo. Retire el capuchón del orificio inferior del pre-filtro.

Inserte firmemente el punzón en el pre-filtro. NO retire el capuchón del pre-filtro. Cierre el tubo justo por debajo de la cámara de goteo con unas pinzas de cierre (ver pinza 2, Figura 7.11 en la página 171). De esta manera se evita la penetración en el pre-filtro y el set de tubos de la suspensión celular preparada en la Cell Preparation Bag.

Conexión de la Cell Preparation Bag

Conecte la Cell Preparation Bag que contiene las células marcadas magnéticamente y lavadas al set de tubos. Inserte el pre-filtro en la Cell Preparation Bag y asegúrese de perforar la membrana de goma para permitir el flujo libre de líquido. Comprima suavemente la bolsa para asegurarse de que el pincho haya penetrado en ella.

Instalación del CliniMACS Plus Instrument

Cuelgue la bolsa de solución tampón en el gancho izquierdo, la Cell Preparation Bag en el gancho central y la Priming Waste Bag en el gancho derecho del instrumento.

Para continuar, pulse **ENT**.

▶ Suspensión de la Priming Waste Bag e inserción de la pre-columna

Consulte la página 154.

▶ Inserción de la columna de separación y carga de la válvula n.° 5

Consulte la página 155.

▶ Carga de las válvulas núms. 1, 2, 3, y 4

Consulte la página 156.

▶ Instalación del tubo de la bomba

Consulte la página 157.

▶ Carga de las válvulas núms. 7 y 8

Consulte la página 158.

▶ Carga de las válvulas núms. 6, 9, 10, y 11

Consulte la página 158.

▶ Revisión de todos los tubos y accesorios

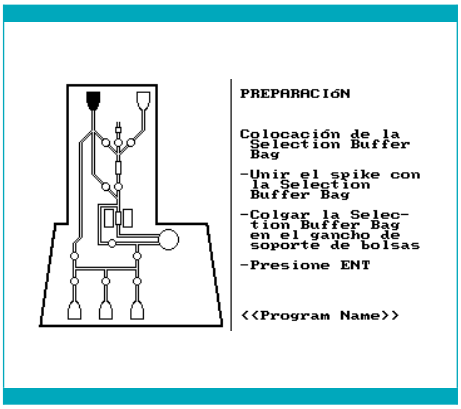
Consulte la página 159.

▶ Asiento de las válvulas

Consulte la página 159.

Conexión del CliniMACS PBS/EDTA Buffer

La ventana muestra la Pantalla 7.51.



Pantalla 7.51: Conexión de la bolsa de solución tampón

1. La bolsa de solución tampón se ha conectado durante la «Preparación para la instalación del set de tubos». Por lo tanto, es posible que solo deba ajustar la altura del gancho de la bolsa de solución tampón. Suba o baje el gancho para ajustar la altura al tamaño de la bolsa de solución tampón, asegurándose de que la altura ajustada sea lo suficientemente alta para evitar que el tubo se doble intensamente, lo que podría restringir el flujo de líquido, y lo suficientemente baja para evitar estirar el tubo o las conexiones.
2. Retire las pinzas de cierre del tubo justo debajo del pincho de la solución tampón.

Para continuar, pulse **ENT**.

▶ Inicio del cebado

Consulte la página 161.

▶ Comprobación durante el cebado

Consulte la página 161.

▶ Comprobación final de todos los tubos y accesorios

Consulte la página 162.

▶ Test de integridad

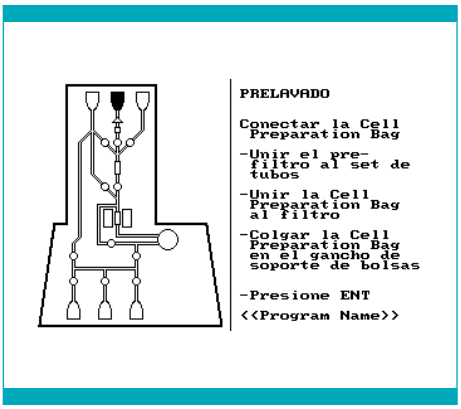
Consulte la página 162.

Conexión de la Cell Preparation Bag (y pre-filtro)

La ventana muestra la Pantalla 7.52.

1. La Cell Preparation Bag y el pre-filtro se han conectado durante la «Preparación para la instalación del set de tubos».
2. Retire las pinzas de cierre situadas debajo de la cámara de goteo.

Para continuar, pulse **ENT**.



Pantalla 7.52: Conexión de la Cell Preparation Bag

▶ Comprobación final del sensor de líquido

Consulte la página 165.

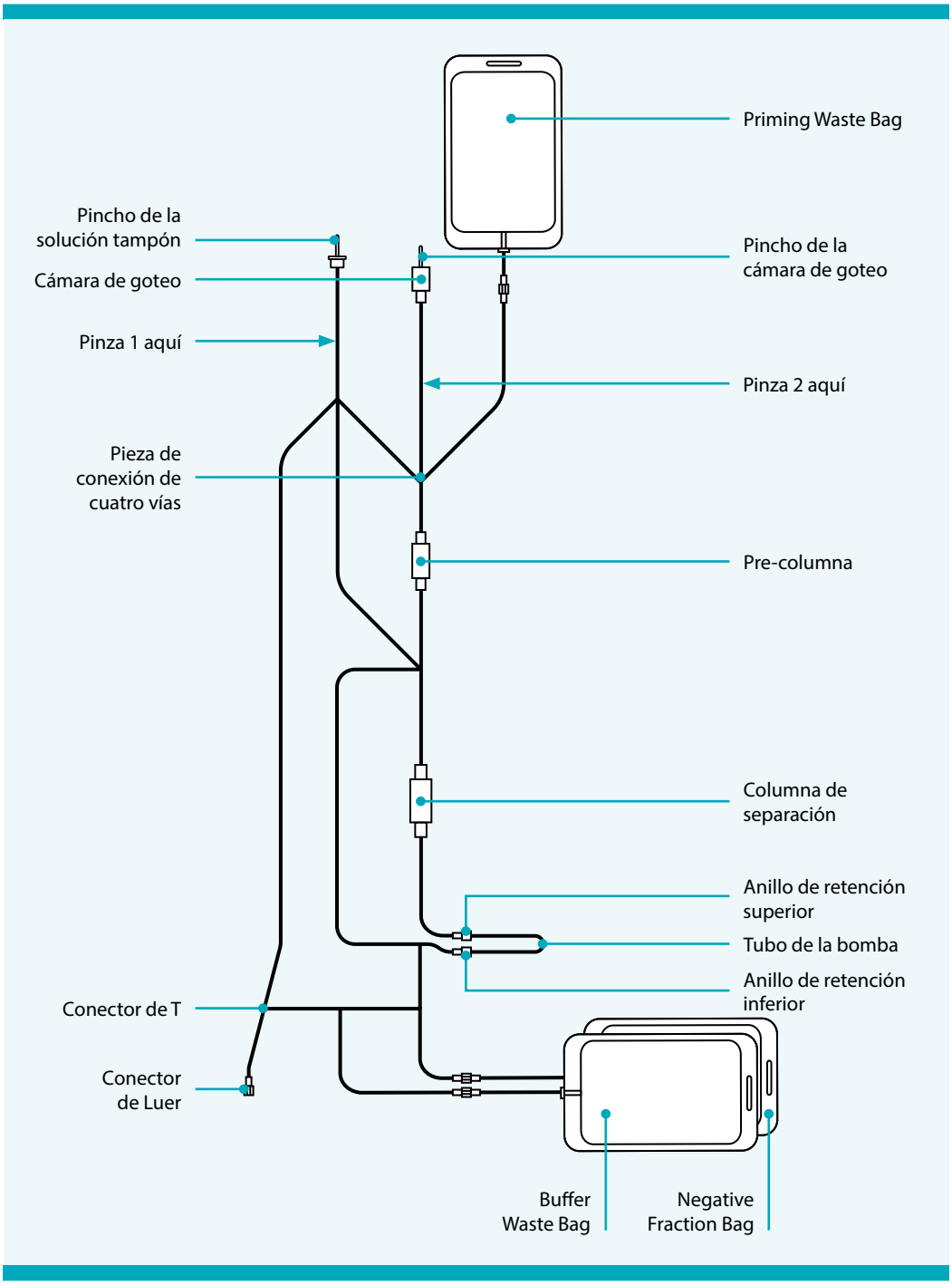


Figura 7.11: Diseño general de un CliniMACS Tubing Set (p. ej., CliniMACS Tubing Set) con posiciones de pinzamiento 1 y 2

7.3.3 CliniMACS Depletion Tubing Set

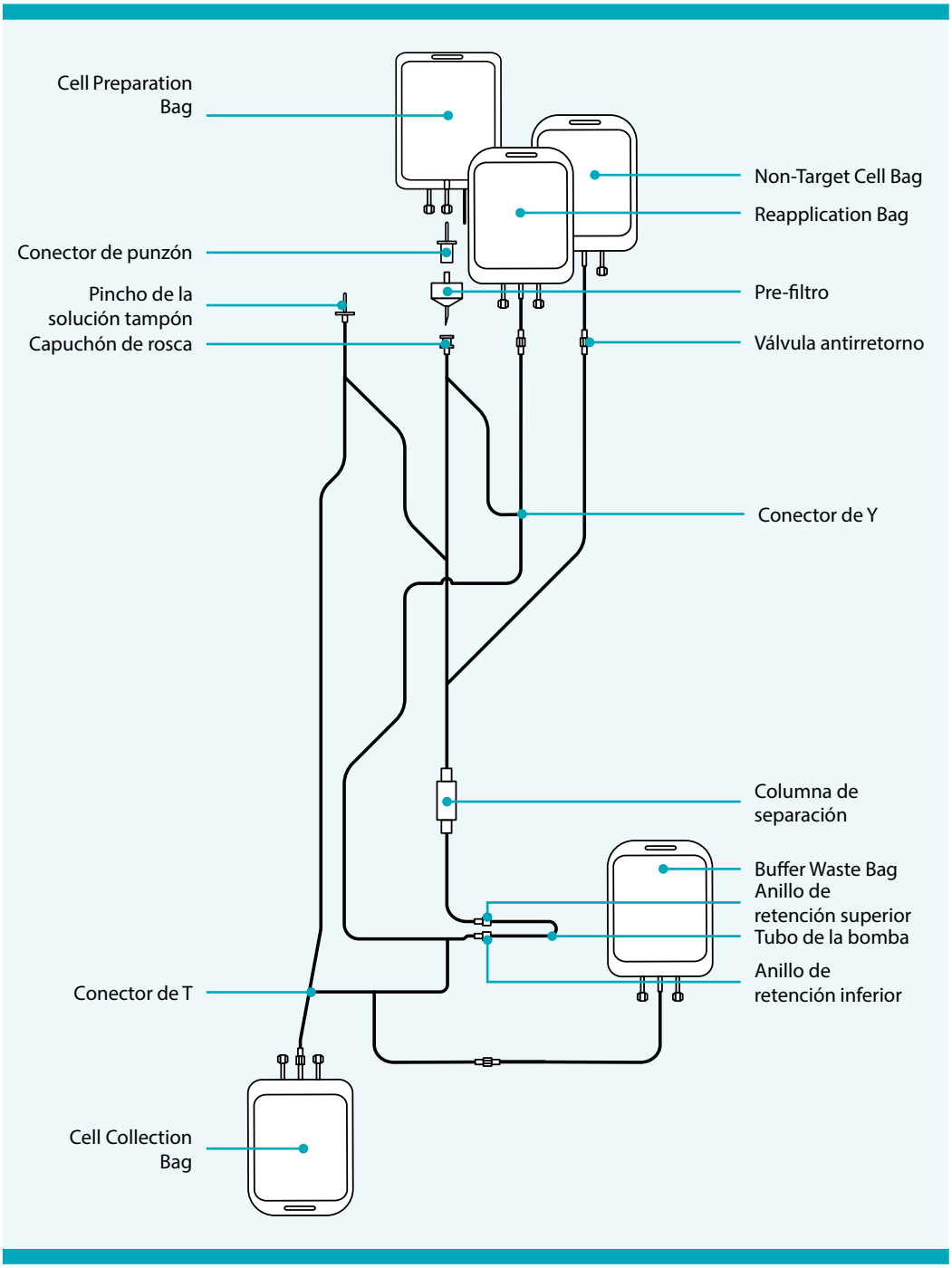


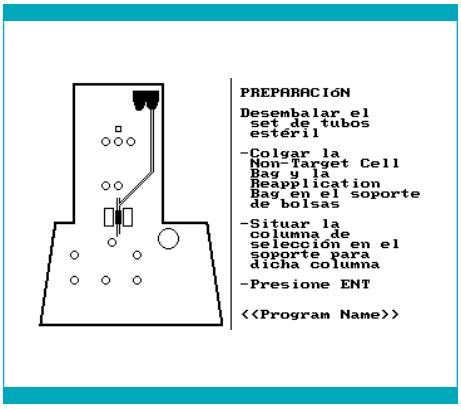
Figura 7.12: Diseño general de un CliniMACS Depletion Tubing Set

Preparación para la instalación del set de tubos

La ventana muestra la Pantalla 7.53.

A la derecha se muestra la instrucción y a la izquierda un diagrama correspondiente a la instrucción. Los elementos parpadeantes de la pantalla indican las áreas a las que debe prestar atención.

El CliniMACS Depletion Tubing Set se suministra en un envase sellado esterilizado. Cada set tubos contiene tubos premontados, una columna y bolsas para una separación celular (ver Figura 7.12). Si el envase está intacto, la vía de líquidos es estéril.



Pantalla 7.53: Desembalaje del set de tubos

Nota: El CliniMACS Plus Instrument indica el nombre del programa seleccionado, p. ej., DEPLETION 3.1, en la línea inferior. En cualquier paso de la instalación del set de tubos, puede pulsar el botón «Undo» (consulte la sección «Descripción» del manual del usuario del CliniMACS Plus Instrument) para volver al paso anterior.

1. Anote el número de lote y la fecha de caducidad del set de tubos.

   Desembale el set de tubos estéril en condiciones estériles (p. ej., campana de flujo de aire laminar). Retire la pinza utilizada para el embalaje antes de utilizar el set de tubos. La pinza está rotulada con «Retirar antes de la conexión al CliniMACS Plus Instrument».

2. Compruebe los conectores de Luer hacia las bolsas. Los conectores de Luer deben estar cerrados herméticamente.

Cell Collection Bag

El CliniMACS Depletion Tubing Set se proporciona con una Cell Collection Bag conectada. Anote el peso de la Cell Collection Bag vacía. Si necesitara más de una Cell Collection Bag para una separación, conecte las bolsas con un set de transferencia de plasma. Asegúrese de que todas las conexiones estén firmemente cerradas. Anote el peso de las Cell Collection Bags vacías.

Suspensión de la Non-Target Cell Bag y la Reapplication Bag e inserción de la columna de separación

1. Cuelgue la Non-Target Cell Bag y la Reapplication Bag al gancho derecho del instrumento (ver Figura 7.13).
2. Ajuste la altura de los ganchos. Suba o baje los ganchos para ajustar la altura al tamaño de la Non-Target Cell Bag y la Reapplication Bag. Asegúrese de que estén colocadas lo suficientemente altas para evitar que los tubos se doblen intensamente, lo que podría limitar el flujo, y que estén lo suficientemente bajas para evitar que los tubos o las conexiones se estiren.

   AVISO

   Riesgo de daños del instrumento. La sobrecarga de los ganchos puede dañar el instrumento. La capacidad de carga de un gancho es de 3 kg. No sobrecargue los ganchos.
3. Inserte la columna de separación en el soporte de columna de separación (ver Figura 7.14).

   ⚠ ADVERTENCIA

   Riesgo de lesiones. Si la columna de separación se inserta o se extrae mientras la unidad magnética está encendida, hay riesgo de lesiones personales. Inserte o extraiga la columna de separación cuando la unidad magnética esté apagada.

Para continuar, pulse **ENT**.

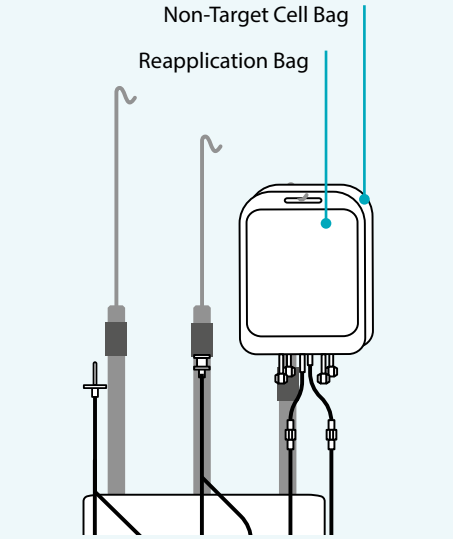


Figura 7.13: Suspensión de la Non-Target Cell Bag y la Reapplication Bag

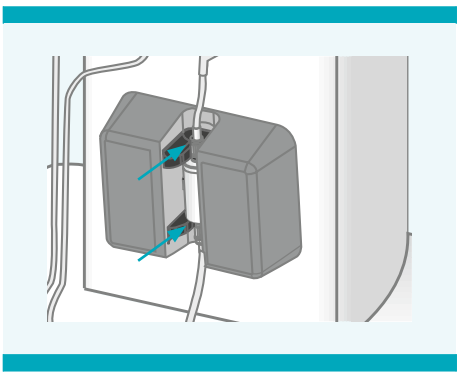
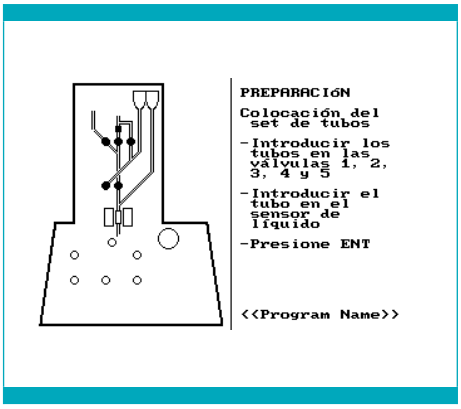


Figura 7.14: Columna de separación en el soporte de columna de separación

Carga de las válvulas núms. 1, 2, 3, 4 y 5

La ventana muestra la Pantalla 7.54.



Pantalla 7.54: Carga de las válvulas núms. 1, 2, 3, 4 y 5

Las válvulas mostradas en la pantalla se abrirán automáticamente.

1. Inserte los tubos en las válvulas núms. 1, 2, 3, 4 y 5.
2. Inserte el tubo situado encima de la válvula n.° 2 en el sensor de líquido (ver Figura 7.15).

