Miltenyi Biotec

Aplicações do CliniMACS® Plus

Manual do utilizador



Os componentes do sistema CliniMACS, incluindo reagentes, conjuntos de tubos, aparelhos e solução tampão PBS/EDTA, são concebidos, fabricados e testados sob um sistema de qualidade certificado em conformidade com a norma ISO 13485. Na UE, os componentes do sistema CliniMACS estão disponíveis sob a forma de dispositivo médico com marcação CE para a respetiva utilização prevista, salvo indicação em contrário. Nos EUA, o sistema CliniMACS CD34 Reagent, incluindo o CliniMACS Plus Instrument, o CliniMACS CD34 Reagent, o CliniMACS Tubing Set TS e o CliniMACS Tubing Set LS, e a CliniMACS PBS/EDTA Buffer, é aprovado pela FDA como aparelho de uso humanitário (*Humanitarian Use Device*, HUD), autorizado pela lei federal dos EUA para utilização no tratamento de pacientes com leucemia mieloide aguda (LMA) na primeira remissão completa. A eficácia do dispositivo para esta indicação não foi demonstrada. Estão disponíveis outros produtos da linha CliniMACS apenas para utilização sob um pedido de novo fármaco experimental (*Investigational New Drug*, IND) aprovado, uma isenção de dispositivo experimental (*Investigational Device Exemption*, IDE) ou aprovação da FDA. Na Austrália, os seguintes componentes do sistema CliniMACS Plus estão incluídos no registo australiano de produtos terapêuticos (*Australian Register of Therapeutic Goods*, ARTG), estando assim aprovados para fornecimento: CliniMACS Plus Instrument, CliniMACS CD34 Reagent, CliniMACS Tubing Set, CliniMACS Tubing Set LS, CliniMACS Depletion Tubing Set e CliniMACS PBS/EDTA Buffer. Apenas os produtos incluídos no ARTG podem ser utilizados na Austrália.

Salvo indicação específica em contrário, os produtos e os serviços da Miltenyi Biotec destinam-se exclusivamente a fins de investigação e não a utilização terapêutica ou diagnóstica.

Copyright© 2023 Miltenyi Biotec e/ou suas filiais. Todos os direitos reservados.

Nenhuma parte desta publicação pode ser reproduzida, armazenada num sistema de recuperação, transmitida, publicada ou distribuída sob qualquer forma ou por qualquer meio, eletronicamente, mecanicamente, por fotocópia, microfilmagem, gravação, ou de outra forma, sem o prévio consentimento por escrito da Miltenyi Biotec. No entanto, não obstante o referido anteriormente, os proprietários do sistema CliniMACS Plus podem fazer cópias apenas para fins de formação de pessoal na utilização e manutenção da unidade dentro da sua empresa ou organização.

CliniMACS, MACS, MACSmix, o logótipo Miltenyi Biotec e MiniMACS são marcas comerciais registadas ou marcas comerciais da Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG e/ou das suas filiais em vários países em todo o mundo. Todas as outras marcas comerciais mencionadas neste documento são propriedade dos respetivos proprietários e são utilizadas exclusivamente para fins de identificação.

Aplicações do CliniMACS® Plus

Manual do utilizador

Versão do software 2.4x

Emitido: 2023-10
210-003-250/01

MD CE 0123

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

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

www.miltenyibiotec.com

Informações essenciais

Este manual do utilizador fornece informações sobre a utilização das aplicações do CliniMACS Plus. O manual do utilizador CliniMACS Plus Instrument contém instruções, advertências, precauções e outras informações importantes para a utilização do CliniMACS Plus Instrument.

⚠ ADVERTÊNCIA

O sistema CliniMACS Plus só pode ser utilizado por operadores formados. Antes de colocar o sistema em funcionamento, ler atentamente e compreender as informações de segurança, as advertências, as precauções e as instruções para o correto funcionamento do CliniMACS Plus Instrument fornecidas nas instruções de utilização do sistema CliniMACS Plus (incluindo, mas não se limitando às informações de segurança no manual do utilizador CliniMACS Plus Instrument e no capítulo 3 "Advertências e precauções" na página 29, neste manual do utilizador), bem como em todas as recomendações relacionadas com a segurança emitidas pela Miltenyi Biotec. Deve ser prestada especial atenção a todas as advertências apresentadas no aparelho ou que acompanhem consumíveis, acessórios, materiais e equipamentos adicionais. O operador tem de respeitar sempre todas as informações de segurança, advertências, precauções e instruções durante o funcionamento do aparelho, e confirmar que todas elas são observadas. A não observação das informações de segurança, das advertências, das precauções e das instruções contidas nas instruções de utilização pode resultar em anomalia do aparelho, danos materiais, perda de células-alvo, lesões e/ou morte.

Índice

1	**Introdução**	**11**
1.1	Informações gerais	11
1.2	Marcação de células com reagentes CliniMACS	12
1.3	Separação magnética de células de gradiente elevado	13
1.4	Estratégias de separação	13
1.4.1	Estratégia de enriquecimento	14
1.4.2	Estratégia de empobrecimento	15
2	**Glossário**	**19**
2.1	Representação gráfica	19
2.2	Glossário de símbolos	19
2.3	Glossário de termos	20
3	**Advertências e precauções**	**29**
3.1	Relacionados com o processo	29
3.2	Reagentes e conjugados de biotina CliniMACS	30
3.3	Manuseamento de materiais com risco biológico	31
3.4	Produto celular inicial	32
4	**O sistema CliniMACS Plus**	**33**
4.1	CliniMACS Plus Instrument	33
4.2	Reagentes e conjugados de biotina CliniMACS	33
4.3	Conjuntos de tubos CliniMACS	33
4.4	CliniMACS PBS/EDTA Buffer	33
4.5	Acessórios CliniMACS	34
4.6	Outros materiais necessários	34
4.7	Equipamento necessário	35
5	**Visão geral das aplicações**	**37**
5.1	Quatro PASSOS para as suas células-alvo	37
5.2	Tabela de visão geral	39

6	**Visão geral específica da aplicação dos PASSOS 1–4**	**43**
6.1	Enriquecimento de células CD34 positivas	43
6.1.1	PASSO 1: Preparação das células e marcação magnética	43
6.1.2	PASSO 2: Escolha do programa de separação	45
6.1.3	PASSO 3: Instalação dos conjuntos de tubos CliniMACS	46
6.1.4	PASSO 4: Separação CliniMACS Plus	46
6.2	Enriquecimento de células CD14 positivas	46
6.2.1	PASSO 1: Preparação das células e marcação magnética	46
6.2.2	PASSO 2: Escolha do programa de separação	49
6.2.3	PASSO 3: Instalação dos conjuntos de tubos CliniMACS	49
6.2.4	PASSO 4: Separação CliniMACS Plus	49
6.3	Enriquecimento/empobrecimento com o CliniMACS Anti-Biotin Reagent	50
6.3.1	PASSO 1: Preparação das células e marcação magnética	50
6.3.2	PASSO 2: Escolha do programa de separação	54
6.3.3	PASSO 3: Instalação dos conjuntos de tubos CliniMACS	54
6.3.4	PASSO 4: Separação CliniMACS Plus	54
6.4	Enriquecimento de células CD56 positivas	55
6.4.1	PASSO 1: Preparação das células e marcação magnética	55
6.4.2	PASSO 2: Escolha do programa de separação	58
6.4.3	PASSO 3: Instalação dos conjuntos de tubos CliniMACS	58
6.4.4	PASSO 4: Separação CliniMACS Plus	58
6.5	Empobrecimento de células CD3 positivas	59
6.5.1	PASSO 1: Preparação das células e marcação magnética	59
6.5.2	PASSO 2: Escolha do programa de separação	63
6.5.3	PASSO 3: Instalação dos conjuntos de tubos CliniMACS	63
6.5.4	PASSO 4: Separação CliniMACS Plus	63
6.6	Empobrecimento de células CD19 positivas	64
6.6.1	PASSO 1: Preparação das células e marcação magnética	64
6.6.2	PASSO 2: Escolha do programa de separação	66
6.6.3	PASSO 3: Instalação dos conjuntos de tubos CliniMACS	66
6.6.4	PASSO 4: Separação CliniMACS Plus	66

6.7	Empobrecimento de células CD3 positivas e de células CD19 positivas	67
6.7.1	PASSO 1: Preparação das células e marcação magnética	67
6.7.2	PASSO 2: Escolha do programa de separação	70
6.7.3	PASSO 3: Instalação dos conjuntos de tubos CliniMACS	70
6.7.4	PASSO 4: Separação CliniMACS Plus	70
6.8	Enriquecimento/empobrecimento de células CD8 positivas	71
6.8.1	PASSO 1: Preparação das células e marcação magnética	71
6.8.2	PASSO 2: Escolha do programa de separação	75
6.8.3	PASSO 3: Instalação dos conjuntos de tubos CliniMACS	75
6.8.4	PASSO 4: Separação CliniMACS Plus	75
6.9	Enriquecimento/empobrecimento das células CD25 positivas	76
6.9.1	PASSO 1: Preparação das células e marcação magnética	76
6.9.2	PASSO 2: Escolha do programa de separação	81
6.9.3	PASSO 3: Instalação dos conjuntos de tubos CliniMACS	81
6.9.4	PASSO 4: Separação CliniMACS Plus	81
6.10	Enriquecimento/empobrecimento das células CD4 positivas	82
6.10.1	PASSO 1: Preparação das células e marcação magnética	82
6.10.2	PASSO 2: Escolha do programa de separação	86
6.10.3	PASSO 3: Instalação dos conjuntos de tubos CliniMACS	86
6.10.4	PASSO 4: Separação CliniMACS Plus	86
6.11	Empobrecimento de células CD4 positivas e de células CD8 positivas	86
6.11.1	PASSO 1: Preparação das células e marcação magnética	87
6.11.2	PASSO 2: Escolha do programa de separação	90
6.11.3	PASSO 3: Instalação dos conjuntos de tubos CliniMACS	90
6.11.4	PASSO 4: Separação CliniMACS Plus	90
6.12	Enriquecimento de células CD1c (BDCA-1) positivas – Parte 1: Empobrecimento de células CD19 positivas e marcação de células CD1c (BDCA-1) positivas	91
6.12.1	PASSO 1: Preparação das células e marcação magnética	91
6.12.2	PASSO 2: Escolha do programa de separação	93
6.12.3	PASSO 3: Instalação dos conjuntos de tubos CliniMACS	93
6.12.4	PASSO 4: Separação CliniMACS Plus	94
6.13	Enriquecimento de células CD1c (BDCA-1) positivas – Parte 2: Flexible Labeling System	94

6.13.1 PASSO 1: Preparação das células e marcação magnética 94
6.13.2 PASSO 2: Escolha do programa de separação 96
6.13.3 PASSO 3: Instalação dos conjuntos de tubos CliniMACS 96
6.13.4 STEP 4: Separação CliniMACS Plus 97
6.14 Enriquecimento de células CD304 (BDCA-4) positivas 97
6.14.1 PASSO 1: Preparação das células e marcação magnética 97
6.14.2 PASSO 2: Escolha do programa de separação 100
6.14.3 PASSO 3: Instalação dos conjuntos de tubos CliniMACS 100
6.14.4 PASSO 4: Separação CliniMACS Plus 100
6.15 Empobrecimento de células TCRα/β positivas 100
6.15.1 PASSO 1: Preparação das células e marcação magnética 101
6.15.2 PASSO 2: Escolha do programa de separação 103
6.15.3 PASSO 3: Instalação dos conjuntos de tubos CliniMACS 103
6.15.4 PASSO 4: Separação CliniMACS Plus 104
6.16 Empobrecimento de células CD45RA positivas 104
6.16.1 PASSO 1: Preparação das células e marcação magnética 104
6.16.2 PASSO 2: Escolha do programa de separação 107
6.16.3 PASSO 3: Instalação dos conjuntos de tubos CliniMACS 107
6.16.4 PASSO 4: Separação CliniMACS Plus 107
6.17 Enriquecimento de células humanas secretoras de IFN-gama com o CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma) 108
6.17.1 PASSO 1: Preparação das células e marcação magnética 108
6.17.2 PASSO 2: Escolha do programa de separação 121
6.17.3 PASSO 3: Instalação dos conjuntos de tubos CliniMACS 121
6.17.4 PASSO 4: Separação CliniMACS Plus 121

7 Explicação detalhada dos PASSOS 1–4 123

7.1 PASSO 1: Preparação das células e marcação magnética 123
7.1.1 Primeiras medidas necessárias 123
7.1.2 Marcação magnética de células 124
7.2 PASSO 2: Escolha do programa de separação 135
7.2.1 Ligar o CliniMACS Plus Instrument 135

7.2.2 CD34 SELECTION 1/2 136
7.2.3 ENRICHMENT 1.1 138
7.2.4 ENRICHMENT 3.2 143
7.2.5 DEPLETION 2.1 145
7.2.6 DEPLETION 3.1 150
7.3 PASSO 3: Instalação dos conjuntos de tubos CliniMACS 156
7.3.1 CliniMACS Tubing Set e CliniMACS Tubing Set LS 156
7.3.2 Instalação alternativa dos conjuntos de tubos CliniMACS 171
7.3.3 CliniMACS Depletion Tubing Set 176
7.4 PASSO 4: Separação CliniMACS Plus 191
7.4.1 CD34 SELECTION 1/2 191
7.4.2 ENRICHMENT 1.1 195
7.4.3 ENRICHMENT 3.2 199
7.4.4 DEPLETION 2.1 203
7.4.5 DEPLETION 3.1 207

8 Resolução de problemas 213

8.1 Miltenyi Biotec Technical Support 213
8.2 Preparação do produto de leucaférese 213
8.3 CliniMACS Plus Instrument e conjuntos de tubos CliniMACS 214
8.3.1 Mensagens de erro 214
8.3.2 Carregamento e escorva do conjunto de tubos 214
8.4 Separação de células automatizada 215
8.4.1 Mensagens de advertência 215
8.4.2 Eventos inesperados: Todos os programas de separação 216
8.4.3 Eventos inesperados: Apenas programas de enriquecimento 218
8.4.4 Eventos inesperados: CD34 SELECTION 1/2 218
8.4.5 Eventos inesperados: ENRICHMENT 1.1 220
8.4.6 Eventos inesperados: ENRICHMENT 3.2 221
8.4.7 Programa de emergência (a utilizar apenas com programas de enriquecimento) 222
8.4.8 Eventos inesperados: DEPLETION 2.1 223
8.4.9 Eventos inesperados: DEPLETION 3.1 224
8.5 Desempenho da separação de células 227
8.5.1 Eventos inesperados: Apenas programas de enriquecimento 227

8.5.2 Eventos inesperados: CD34 SELECTION 1/2 e ENRICHMENT 1.1 229
8.5.3 Eventos inesperados: CD34 SELECTION 1/2 229
8.5.4 Eventos inesperados: ENRICHMENT 1.1 230
8.5.5 Eventos inesperados: DEPLETION 2.1 e DEPLETION 3.1 230

9 Notas legais 231

9.5.1 Garantia limitada 231
9.5.2 Marcas comerciais 232

1 Introdução

1.1 Informações gerais

O sistema CliniMACS Plus oferece um conjunto de ferramentas que disponibiliza uma separação de células padronizada de alta qualidade para aplicações terapêuticas.

O sistema CliniMACS Plus baseia-se na tecnologia de separação magnética de células (tecnologia MACS®) desenvolvida pela Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG. A Miltenyi Biotec disponibilizou estes produtos para aplicações clínicas que cumpram os requisitos das normas regulamentares europeias.

Os reagentes e os conjugados de biotina CliniMACS são indicados apenas para utilização *in vitro*, e não para utilização terapêutica nem para perfusão direta nos pacientes.

Os reagentes CliniMACS, em combinação com o sistema CliniMACS Plus, destinam-se a separar células humanas.

A Miltenyi Biotec, enquanto fabricante do sistema CliniMACS Plus, não emite recomendações com relação à utilização de células separadas para fins terapêuticos, nem alega benefícios clínicos.

Para a fabricação e a utilização de células-alvo em seres humanos têm de ser observados a legislação e os regulamentos nacionais – p. ex., para a UE, a diretiva 2004/23/CE (tecidos e células de origem humana) ou a diretiva 2002/98/CE (sangue humano e componentes sanguíneos). Assim, qualquer aplicação clínica das células-alvo é da exclusiva responsabilidade do utilizador de um sistema CliniMACS Plus.

GARANTIA LIMITADA
Se o sistema CliniMACS Plus for utilizado de uma forma não explicitamente descrita neste manual, todas as garantias ficarão nulas e sem efeito.

IMPORTANTE
Antes da utilização do sistema CliniMACS Plus ou de qualquer componente fora do Espaço Económico Europeu, tem de ser confirmada a aprovação regulamentar do sistema CliniMACS Plus ou de qualquer componente CliniMACS no país.

1.2 Marcação de células com reagentes CliniMACS

A separação celular por ativação magnética MACS (Magnetic Cell Sorting) é uma poderosa ferramenta comprovada para a separação de muitos tipos de célula, tanto em laboratórios de investigação como em aplicações clínicas. As misturas de células são separadas num campo magnético com um rótulo imunomagnético específico para o tipo de célula de interesse, p. ex., células progenitoras hematopoiéticas humanas CD34 positivas de populações de células hematológicas heterogéneas.

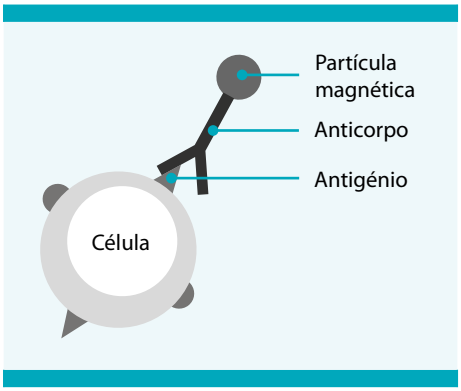


Figura 1.1: Marcação magnética de células

Com o sistema CliniMACS Plus, as células podem ser magneticamente marcadas de três formas:

- Diretamente, num procedimento de marcação de um passo através de anticorpos específicos para antigénios conjugados com esferas de ferro-dextrano superparamagnéticas (ver Figura 1.1).
- Indiretamente, num procedimento de marcação de dois passos, chamado Flexible Labeling System. Num primeiro passo, as células são marcadas com anticorpos específicos para antigénios conjugados com biotina. Num segundo passo, estes anticorpos são marcados com anticorpos específicos para biotina conjugados com esferas de ferro-dextrano superparamagnéticas (ver Figura 1.2).

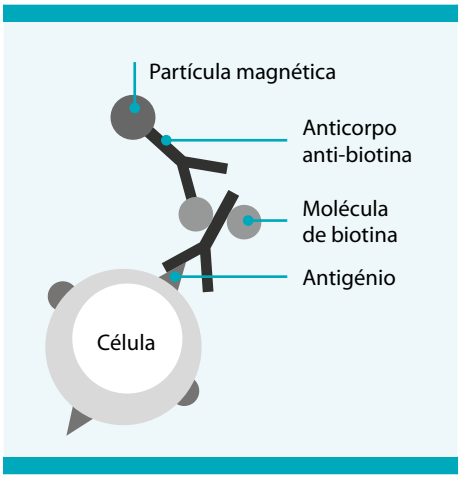


Figura 1.2: Flexible Labeling System

- Indiretamente, num procedimento de marcação de dois passos, chamado CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma). Antes de mais, as células são reestimuladas *in vitro* para secretar a citocina (p. ex., IFN-gama). Num primeiro passo de marcação, as células reestimuladas são marcadas por uma molécula híbrida consistindo num anticorpo específico para leucócitos e num anticorpo específico para citocina, chamado CliniMACS IFN-gamma Catchmatrix Reagent. As células são então incubadas para permitir a secreção da citocina, que é "capturada" pela matriz de captura na superfície celular. A seguir, num segundo passo de marcação, as células secretoras de citocina são marcadas com anticorpos específicos para a citocina conjugados com esferas de ferro-dextrano superpara-magnéticas (CliniMACS IFN-gamma Enrichment Reagent), (ver Figura 1.3).