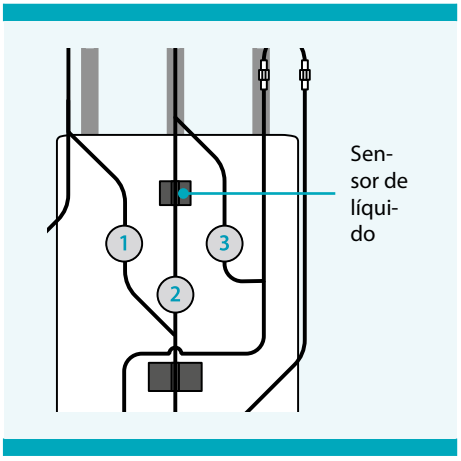


Figura 7.15: Tubos en las válvulas

IMPORTANTE

- *Para garantizar un funcionamiento correcto, el sensor de líquido y el tubo que esté insertando deben estar secos. Examine ambos cuidadosamente. Si presentaran líquido, seque la zona con un paño suave sin pelusas.*
- *A medida que se realiza cada paso, compruebe que todos los tubos y accesorios no estén acodados ni muy doblados, lo que podría limitar el flujo de líquido a través de los tubos. Compruebe todas las válvulas para asegurarse de que los tubos se ajustan firmemente.*
- *Introduzca el set de tubos solo en las válvulas abiertas (con el botón presionado hacia dentro). Los tubos no encajarán correctamente si se introducen en una válvula cerrada.*
- *Si fuera necesario ajustar un tubo después de cerrar una válvula, no tire del tubo sin pulsar previamente el botón de la válvula para abrirla (ver Figura 7.16).*

Para continuar, pulse **ENT**.

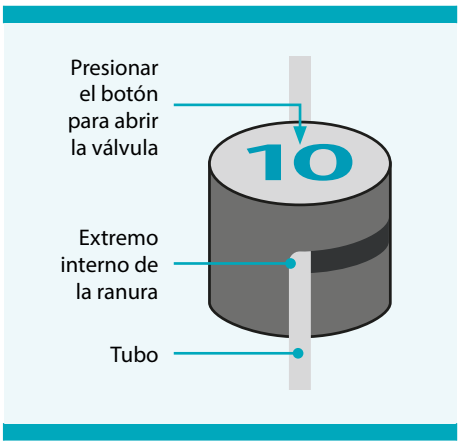
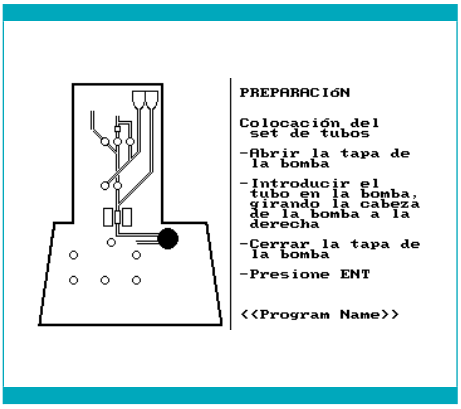


Figura 7.16: Tubo correctamente insertado

Instalación del tubo de la bomba

La ventana muestra la Pantalla 7.55.

1. Abra la puerta de la bomba levantándola por el borde izquierdo.
2. Inserte el anillo de retención superior del tubo de la bomba en la ranura del anillo de retención de la carcasa de la bomba (ver Figura 7.17).
3. Gire el cabezal de la bomba en el sentido de las agujas del reloj hasta que el tubo esté enhebrado entre ambos sets de espigas de guía del tubo y el tubo quede firmemente ajustado alrededor del cabezal de la bomba. Asegúrese de no pinzar el tubo en el extremo de las espigas de guía. (Si fuera necesario ajustar el tubo dentro de la bomba, se puede descargar el tubo levantando el extremo inferior y girando el cabezal de la bomba en sentido contrario al de las agujas del reloj.)
4. Inserte el anillo de retención inferior del tubo de la bomba en la ranura del anillo de retención de la carcasa de la bomba.
5. Vuelva a girar el cabezal de la bomba para asegurarse de que se mueve libremente.
6. Cierre la puerta de bomba.



Pantalla 7.55: Instalación del tubo de la bomba

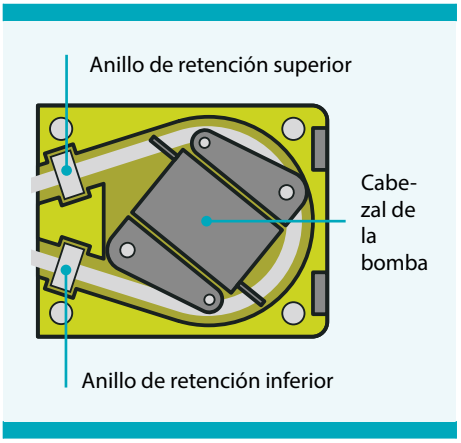


Figura 7.17: Instalación del tubo de la bomba

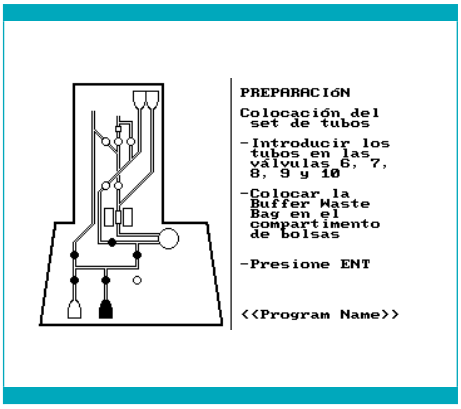
IMPORTANTE

Durante el programa de separación celular, la bomba interrumpirá inmediatamente el ciclo siempre que se abra la carcasa de la bomba. Si se deja abierta durante más de 600 segundos, el instrumento cancelará el ciclo en curso.

Para continuar, pulse **ENT**.

Carga de las válvulas núms. 6, 7, 8, 9 y 10

La ventana muestra la Pantalla 7.56.



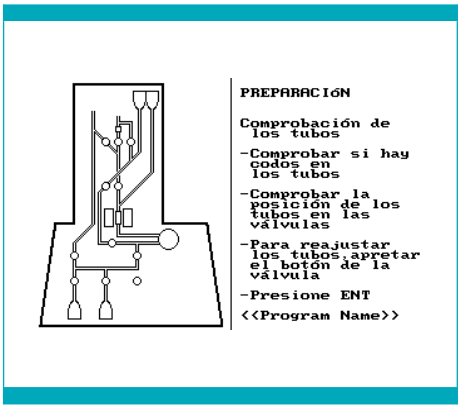
Pantalla 7.56: Carga de las válvulas núms. 6, 7, 8, 9 y 10

1. Inserte los tubos en las válvulas núms. 6, 7, 8, 9 y 10. Asegúrese de que el tubo esté correctamente introducido en la ranura de la válvula.
2. Introduzca la Buffer Waste Bag en el compartimento de bolsa. Asegúrese de que los tubos no estén comprimidos debajo de la tapa del compartimento de bolsa.
3. Asegúrese de que el flujo libre hacia la Cell Collection Bag no esté restringido.

Para continuar, pulse **ENT**.

Revisión de todos los tubos y accesorios

La ventana muestra la Pantalla 7.57.



Pantalla 7.57: Revisión de todos los tubos y accesorios

1. Comenzando por la válvula n.° 1, verifique que el tubo se ajuste y esté introducido correctamente en cada válvula.

   Revise el tubo en cada válvula. Asegúrese de que el tubo entra y sale de cada válvula por el ensanchamiento del extremo interior de la ranura (ver Figura 7.16).
2. Compruebe que el tubo no esté doblado ni retorcido.

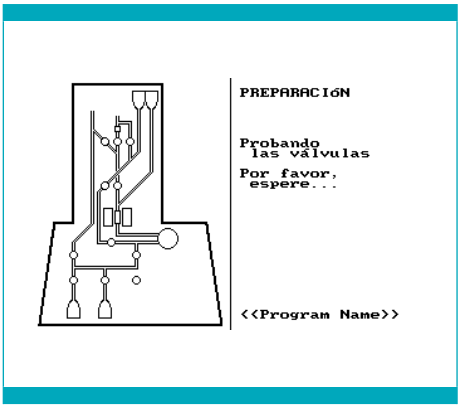
Nota: Si fuera necesario ajustar un tubo después de cerrar una válvula, no tire del tubo sin pulsar el botón de la válvula para abrirla.

Para continuar, pulse **ENT**.

Asiento de las válvulas

La ventana muestra la Pantalla 7.58.

Para garantizar el ajuste correcto de los tubos en las válvulas, el instrumento accionará todas las válvulas sucesivamente dos veces. Observe y escuche para asegurarse de que todas las válvulas funcionan correctamente. Si una válvula no funciona correctamente, consulte el capítulo 8 «Solución de problemas» en la página 207. Este paso se puede repetir pulsando ◄ seguido de **ENT** (consulte la sección «Descripción» del manual del usuario del CliniMACS Plus Instrument).

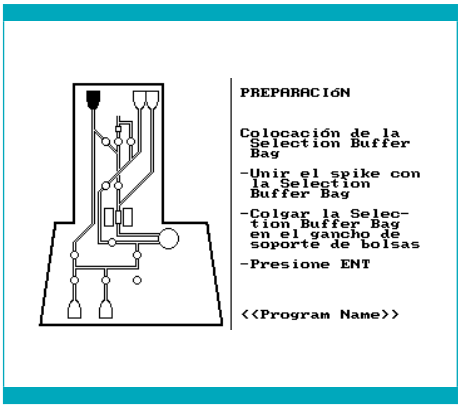


Pantalla 7.58: Asiento de las válvulas

Durante esta secuencia de comprobación también se comprobará el accionamiento del imán.

Conexión del CliniMACS PBS/EDTA Buffer

La ventana muestra la Pantalla 7.59.



Pantalla 7.59: Conexión de la bolsa de solución tampón

La solución tampón indicada para las separaciones CliniMACS Plus es CliniMACS PBS/EDTA Buffer enriquecido con HSA hasta una concentración final del 0,5% (p/v).

1. Utilizando técnicas asépticas, retire el capuchón del pincho de la solución tampón (ver Figura 7.12 en la página 172) del set de tubos y conéctelo a la bolsa de solución tampón. Asegúrese de perforar la membrana de goma para que el líquido pueda fluir libremente. Comprima suavemente la bolsa para asegurarse de que el pincho haya penetrado en ella sin provocar fugas externas.
2. Cuelgue la bolsa de solución tampón en el gancho para bolsas de solución tampón (ver Figura 7.18).
3. Ajuste la altura del gancho para bolsas de solución tampón. Suba o baje el gancho para ajustar la altura al tamaño de la bolsa de solución tampón. Asegúrese de que esté colocada lo suficientemente alta para evitar que el tubo se doble intensamente, lo que podría limitar el flujo, y que esté lo suficientemente baja para evitar que el tubo o las conexiones se estiren.

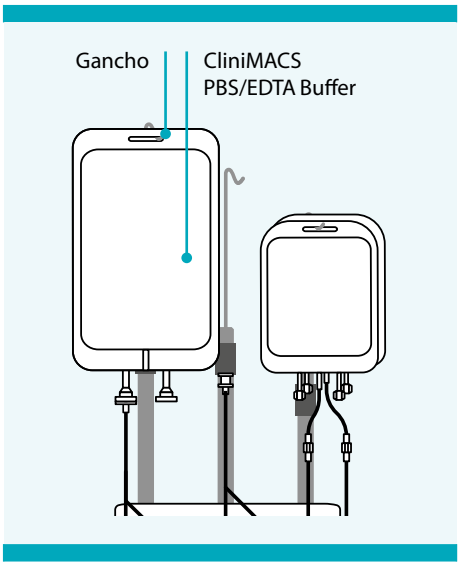


Figura 7.18: Conexión de la bolsa de solución tampón

IMPORTANTE

Debido a varios pasos de cebado y lavado gravimétricos, es esencial colocar la bolsa de solución tampón a la mayor altura posible; asegúrese de que se encuentre por encima de la Reapplication Bag y la Non-Target Cell Bag (ver Figura 7.20 en la página 184).

Para continuar, pulse **ENT**.

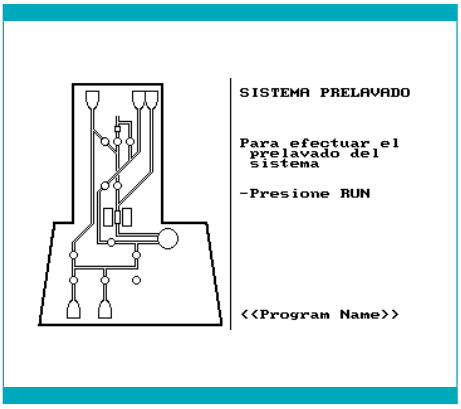
Inicio del cebado

La ventana muestra la Pantalla 7.60.

Para iniciar el cebado, pulse **RUN**.

La ventana muestra la Pantalla 7.61.

Durante la fase de cebado, el set de tubos se llena con CliniMACS PBS/EDTA Buffer. La solución tampón circulará por el set de tubos, incluida la columna de separación. El líquido de cebado se recoge en la Buffer Waste Bag, la Reapplication Bag y la Non-Target Cell Bag, mientras que la Cell Collection Bag permanece vacía (ver Figura 7.12 en la página 172). Los ciclos de cebado continuarán; se repetirán una serie de pasos.



Pantalla 7.60: Inicio del cebado

La fase de cebado tardará aproximadamente 2,5 minutos. El estado del cebado se actualizará en la pantalla.

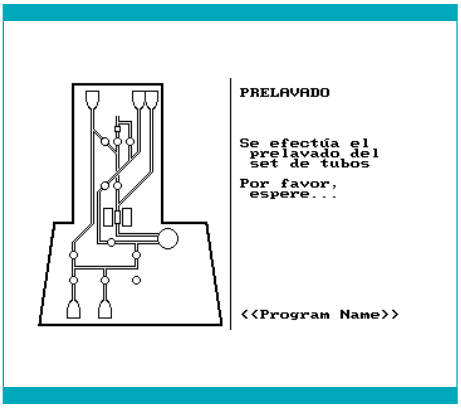
Comprobación durante el cebado

Durante la fase de cebado, compruebe todos los tubos, accesorios, válvulas y la columna de separación para detectar posibles fugas o la presencia de pliegues que puedan bloquear el flujo de líquido.

Si se observan fugas o fallos de funcionamiento, pulse **STOP** para detener el ciclo.

El operario tendrá 600 segundos para resolver el problema.

Pulse **RUN** para continuar el proceso.



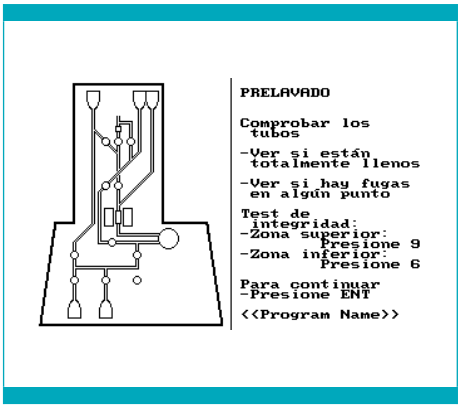
Pantalla 7.61: Cebado en curso

Transcurridos 600 segundos se cancelará la separación. Si el operario no puede resolver el problema o si el set de tubos está defectuoso, retire el set de tubos y sustitúyalo por uno nuevo.

Nota: Una vez iniciado el cebado, no podrá volver al procedimiento de configuración del instrumento.

Comprobación final de todos los tubos y accesorios

La ventana muestra la Pantalla 7.62.



Pantalla 7.62: Comprobación final de los tubos y accesorios

Antes de iniciar el ciclo, compruebe lo siguiente:

- que hay líquido en todos los componentes del set de tubos, excepto las válvulas núms. 2 y 3
- no haya aire en el set de tubos
- que hay líquido en la Reapplication Bag, la Buffer Waste Bag y la Non-Target Cell Bag
- ausencia de líquido en la Cell Collection Bag

No pulse todavía **ENT**.

Test de integridad

Para mayor seguridad, debe realizarse un test de integridad para verificar la ausencia de fugas en el set tubos. La secuencia del test consta de dos secuencias automatizadas que permiten sobrepresurizar y comprobar por separado las partes superior e inferior del set de tubos.

⚠ ATENCIÓN

Riesgo de retardo del proceso. Si una vez finalizado el test de integridad no ha retirado la pinza situada debajo de la Non-Target Cell Bag, las células no diana (marcadas) no se podrán retirar de la columna de separación durante la elución. Resultará imposible la retención ulterior de las células no diana. Es necesario repetir el procedimiento de separación. Retire la pinza una vez finalizado el test de integridad.

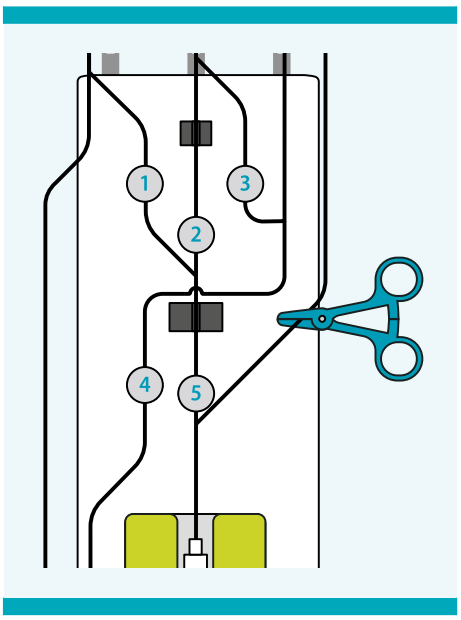


Figura 7.19: Preparación para el test de integridad

IMPORTANTE

El test de integridad solo funcionará correctamente si el tubo se pinza debajo de la Non-Target Cell Bag. Pince el tubo debajo de la Non-Target Cell Bag antes de iniciar el test de integridad. Retire la pinza una vez finalizado el test de integridad.

Test de integridad de la parte superior del set de tubos

1. Cuando el operario lleve a cabo la «Comprobación final de todos los tubos y accesorios», la ventana indicará Pantalla 7.63.

2. Tras realizar la «Comprobación final de todos los tubos y accesorios», **no** pulse ENT.

3. Para comenzar el test de integridad de la parte superior, pulse 9.

   La ventana muestra la Pantalla 7.64.

   IMPORTANTE
   Pince el tubo debajo de la válvula antirretorno de la Non-Target Cell Bag.

4. Para iniciar la secuencia de test, pulse RUN.

   Para volver a la Pantalla 7.63, pulse ◄.

5. Una vez haya pulsado RUN, el instrumento iniciará la secuencia de test automatizada de la parte superior del set de tubos

   La ventana muestra la Pantalla 7.65.

   Se creará y mantendrá una sobrepresión durante dos minutos. Durante este tiempo, el operario debe vigilar todas las conexiones situadas encima de la conexión del tubo superior de la bomba.