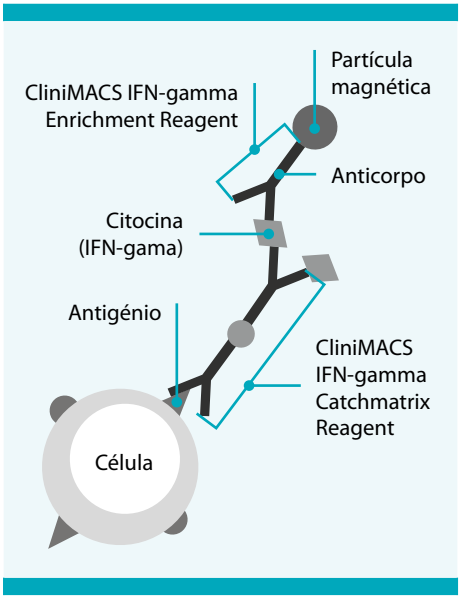


Figura 1.3: CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma)

1.3 Separação magnética de células de gradiente elevado

A suspensão de células marcadas magneticamente é carregada no CliniMACS Plus Instrument preparado com um conjunto de tubos. Esta unidade de separação magnética de células de gradiente elevado consiste num potente íman permanente especificamente desenvolvido e numa coluna de separação com uma matriz ferromagnética.

O campo de gradiente elevado permite a geração de forças magnéticas fortes e uma rápida desmagnetização. Ao colocar pequenas estruturas ferromagnéticas, como a matriz da coluna, dentro do campo magnético, estas perturbam a homogeneidade do campo. Isto resulta na geração de gradientes magnéticos elevados. Nas suas proximidades imediatas, as estruturas ferromagnéticas geram forças magnéticas 10 000 vezes mais fortes do que em geometrias convencionais. O campo de gradiente elevado atrai células marcadas para a matriz, retendo-as eficazmente. Uma vez removida a coluna do íman, a rápida desmagnetização da matriz da coluna permite a libertação das células retidas.

1.4 Estratégias de separação

O sistema CliniMACS Plus oferece ao utilizador uma série de programas de separação. Normalmente, os programas de separação podem ser divididos em estratégias de enriquecimento (CD34 SELECTION 1 e 2, ENRICHMENT 1.1 e ENRICHMENT 3.2) e estratégias de empobrecimento (DEPLETION 2.1 e DEPLETION 3.1).

Enriquecimento de células marcadas magneticamente

Ao escolher uma estratégia de enriquecimento, as células marcadas magneticamente (marcadas primariamente com um reagente CliniMACS) são retidas na coluna de separação e as células não marcadas são deixadas passar. As células marcadas (células-alvo) são reunidas na Cell Collection Bag e as células não marcadas (células não-alvo) na Negative Fraction Bag (ver Figura 1.4).

Empobrecimento de células marcadas magneticamente

A tecnologia MACS também é muito eficaz no empobrecimento de populações de células especificas. As células indesejadas são especificamente marcadas com partículas superparamagnéticas e separadas das células-alvo ao atravessarem a coluna magnética de gradiente elevado. Ao contrário da estratégia de enriquecimento, as células não marcadas (células-alvo) são reunidas na Cell Collection Bag, e as marcadas (células não-alvo) na Negative Fraction Bag (ver Figura 1.5) ou na Non-Target Cell Bag (ver Figura 1.6 e Figura 1.7), respetivamente.

1.4.1 Estratégia de enriquecimento

Enriquecimento de células com o CliniMACS Tubing Set ou o CliniMACS Tubing Set LS

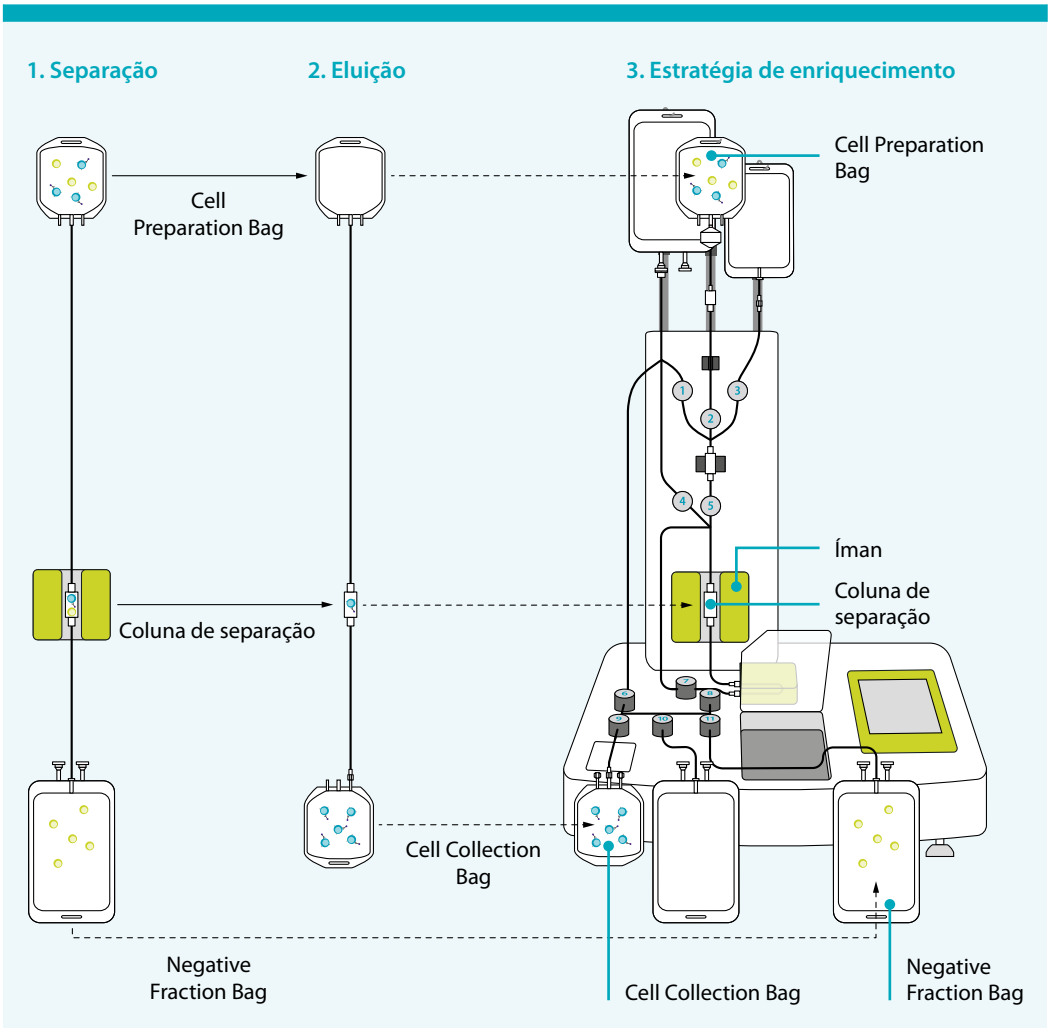


Figura 1.4: Estratégia dos programas de enriquecimento com o CliniMACS Tubing Set ou o CliniMACS Tubing Set LS

1. O íman está na posição "ON". As células marcadas magneticamente são mantidas na coluna de separação, ao passo que outras células não marcadas (células não-alvo) atravessam a coluna e são reunidas na Negative Fraction Bag.
2. O íman está na posição "OFF". As células marcadas magneticamente (células-alvo) são libertadas da coluna de separação e reunidas na Cell Collection Bag.
3. O programa de enriquecimento mantém as células marcadas magneticamente na coluna de separação, as células não marcadas (células não-alvo) atravessam a coluna e são reunidas na Negative Fraction Bag. Quando o íman é deslocado para a posição "OFF", as células marcadas magneticamente (células-alvo) são libertadas da coluna e reunidas na Cell Collection Bag. **Nota:** a fração de células-alvo é sempre reunida na Cell Collection Bag.

1.4.2 Estratégia de empobrecimento

Empobrecimento de células com o CliniMACS Tubing Set LS: DEPLETION 2.1

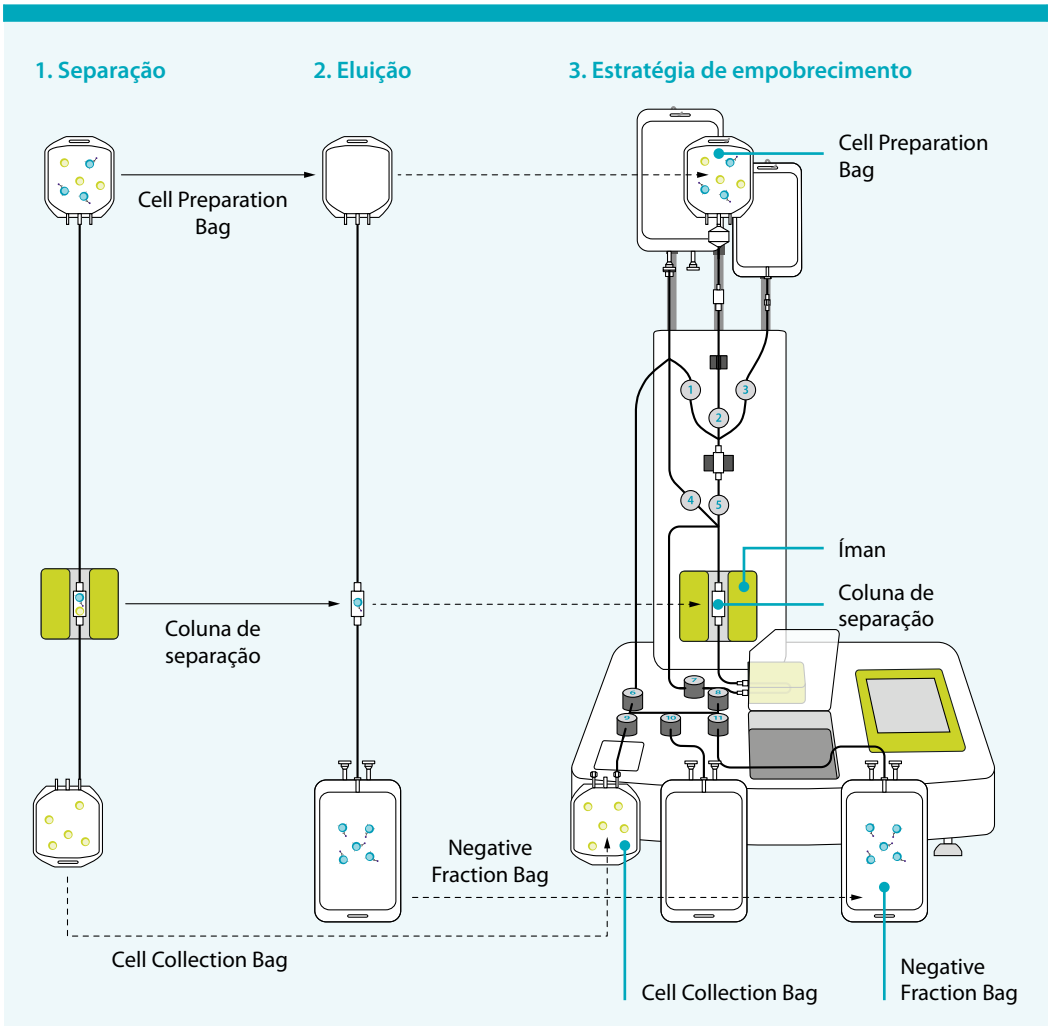


Figura 1.5: Estratégia do programa de empobrecimento DEPLETION 2.1 com o CliniMACS Tubing Set LS

1. O íman está na posição "ON". As células marcadas magneticamente são mantidas na coluna de separação, ao passo que outras células não marcadas (células-alvo) atravessam a coluna e são reunidas na Cell Collection Bag.
2. O íman está na posição "OFF". As células marcadas magneticamente (células não-alvo) são libertadas da coluna de separação e reunidas na Negative Fraction Bag.
3. O programa de empobrecimento (DEPLETION 2.1) mantém as células marcadas magneticamente na coluna de separação, as células não marcadas (células-alvo) atravessam a coluna e são reunidas na Cell Collection Bag. Quando o íman é deslocado para a posição "OFF", as células marcadas magneticamente (células não-alvo) são libertadas da coluna e reunidas na Negative Fraction Bag. **Nota:** A fração de células-alvo é sempre reunida na Cell Collection Bag.

Empobrecimento de células com o CliniMACS Depletion Tubing Set: DEPLETION 3.1 (Parte 1: Staged Cell Loading [Bulk Loading Stage])

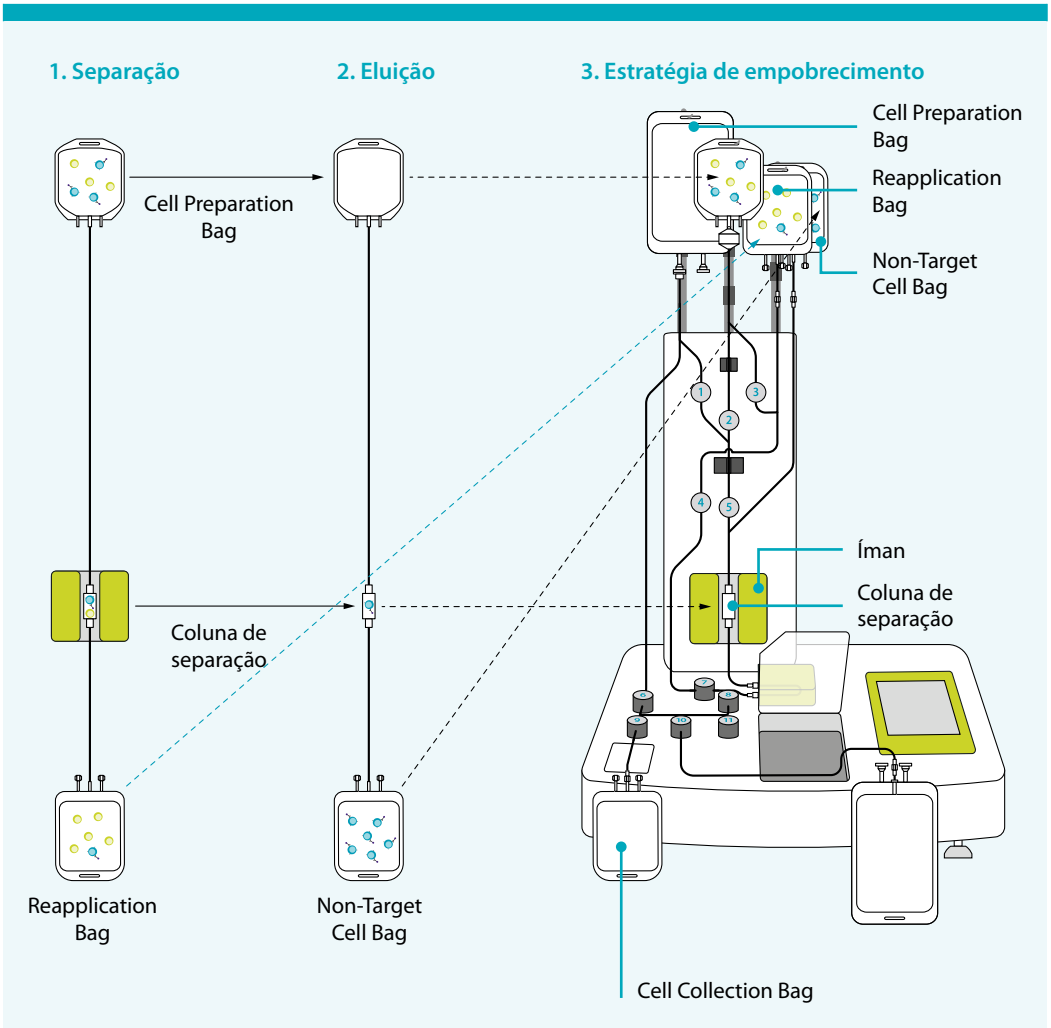


Figura 1.6: Estratégia do programa de empobrecimento DEPLETION 3.1 com o CliniMACS Depletion Tubing Set (Parte 1)

1. Staged Cell Loading (Bulk Loading Stage): O íman está na posição "ON". As células marcadas magneticamente são mantidas na coluna de separação, ao passo que outras células não marcadas (células-alvo) a atravessam e são reunidas na Reapplication Bag.
2. O íman está na posição "OFF". As células marcadas magneticamente (células não-alvo) são libertadas da coluna de separação e reunidas na Non-Target Cell Bag.
3. O programa de empobrecimento (DEPLETION 3.1) mantém as células marcadas magneticamente na coluna de separação, as células não marcadas (células-alvo) atravessam a coluna e são reunidas na Reapplication Bag para serem recarregadas na coluna de separação num segundo empobrecimento sensível (ver Figura 1.7). Quando o íman é deslocado para a posição "OFF", as células marcadas magneticamente (células não-alvo) são libertadas da coluna e reunidas na Non-Target Cell Bag.

Empobrecimento de células com o CliniMACS Depletion Tubing Set: DEPLETION 3.1 (Parte 2: Sensitive Sample Loading [Sensitive Loading Stage])

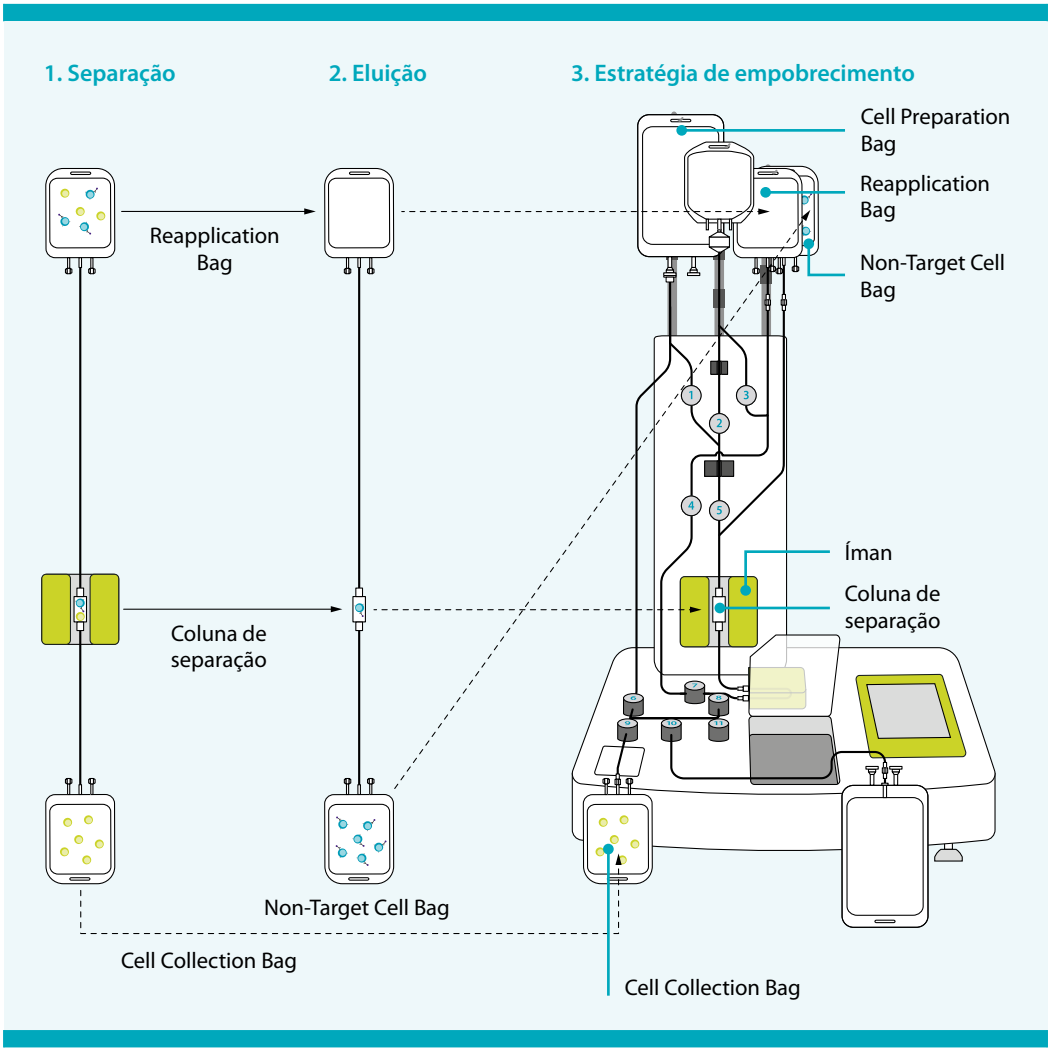


Figura 1.7: Estratégia do programa de empobrecimento DEPLETION 3.1 com o CliniMACS Depletion Tubing Set (Parte 2)

4. Sensitive Sample Loading (Sensitive Loading Stage): O íman está na posição "ON". As células da Reapplication Bag são recarregadas na coluna de separação. As poucas células marcadas magneticamente que ainda restam são mantidas na coluna de separação, ao passo que as células não marcadas (células-alvo) atravessam a coluna e são reunidas na Cell Collection Bag.
5. O íman está na posição "OFF". As células marcadas magneticamente (células não-alvo) são libertadas da coluna de separação e reunidas na Non-Target Cell Bag.
6. No final da separação, as células marcadas (células não-alvo) estão na Non-Target Cell Bag e as células não marcadas (células-alvo) na Cell Collection Bag. **Nota:** a fração de células-alvo é sempre reunida na Cell Collection Bag.