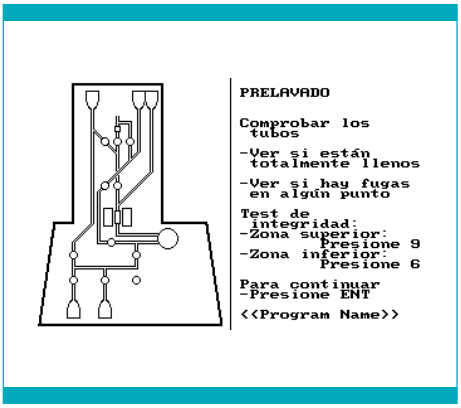
   La secuencia del test se puede finalizar en cualquier punto pulsando ENT.

6. Transcurridos dos minutos, la presión se reducirá automáticamente y la ventana indicará Pantalla 7.63.

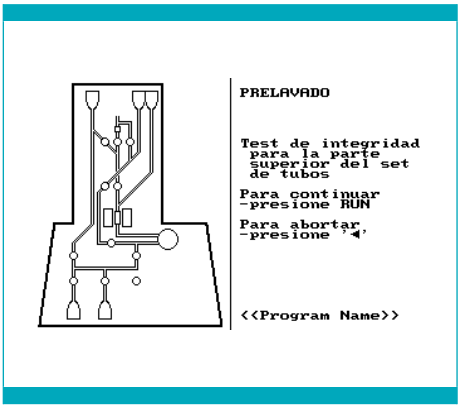
   Compruebe si se han producido fugas durante la secuencia del test. Si se observan fugas en alguna de las conexiones del set de tubos, deberá desconectar el set de tubos y sustituirlo por uno nuevo.

   Póngase en contacto con el Miltenyi Biotec Technical Support para obtener instrucciones sobre la devolución del set de tubos defectuoso.

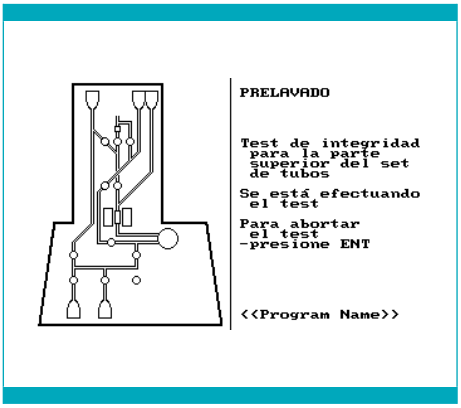
7. Si no se observan fugas, continúe con el test de integridad de la parte inferior del set de tubos.



Pantalla 7.63: Inicio del test de integridad para la parte superior



Pantalla 7.64: Inicio del test de integridad para parte superior



Pantalla 7.65: Inicio del test de integridad para parte superior

Test de integridad de la parte inferior del set de tubos

La ventana muestra la Pantalla 7.63.

1. Para comenzar el test de integridad, pulse **6**.
   No pulse **ENT**.

   La ventana muestra la Pantalla 7.66.

2. Para iniciar la secuencia de test, pulse **RUN**.

   Para volver a la Pantalla 7.63, pulse ◄.

3. Una vez haya pulsado **RUN**, el instrumento iniciará la secuencia de test automatizada de la parte inferior del set de tubos

   La ventana muestra la Pantalla 7.67.

   Se creará y mantendrá una sobrepresión durante 30 segundos.

   Durante este tiempo, el operario debe vigilar la conexión del tubo inferior de la bomba y los conectores de T entre las válvulas núms. 6, 8, 9 y 10.

   La secuencia del test se puede finalizar en cualquier punto pulsando **ENT**.

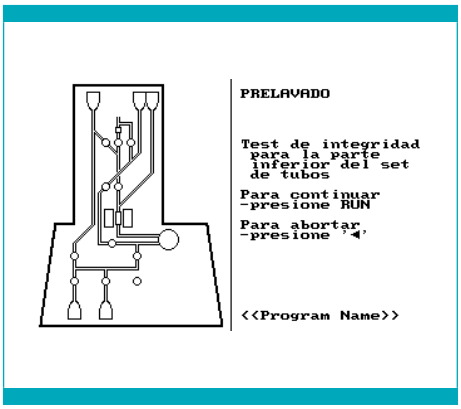
4. Transcurridos 30 segundos, la presión se reducirá automáticamente y la ventana indicará Pantalla 7.63.

   El operario debe comprobar si se han producido fugas durante la secuencia del test. Si se observan fugas en alguna de las conexiones del set de tubos, deberá desconectar el set de tubos y sustituirlo por uno nuevo.

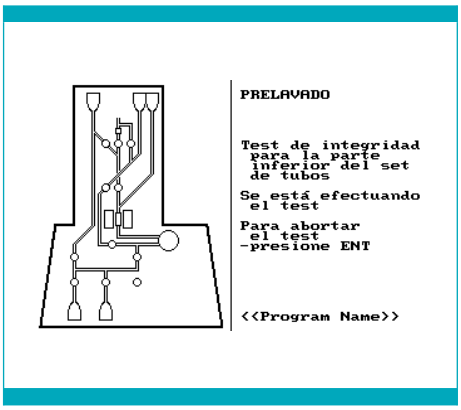
   Póngase en contacto con el Miltenyi Biotec Technical Support para obtener instrucciones sobre la devolución del set de tubos defectuoso.

5. **Abra la vía hacia la Non-Target Cell Bag retirando la pinza situada debajo de la válvula antirretorno.**

6. Si no se detectan fugas, el operario puede continuar con el siguiente paso pulsando **ENT**.



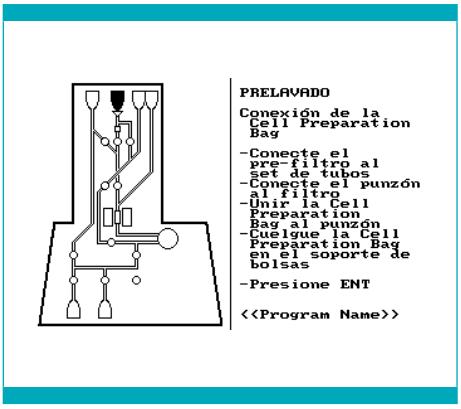
Pantalla 7.66: Inicio del test de integridad para la parte inferior



Pantalla 7.67: Test de integridad para la parte inferior en curso

Conexión de la Cell Preparation Bag

La ventana muestra la Pantalla 7.68.



Pantalla 7.68: Conexión de la Cell Preparation Bag

Conecte la Cell Preparation Bag (que contiene las células marcadas magnéticamente) al set de tubos:

1. Retire el capuchón de rosca (ver Figura 7.12 en la página 172) del set de tubos.
2. Retire el capuchón del punzón del pre-filtro. Inserte firmemente el punzón del pre-filtro en el set de tubos y asegúrese de haber perforado la membrana de goma.
3. Retire los capuchones del pre-filtro y el extremo romo del conector del punzón y conecte ambas partes entre sí.
4. Retire el otro capuchón del conector del punzón y conecte el punzón a la Cell Preparation Bag; asegúrese de haber perforado la membrana de goma para que el líquido pueda fluir libremente. Comprima suavemente la bolsa para asegurarse de que el pincho haya penetrado en ella.
5. Compruebe la conexión entre la Cell Preparation Bag, el conector del punzón, el pre-filtro y el set de tubos para confirmar que la conexion sea segura.
6. Cuelgue la Cell Preparation Bag en el gancho (ver Figura 7.21).
7. Asegúrese de que las bolsas y los tubos fijados al gancho no estén estirados ni doblados.

Debido a las etapas de cebado y lavado gravimétricos realizados durante la separación automatizada, es muy importante que las bolsas estén correctamente niveladas. Asimismo, para garantizar el procesamiento completo de la muestra, es esencial colgar la Reapplication y la Non-Target Cell Bag a mayor altura que la Cell Preparation Bag (ver Figura 7.20):

- **Posición superior:** bolsa de solución tampón
- **Posición intermedia:** Reapplication y Non-Target Cell Bag
- **Posición inferior:** Cell Preparation Bag.

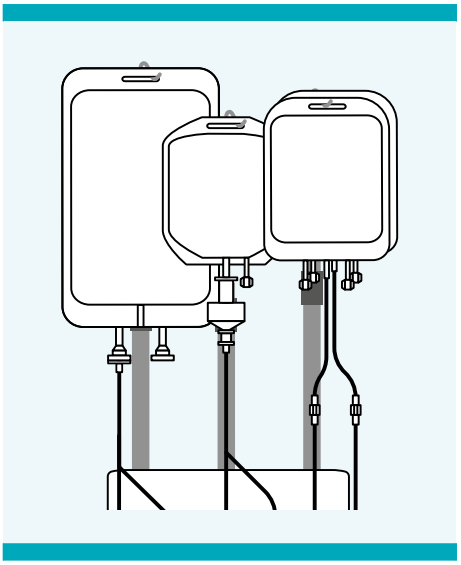


Figura 7.20: Bolsas correctamente niveladas

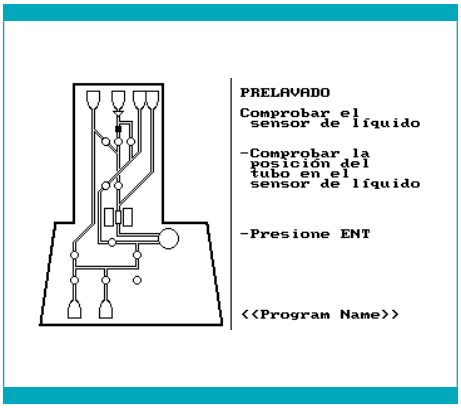
Para continuar, pulse **ENT**.

Comprobación final del sensor de líquido

La ventana muestra la Pantalla 7.69.

1. Compruebe el tubo del sensor de líquido. Asegúrese de que el tubo se haya insertado correctamente, de que no contenga líquido externo y que no se haya desprendido durante el procedimiento de carga.
2. Confirme que el líquido pueda fluir sin restricciones a cada bolsa.

Para continuar, pulse **ENT**.



Pantalla 7.69: Comprobación final del sensor de líquido

▶ **Continúe con el PASO 4.**

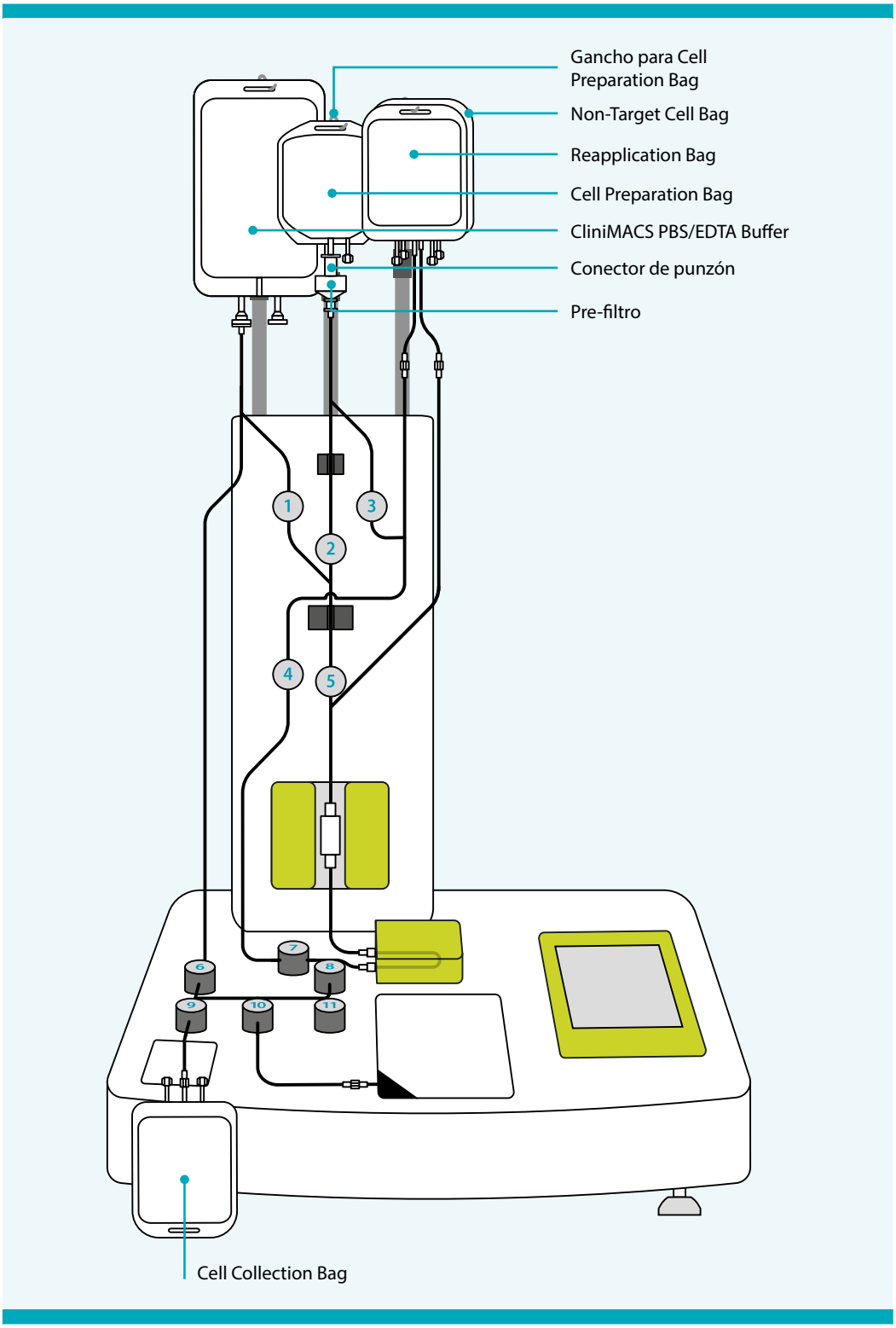


Figura 7.21: CliniMACS Plus Instrument con CliniMACS Depletion Tubing Set, CliniMACS PBS/EDTA Buffer, Cell Preparation Bag y Cell Collection Bag

7.4 PASO 4: Separación CliniMACS Plus

7.4.1 CD34 SELECTION 1/2

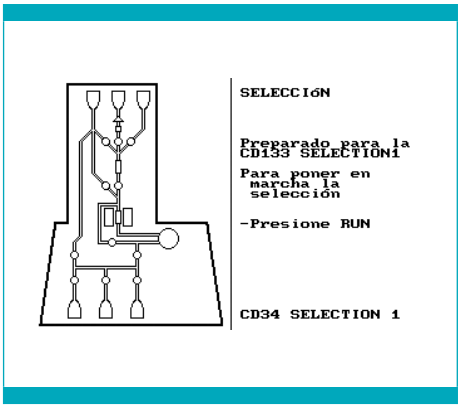
Una vez finalizada la comprobación final, el CliniMACS Plus Instrument está listo para iniciar la separación. La ventana muestra la Pantalla 7.70.

Para continuar, pulse **RUN**.

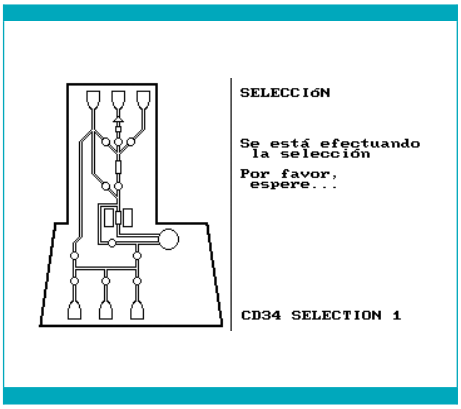
Una vez haya pulsado **RUN**, el instrumento realizará automáticamente el procedimiento de separación seleccionado.

En cada fase del procedimiento se mostrará una pantalla similar a la Pantalla 7.71 para indicar el estado de la separación.

El indicador de la posición del imán se representa por dos recuadros negros situados al lado de la columna de separación si el imán está «ON», es decir, se ha desplazado hacia delante para magnetizar la columna de separación. Si el indicador de la posición del imán es transparente (p. ej., Pantalla 7.70), el imán está «OFF», es decir, se ha desplazado a la parte posterior del instrumento. Con el imán retirado, la columna de separación se encuentra fuera del campo magnético y ya no está magnetizada.



Pantalla 7.70: Inicio de la separación



Pantalla 7.71: Separación en curso

Nota: La pantalla puede mostrar un nombre de programa diferente en función del programa de separación seleccionado (CD34 SELECTION 1 o 2).

Procedimiento de separación

Carga de células

El procedimiento de separación comienza con el llenado del pre-filtro para eliminar el aire del pre-filtro.

Después se inicia la separación de las células marcadas. La bomba aspira el contenido de la Cell Preparation Bag al set de tubos y carga el producto en la columna de separación a través de la pre-columna. Las células marcadas magnéticamente (células diana) se retienen en la columna de separación situada en el campo magnético, mientras que las células no marcadas (células no diana)

atraviesan la columna y se recogen en la Negative Fraction Bag. Una vez vacía la Cell Preparation Bag (lo que se detecta automáticamente con el sensor de líquido), el pre-filtro se lava dos veces con solución tampón.

Lavado de la columna I

La pre-columna y la columna de separación se lavan abundantemente para eliminar todas las células no marcadas. La solución tampón de lavado se recoge en la Buffer Waste Bag. Al iniciarse el «Lavado de columna I», se indica el tiempo total restante hasta el final del procedimiento de separación.

IMPORTANTE
Al principio de la separación, la solución tampón se bombea hacia arriba, hacia la Cell Preparation Bag, para llenar el pre-filtro. Golpee suavemente el lateral del filtro varias veces para eliminar las posibles burbujas atrapadas en el filtro.

Descarga de células I

El imán se desplaza hacia la parte posterior del instrumento (posición «OFF»). Las células retenidas se descargan con un flujo de alta velocidad, pero las células permanecen dentro del circuito interno de tubos.

Recarga de células I

El imán vuelve a desplazarse a la posición «ON» para magnetizar la columna de separación y las células se vuelven a cargar en la columna de separación.

Lavado de la columna II

Tras la recarga de las células, se realizará un segundo paso de lavado para eliminar las células no marcadas restantes. Asimismo, todos los tubos se lavan varias veces.

Descarga de células II, recarga de células II, lavado de columna III

Las células se descargan y se vuelven a cargar por segunda vez en la columna de separación para eliminar cualquier célula no marcada, adherida de forma inespecífica a la matriz de la columna. Después se vuelve a lavar la columna de separación.

Descarga de células III, recarga de células III, lavado de columna IV

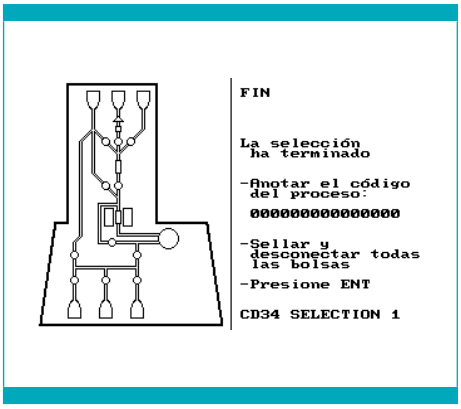
Además, el programa de separación CD34 SELECTION 2 incluye un tercer paso de descarga y de reaplicación.