2 Glossário

2.1 Representação gráfica

A tabela seguinte descreve os painéis utilizados neste manual do utilizador para informar o utilizador sobre os possíveis riscos se as advertências e as precauções indicadas não forem observadas. O nível de perigo classifica o perigo, tal como descrito abaixo. O nível, o tipo e a fonte do perigo, assim como as possíveis consequências, proibições e medidas são indicados como se segue. Os ícones à esquerda especificam o risco.

⚠ ADVERTÊNCIA

Indica uma situação perigosa que, se não for evitada, pode resultar em morte ou em lesões graves

⚠ CUIDADO

Indica uma situação perigosa que, se não for evitada, pode resultar em lesões ligeiras ou moderadas

ATENÇÃO

Indica informações consideradas importantes, mas não relacionadas com perigos (p. ex., mensagens relacionadas com danos materiais)

IMPORTANTE

Adverte o utilizador para práticas ou informações importantes não relacionadas com lesões pessoais ou danos materiais

2.2 Glossário de símbolos

É apresentada uma visão geral dos símbolos utilizados para o sistema CliniMACS Plus no manual do utilizador CliniMACS Plus Instrument. O glossário de símbolos apresenta os símbolos utilizados nos manuais do utilizador e na rotulagem dos produtos CliniMACS.

2.3 Glossário de termos

Acoplador do local de amostragem	Orifício de injeção, p. ex., para remover amostras ou adicionar reagentes CliniMACS à Cell Preparation Bag
Aférese	O método de colheita de sangue em que o sangue total é retirado, um componente desejado é selecionado e retido, e o resto do sangue é devolvido ao dador
Albumina do soro humano	A HSA de grau farmacêutico aprovada no país do utilizador é necessária como suplemento da solução tampão quando utilizada com o sistema CliniMACS Plus.
Anel de retenção	Parte de um conjunto de tubos que permite que o tubo da bomba permaneça no devido lugar
Anticorpo anti-biotina	Este anticorpo reconhece células previamente marcadas com um anticorpo biotinilado ou ligando adequado.
Anticorpo magnético	Um anticorpo marcado superparamagneticamente
Anticorpos monoclonais	Um único tipo de anticorpo que é dirigido contra um epítopo específico (antigénio, determinante antigénico) e é produzido por um único clone de células B ou por uma única linha celular de hibridoma, que é formada pela fusão de uma célula linfocitária com uma célula do mieloma. Algumas células de mieloma sintetizam anticorpos individuais naturalmente.
Antigénio CD14	O antigénio CD14 é uma glicoproteína da membrana celular de 53-55 kD expressa em monócitos. O antigénio CD14 é conhecido como recetor do complexo do LPS e da proteína de ligação ao LPS (LBP).
Antigénio CD19	O antigénio CD19 é uma molécula transdutora de sinais crítica que regula o desenvolvimento, a ativação e a diferenciação dos linfócitos B. Enquanto marcador de linhagem de células B, o CD19 é expresso a partir da fase inicial das células pró-B até à fase de linfoblasto das células B, mas a expressão é infrarregulada quando as células B amadurecem para células plasmáticas. O antigénio CD19 é ainda expresso na maioria das células B malignas e num subconjunto de células dendríticas foliculares.

Antigénio CD1c (BDCA-1)	CD1c é parte de um grupo de genes CD1, que se crê estar relacionado com o MHC. Os genes CD1 estão agrupados numa região de 170 000 bp do cromossoma humano 1q23.1. As proteínas aí codificadas (CD1a-e) são expressas como heterodímeros compostos pela cadeia pesada dos CD1 não-covalentemente emparelhada com ß2-microglobulina. O CD1c está envolvido na apresentação do antigénio de glicolípidos microbianos ou antigénios lipopeptídeos aos linfócitos T. No sangue periférico humano, o CD1c (BDCA-1) é expresso em células dendríticas mieloides do tipo 1 (MDC1) e num subconjunto de linfócitos B. Estes podem ser encontrados no gânglio linfático, nas zonas do manto e centros germinais, na zona marginal do baço e no sangue periférico em fetos e adultos humanos.
Antigénio CD25	O antigénio CD25, a cadeia alfa do recetor de interleucina-2 de baixa afinidade (IL-2Rα), é expresso em células T e B ativadas, células NK e monócitos, bem como em células T reguladoras CD4 positivas. O antigénio CD25 mostra três regiões de epítopos A, B e C. O anticorpo do CliniMACS CD25 Reagent reconhece o epítopo A da molécula CD25.
Antigénio CD3	O antigénio CD3 está presente em células T humanas maduras, timócitos e num subconjunto de células NK. Está associado ao recetor da célula T (TCR) e é responsável pela transdução do sinal do TCR. O antigénio CD3 é um complexo de cinco cadeias invariáveis: γ, δ, ε, ζ e η. O anticorpo CD3 reconhece todas as células T, ou seja, reage com 70-80% dos linfócitos do sangue periférico humano e com 65-85% dos timócitos. O epítopo reconhecido pelo anticorpo está localizado na cadeia ε do complexo CD3.
Antigénio CD304 (BDCA-4)	O antigénio CD304 (BDCA-4) é uma glicoproteína da superfície celular de 130-140 kDa expressa em sangue fresco e medula óssea exclusivamente em células dendríticas plasmacitoides.
Antigénio CD34	O antigénio CD34 é uma proteína integral de membrana altamente glicosilada do tipo 1 de 115 kDa de função desconhecida, expressa em 1% a 4% das células normais da medula óssea e em menos de 0,2% dos leucócitos normais do sangue periférico, em subconjuntos de células estromais da medula óssea e no endotélio de vasos pequenos de diversos tecidos.

Antigénio CD4	O antigénio CD4 é expresso na maioria dos timócitos e em cerca de dois terços das células T do sangue periférico; também é expresso em monócitos e macrófagos. CD4 é uma molécula acessória no reconhecimento de antigénios estranhos em associação com MHC de classe II. Além disso, o CD4 é um recetor do VIH-1.
Antigénio CD45RA	O antigénio CD45RA é expresso em células T virgens CD4 e CD8 positivas, bem como em subconjuntos de células B, NK e monócitos. É uma isoforma do antigénio CD45 comum dos leucócitos, uma proteína tirosina fosfatase transmembranar.
Antigénio CD56	O antigénio CD56 é um membro da família NCAM (molécula de adesão celular neuronal), expresso no sistema hematopoiético em células NK, NKT.
Antigénio CD8	O antigénio CD8 é um dímero ligado por dissulfeto, que existe tanto como um homodímero CD8 α ou um heterodímero CD8 α/β. O CD8 é fortemente expresso em células T CD8 positivas e em timócitos e num subconjunto de células NK e células T γ/δ CD8 positivas. O CD8 atua como um correcetor com recetores de células T MHC restritas à classe I no reconhecimento do antigénio.
Antigénio TCRα/β	O TCRα/β é o heterodímero recetor de células T composto por duas cadeias de glicoproteína transmembranar, α e β. Ambas as cadeias são membros da superfamília Ig e consistem numa região variável constante e polimórfica. A região variável do TCRα/β está envolvida no reconhecimento dos peptídeos antigénicos apresentados pelo complexo MHC das células de apresentação do antigénio. O antigénio TCRα/β é expresso na maioria das células T do sangue periférico.
BDCA	Antigénio de células dendríticas do sangue
Bolsa de transferência	Bolsa com um tubo e um espigão na extremidade.
Bomba peristáltica	Bomba de tubos utilizada no CliniMACS Plus Instrument para controlar o débito de fluido no conjunto de tubos
Buffer Waste Bag	Bolsa de lixo para recolher a solução tampão durante a separação de células com o CliniMACS Plus Instrument
Cell Collection Bag	Bolsa na qual as células-alvo purificadas são reunidas depois da separação
Cell Preparation Bag	Bolsa para a qual o produto celular é transferido e na qual se realizam a marcação magnética e a lavagem das células

CliniMACS Anti-Biotin Reagent	Reagente para a marcação magnética de células primariamente marcadas com anticorpos biotinilados ou ligandos
CliniMACS CD14 Reagent	Reagente para a marcação magnética de células que expressam o antigénio CD14
CliniMACS CD19 Reagent	Reagente para a marcação magnética de células que expressam o antigénio CD19
CliniMACS CD1c Biotin (BDCA-1)	Anticorpo biotinilado para a marcação de células humanas que expressam o antigénio CD1c (BDCA-1) antes da marcação magnética com o CliniMACS Anti-Biotin Reagent
CliniMACS CD25 Reagent	Reagente para a marcação magnética de células que expressam o antigénio CD25
CliniMACS CD3 Reagent	Reagente para a marcação magnética de células que expressam o antigénio CD3
CliniMACS CD304 (BDCA-4) Reagent	Reagente para a marcação magnética de células que expressam o antigénio CD304 (BDCA-4)
CliniMACS CD34 Reagent	Reagente para a marcação magnética de células que expressam o antigénio CD34
CliniMACS CD4 Reagent	Reagente para a marcação magnética de células que expressam o antigénio CD4
CliniMACS CD45RA Reagent	Reagente para a marcação magnética de células que expressam o antigénio CD45RA
CliniMACS CD56 Reagent	Reagente para a marcação magnética de células que expressam o antigénio CD56
CliniMACS CD8 Reagent	Reagente para a marcação magnética de células que expressam o antigénio CD8
CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma)	Combinação de reagentes consistindo no CliniMACS IFN-gamma Catchmatrix Reagent e no CliniMACS IFN-gamma Enrichment Reagent. Com o CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma), as células secretoras de IFN-gama podem ser enriquecidas depois da reestimulação *in vitro*.
CliniMACS Depletion Tubing Set	Conjunto de tubos, conectores, colunas e bolsas através dos quais é processada a suspensão de células marcadas magneticamente e onde é realizada a separação magnética de células, especialmente concebida para as necessidades específicas de empobrecimento