Elución final de las células

El imán se desplaza a la posición «OFF» y las células marcadas magnéticamente se descargan de la columna de separación y se recogen en la Cell Collection Bag conectada.

Desconexión de las bolsas y registro del código del proceso

Una vez finalizado el ciclo, la ventana muestra la Pantalla 7.72.



Pantalla 7.72: Desconexión de las bolsas y registro del código del proceso

1. Anote el código del proceso.
2. Pince o selle el tubo encima del conector de Luer que conecta la Cell Collection Bag con el set de tubos (ver Figura 7.22).

   Cree tres selladuras herméticas en el tubo, directamente debajo de la válvula n. 9. Corte con cuidado por la selladura central para desconectar la Cell Collection Bag del set de tubos.
3. Pese la Cell Collection Bag llena. Anote el peso.

   Determine el peso de la fracción celular objetivo restando el peso de la Cell Collection Bag vacía del peso de la Cell Collection Bag llena que contiene las células diana. Anote el peso.
4. Mezcle bien la suspensión de células diana girando la bolsa. Extraiga una cantidad adecuada, p. ej., 0,5 mL, y consérvela para el análisis.
5. Selle el tubo con el sellador térmico por encima del conector de Luer de la Negative Fraction Bag. Cree tres selladuras herméticas en el tubo. Corte por la selladura central para desconectar la Negative Fraction Bag.
6. Desconecte la Buffer Waste Bag de la misma manera.
7. Retire la Negative Fraction Bag y la Buffer Waste Bag. Conserve todas las bolsas hasta que haya concluido el análisis final de todas las células positivas.

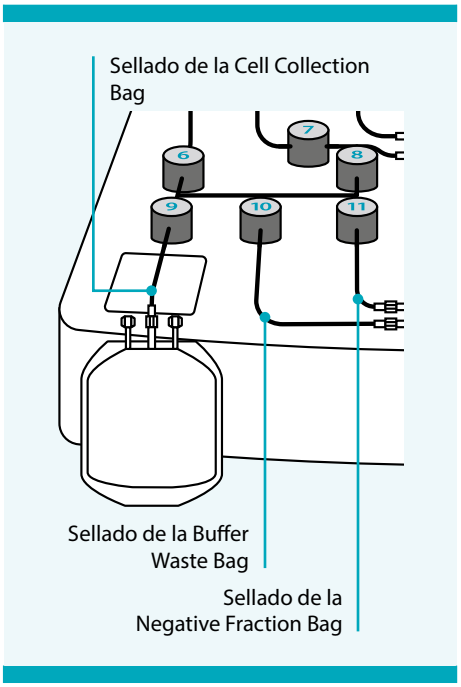


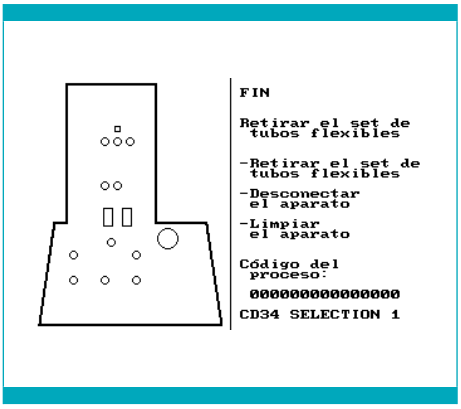
Figura 7.22: Desconexión de las bolsas

Ahora se pueden procesar las células diana de acuerdo con los protocolos clínicos.

Para continuar, pulse **RUN**.

Descarga del set de tubos y apagado

La ventana muestra la Pantalla 7.73.



Pantalla 7.73: Descarga del set de tubos y apagado

1. Retire el set de tubos: Comience por las válvulas núms. 6, 9, 10 y 11 y ascienda; extraiga el tubo del sensor de líquido y de las válvulas presionando las válvulas. Extraiga las columnas de los soportes de columna. Elimine el set de tubos como material biopeligroso, de acuerdo con los procedimientos hospitalarios habituales.
2. Apague el CliniMACS Plus Instrument.
3. Limpie el instrumento de acuerdo con las instrucciones de limpieza; consulte la sección «Limpieza y desinfección» del manual del usuario del CliniMACS Plus Instrument. Observe los procedimientos habituales para el tratamiento de material infeccioso.

Análisis celular

IMPORTANTE

- *El CliniMACS PBS/EDTA Buffer no se debe eliminar antes de la administración de las células diana separadas si el volumen no supera los 100 mL por trasplante, con velocidades de infusión adecuadas. Deberán tenerse en cuenta el estado renal del paciente y los efectos sobre los electrolitos en sangre. Las tasas de infusión deberán ajustarse correspondientemente, sobre todo en los niños.*
- *Si el volumen de la fracción celular diana supera 100 mL, se deberá reducir por medios adecuados, p. ej., mediante centrifugado o la sustitución de la solución tampón por una solución de infusión aprobada en el país del usuario.*

⚠ ATENCIÓN

Riesgo de reducción de la calidad de las células diana. Las células diana se deben analizar y confirmar para satisfacer los requisitos del usuario; de lo contrario puede verse comprometida la aptitud para la aplicación clínica. Examine las células diana con respecto a calidad y cantidad de acuerdo con el uso previsto.

Se deben incluir los parámetros siguientes:

- número total de leucocitos
- viabilidad y número total de células diana
- pureza y recuperación de células diana

También se recomienda determinar el número total de leucocitos y la viabilidad de la fracción de células no diana. La lista es un ejemplo y se deben incluir otras pruebas en función del uso previsto y de los protocolos clínicos. Anote los datos del análisis.

7.4.2 ENRICHMENT 1.1

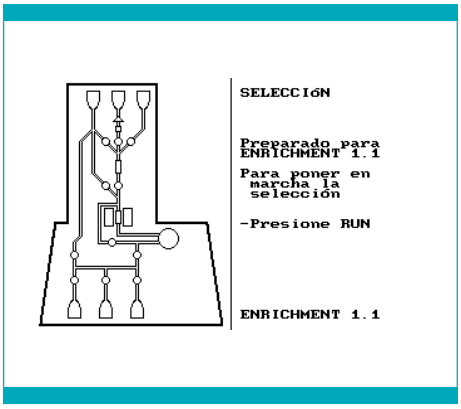
Una vez finalizada la comprobación final, el CliniMACS Plus Instrument está listo para iniciar la separación. La ventana muestra la Pantalla 7.74.

Para continuar, pulse **RUN**.

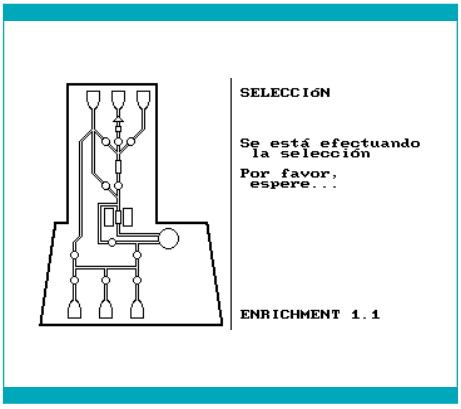
Una vez haya pulsado **RUN**, el instrumento realizará automáticamente el procedimiento de separación seleccionado.

En cada fase del procedimiento se mostrará una pantalla similar a la Pantalla 7.75 para indicar el estado de la separación.

El indicador de la posición del imán se representa por dos recuadros negros situados al lado de la columna de separación si el imán está «ON», es decir, se ha desplazado hacia delante para magnetizar la columna de separación. Si el indicador de la posición del imán es transparente (p. ej., Pantalla 7.74), el imán está «OFF», es decir, se ha desplazado a la parte posterior del instrumento. Con el imán retirado, la columna de separación se encuentra fuera del campo magnético y no está magnetizada.



Pantalla 7.74: Inicio de la separación



Pantalla 7.75: Separación en curso

Procedimiento de separación

Carga de células

El procedimiento de separación comienza con el llenado del pre-filtro para eliminar el aire del pre-filtro. Después se inicia la separación de las células marcadas. La bomba aspira el contenido de la Cell Preparation Bag al set de tubos y carga el producto celular a través de la pre-columna en la columna de separación. Las células marcadas magnéticamente (células diana) se retienen en la columna de separación situada en el campo magnético, mientras que las células no marcadas (células no diana) atraviesan la columna y se recogen en la Negative Fraction Bag.

IMPORTANTE

Al principio de la separación, la solución tampón se bombea hacia arriba, hacia la Cell Preparation Bag, para llenar el pre-filtro. Golpee suavemente el lateral del filtro varias veces para eliminar las posibles burbujas atrapadas en el filtro.

Nota:

- Si el número de células marcadas magnéticamente (calculado por el software CliniMACS Plus) supera la capacidad de unión de la columna de separación, el programa de separación cargará y separará automáticamente la muestra celular en porciones adecuadas («carga por etapas»).
- La carga se detendrá cuando se alcance la capacidad de la columna de separación y el programa de separación pasará al siguiente paso de la separación. Tras el último paso (elución final de las células), se cargará la siguiente porción de la muestra en la columna y se procesará de manera correspondiente.

Lavado de la columna I

La pre-columna y la columna de separación se lavan abundantemente para eliminar todas las células no marcadas. La solución tampón de lavado se recoge en la Buffer Waste Bag.

Descarga de células

El imán se desplaza hacia la parte posterior del instrumento (posición «OFF»). Las células retenidas se descargan con un flujo de alta velocidad, pero permanecen dentro del circuito interno de tubos.

Recarga de células

El imán vuelve a desplazarse a la posición «ON» para magnetizar la columna de separación y las células se vuelven a cargar en la columna de separación.

Lavado de la columna II

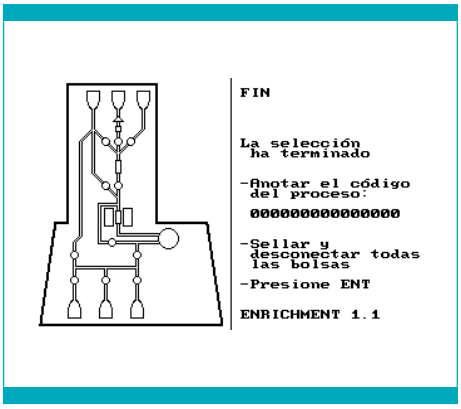
Tras la recarga de las células, se realiza una segunda secuencia de lavado de la columna para eliminar las células no marcadas restantes. Asimismo, todos los tubos se lavan varias veces.

Elución final de las células

El imán se desplaza a la posición «OFF» y las células marcadas magnéticamente (células diana) se descargan de la columna de separación y se recogen en la Cell Collection Bag.

Desconexión de las bolsas y registro del código del proceso

Una vez finalizado el ciclo, la ventana muestra la Pantalla 7.76.



Pantalla 7.76: Desconexión de las bolsas y registro del código del proceso

1. Anote el código del proceso.
2. Pince o selle el tubo encima del conector de Luer que conecta la Cell Collection Bag con el set de tubos (ver Figura 7.23).

   Cree tres selladuras herméticas en el tubo, directamente debajo de la válvula n. 9. Corte con cuidado por la selladura central para desconectar la Cell Collection Bag del set de tubos.
3. Pese la Cell Collection Bag llena. Anote el peso.

   Determine el peso de la fracción celular objetivo restando el peso de la Cell Collection Bag vacía del peso de la Cell Collection Bag llena que contiene las células diana. Anote el peso.
4. Mezcle bien la suspensión de células diana girando la bolsa. Extraiga una cantidad adecuada, p. ej., 0,5 mL, y consérvela para el análisis.
5. Selle el tubo con el sellador térmico por encima del conector de Luer de la Negative Fraction Bag. Cree tres selladuras herméticas en el tubo. Corte por la selladura central para desconectar la Negative Fraction Bag.
6. Desconecte la Buffer Waste Bag de la misma manera.
7. Retire la Negative Fraction Bag y la Buffer Waste Bag. Conserve todas las bolsas hasta que haya concluido el análisis final de todas las células positivas.

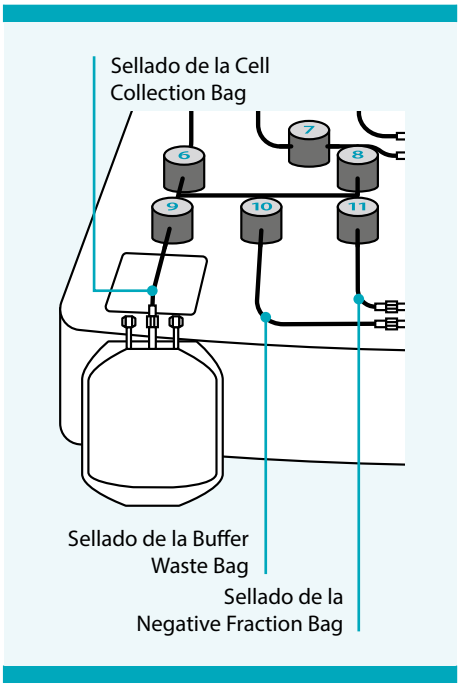


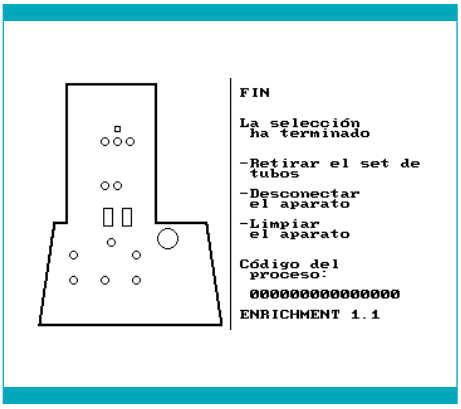
Figura 7.23: Desconexión de las bolsas

Ahora se pueden procesar las células diana de acuerdo con los protocolos clínicos.

Para continuar, pulse **ENT**.

Descarga del set de tubos y apagado

La ventana muestra la Pantalla 7.77.



Pantalla 7.77: Descarga del set de tubos y apagado

1. Retire el set de tubos: Comience por las válvulas núms. 6, 9, 10 y 11 y ascienda; extraiga el tubo del sensor de líquido y de las válvulas presionando las válvulas. Extraiga las columnas de los soportes de columna. Elimine el set de tubos como material biopeligroso, de acuerdo con los procedimientos hospitalarios habituales.
2. Apague el CliniMACS Plus Instrument.
3. Limpie el instrumento de acuerdo con las instrucciones de limpieza; consulte la sección «Limpieza y desinfección» del manual del usuario del CliniMACS Plus Instrument. Observe los procedimientos habituales para el tratamiento de material infeccioso.

Análisis celular

IMPORTANTE

- *El CliniMACS PBS/EDTA Buffer no se debe eliminar antes de la administración de las células diana separadas si el volumen no supera los 100 mL por trasplante, con velocidades de infusión adecuadas. Deberán tenerse en cuenta el estado renal del paciente y los efectos sobre los electrolitos en sangre. Las tasas de infusión deberán ajustarse correspondientemente, sobre todo en los niños..*
- *Si el volumen de la fracción celular diana supera 100 mL, se deberá reducir por medios adecuados, p. ej., mediante centrifugado o la sustitución de la solución tampón por una solución de infusión aprobada en el país del usuario.*

⚠ ATENCIÓN

Riesgo de reducción de la calidad de las células diana. Las células diana se deben analizar y confirmar para satisfacer los requisitos del usuario; de lo contrario puede verse comprometida la aptitud para la aplicación clínica. Examine las células diana con respecto a calidad y cantidad de acuerdo con el uso previsto.

Se deben incluir los parámetros siguientes:

- número total de leucocitos
- viabilidad y número total de células diana
- pureza (eficiencia de depleción) y recuperación de células diana

También se recomienda determinar el número total de leucocitos y la viabilidad de la fracción de células no diana. La lista es un ejemplo y se deben incluir otras pruebas en función del uso previsto y de los protocolos clínicos. Anote los datos del análisis.

7.4.3 ENRICHMENT 3.2

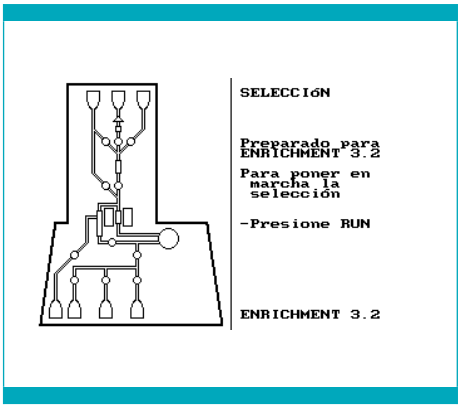
Una vez finalizada la comprobación final, el CliniMACS Plus Instrument está listo para iniciar la separación. La ventana muestra la Pantalla 7.78.

Para continuar, pulse **RUN**.

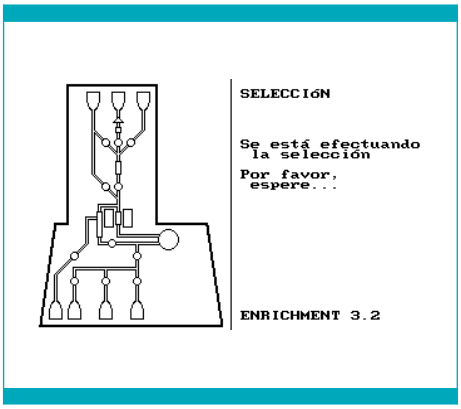
Una vez haya pulsado **RUN**, el instrumento realizará automáticamente el procedimiento de separación seleccionado.

En cada fase del procedimiento se mostrará una pantalla similar a la Pantalla 7.79 para indicar el estado de la separación.

El indicador de la posición del imán se representa por dos recuadros negros situados al lado de la columna de separación si el imán está «ON», es decir, se ha desplazado hacia delante para magnetizar la columna de separación. Si el indicador de la posición del imán es transparente (p. ej., Pantalla 7.78), el imán está «OFF», es decir, se ha desplazado a la parte posterior del instrumento. Con el imán retirado, la columna de separación se encuentra fuera del campo magnético y no está magnetizada.



Pantalla 7.78: Inicio de la separación



Pantalla 7.79: Separación en curso

Procedimiento de separación

Carga de células

El procedimiento de separación comienza con el llenado del pre-filtro para eliminar el aire del pre-filtro. Después se inicia la separación de las células marcadas. La bomba aspira el contenido de la Cell Preparation Bag al set de tubos y carga el producto celular a través de la pre-columna en la columna de separación. Las células marcadas magnéticamente (células diana) se retienen en la columna de separación situada en el campo magnético, mientras que las células no marcadas (células no diana) atraviesan la columna y se recogen en la Negative Fraction Bag. Una vez vacía la Cell Preparation Bag (lo que se detecta automáticamente por el sensor de líquido), el pre-filtro se lava dos veces con solución tampón.