CliniMACS IFN-gamma Enrichment Reagent	Componente do CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma) para a marcação magnética do IFN-gama ligado ao CliniMACS IFN-gamma Catchmatrix Reagent nas células secretoras do IFN-gama
CliniMACS IFN-gamma do Catchmatrix Reagent	Componente do CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma) para a marcação da superfície de leucócitos com anticorpos específicos para IFN-gama
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	Solução tampão utilizada na preparação e separação de células com o Sistema CliniMACS Plus: PBS (tampão fosfato-salino), suplementado com 1 mM EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), pH 7,2. Antes da utilização, o CliniMACS PBS/EDTA Buffer tem de ser suplementado com HSA de grau farmacêutico até uma concentração final de 0,5% (peso/volume, ou seja, 5 g de HSA por litro de solução tampão).
CliniMACS Plus Instrument	Aparelho de separação magnética de células com base na Tecnologia MACS
CliniMACS TCRα/β-Biotin	Anticorpo biotinilado para a marcação de células humanas expressando o antigénio TCRα/β antes da marcação magnética com o CliniMACS Anti-Biotin Reagent
CliniMACS Tubing Set, CliniMACS Tubing Set LS	Conjunto de tubos, conectores, colunas e bolsas através dos quais é processada a suspensão de células marcadas magneticamente e onde é realizada a separação magnética de células
Coluna de seleção	Ver coluna de separação.
Coluna de separação	Coluna na qual as células marcadas magneticamente são separadas quando expostas ao campo magnético
Compartimento da bolsa	Compartimento do CliniMACS Plus Instrument onde são colocadas a Negative Fraction Bag e a Buffer Waste Bag
Conector Luer	Acoplamento roscado, parte do conjunto de tubos
Conexão T (conector)	Conexão em forma de T (conector) num conjunto de tubos onde se juntam três tubos
Conjunto de transferência de plasma	Conjunto de transferência com dois pinos de perfuração (espigões) para plasma ou fluidos
Células progenitoras hematopoiéticas	Células progenitoras de linhagens linfoide, mieloide e eritroide
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético

Escorva	Fase anterior à separação de células em que a solução tampão é introduzida no conjunto de tubos
Extrator de plasma	Dispositivo utilizado para extrair líquido da Cell Preparation Bag depois da lavagem de células
Filtro pré-sistema	Dispositivo de filtragem de 40 µm entre a Cell Preparation Bag e a pré-coluna utilizado para capturar grumos e resíduos celulares
HSA	Albumina do soro humano
IgG	Imunoglobulina G
Interruptor de segurança da bomba	Sensor que impede que a bomba funcione se tiver a porta aberta
Leucaférese	Aférese que extrai leucócitos
Luer/Spike Interconnector	Conjunto de transferência com pino de perfuração (espigão) e adaptador de seringa (Luer fêmea) para plasma ou fluidos
Marcação	Reação de células com reagente de marcação magnética, p. ex., CliniMACS CD34 Reagent para células CD34 positivas
MDC	Células dendríticas mieloides
Negative Fraction Bag	Bolsa do CliniMACS Tubing Set e do CliniMACS Tubing Set LS contendo a fração celular não-alvo
Non-Target Cell Bag	Bolsa do CliniMACS Depletion Tubing Set contendo a fração celular não-alvo
PBMC	Célula mononuclear do sangue periférico
Plasma Waste Bag	Bolsa de lixo para reunir o excesso de plasma antes da marcação
Priming Waste Bag	Bolsa onde é reunida a solução tampão da fase de escorva
Procedimento dentro da bolsa	Processamento estéril e transferência de células para o ambiente fechado das bolsas de transferência
Produto celular inicial	Produto contendo células utilizado como material inicial para o processo de separação CliniMACS Plus, p. ex., colheita de leucaférese, PBMCs ou medula óssea

Programa de separação	Programa de software concebido para o enriquecimento ou o empobrecimento de subconjuntos de células marcadas magneticamente a partir de uma população mista de células. Escolher a partir de um menu de programas de separação em função da separação pretendida.
Pré-coluna	Primeira coluna no CliniMACS Tubing Set e no CliniMACS Tubing Set LS, serve de filtro para capturar células com interações não-específicas com a matriz da coluna
Reagente de separação	Reagente para a marcação magnética de células, p. ex., CliniMACS CD34 Reagent
Reapplication Bag	Bolsa do CliniMACS Depletion Tubing Set na qual células não marcadas são reunidas temporariamente durante a separação. As células não marcadas da Reapplication Bag são aplicadas duas vezes na coluna de separação para garantir a elevada pureza das células-alvo.
Rotador orbital	Dispositivo utilizado para misturar o produto celular durante a reação com reagentes CliniMACS
Selador térmico	Dispositivo de aquecimento utilizado para selar os tubos PVC de forma estéril
Sensor de líquido	Componente do CliniMACS Plus Instrument que deteta líquido nos tubos
Solução tampão de seleção	Ver CliniMACS PBS/EDTA Buffer.
Suporte da bolsa	Suporte no CliniMACS Plus Instrument para montar a Cell Preparation Bag, a Non-Target Cell Bag, a Priming Waste Bag, a Reapplication Bag e a bolsa de solução tampão
Suporte da coluna de seleção	Ver suporte da coluna de separação.
Suporte da coluna de separação	Guias moldadas no invólucro do íman que mantém a coluna de separação no lugar
Suporte da pré-coluna	Suporte montado no CliniMACS Plus Instrument que mantém a pré-coluna no devido lugar
WBC	Leucócitos
Wash Waste Bag	Bolsa de recolha onde é reunido o sobrenadante da lavagem por separação da suspensão de células sedimentadas depois dos passos de centrifugação durante a preparação da amostra

rpm	Rotações por minuto
×g	Múltiplos da aceleração gravitacional da Terra

3 Advertências e precauções

Este capítulo explica os possíveis riscos associados à operação do sistema CliniMACS Plus. Observar sempre as instruções de segurança, a políticas, as normas relativas às boas práticas de fabrico, a saúde, a segurança e a prevenção de acidentes do local de trabalho. Para instruções de utilização, p. ex., advertências e precauções, relativas ao manuseamento de materiais com risco biológico e produto celular inicial, bem como aos componentes do sistema CliniMACS Plus, consultar as secções relevantes nas instruções de utilização do respetivo componente. As instruções de utilização detalhadas do CliniMACS Plus Instrument são descritas no manual do utilizador CliniMACS Plus Instrument.

Qualquer incidente grave ocorrido relativamente a este produto deve ser comunicado à Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG – utilizando as informações de contacto fornecidas – e à autoridade competente do Estado-Membro no qual o utilizador deste produto se encontra estabelecido.

3.1 Relacionados com o processo

⚠ ADVERTÊNCIA

Risco de falha do processo ou danos no aparelho. Risco de falha do processo ou danos no aparelho se os procedimentos forem executados por operadores sem a devida formação. Todos os procedimentos de processamento só podem ser realizados por operadores formados. A formação dos operadores será dada por um representante qualificado da Miltenyi Biotec.

⚠ CUIDADO

Risco de desempenho reduzido do processo. Temperaturas inferiores ou superiores à temperatura ambiente podem resultar em menor viabilidade, pureza e rendimento das células-alvo. A preparação da amostra e a separação de células devem fazer-se à temperatura ambiente (+19 a +25 °C [+66 a +77 °F]).

⚠ CUIDADO

A segurança do equipamento pode ficar comprometida. A segurança do equipamento pode ficar comprometida se o aparelho não for utilizado de acordo com as instruções do fabricante. Ler atentamente e compreender as informações de segurança, as advertências, as precauções e as instruções para o correto funcionamento do sistema CliniMACS Plus fornecidas nas instruções de utilização CliniMACS Plus, bem como em todas as recomendações relacionadas com a segurança emitidas pela Miltenyi Biotec.

- Para a fabricação e a utilização de células-alvo em seres humanos têm de ser observados a legislação e os regulamentos nacionais – p. ex., para a UE, a diretiva 2004/23/CE (tecidos e células de origem humana) ou a diretiva 2002/98/CE (sangue humano e componentes sanguíneos). Assim, qualquer aplicação clínica das células-alvo é da exclusiva responsabilidade do utilizador de um sistema CliniMACS Plus.

- Todos os materiais que tenham entrado em contacto com sangue e produtos sanguíneos têm de ser tratados como material infecioso. Os regulamentos para o manuseamento de material infecioso têm de ser observados.
- Todos os tubos, acessórios, válvulas, a pré-coluna e a coluna de separação devem ser atentamente verificados quanto a fugas durante a fase de escorva.
- Todas as bolsas, incluindo as utilizadas na preparação da amostra, devem ser conservadas até a análise final das células reunidas ter sido concluída e a separação bem-sucedida das células-alvo ter sido confirmada.

3.2 Reagentes e conjugados de biotina CliniMACS

- Quando a fração de células-alvo é perfundida ou injetada em pacientes, estes poderão receber vestígios de anticorpos de murino e ferro-dextrano.
- As esferas de ferro-dextrano e/ou anticorpos de murino poderão provocar reações alérgicas ou anafiláticas nos pacientes. Devem estar disponíveis equipamentos de cuidados intensivos e medicamentos.
- A separação de células utilizando reagentes e conjugados de biotina CliniMACS só pode ser realizada por operadores formados.
- Os operadores que utilizem reagentes e conjugados de biotina CliniMACS devem ter experiência na separação das células da medula óssea ou de sangue periférico.
- As células não-alvo não se destinam a utilização terapêutica e não podem ser reperfundidas nos pacientes.
- Os reagentes e os conjugados de biotina CliniMACS são indicados apenas para utilização *in vitro*, e não para utilização terapêutica nem para perfusão direta nos pacientes.
- A utilização dos reagentes e conjugados de biotina CliniMACS não é recomendada em pacientes com sensibilidade conhecida ou suspeita a imunoglobulinas de murino ou ferro-dextrano.
- Os pacientes poderão desenvolver anticorpos humanos anti-murino (HAMA).
- Não utilizar após a data de validade impressa no rótulo do produto.
- Não utilizar se a embalagem estiver danificada. Utilizar o reagente somente se o frasco estiver intacto e selado.

3.3 Manuseamento de materiais com risco biológico

⚠ ADVERTÊNCIA

Risco de lesões graves ou morte. Dependendo do material biológico utilizado, o contacto poderá resultar em lesões pessoais graves ou morte. Usar sempre equipamento de segurança individual de acordo com as advertências e precauções, em particular se for ou tiver sido utilizado material de risco biológico.