IMPORTANTE

Al principio de la separación, la solución tampón se bombea hacia arriba, hacia la Cell Preparation Bag, para llenar el pre-filtro. Golpee suavemente el lateral del filtro varias veces para eliminar las posibles burbujas atrapadas en el filtro.

Lavado de la columna I

La pre-columna y la columna de separación se lavan abundantemente para eliminar todas las células no marcadas. La solución tampón de lavado se recoge en la Buffer Waste Bag.

Descarga de células I

El imán se desplaza hacia la parte posterior del instrumento (posición «OFF»). Las células retenidas se descargan con un flujo de alta velocidad, pero las células permanecen dentro del circuito interno de tubos.

Recarga de células I

El imán vuelve a desplazarse a la posición «ON» para magnetizar la columna de separación y las células se vuelven a cargar en la columna de separación.

Lavado de la columna II

Tras la recarga de las células, se realiza un segundo paso de lavado para eliminar las células no marcadas restantes. Asimismo, todos los tubos se lavan varias veces.

Descarga de células II, recarga de células II, lavado de columna III

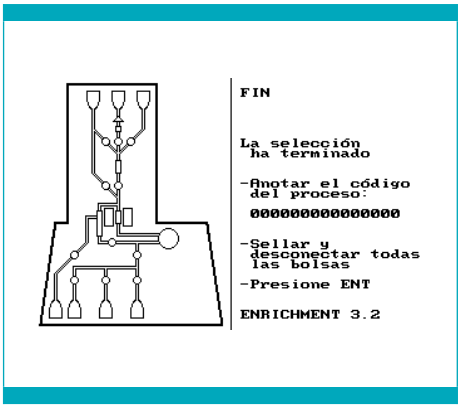
Las células se descargan y se vuelven a cargar por segunda vez en la columna de separación para eliminar cualquier célula no marcada, adherida de forma inespecífica a la matriz de la columna. Después se vuelve a lavar la columna de separación.

Elución final de las células

El imán se desplaza a la posición «OFF» y las células marcadas magnéticamente (células diana) se descargan y se recogen en la Cell Collection Bag.

Desconexión de las bolsas y registro del código del proceso

Una vez finalizado el ciclo, la ventana muestra la Pantalla 7.80.



Pantalla 7.80: Desconexión de las bolsas y registro del código del proceso

1. Anote el código del proceso.
2. Pince o selle el tubo encima del conector de Luer que conecta la Cell Collection Bag con el set de tubos (ver Figura 7.24).

   Cree tres selladuras herméticas en el tubo, directamente debajo de la válvula n. 9. Corte con cuidado por la selladura central para desconectar la Cell Collection Bag del set de tubos.
3. Pese la Cell Collection Bag llena. Anote el peso.

   Determine el peso de la fracción celular objetivo restando el peso de la Cell Collection Bag vacía del peso de la Cell Collection Bag llena que contiene las células diana. Anote el peso.
4. Mezcle bien la suspensión de células diana girando la bolsa. Extraiga una cantidad adecuada, p. ej., 0,5 mL, y consérvela para el análisis.
5. Selle el tubo con el sellador térmico por encima del conector de Luer de la Negative Fraction Bag. Cree tres selladuras herméticas en el tubo. Corte por la selladura central para desconectar la Negative Fraction Bag.
6. Desconecte la Buffer Waste Bag de la misma manera.
7. Retire la Negative Fraction Bag y la Buffer Waste Bag. Conserve todas las bolsas hasta que haya concluido el análisis final de todas las células positivas.

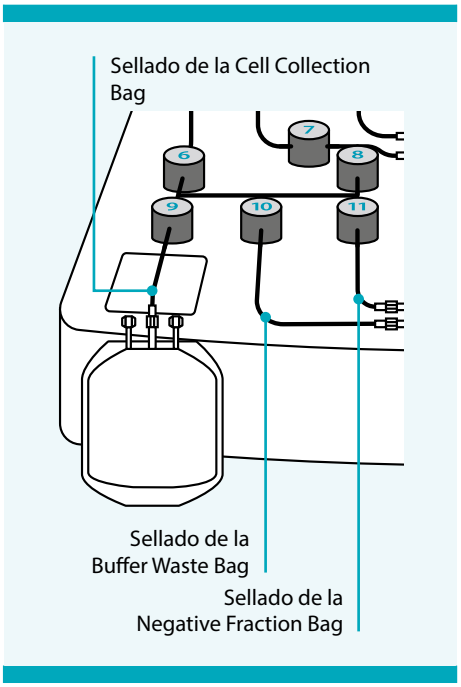


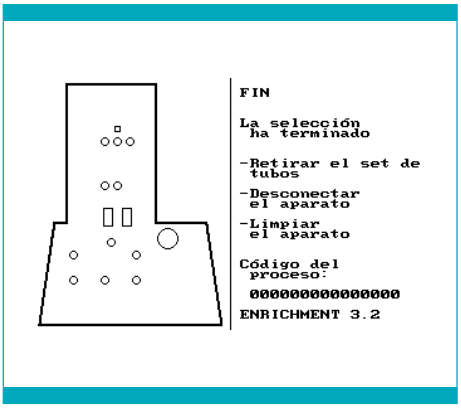
Figura 7.24: Desconexión de las bolsas

Ahora se pueden procesar las células diana de acuerdo con los protocolos clínicos.

Para continuar, pulse **ENT**.

Descarga del set de tubos y apagado

La ventana muestra la Pantalla 7.81.



Pantalla 7.81: Descarga del set de tubos y apagado

1. Retire el set de tubos: Comience por las válvulas núms. 6, 9, 10 y 11 y ascienda,; extraiga el tubo del sensor de líquido y de las válvulas presionando las válvulas. Extraiga las columnas de los soportes de columna. Elimine el set de tubos como material biopeligroso, de acuerdo con los procedimientos hospitalarios habituales.
2. Apague el CliniMACS Plus Instrument.
3. Limpie el instrumento de acuerdo con las instrucciones de limpieza; consulte la sección «Limpieza y desinfección» del manual del usuario del CliniMACS Plus Instrument. Observe los procedimientos habituales para el tratamiento de material infeccioso.

Análisis celular

IMPORTANTE

- *El CliniMACS PBS/EDTA Buffer no se debe eliminar antes de la administración de las células diana separadas si el volumen no supera los 100 mL por trasplante, con velocidades de infusión adecuadas. Deberán tenerse en cuenta el estado renal del paciente y los efectos sobre los electrolitos en sangre. Las tasas de infusión deberán ajustarse correspondientemente, sobre todo en los niños.*
- *Si el volumen de la fracción celular diana supera 100 mL, se deberá reducir por medios adecuados, p. ej., mediante centrifugado o la sustitución de la solución tampón por una solución de infusión aprobada en el país del usuario.*

⚠ ATENCIÓN

Riesgo de reducción de la calidad de las células diana. Las células diana se deben analizar y confirmar para satisfacer los requisitos del usuario; de lo contrario puede verse comprometida la aptitud para la aplicación clínica. Examine las células diana con respecto a calidad y cantidad de acuerdo con el uso previsto.

Se deben incluir los parámetros siguientes:

- número total de leucocitos
- viabilidad y número total de células diana
- pureza y recuperación de células diana

También se recomienda determinar el número total de leucocitos y la viabilidad de la fracción de células no diana. La lista es un ejemplo y se deben incluir otras pruebas en función del uso previsto y de los protocolos clínicos. Anote los datos del análisis.

7.4.4 DEPLETION 2.1

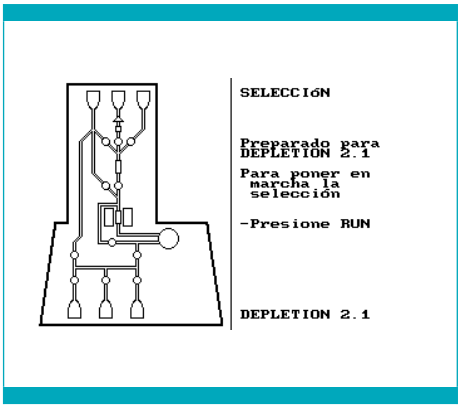
Una vez finalizada la comprobación final, el CliniMACS Plus Instrument está listo para iniciar la separación. La ventana muestra la Pantalla 7.82.

Para continuar, pulse **RUN**.

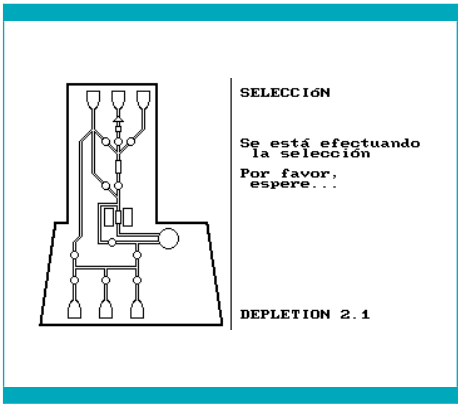
Una vez haya pulsado **RUN**, el instrumento realizará automáticamente el procedimiento de separación seleccionado.

En cada fase del procedimiento se mostrará una pantalla similar a la Pantalla 7.83 para indicar el estado de la separación.

El indicador de la posición del imán se representa por dos recuadros negros situados al lado de la columna de separación si el imán está «ON», es decir, se ha desplazado hacia delante para magnetizar la columna de separación. Si el indicador de la posición del imán es transparente (p. ej., Pantalla 7.82), el imán está «OFF», es decir, se ha desplazado a la parte posterior del instrumento. Con el imán retirado, la columna de separación se encuentra fuera del campo magnético y no está magnetizada.



Pantalla 7.82: Inicio de la separación



Pantalla 7.83: Separación en curso

Procedimiento de separación

Carga de células

El procedimiento de separación comienza con el llenado del pre-filtro para concluir el cebado del sistema. Después se inicia la separación de las células marcadas. La bomba aspira el contenido de la Cell Preparation Bag al set de tubos. Las células marcadas magnéticamente (células no diana) se retienen en la columna de separación situada en el campo magnético, mientras que las células no marcadas (células diana) atraviesan la columna y se recogen en la Cell Collection Bag.

IMPORTANTE

Al principio de la separación, la solución tampón se bombea hacia arriba, hacia la Cell Preparation Bag, para llenar el pre-filtro. Golpee suavemente el lateral del filtro varias veces para eliminar las posibles burbujas atrapadas en el filtro.

Lavado del pre-filtro

Tras cargar toda la muestra celular en el set de tubos, el pre-filtro se lava dos veces con solución tampón para reducir la pérdida de células en el filtro.

Nota:

- Si el número de células marcadas magnéticamente (calculado por el software CliniMACS Plus) supera la capacidad de unión de la columna de separación, el programa de separación cargará y separará automáticamente la muestra celular en porciones más pequeñas («carga por etapas»).
- La carga se detendrá cuando se alcance la capacidad de la columna de separación y el programa de separación pasará al siguiente paso de la separación. Tras el último paso (elución final de las células), se cargará la siguiente porción de la muestra en la columna.

Lavado de la columna

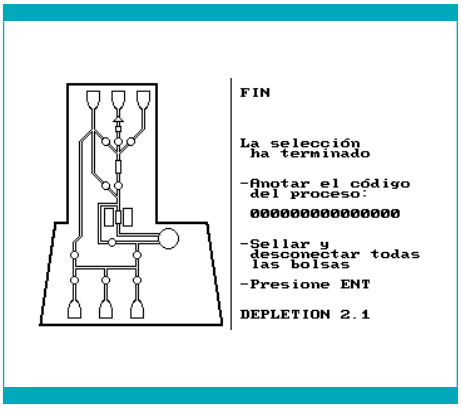
La pre-columna y la columna de separación se lavan abundantemente para eliminar todas las células no marcadas. La solución tampón de lavado se recoge en la Buffer Waste Bag.

Elución final de las células

El imán se desplaza a la posición «OFF». Al principio, las células marcadas magnéticamente se eluyen a la Priming Waste Bag. Tras finalizar la última etapa de carga, se descargarán todas las células marcadas magnéticamente (células no diana) de la columna de separación y se recogerán en la Negative Fraction Bag para reducir el arrastre de células marcadas en el tubo de la bomba.

Desconexión de las bolsas y registro del código del proceso

Una vez finalizado el ciclo, la ventana muestra la Pantalla 7.84.



Pantalla 7.84: Desconexión de las bolsas y registro del código del proceso

1. Anote el código del proceso.
2. Pince o selle el tubo encima del conector de Luer que conecta la Cell Collection Bag con el set de tubos (ver Figura 7.25).

   Cree tres selladuras herméticas en el tubo, directamente debajo de la válvula n. 9. Corte con cuidado por la selladura central para desconectar la Cell Collection Bag del set de tubos.
3. Pese la Cell Collection Bag llena. Anote el peso.

   Determine el peso de la fracción celular objetivo restando el peso de la Cell Collection Bag vacía del peso de la Cell Collection Bag llena que contiene las células diana. Anote el peso.
4. Mezcle bien la suspensión de células diana girando la bolsa. Extraiga una cantidad adecuada, p. ej., 0,5 mL, y consérvela para el análisis.
5. Selle el tubo con el sellador térmico por encima del conector de Luer de la Negative Fraction Bag. Cree tres selladuras herméticas en el tubo. Corte por la selladura central para desconectar la Negative Fraction Bag.
6. Desconecte la Buffer Waste Bag de la misma manera.
7. Retire la Negative Fraction Bag y la Buffer Waste Bag. Conserve todas las bolsas hasta que haya concluido el análisis final de todas las células positivas.

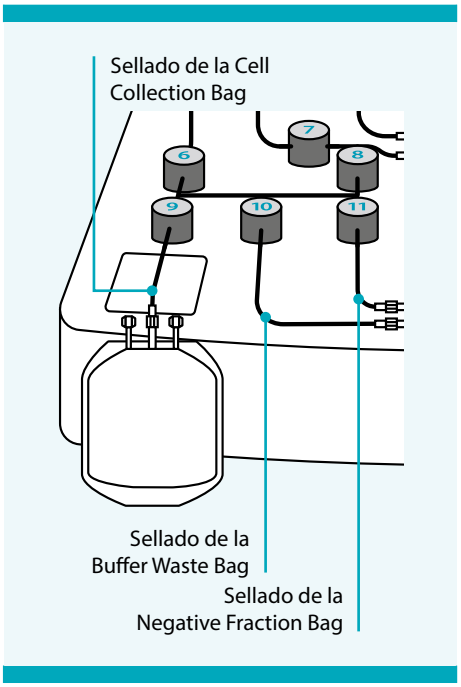


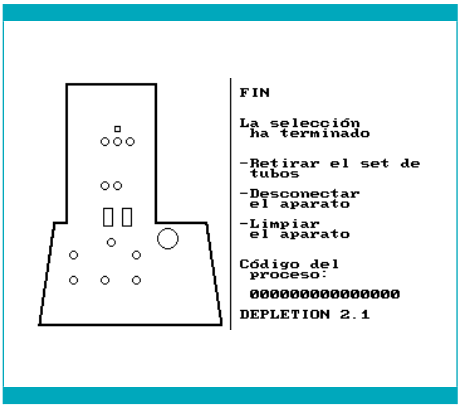
Figura 7.25: Desconexión de las bolsas

Ahora se pueden procesar las células diana de acuerdo con los protocolos clínicos.

Para continuar, pulse **ENT**.

Descarga del set de tubos y apagado

La ventana muestra la Pantalla 7.85.



Pantalla 7.85: Descarga del set de tubos y apagado

1. Retire el set de tubos: Comience por las válvulas núms. 6, 9 y 10 y ascienda; extraiga el tubo del sensor de líquido y de las válvulas presionando las válvulas. Extraiga la columna del soporte de columna. Elimine el set de tubos como material biopeligroso, de acuerdo con los procedimientos hospitalarios habituales.
2. Apague el CliniMACS Plus Instrument.
3. Limpie el instrumento de acuerdo con las instrucciones de limpieza; consulte la sección «Limpieza y desinfección» del manual del usuario del CliniMACS Plus Instrument. Observe los procedimientos habituales para el tratamiento de material infeccioso.

Análisis celular

IMPORTANTE

- *El CliniMACS PBS/EDTA Buffer no se debe eliminar antes de la administración de las células diana separadas si el volumen no supera los 100 mL por trasplante, con velocidades de infusión adecuadas. Deberán tenerse en cuenta el estado renal del paciente y los efectos sobre los electrolitos en sangre. Las tasas de infusión deberán ajustarse correspondientemente, sobre todo en los niños.*
- *Si el volumen de la fracción celular diana supera 100 mL, se deberá reducir por medios adecuados, p. ej., mediante centrifugado o la sustitución de la solución tampón por una solución de infusión aprobada en el país del usuario.*

⚠ ATENCIÓN

Riesgo de reducción de la calidad de las células diana. Las células diana se deben analizar y confirmar para satisfacer los requisitos del usuario; de lo contrario puede verse comprometida la aptitud para la aplicación clínica. Examine las células diana con respecto a calidad y cantidad de acuerdo con el uso previsto.

Se deben incluir los parámetros siguientes:

- número total de leucocitos
- viabilidad y número total de células diana
- eficiencia de depleción

También se recomienda determinar el número total de leucocitos y la viabilidad de la fracción de células no diana. La lista es un ejemplo y se deben incluir otras pruebas en función del uso previsto y de los protocolos clínicos. Anote los datos del análisis.

7.4.5 DEPLETION 3.1

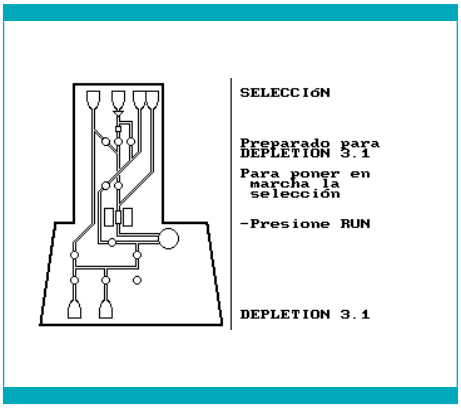
Una vez finalizada la comprobación final, el CliniMACS Plus Instrument está listo para iniciar la separación. La ventana muestra la Pantalla 7.86.

Para continuar, pulse **RUN**.

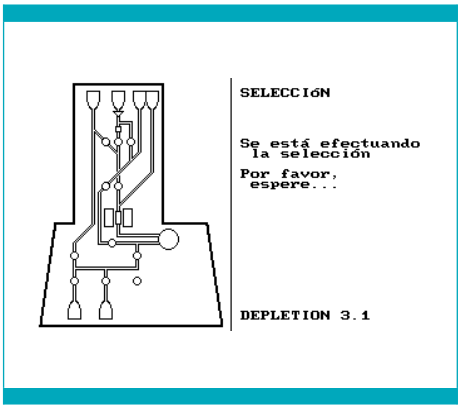
Una vez haya pulsado **RUN**, el instrumento realizará automáticamente el procedimiento de separación seleccionado.

En cada fase del procedimiento se mostrará una pantalla similar a la Pantalla 7.87 para indicar el estado de la separación.

El indicador de la posición del imán se representa por dos recuadros negros situados al lado de la columna de separación si el imán está «ON», es decir, se ha desplazado hacia delante para magnetizar la columna de separación. Si el indicador de la posición del imán es transparente (p. ej., Pantalla 7.86), el imán está «OFF», es decir, se ha desplazado a la parte posterior del instrumento. Con el imán retirado, la columna de separación se encuentra fuera del campo magnético y no está magnetizada



Pantalla 7.86: Inicio de la separación



Pantalla 7.87: Separación en curso

Procedimiento de separación

Depletion 3.1 es un programa de depleción de dos pasos, es decir, las células se cargan dos veces a la columna de separación.

En la primera parte del proceso se lleva a cabo la depleción de la mayor parte de las células marcadas (Staged Cell Loading [Bulk Loading Stage]). En la segunda parte del proceso se lleva a cabo la depleción de las pocas células marcadas restantes (Sensitive Sample Loading [Sensitive Loading Stage]).

IMPORTANTE

Al principio de la separación, la solución tampón se bombea hacia arriba, hacia la Cell Preparation Bag, para llenar el pre-filtro. Golpee suavemente el lateral del filtro varias veces para eliminar las posibles burbujas atrapadas en el filtro.

Nota: Si el número de células marcadas magnéticamente (calculado por el software CliniMACS Plus) supera la capacidad de unión de la columna de separación, el programa de separación cargará y separará automáticamente la muestra celular en porciones más pequeñas («carga por etapas»). Entre cada etapa de carga, la

columna de separación se lava para eliminar todas las células marcadas. Las células marcadas se eluirán y se conservarán en la Non-Target Cell Bag. La solución tampón de lavado se recoge en la Reapplication Bag.

Staged cell loading (Bulk Loading Stage)

El procedimiento de separación comienza con el llenado del pre-filtro para concluir el cebado del sistema. Después se inicia la separación de las células marcadas. La bomba aspira el contenido de la Cell Preparation Bag al set de tubos. Las células marcadas magnéticamente (células no diana) se retienen en la columna de separación situada en el campo magnético, mientras que las células no marcadas (células diana) atraviesan la columna y se recogen en la Reapplication Bag.

Sensitive Sample Loading (Sensitive Loading Stage)

Para una depleción adicional, las células de la Reapplication Bag se vuelven a cargar en la columna de separación a una velocidad inferior. Mientras que las pocas células marcadas restantes se retienen en la columna, las células no marcadas (células diana) fluyen a través del campo magnético y se recogen en la Cell Collection Bag.

Lavado del pre-filtro y de la Reapplication Bag

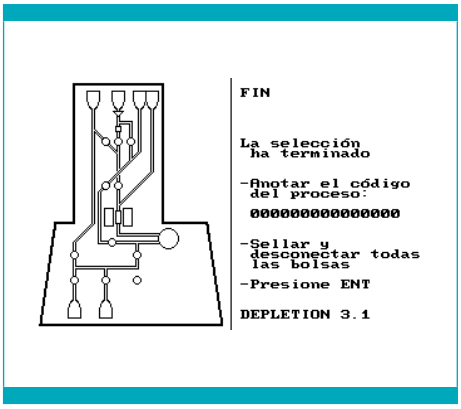
Una vez finalizada la depleción masiva y sensible de la muestra celular, el pre-filtro y la Reapplication Bag se lavan dos veces con solución tampón para reducir la pérdida de células en el sistema.

Eliminación de células no diana

El imán se desplaza a la posición «OFF». Las células marcadas magnéticamente (células no diana) se descargan de la columna de separación y se recogen en la Non-Target Cell Bag después de cada etapa de carga.

Desconexión de las bolsas y registro del código del proceso

Una vez finalizado el ciclo, la ventana muestra la Pantalla 7.88.



Pantalla 7.88: Desconexión de las bolsas y registro del código del proceso

1. Anote el código del proceso.
2. Pince o selle el tubo encima del conector de Luer que conecta la Cell Collection Bag con el set de tubos (ver Figura 7.26).

   Cree tres selladuras herméticas en el tubo, directamente debajo de la válvula n. 9. Corte con cuidado por la selladura central para desconectar la Cell Collection Bag del set de tubos.
3. Pese la Cell Collection Bag llena. Anote el peso.

   Determine el peso de la fracción celular objetivo restando el peso de la Cell Collection Bag vacía del peso de la Cell Collection Bag llena que contiene las células diana. Anote el peso.
4. Mezcle bien la suspensión de células diana girando la bolsa. Extraiga una cantidad adecuada, p. ej., 0,5 mL, y consérvela para el análisis.
5. Selle el tubo con el sellador térmico por encima del conector de Luer de la Buffer Waste Bag. Cree tres selladuras herméticas en el tubo. Corte por la selladura central para desconectar la Buffer Waste Bag.
6. Desconecte la Non-Target Cell Bag de la misma manera.
7. Retire la Non-Target Cell Bag y la Buffer Waste Bag. Conserve todas las bolsas hasta que haya concluido el análisis final de todas las células positivas.

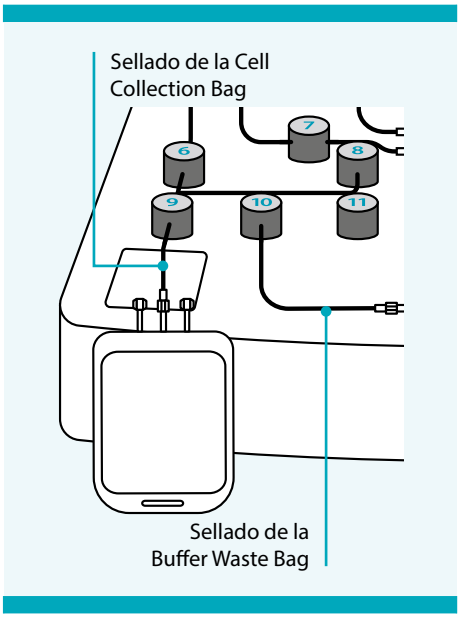


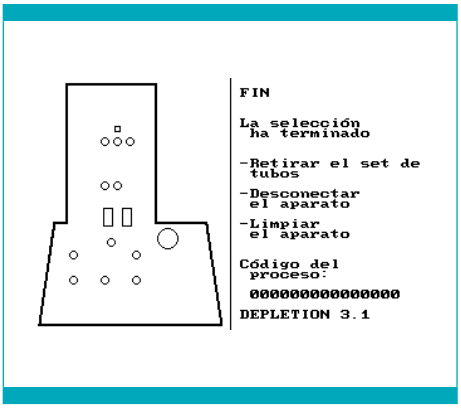
Figura 7.26: Desconexión de las bolsas

Ahora se pueden procesar las células diana de acuerdo con los protocolos clínicos.

Para continuar, pulse **ENT**.

Descarga del set de tubos y apagado

La ventana muestra la Pantalla 7.89.



Pantalla 7.89: Descarga del set de tubos y apagado

1. Retire el set de tubos: Comience por las válvulas núms. 6, 9 y 10 y ascienda,; extraiga el tubo del sensor de líquido y de las válvulas presionando las válvulas. Extraiga la columna del soporte de columna. Elimine el set de tubos como material biopeligroso, de acuerdo con los procedimientos hospitalarios habituales.
2 Apague el CliniMACS Plus Instrument
3. Limpie el instrumento de acuerdo con las instrucciones de limpieza; consulte la sección «Limpieza y desinfección» del manual del usuario del CliniMACS Plus Instrument. Observe los procedimientos habituales para el tratamiento de material infeccioso.

Análisis celular

IMPORTANTE

- *El CliniMACS PBS/EDTA Buffer no se debe eliminar antes de la administración de las células diana separadas si el volumen no supera los 100 mL por trasplante, con velocidades de infusión adecuadas. Deberán tenerse en cuenta el estado renal del paciente y los efectos sobre los electrolitos en sangre. Las tasas de infusión deberán ajustarse correspondientemente, sobre todo en los niños.*
- *Si el volumen de la fracción celular diana supera 100 mL, se deberá reducir por medios adecuados, p. ej., mediante centrifugado o la sustitución de la solución tampón por una solución de infusión aprobada en el país del usuario.*

⚠ ATENCIÓN

Riesgo de reducción de la calidad de las células diana. Las células diana se deben analizar y confirmar para satisfacer los requisitos del usuario; de lo contrario puede verse comprometida la aptitud para la aplicación clínica. Examine las células diana con respecto a calidad y cantidad de acuerdo con el uso previsto.

Se deben incluir los parámetros siguientes:

- número total de leucocitos
- viabilidad y número total de células diana
- eficiencia de depleción

También se recomienda determinar el número total de leucocitos y la viabilidad de la fracción de células no diana. La lista es un ejemplo y se deben incluir otras pruebas en función del uso previsto y de los protocolos clínicos. Anote los datos del análisis.

8 Solución de problemas

Este capítulo constituye una referencia para proporcionar información sobre posibles imprevistos que puedan surgir y proponer las acciones correctivas adecuadas. Para cualquier información no contemplada en el siguiente capítulo, póngase en contacto con el Miltenyi Biotec Technical Support a la mayor brevedad posible.

Nota: El orden de este capítulo sigue la secuencia real de una separación.

8.1 Miltenyi Biotec Technical Support

En caso de un fallo de funcionamiento del instrumento o de un fallo del proceso que no pueda corregir el operario (mensajes de error), póngase en contacto con el equipo del Miltenyi Biotec Technical Support:

+49 2204 8306-3803
technicalsupport@miltenyi.com

Consulte la información de contacto del Miltenyi Biotec Technical Support en www.miltenyibiotec.com.

8.2 Preparación del producto de leucaféresis

La muestra recibida se ha diluido

Lo ideal es que el marcaje magnético se realice en el producto de leucaféresis diluido. Ajuste el producto de leucaféresis a una dilución final de aproximadamente 1:3. Si la muestra recibida presenta una dilución superior a 1:3, o si el operario no conoce exactamente la concentración de plasma en la muestra, añada inmunoglobulina a la muestra antes de añadir el reactivo (concentración recomendada de inmunoglobulina en el volumen de marcaje: 1,5 mg/mL). Es importante disponer durante el marcaje de una cierta cantidad de inmunoglobulina en la muestra para minimizar la unión inespecífica del reactivo.

El número de células diana es bajo en el producto de leucaféresis

La movilización de células madre ha sido insuficiente. Compruebe el análisis del producto de leucaféresis.

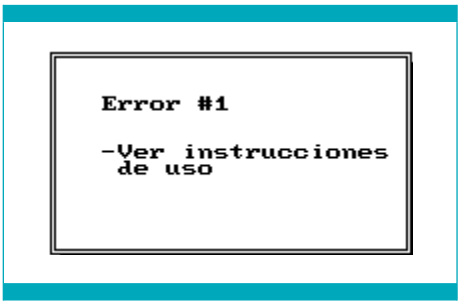
- Viabilidad deficiente de las células en el producto de leucaféresis

  Es posible que el producto de leucaféresis se haya recogido, conservado o transportado de forma inapropiada. Para garantizar una mejor calidad de muestra, la preparación y separación del producto de leucaféresis se debe realizar inmediatamente después de la leucaféresis. Mantenga el producto de leucaféresis a una concentración de leucocitos inferior a $0{,}2\times10^9$ por mL. En caso necesario, diluya el producto de leucaféresis con plasma autólogo. El producto de leucaféresis no debe tener más de 24 horas cuando se inicie el procedimiento de marcaje y separación. Si fuera necesario conservar el producto de leucaféresis, p. ej., durante la noche, se deberá mantener a temperatura ambiente controlada (+19 °C a +25 °C [+66 °F a +77 °F]).

8.3 CliniMACS Plus Instrument y sets de tubos CliniMACS

8.3.1 Mensajes de error

Se pueden producir diversos fallos de funcionamiento del instrumento o del software. Estos se marcarán correspondientemente y se indicarán en pantalla. Remiten a errores internos que no pueden ser subsanados por el operario. Anote el número de error y póngase en contacto con el Miltenyi Biotec Technical Support.



Pantalla 8.1: Mensaje de error n.° 1

Un posible mensaje de error se muestra en la Pantalla 8.1.

Aparte de los mensajes de error, las averías que puede corregir el operario están identificadas como «Mensajes de advertencia» (consulte la sección 8.4.1).

8.3.2 Carga y cebado del set de tubos

- La válvula no se abre cuando el operario intenta introducir el tubo en una válvula determinada

  Las válvulas están diseñadas para funcionar correctamente una vez insertado el tubo. Presione la válvula manualmente para abrirla. Observe cuidadosamente la válvula durante la secuencia de activación de la válvula. Si la válvula no baja durante la secuencia de activación de la válvula, consulte la sección «La válvula no baja durante la secuencia de activación de la válvula».

- La válvula no baja durante la secuencia de activación de la válvula

  Confirme que el tubo esté correctamente insertado. Compruebe si las válvulas se han limpiado meticulosamente. Se deberá sustituir cualquier válvula que se haya contaminado por líquido. Póngase en contacto con el Miltenyi Biotec Technical Support.

- Durante el cebado gotea solución tampón del set de tubos

  El set de tubos está defectuoso. Apague el CliniMACS Plus Instrument y, tras haber instalado un nuevo set de tubos, reinicie el cebado con suficiente solución tampón nueva.

- Hay un exceso de aire en el set de tubos después del cebado

  No se ha perforado correctamente la bolsa de solución tampón. Utilice un nuevo set de tubos y suficiente solución tampón nueva y reinicie la separación CliniMACS Plus. Confirme que la membrana de goma de la bolsa de solución tampón se haya perforado correctamente.

- Volumen inesperado de solución tampón en las bolsas tras el cebado. Después del cebado, solo deben contener líquido la Priming Waste Bag y la Buffer Waste Bag.

  El set de tubos no se ha montado correctamente. Pueden haber fugas de líquido bajo las válvulas si el set de tubos no está correctamente instalado o las válvulas no funcionan correctamente. Retire el set de tubos y sustitúyalo por uno nuevo. Reinicie el cebado con suficiente solución tampón nueva. El rendimiento de la separación CliniMACS Plus puede ser deficiente si el set de tubos no se ha insertado correctamente.

- El motor de la bomba se detiene durante el cebado

  No se ha insertado correctamente el tubo de la bomba. Pulse **STOP** para interrumpir el cebado y apagar y volver a encender el aparato. Pince el tubo de solución tampón con unas pinzas de cierre durante el procedimiento de instalación, corrija la posición del tubo de la bomba y retire las pinzas de cierre antes de reiniciar la secuencia de cebado.

8.4 Separación celular automatizada

8.4.1 Mensajes de advertencia

A diferencia de los mensajes de error (consulte la sección 8.3.1), los mensajes de advertencia aparecerán en pantalla si el sistema de control interno del CliniMACS Plus Instrument detecta un fallo de funcionamiento corregible por el operario. Los mensajes de advertencia suelen combinarse con un pitido. Si aparece un mensaje de advertencia durante la separación CliniMACS Plus, observe las instrucciones en pantalla para continuar con la separación celular. En general, los mensajes de advertencia aparecen si se pulsa la tecla **STOP**, si se abre la puerta de la bomba, si la bomba se para o si el sensor de líquido detecta un error.

Dado que se pueden producir diferentes tipos de imprevistos durante los distintos programas de separación, la siguiente sección se subdivide correspondientemente.

8.4.2 Incidentes inesperados: Todos los programas de separación

- Error detectado por el sensor de líquido

El mensaje de advertencia n.° 1 aparecerá durante la fase de inicio del proceso de carga de las células si el sensor de líquido no detecta líquido en el tubo. Como el pre-filtro se lava con solución tampón antes de la carga de las células, debe haber líquido en el tubo en este momento.

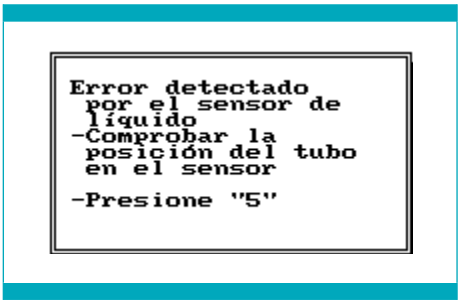


Figura 8.1: Mensaje de advertencia n.° 1

Compruebe los puntos siguientes:

1. ¿Se ha insertado correctamente el tubo en el sensor de líquido? Si no, hágalo.
2. ¿Se ha llenado el tubo con solución tampón? Si no, consulte el punto 3.
3. Si el tubo no está lleno de solución tampón, compruebe si presenta dobleces que bloquean el flujo ascendente de solución tampón en el pre-filtro y la Cell Preparation Bag. Ajuste la posición del set de tubos. En caso necesario, suba o baje los ganchos con las abrazaderas del gancho. Ajuste la posición del tubo en la válvula. Para modificar la posición del tubo, abra la válvula pulsando manualmente el botón. Confirme que el tubo no esté doblado, retorcido ni tenso.
4. ¿Se ha perforado correctamente la Cell Preparation Bag? Confirme que el pincho del pre-filtro de sistema haya penetrado en la membrana de goma de la conexión de la Cell Preparation Bag.

5. Si el set de tubos no se ha llenado completamente de solución tampón: ¿Ha perforado el pincho de la solución tampón la bolsa de solución tampón? Para corregirlo, consulte «Hay un exceso de aire en el set de tubos después del cebado» en la sección 8.3.2.

Tras la acción correctiva, prosiga con la separación en curso y pulse **5**. Si vuelve a aparecer el mensaje de advertencia n.° 1 tras haber descartado cada una de las posibles causas anteriores, es posible que el sensor de líquido esté defectuoso. Póngase en contacto con el Miltenyi Biotec Technical Support.

Las células se desplazan a la parte incorrecta del set de tubos. Hay fugas de líquido en las válvulas

- El set de tubos no se ha insertado correctamente. Si el instrumento sigue funcionando, pulse **STOP** y pince el tubo con unas pinzas de cierre. Ajuste el tubo presionando primero la válvula adecuada. Retire las pinzas de cierre y pulse **RUN** para reanudar la separación. La separación celular se cancelara si no se pulsa **RUN** en un plazo de 600 segundos.
- La válvula no funciona correctamente. Pulse **STOP**. Pince el tubo con unas pinzas de cierre. Presione la válvula varias veces manualmente para desatascarla. Retire las pinzas de cierre y pulse **RUN** para continuar. La separación celular se cancelara si no se pulsa **RUN** en un plazo de 600 segundos. Si el usuario no puede desatascar la válvula, póngase en contacto con el Miltenyi Biotec Technical Support.
- Se ha utilizado el programa de software incorrecto. Compruebe en la pantalla el nombre del programa actualmente utilizado. Cancele el ciclo pulsando **STOP** y póngase inmediatamente en contacto con el Miltenyi Biotec Technical Support.