- Para evitar a contaminação do produto celular inicial, todas as fases de preparação devem ser executadas em condições estéreis mediante técnicas asséticas (p. ex., na campânula de fluxo laminar).
- O operador que efetua a separação de células tem de ter recebido formação relativa à utilização adequada do equipamento e ao manuseamento de produtos sanguíneos e aspirado de medula óssea.
- O operador que realiza a separação de células deve usar vestuário apropriado (p. ex., bata de laboratório, luvas e óculos ou óculos protetores) ao trabalhar com amostras de paciente e ao manusear material com possível risco.
- Todos os produtos sanguíneos têm de ser tratados como material com possível risco biológico. O produto de leucaférese, o produto sanguíneo, o aspirado de medula óssea, as células colhidas, a solução tampão utilizada, o conjunto de tubos utilizado e outros materiais que tenham estado em contacto com estes fluidos têm de ser tratados como materiais com risco biológico de acordo com os requisitos hospitalares ou institucionais padrão.
- O CliniMACS Plus Instrument deve ser considerado um possível risco biológico depois de cada corrida de separação e limpo com um detergente biocida aquoso (p. ex., Bacillol® plus ou Meliseptol®, ver também a secção "Limpeza e manutenção" no manual do utilizador CliniMACS Plus Instrument) de acordo com os requisitos hospitalares ou institucionais padrão.
- Os materiais descartáveis têm de ser tratados como materiais com risco biológico de acordo com os requisitos hospitalares ou institucionais padrão.

3.4 Produto celular inicial

IMPORTANTE

A marcação e a separação de células devem começar quanto antes depois da colheita do produto celular inicial. O produto não deve ter mais de 24 horas ao iniciar o processo de marcação e separação.

- O produto celular inicial (p. ex., produto de leucaférese) deve ser colhido de acordo com procedimentos hospitalares ou institucionais padrão em bolsas de colheita padrão.
- O recipiente com o produto celular inicial deve ser rotulado com a identificação do paciente, a hora, a data e o local da colheita, de acordo com os procedimentos especificados para utilização com o protocolo clínico.
- Para o transporte, o produto celular inicial deve ser embalado em recipientes isolados e mantido a uma temperatura ambiente controlada (+19 a +25 °C [+66 a +77 °F]). de acordo com os procedimentos hospitalares ou institucionais padrão para a colheita de sangue aprovados para utilização com o protocolo clínico. Não refrigerar. A concentração de células não deve exceder $0{,}2\times10^9$ células por mL durante o transporte.
- Evitar a mistura intensiva do material celular inicial.
- Se o produto celular inicial tiver de ser armazenado, p. ex., durante a noite, deve ser mantido a uma temperatura ambiente controlada (+19 a +25 °C [+66 a +77 °F]). Durante o armazenamento, a concentração de leucócitos nunca deve exceder $0{,}2\times10^9$ células por mL.
- As células devem ser armazenadas em plasma autólogo. Se a concentração de células for superior a $0{,}2\times10^9$ células por mL, diluir o produto celular inicial com plasma autólogo.

4 O sistema CliniMACS Plus

O sistema CliniMACS Plus, consistindo nos componentes CliniMACS Plus Instrument, reagente(s) CliniMACS, CliniMACS Tubing Set, CliniMACS PBS/EDTA Buffer, e noutros acessórios, que têm de ser utilizados em combinação, destina-se à separação *in vitro* de células humanas específicas para aplicações clínicas.

IMPORTANTE
Para instruções de utilização, p. ex., advertências e precauções relativas aos componentes do sistema CliniMACS Plus, consultar as instruções de utilização fornecidas com o respetivo componente.

4.1 CliniMACS Plus Instrument

O CliniMACS Plus Instrument é um dispositivo eletromecânico que incorpora um íman permanente, uma bomba peristáltica, válvulas de aperto, sistema eletrónico e software.

4.2 Reagentes e conjugados de biotina CliniMACS

Os reagentes CliniMACS são soluções coloidais de cor escura, não viscosas, contendo os conjugados de anticorpos específicos para células em solução tampão. Os reagentes consistem no anticorpo quimicamente ligado a partículas superparamagnéticas.

Os conjugados de biotina CliniMACS são soluções claras e incolores contendo anticorpos covalentemente ligados à biotina em solução tampão. Os anticorpos são altamente específicos, tornando possível a marcação *in vivo* de células-alvo raras.

4.3 Conjuntos de tubos CliniMACS

Os conjuntos de tubos CliniMACS são descartáveis, estéreis, de utilização única, concebidos para serem utilizados em combinação com o CliniMACS Plus Instrument para o enriquecimento ou o empobrecimento *in vitro* de células humanas de populações heterogéneas de células hematológicas.

4.4 CliniMACS PBS/EDTA Buffer

O CliniMACS PBS/EDTA Buffer é um fluido de lavagem e transporte para permitir a separação de células humanas *in vitro*.

4.5 Acessórios CliniMACS

- **Conjunto de transferência de plasma:**
  Conjunto de transferência com dois espigões para plasma ou fluidos, Transfer Set Coupler/Coupler (REF 200-073-902 ou equivalente
- **Luer/Spike Interconnector:**
  Conjunto de transferência com espigão e adaptador de seringa (Luer fêmea) para plasma ou fluidos, Luer/Spike Interconnector (REF 200-073-903) ou equivalente

4.6 Outros materiais necessários

Além dos produtos CliniMACS, podem ser necessários outros materiais para uma separação CliniMACS Plus:

- **Bolsas de cultura de células, permeáveis ao gás:**
  MACS GMP Cell Differentiation Bag – 100 mL ou equivalente
- **Bolsa de transferência, indicada para centrifugação:**
  Bolsa de transferência 150 mL, Terumo ou equivalente
  Bolsa de transferência 600 mL, Terumo ou equivalente
  Bolsa de transferência 1 000 mL, Terumo ou equivalente
- **Acoplador do local de amostragem:**
  Acoplador do local de amostragem, Terumo ou equivalente
- **Filtro pré-sistema:**
  Filtro para transfusão sanguínea, Haemonetics® ou equivalente
- **Seringas e agulhas:**
  Seringas apropriadas (5 mL, 10 mL, 20 mL, 50 mL) e seringas hipodérmicas de calibre 20
- **Pinça de bloqueio**
- **Tubos de amostra**
- **Albumina do soro humano (HSA):**
  Utilizar apenas HSA de grau farmacêutico, disponível enquanto produto aprovado no país do utilizador.
- **Imunoglobulina G de grau médico:**
  Utilizar apenas IgG de grau farmacêutico, disponível enquanto fármaco aprovado no país do utilizador, p. ex., para a Alemanha: Gamunex® 10% ou equivalente.
- **Meio de cultura de células:**
  p. ex., RPMI 1640 ou equivalente
- **Materiais específicos para a aplicação:**
  Anticorpo biotinilado específico para células ou ligando individual; soro AB ou, em alternativa, soro autólogo

4.7 Equipamento necessário

- **Fonte de alimentação ininterrupta:**
  UPS recomendada: APC Smart-UPS 1500 VA USB & Serial 230 V, fabricada pela APC (American Power Conversion) ou equivalente.
- **Campânula de fluxo laminar**
- **Conector de tubos estéril:**
  Dispositivo de conexão estéril Terumo (TSCD®) ou equivalente
- **Rotador orbital:**
  Agitadores de plataforma, Heidolph Instruments ou equivalente
- **Centrífuga:**
  Centrífuga, Sorvall ou equivalente e copos para centrifugação com tampas de contenção de aerossol
- **Extrator de plasma:**
  Bancada de separação de plasma, Terumo Equipment ou equivalente
- **Balança de mesa:**
  Balança de laboratório, Mettler Toledo ou equivalente, com 1 kg de capacidade; resolução até 0,1 g
- **Selador térmico de tubos:**
  Selador térmico manual Hematron III, Baxter ou equivalente
- **Abre-tubos:**
  Abre-tubos, Baxter ou equivalente
- **Recipientes para resíduos de risco biológico**

Equipamento adicional necessário para o CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma):

- Placa de cultura de 24 poços Corning™ Costar™, placa de cultura de 24 poços, Sigma Aldrich ou 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 Visão geral das aplicações

5.1 Quatro PASSOS para as suas células-alvo

No capítulo seguinte é apresentada uma visão geral da separação CliniMACS Plus. A separação CliniMACS Plus é feita em quatro PASSOS. No primeiro passo, as células são preparadas e marcadas magneticamente. No segundo passo, é escolhido um programa de separação adequado. Num terceiro passo, é instalado o conjunto de tubos no CliniMACS Plus Instrument e, no quarto passo, as células são separadas automaticamente.

Poderá ser necessário registar os dados do processo relacionados com a aplicação. Para fichas de trabalho de apoio, contactar o Miltenyi Biotec Technical Support.

O manual do utilizador das aplicações do CliniMACS Plus compreende opções diferentes para cada passo (diversos reagentes, conjunto de tubos e programas). Antes do início de uma aplicação, é necessário escolher os respetivos capítulos específicos da aplicação (capítulo 6) e uma explicação detalhada dos PASSOS 1–4 (capítulo 7) através da tabela de visão geral com início na página seguinte. A tabela de visão geral contém informações sobre as secções aplicáveis do manual do utilizador. A tabela de visão geral baseia-se no tipo e no número de reagentes, no número de células, no tipo de conjunto de tubos e no programa de separação pertinente necessário para a separação.

PASSO 1: Preparação das células e marcação magnética

O PASSO 1 descreve a preparação do produto celular e a marcação magnética das células específicas, expressando o respetivo antigénio. Seguir as instruções da secção aplicável. Continuar com o PASSO 2.

PASSO 2: Escolha do programa de separação

O PASSO 2 descreve a seleção de um programa de separação do CliniMACS Plus Instrument. Dependendo do tipo e do número de células a separar, têm de ser selecionados diferentes programas. Para determinar qual o programa aplicável, ver a tabela de visão geral na página seguinte. Ler a respetiva secção do programa de separação selecionado. Observar as instruções indicadas na secção aplicável. Continuar com o PASSO 3.

PASSO 3: Instalação dos conjuntos de tubos CliniMACS

O PASSO 3 descreve a instalação do conjunto de tubos no CliniMACS Plus Instrument. Observar as instruções na secção aplicável. Continuar com o PASSO 4.

PASSO 4: Separação CliniMACS Plus

O PASSO 4 descreve a separação CliniMACS Plus automatizada. O CliniMACS Plus Instrument executa o procedimento automatizado de separação de células (escolhido no PASSO 2). Observar as instruções da secção aplicável.

IMPORTANTE

A tabela de visão geral nas páginas seguintes resume informações sobre as aplicações típicas dos reagentes CliniMACS. Para a execução de uma separação de um número diferente de células-alvo, consultar as instruções na visão geral específica da aplicação para encontrar informações sobre a capacidade máxima da respetiva aplicação. Observar as instruções das secções específicas da aplicação e as explicações detalhadas dos PASSO 1–4. Ver Tabela de visão geral.