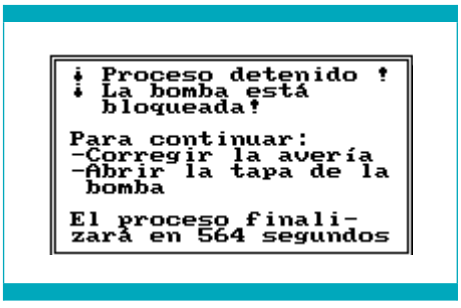
El imán no se desplaza

El desplazamiento del imán no funciona. Se ha producido un fallo del desplazamiento del imán. Aparecerá un mensaje de error (consulte la sección 8.3.1). Anote el número del mensaje de error y póngase en contacto con el Miltenyi Biotec Technical Support.

El motor de la bomba se detiene durante el separación celular

No se ha insertado correctamente el tubo de la bomba, lo que puede impedir que la bomba gire. En este caso, aparecerá el mensaje de advertencia n.° 2 en la ventana de la pantalla. El operario tiene 600 segundos para corregir la posición del tubo de la bomba.

1. Retire con cuidado el tubo de la bomba.



Pantalla 8.2: Mensaje de advertencia n.° 2

2. Confirme que el tubo de la bomba no se haya dañado por la inserción incorrecta. Si el tubo de la bomba presenta fugas, sujete el tubo por encima y por debajo de la columna de separación para conservar las células retenidas en la columna y póngase en contacto con el Miltenyi Biotec Technical Support.
3. Si el tubo de la bomba no se ha dañado, puede volver a insertarlo en la carcasa de la bomba.
4. Pulse **RUN** para reiniciar la separación en 600 segundos o la separación se cancelará.

Un tubo de la bomba aplanado o colapsado puede indicar una obstrucción de la columna. En este caso, póngase en contacto con el Miltenyi Biotec Technical Support.

La carga de la muestra no se detiene aunque la Cell Preparation Bag y el pre-filtro estén vacíos

El sensor de líquido no funciona correctamente, p. ej., porque la superficie del tubo del sensor de líquido está mojada. Pulse **STOP** para interrumpir la separación. Extraiga el tubo del sensor. Seque el tubo y la zona de contacto con una toallita de papel o un material absorbente. Sustituya el tubo en el sensor de líquido y pulse **RUN**. No interrumpa la secuencia durante más de 600 segundos o la separación de las células finalizará.

Si no fuera posible activar el sensor de líquido de esta manera, pulse **STOP** y después **2** y confirme con **ENT** para omitir la carga de la muestra y continuar con la separación.

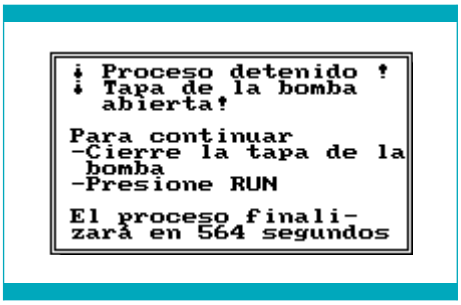
8.4.3 Incidentes inesperados: Solo programas de enriquecimiento

Es ciclo se cancela antes de finalizar el programa de separación celular

- Puerta de la bomba abierta: Por razones de seguridad, la separación en curso se parará automáticamente durante el funcionamiento del instrumento si se abre la puerta de la bomba. Aparecerá el mensaje n.° 5 en la ventana de la pantalla.

  Cierre la puerta de la bomba y pulse **RUN**.

  Si, como en este caso, no se pulsa **RUN** en un plazo de 600 segundos, la separación se cancelará y no se finalizará la separación celular. Recupere la mayor cantidad de muestra posible del set de tubos ejecutando el PROGRAMA DE EMERGENCIA.



Pantalla 8.3: Mensaje de advertencia n.° 5

- Fallo de la alimentación eléctrica: El fallo de la alimentación eléctrica provocará la finalización de la separación CliniMACS Plus. La separación de las células no se finalizará una vez restablecida la alimentación eléctrica. Recupere la mayor cantidad de muestra posible del set de tubos ejecutando el PROGRAMA DE EMERGENCIA.

8.4.4 Incidentes inesperados: CD34 SELECTION 1/2

- La carga se detiene antes de que se haya cargado toda la muestra en las columnas

  El pre-filtro está obstruido por una gran cantidad de residuos celulares o por un llenado incompleto del filtro. Debido al bombeo continuo se ha creado un vacío que ha provocado la formación de burbujas de aire que a su vez ha activado el sensor de líquido. En consecuencia, el proceso de separación ha continuado con los lavados de la columna antes de que se haya podido cargar toda la muestra. No se puede reiniciar la carga de la muestra una vez interrumpida la secuencia de carga.

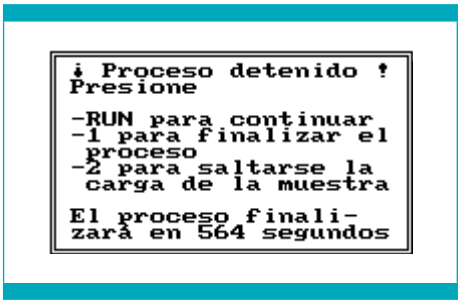
  Deje que el CliniMACS Plus Instrument finalice el programa de separación. No cancele el ciclo actual; se podría producir una pérdida celular innecesaria. Una vez finalizado el procedimiento de separación, filtre la muestra restante con un filtro de sangre en línea de 200 µm y transfiérala a una nueva bolsa de transferencia. Realice inmediatamente una segunda separación con un nuevo set de tubos y suficiente solución tampón nueva.

- El tubo de la bomba se ha colapsado o ha aparecido un exceso de aire en el tubo debajo de la pre-columna durante la carga de las células

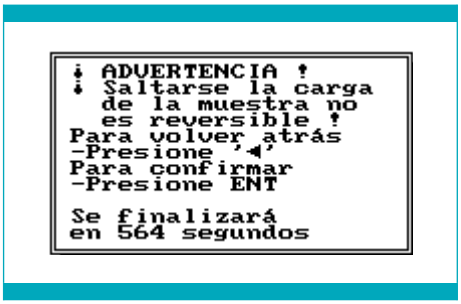
  La pre-columna está obstruida por una gran cantidad de restos celulares en la Cell Preparation Bag. Se debe omitir manualmente la carga de la muestra restante y continuar la separación con las células ya cargadas en el sistema.

1. Pulse **STOP** para interrumpir la carga de las células. Aparecerá el mensaje de advertencia n.° 3.
2. Pulse **2** para omitir la carga de células.

   Aparecerá el mensaje de advertencia n.° 4 y el operario podrá confirmar y modificar la decisión, porque la omisión de la carga de la muestra no es reversible.
3. Pulse **ENT** y el programa de separación detendrá la carga de la muestra y continuará con los lavados de la columna.



Pantalla 8.4: Mensaje de advertencia n.° 3



Pantalla 8.5: Mensaje de advertencia n.° 4

Pince el tubo por debajo del pre-filtro para evitar que las células salgan de la Cell Preparation Bag al set de tubos. Una vez finalizado el procedimiento de separación, filtre la muestra restante con un filtro de sangre en línea de 200 µm y transfiérala a una nueva bolsa de transferencia.

Realice inmediatamente una segunda separación con un nuevo set de tubos y suficiente solución tampón nueva.

8.4.5 Incidentes inesperados: ENRICHMENT 1.1

La carga se detiene antes de que se haya cargado toda la muestra en las columnas

El pre-filtro está obstruido por una gran cantidad de residuos celulares o por un llenado incompleto del filtro. Debido al bombeo continuo se ha creado un vacío que ha provocado la formación de burbujas de aire. Estas han activado el sensor de líquido y el proceso de separación ha continuado directamente con la etapa final de carga de la muestra. Una vez finalizada la separación, puede quedar una parte de la muestra en la Cell Preparation.

Deje que el CliniMACS Plus Instrument finalice el programa de separación. No cancele el ciclo actual; se podría producir una pérdida celular innecesaria.

Determine el número total de células, el porcentaje de células diana y el volumen de carga de la muestra restante en la Cell Preparation Bag e introduzca los parámetros de la muestra reales durante la configuración del instrumento (PASO 2). Una vez finalizado el procedimiento de separación, filtre la muestra restante con un filtro de sangre en línea de 200 µm y transfiérala a una nueva bolsa de transferencia. Realice inmediatamente una segunda separación con un nuevo set de tubos y suficiente solución tampón nueva.

- Se han introducido valores incorrectos para los parámetros de la muestra

  El volumen de carga de la muestra introducido era inferior al volumen real en la Cell Preparation Bag. No se puede reiniciar la carga de la muestra una vez interrumpida.

  Deje que el CliniMACS Plus Instrument finalice el programa de separación. No cancele el ciclo actual; se podría producir una pérdida celular innecesaria.

  Determine el número total de células, el porcentaje de células diana y el volumen de carga de la muestra restante en la Cell Preparation Bag e introduzca los parámetros de la muestra reales durante la configuración del instrumento (PASO 2). Procese la muestra restante con un nuevo set de tubos, un nuevo pre-filtro y suficiente solución tampón nueva.

- El motor de la bomba se detiene durante la elución de las células diana a la Cell Collection Bag

  Las pinzas de cierre de la Cell Collection Bag no están abiertas durante la secuencia de elución. Por lo tanto, la vía a la Cell Collection Bag está bloqueada.

  Pulse **STOP** y abra las pinzas de cierre de la Cell Collection Bag. Abra la puerta de la bomba y compruebe si el tubo de la bomba está correctamente insertado. Cierre la puerta de la bomba y pulse **RUN** para reiniciar la secuencia de elución en el plazo de 600 segundos.

8.4.6 Incidentes inesperados: ENRICHMENT 3.2

- La carga se detiene antes de que se haya cargado toda la muestra en las columnas

  El pre-filtro está obstruido por una gran cantidad de residuos celulares o por un llenado incompleto del filtro. Debido al bombeo continuo se ha creado un vacío que ha provocado la formación de burbujas de aire. Estas han activado el sensor de líquido y el proceso de separación ha continuado con los lavados de la columna antes de que se haya podido cargar toda la muestra. No se puede reiniciar la carga de la muestra una vez interrumpida la secuencia de carga.

  Deje que el CliniMACS Plus Instrument finalice el programa de separación. No cancele el ciclo actual; se podría producir una pérdida celular innecesaria.

  Una vez finalizado el procedimiento de separación, filtre la muestra restante con un filtro de sangre en línea de 200 µm y transfiérala a una nueva bolsa de transferencia. Realice inmediatamente una segunda separación con un nuevo set de tubos y suficiente solución tampón nueva.

- El motor de la bomba se detiene durante la elución de las células diana a la Cell Collection Bag

  Las pinzas de cierre de la Cell Collection Bag no están abiertas durante la secuencia de elución. Por lo tanto, la vía a la Cell Collection Bag está bloqueada.

Pulse **STOP** y abra las pinzas de cierre de la Cell Collection Bag. Abra la puerta de la bomba y compruebe si el tubo de la bomba está correctamente insertado. Cierre la puerta de la bomba y pulse **RUN** para reiniciar la secuencia de elución en el plazo de 600 segundos.

8.4.7 Programa de emergencia (solo se debe utilizar con programas de enriquecimiento)

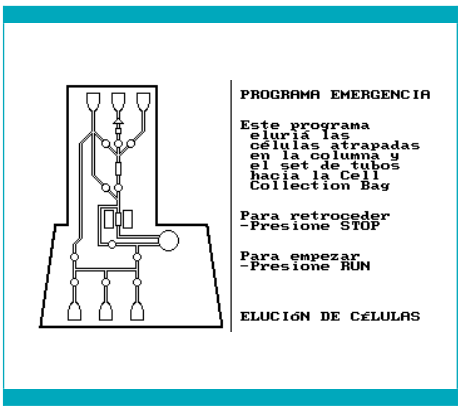
Si, por cualquier razón, un ciclo ha finalizado irreversiblemente antes de la elución de las células diana de la columna de separación, se puede ejecutar el programa de emergencia para eluir las células de la columna de separación. Este programa se ha diseñado únicamente para el uso con los programas de enriquecimiento en combinación con un CliniMACS Tubing Set (REF 161-01) o un CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01).

El programa de emergencia no se debe utilizar con ninguno de los programas de depleción.

Nota: El programa de emergencia eluirá aproximadamente 75 mL de líquido. Confirme que hay conectada una Cell Collection Bag adecuada al set de tubos.

1. Para confirmar que la columna de separación no está magnetizada, apague el instrumento, espere 5 segundos y vuelva a encenderlo. El imán se retirará de la unidad de separación magnética (consulte la sección «Descripción» del manual del usuario del CliniMACS Plus Instrument). Compruébelo acercando un pequeño objeto magnetizable a la unidad de separación magnética. Si el imán no se ha retirado, o en caso de un fallo de la alimentación eléctrica, póngase en contacto con el Miltenyi Biotec Technical Support.
2. Espere a que aparezca la pantalla principal en la ventana (consulte la sección «Instalación» del manual del usuario del CliniMACS Plus Instrument.

   Para abrir el programa de emergencia, pulse **4**. La ventana muestra la Pantalla 8.6.



Pantalla 8.6: Programa de emergencia

3. Para continuar con la elución de las células retenidas, pulse **RUN**.

   Nota: Para salir del programa de emergencia sin iniciar la elución de las células retenidas, pulse **STOP**.

4. Transfiera las células eluidas recogidas en la Cell Collection Bag a una nueva bolsa de transferencia de 600 mL. Finalmente, mezcle las células restantes en la Cell Preparation Bag con las células eluidas por el programa de emergencia. Inicie una nueva separación con un nuevo set de tubos y suficiente solución tampón nueva.

8.4.8 Incidentes inesperados: DEPLETION 2.1

Las células de destino no llegan a la Cell Collection Bag

La bomba no puede cargar el producto de la Cell Preparation Bag porque la pinza situada de la Cell Collection Bag no está abierta durante la secuencia de carga de células. Pulse **STOP** y abra la pinza de la Cell Collection Bag. Pulse **RUN** para continuar el proceso de depleción.

Deje que el CliniMACS Plus Instrument finalice el programa de separación. No cancele el ciclo actual; se podría producir una pérdida innecesaria de células. Si, una vez finalizado el procedimiento de depleción, una parte del producto permanece en la Cell Preparation Bag, procese las células restantes con un nuevo set de tubos, un nuevo pre-filtro y suficiente solución tampón nueva.

Determine el número total de células, el porcentaje de células marcadas y el volumen de carga de la muestra, introduzca los parámetros de la muestra reales durante la configuración del instrumento (PASO 2) e inicie una nueva depleción.

La carga se detiene antes de que se haya cargado toda la muestra en las columnas

Las burbujas de aire de la muestra o del pre-filtro han activado el sensor de líquido antes de que se hubiera cargado toda la muestra. Cancele el ciclo actual y compruebe el número total de células y la eficiencia de depleción de las células en la Cell Collection Bag. En caso necesario, procese la muestra restante con un nuevo set de tubos, un nuevo pre-filtro y suficiente solución tampón nueva.

Determine el número total de células, el porcentaje de células marcadas y el volumen de carga de la muestra, introduzca los parámetros de la muestra reales durante la configuración del instrumento (PASO 2) e inicie una nueva depleción.

8.4.9 Incidentes inesperados: DEPLETION 3.1

La carga se ha interrumpido durante la Staged Cell Loading, antes de que se haya cargado toda la muestra en las columnas

- pre-filtro insertado al revés. En consecuencia, la función de cámara de goteo no está disponible y las burbujas de aire pueden pasar directamente por el sensor de líquido y provocar la finalización de la carga de la muestra antes de que se haya cargado toda la muestra. El instrumento continúa el proceso de depleción, iniciando directamente el siguiente paso. No se puede reiniciar la carga de la muestra una vez interrumpida.
- El pre-filtro está obstruido por una gran cantidad de residuos celulares o por un llenado incompleto del filtro. Debido al bombeo continuo se ha creado un vacío que ha provocado la formación de burbujas de aire. Estas han activado el sensor de líquido y el proceso de separación ha continuado directamente con la etapa final de carga de la muestra. Una vez finalizada la separación, puede quedar una parte de la muestra en la Cell Preparation.

Cancele el ciclo actual y mezcle el contenido de la Reapplication Bag y de la Cell Preparation Bag. Procese las células restantes con un nuevo set de tubos, un nuevo pre-filtro y suficiente solución tampón nueva.

- La carga se ha interrumpido durante el Sensitive Sample Loading (Sensitive Loading Stage)

  La Reapplication Bag cuelga a una altura inferior a la de la Cell Preparation Bag. Durante el paso de carga sensible, la Cell Preparation Bag se vacía antes de que se haya cargado completamente el volumen de la Reapplication Bag. En consecuencia, es posible que una burbuja de aire active el sensor de líquido antes de que la muestra se haya cargado completamente desde la Reapplication Bag una vez finalizada la depleción. No se puede reiniciar la carga de la muestra una vez interrumpida.

  Deje que el CliniMACS Plus Instrument finalice el programa de separación. No cancele el ciclo actual; se podría producir una pérdida innecesaria de células. Procese la muestra restante con un nuevo set de tubos, un nuevo pre-filtro y suficiente solución tampón nueva.

  Determine el número total de células, el porcentaje de células marcadas y el volumen de carga de la muestra e introduzca los parámetros de la muestra reales durante la configuración del instrumento (PASO 2). Tenga en cuenta que para el programa DEPLETION 3.1 se requieren tres ganchos para bolsas grandes y consulte las alturas adecuadas de las bolsas en las instrucciones de instalación (consulte la sección 7.3.3).

- Las células diana (células no marcadas) no llegan a la Reapplication Bag durante la Staged Cell Loading masiva (etapa de carga)

  Se ha introducido un tubo incorrecto en la válvula n.° 3 (rama derecha del tubo de la Reapplication Bag en lugar de la rama izquierda [conector de Y] del tubo). Pulse **STOP** y retire el tubo incorrecto de la válvula n.° 3. Inserte manualmente el tubo correcto (rama izquierda del tubo de la Reapplication Bag) en la válvula n.° 3, como se describe en las instrucciones de instalación. Pulse **RUN** para continuar con la depleción en el plazo de 600 segundos.

  Deje que el CliniMACS Plus Instrument finalice el programa de separación. No cancele el ciclo actual; se podría producir una pérdida celular innecesaria. Compruebe la eficiencia de depleción de la fracción objetivo en la Cell Collection Bag. Si la eficiencia de depleción no es suficiente, repita la depleción con un nuevo set de tubos, un nuevo pre-filtro y suficiente solución tampón nueva.

  Determine el número total de células, el porcentaje de células marcadas y el volumen de carga de la muestra, introduzca los valores reales de los parámetros de la muestra durante la configuración del instrumento (PASO 2) e inicie una nueva depleción.

Las células fluyen a la bolsa de solución tampón durante los pasos de lavado gravimétricos

La bolsa de solución tampón está demasiado baja (inferior a la Cell Preparation Bag). Pulse **STOP** y ajuste el gancho de la bolsa de solución tampón a la posición correcta. Confirme que para el programa DEPLETION 3.1 se hayan montado tres ganchos para bolsas grandes y consulte las alturas adecuadas de las bolsas en las instrucciones de instalación (consulte la sección 7.3.3).

- Si las células no han llegado a la bolsa de solución tampón, basta con abrir manualmente las válvulas núms. 1 y 2 para permitir un breve retrolavado de células a la Cell Preparation Bag. Una vez la bolsa de solución tampón este nuevamente despejada, cierre las válvulas núms. 1 y 2 y pulse **RUN** para continuar con la depleción en el plazo de 600 segundos.
- Si las células ya han llegado a la bolsa de solución tampón, sustituya la bolsa de solución tampón, abra manualmente las válvulas núms. 1 y 2 para un breve lavado de la bolsa de solución tampón y pulse **RUN** para continuar con la depleción en el plazo de 600 segundos. En caso necesario, procese el resto de la muestra en la bolsa de solución tampón (si el volumen supera 300 mL, transfiera la muestra a una bolsa centrifugable para reducir primero el volumen) con un nuevo set de tubos, un nuevo pre-filtro y suficiente solución tampón nueva.

El motor de la bomba se detiene durante la primera elución de las células marcadas a la Non-Target Cell Bag

- No se han retirado las pinzas de cierre después del test de integridad. Pulse **STOP** y retire las pinzas de cierre. Abra la puerta de la bomba y compruebe si el tubo de la bomba está correctamente insertado. Cierre la puerta de la bomba y pulse **RUN** para reiniciar la secuencia de elución en el plazo de 600 segundos.
- Se ha introducido un tubo incorrecto en la válvula n.° 3 (tubo de la Non-Target Cell Bag en lugar de la rama izquierda [conector de Y] de la Reapplication Bag). Pulse **STOP** y retire el tubo de la Non-Target Cell Bag de la válvula n.° 3. Inserte manualmente el tubo correcto (rama izquierda del tubo de la Reapplication Bag) en la válvula n.° 3, como se describe en las instrucciones de instalación. Pulse **RUN** para reiniciar la secuencia de elución en el plazo de 600 segundos.

8.5 Rendimiento de la separación celular

8.5.1 Incidentes inesperados: Solo programas de enriquecimiento

■ El rendimiento de células diana es bajo

- Las células diana se han marcado deficientemente con reactivo:
  - El reactivo ha caducado. Compruebe la fecha de caducidad. No utilice ningún reactivo después de la fecha de caducidad.
  - El reactivo no se ha conservado correctamente. Compruebe la temperatura de conservación. No utilice ningún reactivo que se haya conservado de forma inadecuada (consulte las instrucciones de uso del reactivo).
  - No se ha seguido el procedimiento de marcaje recomendado. Consulte las secciones relativas al procedimiento de preparación de muestras y de separación del manual del usuario.
- Se han perdido células durante los pasos de preparación.
  - Las células se han eliminado con el sobrenadante a la Plasma Waste Bag y a la Wash Waste Bag debido a una sedimentación incompleta o a una resuspensión demasiado temprana de las células, p. ej., al retirar la bolsa de la centrífuga. Compare el contenido de leucocitos del producto celular no marcado y del producto celular marcado. Compruebe los ajustes de centrifugado para un centrifugado correcto. Determine el número de células de todas las bolsas de desechos.
  - La solución tampón no contenía HSA. Enriquezca la solución tampón con HSA a una concentración final del 0,5% (p/v), (consulte la sección «Materiales CliniMACS necesarios» de la aplicación correspondiente).
  - Los ajustes de la centrífuga eran deficientes. Compruebe los ajustes de centrifugado.
  - Desequilibrio de la centrífuga o uso del freno o carga asimétrica de la centrífuga.
- El análisis era incorrecto.
  - Se ha producido un error de muestreo. Compruebe si la suspensión celular presenta células aglutinadas o precipitadas. Confirme que se han tomado muestras representativas y repita el análisis.
  - Se ha producido un error de tinción. Compruebe los reactivos de citometría de flujo. Repita la tinción.
  - Los ajustes de citometría de flujo eran incorrectos. Compruebe los ajustes del instrumento.

■ La pureza de las células diana es baja.

- El producto celular se ha conservado de forma inadecuada. La preparación y separación del producto celular se debe realizar inmediatamente después de la leucaféresis. Mantenga el producto celular a una concentración de leucocitos inferior a $0{,}2\times10^9$ por mL. En caso necesario, diluya el producto celular con plasma autólogo. El producto celular no debe tener más de 24 horas cuando se inicie el procedimiento de marcaje y separación. Si el producto celular se ha conservado, p. ej., durante la noche, se deberá mantener a temperatura ambiente controlada (+19 °C a +25 °C [+66 °F a +77 °F]).
- No se ha seguido el protocolo de marcaje magnético (p. ej., volúmenes incorrectos durante el marcaje magnético). Siga las instrucciones del marcaje magnético (consulte el PASO 1 en la sección de la aplicación correspondiente). Para la resolución de problemas, determine los subconjuntos de leucocitos (linfocitos B, linfocitos T, monocitos, granulocitos y plaquetas) que contaminan la fracción de células diana y solicite asesoramiento al Miltenyi Biotec Technical Support.
- Un número elevado de granulocitos ha contaminado el producto inicial (ajuste de aféresis deficiente). Los granulocitos moribundos se unirán entonces al reactivo CliniMACS de forma inespecífica, lo que puede reducir la pureza de las células diana.
- Se ha producido un fallo de funcionamiento de una válvula. La fracción eluida de células diana se ha contaminado por parte de la fracción no diana o la fracción de residuos de solución tampón. Revise la inserción de los tubos en las válvulas para verificar su correcto funcionamiento. Evalúe el contenido de células diana de la fracción de células no diana y de los residuos de la solución tampón. En caso necesario, mezcle la fracción de células diana y no diana, redúzcala a un volumen adecuado y repita la separación con un nuevo set de tubos y suficiente solución tampón nueva.

■ Retención inespecífica de células muertas del producto celular o elevadas pérdidas celulares inespecíficas en el procedimiento

- La solución tampón no contiene HSA. Enriquezca la solución tampón con HSA a una concentración final del 0,5% (p/v), (consulte la sección «Materiales CliniMACS necesarios» de la aplicación correspondiente).
- Es posible que el producto celular se haya conservado de forma inapropiada. La preparación y separación del producto celular se debe realizar inmediatamente después de la leucaféresis. Mantenga el producto celular a una concentración de leucocitos inferior a $0{,}2\times10^9$ por mL. En caso necesario, diluya la leucaféresis con plasma autólogo. El producto celular no debe tener más de 24 horas cuando se inicie el procedimiento de marcaje y separación. Si el producto celular se ha conservado, p. ej., durante la noche, se deberá mantener a temperatura ambiente controlada (+19 °C a +25 °C [+66 °F a +77 °F]).

- Carga incompleta de la muestra debido a la obstrucción de la columna de separación, del pre-filtro o de la pre-columna. Compruebe el número total de células y la eficiencia de depleción de las células restantes.

8.5.2 Incidentes inesperados: CD34 SELECTION 1/2, ENRICHMENT 1.1

■ La pureza de las células diana diana es baja

La elución de la columna de separación ha sido incompleta.

- Se ha cancelado el programa de separación. Compruebe si hay un mensaje de error en la pantalla. Continúe con la sección «Es ciclo se cancela antes de finalizar el programa de separación celular» (consulte la sección 8.4.3 en la página 213).
- Se ha producido un fallo de la bomba o de una válvula. Recupere las células del set de tubos con el programa de emergencia descrito en la sección 8.4.7. Compruebe los volúmenes de todas las fracciones. Evalúe el contenido de células diana de la Buffer Waste Bag y la Negative Fraction Bag.
- El tubo a la Cell Collection Bag está bloqueado. Compruebe si el set de tubos presenta pinzas cerradas, oclusiones o dobleces.
- Se ha superado la capacidad del reactivo o del set de tubos. Consulte el límite de capacidad de la aplicación correspondiente.
- El tubo no se ha insertado correctamente. Compruebe si los tubos están correctamente insertados en las válvulas.

8.5.3 Incidentes inesperados: CD34 SELECTION 1/2

■ La pureza de las células diana es baja

Se han retenido células no diana.

- Movilización deficiente de las células diana. Se ha obtenido un número muy bajo de células diana. En consecuencia, un número bajo de células no diana contaminantes (p, ej., granulocitos, monocitos, plaquetas) puede disminuir la pureza.
- Plasma o inmunoglobulinas insuficientes durante el marcaje magnético. Siga las instrucciones del marcaje magnético (consulte el PASO 1 de la aplicación correspondiente).

  Si durante el marcaje magnético no se puede garantizar una concentración final de aproximadamente el 30% de plasma autólogo en la muestra, añada inmunoglobulina. Se recomienda una concentración final de 1,5 mg/mL para bloquear eficazmente la unión inespecífica de reactivos durante el marcaje magnético.

8.5.4 Incidentes inesperados: ENRICHMENT 1.1

El rendimiento de células diana es bajo

Se han introducido parámetros de muestra incorrectos. Compruebe los parámetros introducidos con los resultados del análisis.

8.5.5 Incidentes inesperados: DEPLETION 2.1 y DEPLETION 3.1

La eficiencia de depleción es baja

Si la eficiencia de depleción es insuficiente, procese la muestra restante con un nuevo set de tubos y suficiente solución tampón nueva. Considere realizar un nuevo marcaje de las células que se deben deplecionar. Determine el número y el porcentaje de células que se deben deplecionar e introduzca los parámetros reales de la muestra durante la configuración del instrumento (PASO 2). Si se producen aglutinaciones visibles, puede ser útil filtrar las células antes de ejecutar un nuevo ciclo. Considere que se pueden perder células debido a la aglutinación y la filtración adicional.

- Se ha superado la capacidad del reactivo o del set de tubos. Consulte el límite de capacidad de la aplicación correspondiente.
- Determinación incorrecta de las células que debe marcar el reactivo.
- Se han introducido parámetros de muestra incorrectos. Compruebe los parámetros introducidos con los resultados del análisis.
- Viabilidad reducida de las células. Las células muertas se pueden unir de forma inespecífica a la columna de separación, reduciendo así la capacidad de marcaje de la columna, lo que puede disminuir la eficiencia de depleción. Utilice un producto celular de mejor calidad y procese el producto lo más fresco posible. No se deben usar productos conservados más de 24 horas. Si fuera necesario conservarlo, el producto celular se debe conservar a temperatura ambiente controlada (+19 °C a +25 °C [+66 °F a +77 °F]). La concentración de células no debe superar $0{,}2\times10^{9}$/mL. En caso necesario, diluya el producto celular con plasma autólogo para conseguir una concentración celular óptima.

9 Aviso legal

9.5.1 Garantía limitada

Salvo que se indique en una declaración de garantía específica, que puede acompañar al producto, o a menos que se acuerde lo contrario por escrito por un representante debidamente autorizado de Miltenyi Biotec, la garantía de Miltenyi Biotec para cualquier producto comprado directamente a Miltenyi Biotec estará sujeta a los términos y condiciones de venta bajo los cuales le fue proporcionada por la respectiva organización de ventas de Miltenyi Biotec. Los términos y condiciones de venta aplicables pueden variar según el país y la región. Estas condiciones están disponibles a petición o en www.miltenyibiotec.com. Nada de lo aquí expuesto debe interpretarse como una garantía adicional.

En el caso de los productos comprados a terceros minoristas o revendedores (por ejemplo, comprados a un proveedor de servicios local autorizado de Miltenyi Biotec), pueden aplicarse términos y condiciones diferentes.

Para determinar la garantía que acompaña a su producto, consulte el albarán, la factura, el recibo u otra documentación de venta. Algunos componentes de una combinación de productos que haya adquirido pueden tener una garantía más corta que la que figura en el albarán, la factura, el recibo u otra documentación de venta (por ejemplo, productos sujetos a caducidad y obsolescencia).

La garantía de Miltenyi Biotec para este producto solo cubre los problemas del producto causados por defectos en el material o la mano de obra durante el uso normal. No cubre los problemas del producto causados por cualquier otra razón, incluidos, entre otros, los problemas del producto debidos a su uso de una manera distinta a la descrita específicamente en este manual, por ejemplo: uso inapropiado o inadecuado; montaje o instalación incorrecta por parte de un operario o un tercero; desgaste razonable; operación, manipulación, almacenamiento, servicio o mantenimiento negligentes o incorrectos; incumplimiento de las instrucciones de funcionamiento; modificación no autorizada de o a cualquier parte de este producto; o uso de consumibles, accesorios o materiales de trabajo inapropiados

La garantía de Miltenyi Biotec no cubre los productos vendidos TAL CUAL o CON TODOS LOS FALLOS ni los consumibles. Nada de lo aquí expuesto debe interpretarse como una garantía adicional.

Se deberá informar sin demora a Miltenyi Biotec si se realiza una reclamación bajo esta garantía. Si se produce un defecto de material o de fabricación dentro del periodo de garantía, Miltenyi Biotec tomará las medidas oportunas para restablecer la plena capacidad de uso del instrumento.

Limitación de daños Miltenyi Biotec no se responsabilizará de ningún daño incidental o consecuente por incumplimiento de cualquier garantía o condición expresa o implícita relacionada con este producto.

Algunos países, estados o jurisdicciones no permiten la exclusión ni limitación de los daños incidentales o consecuentes, por lo que las limitaciones o exclusiones anteriores pueden no ser aplicables en su caso. Esta declaración de garantía le otorga derechos legales específicos y puede tener otros derechos, que varían de un estado a otro o de una jurisdicción a otra.

9.5.2 Marcas comerciales

CliniMACS, MACS, MACSmix, el logotipo de Miltenyi Biotec MiniMACS son marcas registradas de Miltenyi Biotec o de sus filiales en diferentes países del mundo. Todas las demás marcas comerciales mencionadas en este documento son propiedad de sus respectivos dueños y tienen únicamente fines de identificación.

Miltenyi Biotec

Alemania/Austria
Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG
Friedrich-Ebert-Straße 68
51429 Bergisch Gladbach
Alemania
+49 2204 8306-0
+49 2204 85197
macsde@miltenyi.com

Estados Unidos/Canadá
Miltenyi Biotec Inc.
2303 Lindbergh Street
Auburn, CA 95602
Estados Unidos
800 FOR MACS
+1 866 811 4466
+1 877 591 1060
macsus@miltenyi.com

Australia
Miltenyi Biotec
Australia Pty. Ltd.
Unit 11, 2 Eden Park Drive
Macquarie Park NSW 2113
Australia
+61 2 8877 7400
+61 2 9889 5044
macsau@miltenyi.com

Benelux
Miltenyi Biotec B.V.
Dellaertweg 9C
2316 WZ Leiden
Países Bajos
macsnl@miltenyi.com
Servicio de atención al cliente
Países Bajos
0800 4020120
0800 4020100
Servicio de atención al cliente
Bélgica
0800 94016
0800 99626

Servicio de atención al cliente
Luxemburgo
800 24971
800 24984

China
Miltenyi Biotec Technology &
Trading (Shanghai) Co., Ltd.
Room A401, 4/F
No. 1077, Zhangheng Road
Pudong New Area
201203 Shanghai
P.R. China
+86 21 6235 1005-0
+86 21 6235 0953
macscn@miltenyi.com.cn

Corea del Sur
Miltenyi Biotec Korea Co., Ltd.
Donggeuk 7F
562 Nonhyeon-ro
Gangnam-gu
Seúl 06136
Corea del Sur
+82 2 555 1988
+82 2 555 8890
macskr@miltenyi.com

España
Miltenyi Biotec S.L.
C/Luis Buñuel 2
Ciudad de la Imagen
28223 Pozuelo de Alarcón (Madrid)
España
+34 91 512 12 90
+34 91 512 12 91
macses@miltenyi.com

Francia
Miltenyi Biotec SAS
10 rue Mercoeur
75011 París
Francia
+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

Italia
Miltenyi Biotec S.r.l.
Via Paolo Nanni Costa, 30
40133 Bologna
Italia
+39 051 6 460 411
+39 051 6 460 499
macsit@miltenyi.com

Japón
Miltenyi Biotec K.K.
NEX-Eitai Building 5F
16-10 Fuyuki, Koto-ku
Tokio 135-0041
Japón
+81 3 5646 8910
+81 3 5646 8911
macsjp@miltenyi.com

Países Nórdicos y Bálticos
Miltenyi Biotec Norden AB
Medicon Village
Scheeletorget 1
223 81 Lund
Suecia
macsse@miltenyi.com
Servicio de atención al cliente
Suecia
0200 111 800
+46 280 72 99
Servicio de atención al cliente
Dinamarca
80 20 30 10
+46 46 280 72 99

Servicio de atención al cliente
Noruega, Finlandia, Islandia
y países bálticos
+46 46 280 72 80
+46 46 280 72 99

Reino Unido
Miltenyi Biotec Ltd.
Almac House, Church Lane
Bisley, Surrey GU24 9DR
Reino Unido
+44 1483 799 800
+44 1483 799 811
macsuk@miltenyi.com

Singapur
Miltenyi Biotec Asia Pacific Pte Ltd.
438B Alexandra Road, Block B
Alexandra Technopark
#06-01
Singapur 119968
+65 6238 8183
+65 6238 0302
macssg@miltenyi.com

Suiza
Miltenyi Biotec Swiss AG
Gibelinstrasse 27
4500 Solothurn
Suiza
+41 32 623 08 47
+49 2204 85197
macsch@miltenyi.com

www.miltenyibiotec.com

Miltenyi Biotec suministra productos y servicios en todo el mundo. Visite **www.miltenyibiotec.com/local** para encontrar su contacto de Miltenyi Biotec más cercano.

CliniMACS, MACS, MACSmix, el logotipo de Miltenyi Biotec y MiniMACS son marcas comerciales registradas o marcas comerciales de Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG y/o sus filiales en distintos países del mundo. Copyright © 2023 Miltenyi Biotec y/o sus filiales. Todos los derechos reservados.

210-003-230/01 | IEdición: 2023-02