5.2 Tabela de visão geral

Capacidade da aplicação	Frasco(s) de reagente	Conjunto de tubos	Programa de separação	Secção específica da aplicação	Explicação detalhada das secções PASSOS 1–4			
					PASSO 1	PASSO 2	PASSO 3	PASSO 4
Anti-Biotin (REF 173-01) – Enriquecimento								
≤40×10^9 células no total	1× Anti-Biotin Reagent	1× CliniMACS Tubing Set (REF 161-01)	ENRICHMENT 1.1	6.3	7.1	7.2.3	7.3.1	7.4.2
Anti-Biotin (REF 173-01) – Empobrecimento (aplicação em escala normal)								
≤40×10^9 células no total	1× Anti-Biotin Reagent	1× CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01)	DEPLETION 2.1	6.3	7.1	7.2.5	7.3.1	7.4.4
Anti-Biotin (REF 173-01) – Empobrecimento (aplicação em escala grande)								
>40–80×10^9 células no total	2× Anti-Biotin Reagent	1× CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01)	DEPLETION 2.1	6.3	7.1	7.2.5	7.3.1	7.4.4
CCS (REF 279-01) – Enriquecimento								
Células secretoras de IFN de ≤1×10^9 células no total	1 kit (2 frascos de reagente)	1× CliniMACS Tubing Set (REF 161-01)	ENRICHMENT 3.2	6.17	7.1	7.2.4	7.3.1	7.4.3
CD1c (BDCA-1)-Biotin (REF 277-01) – Empobrecimento - Parte 1 de 2								
≤5×10^9 células CD19 positivas de ≤40×10^9 células no total (WBC)	1× CD19 Reagent e 1× CD1c (BDCA-1)-Biotin.	1× CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01)	DEPLETION 2.1	6.12	7.1	7.2.5	7.3.1	7.4.4
CD1c (BDCA-1)-Biotin (REF 277-01) – Enriquecimento - Parte 2 de 2								
≤0,2×10^9 células CD1c (BDCA-1) positivas de ≤40×10^9 células no total (WBC)	1× Anti-Biotin Reagent	1× CliniMACS Tubing Set (REF 161-01)	ENRICHMENT 3.2	6.13	7.1	7.2.4	7.3.1	7.4.3
CD3 (REF 273-01) – Empobrecimento (aplicação em escala normal)								
≤15×10^9 células CD3 positivas de ≤40×10^9 células no total	1× CD3 Reagent	1× CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01)	DEPLETION 2.1	6.5	7.1	7.2.5	7.3.1	7.4.4
CD3 (REF 273-01) – Empobrecimento (aplicação em escala grande)								
>15–20×10^9 células CD3 positivas de >40–80×10^9 células no total	2× CD3 Reagent	1× CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01)	DEPLETION 2.1	6.5	7.1	7.2.5	7.3.1	7.4.4
CD3 (REF 273-01) – Empobrecimento (aplicação em escala normal)								
≤15×10^9 células CD3 positivas de ≤40×10^9 células no total	1× CD3 Reagent	1× CliniMACS Depletion Tubing Set (REF 261-01)	DEPLETION 3.1	6.5	7.1	7.2.6	7.3.3	7.4.5

Capacidade da aplicação	Frasco(s) de reagente	Conjunto de tubos	Programa de separação	Secção específica da aplicação	Explicação detalhada das secções PASSOS 1–4			
					PASSO 1	PASSO 2	PASSO 3	PASSO 4
CD3 (REF 273-01) – Empobrecimento (aplicação em escala grande)								
>15–30×10^9 células CD3 positivas de >40–80×10^9 células no total	2× CD3 Reagent	1× CliniMACS Depletion Tubing Set (REF 261-01)	DEPLETION 3.1	6.5	7.1	7.2.6	7.3.3	7.4.5
CD4 (REF 276-01) – Enriquecimento								
≤5×10^9 células CD4 positivas de ≤40×10^9 células no total	1× CD4 Reagent	1× CliniMACS Tubing Set (REF 161-01)	ENRICHMENT 1.1	6.10	7.1	7.2.3	7.3.1	7.4.2
CD4 (REF 276-01) – Empobrecimento								
≤12×10^9 células CD4 positivas de ≤40×10^9 células no total	1× CD4 Reagent	1× CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01)	DEPLETION 2.1	6.10	7.1	7.2.5	7.3.1	7.4.4
CD8 (REF 275-01) – Enriquecimento								
≤4×10^9 células CD8 positivas de ≤40×10^9 células no total	1× CD8 Reagent	1× CliniMACS Tubing Set (REF 161-01)	ENRICHMENT 1.1	6.8	7.1	7.2.3	7.3.1	7.4.2
CD8 (REF 275-01) – Empobrecimento								
≤4×10^9 células CD8 positivas de ≤40×10^9 células no total	1× CD8 Reagent	1× CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01)	DEPLETION 2.1	6.8	7.1	7.2.5	7.3.1	7.4.4
Combinação CD4/CD8 (REF 276-01/REF 275-01) – Empobrecimento								
≤12×10^9 células CD4 positivas e ≤4×10^9 células CD8 positivas de ≤40×10^9 células no total	1× CD4 Reagent e 1× CD8 Reagent	1× CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01)	DEPLETION 2.1	6.11	7.1	7.2.5	7.3.1	7.4.4
CD14 (REF 272-01) – Enriquecimento								
≤4×10^9 células CD14 positivas de ≤20×10^9 células no total	1× CD14 Reagent	1× CliniMACS Tubing Set (REF 161-01)	ENRICHMENT 1.1	6.2	7.1	7.2.3	7.3.1	7.4.2
CD19 (REF 179-01) – Empobrecimento								
≤5×10^9 células CD19 positivas de ≤40×10^9 células no total	1× CD19 Reagent	1× CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01)	DEPLETION 2.1	6.6	7.1	7.2.5	7.3.1	7.4.4

Capacidade da aplicação	Frasco(s) de reagente	Conjunto de tubos	Programa de separação	Secção específica da aplicação	Explicação detalhada das secções PASSOS 1–4			
					PASSO 1	PASSO 2	PASSO 3	PASSO 4
Combinação CD3/CD19 (REF 273-01/REF 179-01) – Empobrecimento								
≤15×10^9 células CD3 positivas e 5×10^9 células CD19 positivas de ≤40×10^9 células no total	1× CD3 Reagent e 1× CD19 Reagent	1× CliniMACS Depletion Tubing Set (REF 261-01)	DEPLETION 3.1	6.7	7.1	7.2.6	7.3.3	7.4.5
CD25 (REF 274-01) – Enriquecimento								
≤0,6×10^9 células CD25 positivas de ≤40×10^9 células no total (WBC)	1× CD25 Reagent	1× CliniMACS Tubing Set (REF 161-01)	ENRICHMENT 3.2	6.9	7.1	7.2.4	7.3.1	7.4.3
CD25 (REF 274-01) – Enriquecimento								
≤0,6×10^9 células CD25 positivas com alta expressão de CD25 de ≤40×10^9 células no total (WBC)	1× CD25 Reagent	1× CliniMACS Tubing Set (REF 161-01)	ENRICHMENT 3.2	6.9	7.1	7.2.4	7.3.1	7.4.3
CD25 (REF 274-01) – Empobrecimento (aplicação em escala normal)								
≤6×10^9 células CD25 positivas de ≤40×10^9 células no total (WBC)	1× CD25 Reagent	1× CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01)	DEPLETION 2.1	6.9	7.1	7.2.5	7.3.1	7.4.4
CD25 (REF 274-01) – Empobrecimento (aplicação em escala grande)								
>6–12×10^9 células CD25 positivas de >40–80×10^9 células no total (WBC)	2× CD25 Reagent	1× CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01)	DEPLETION 2.1	6,9	7.1	7.2.5	7.3.1	7.4.4
CD34 (REF 171-01) – Enriquecimento (aplicação em escala normal)								
≤0,6×10^9 células CD34 positivas de ≤60×10^9 células no total	1× CD34 Reagent	1× CliniMACS Tubing Set (REF 161-01)	CD34 SELECTION 1	6.1	7.1	7.2.2	7.3.1	7.4.1
CD34 (REF 171-01) – Enriquecimento (aplicação em escala grande)								
>0.6–1,2×10^9 células CD34 positivas de >60–120×10^9 células no total	2× CD34 Reagent	1× CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01)	CD34 SELECTION 2	6.1	7.1	7.2.2	7.3.1	7.4.1
CD45RA (REF 701-46) – Empobrecimento								
≤20×10^9 células CD45RA positivas de ≤50×10^9 células no total	1× CD45RA Reagent	1× CliniMACS Depletion Tubing Set (REF 261-01)	DEPLETION 3.1	6.16	7.1	7.2.6	7.3.3	7.4.5

Capacidade da aplicação	Frasco(s) de reagente	Conjunto de tubos	Programa de separação	Secção específica da aplicação	Explicação detalhada das secções PASSOS 1–4			
					PASSO 1	PASSO 2	PASSO 3	PASSO 4
CD56 (REF 271-01) – Enriquecimento								
≤5×10^9 células CD56 positivas de ≤40×10^9 células no total	1× CD25 Reagent	1× CliniMACS Tubing Set (REF 161-01)	ENRICHMENT 1.1	6.4	7.1	7.2.3	7.3.1	7.4.2
CD304 (BDCA-4) (REF 278-01) – Enriquecimento								
≤0,2×10^9 células CD304 (BDCA-4) positivas de ≤40×10^9 células no total	1× CD304 Reagent (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
TCRα/β-Biotin (REF 701-48/REF 173-01) – Empobrecimento								
≤24×10^9 células TCRα/β positivas de ≤60×10^9 células no total	1× TCRα/β-Biotin e 2× Anti-Biotin Reagent	1× CliniMACS Depletion Tubing Set (REF 261-01)	DEPLETION 3.1	6.15	7.1	7.2.6	7.3.3	7.4.5

Tabela 5.1: Visão geral das aplicações disponíveis com os conjuntos de tubos e os programas de separação correspondentes

6 Visão geral específica da aplicação dos PASSOS 1–4

6.1 Enriquecimento de células CD34 positivas

O sistema CliniMACS Plus CD34, incluindo o CliniMACS Plus Instrument, o CliniMACS CD34 Reagent, o CliniMACS Tubing Set ou o CliniMACS Tubing Set LS e o CliniMACS PBS/EDTA Buffer, destina-se ao enriquecimento *in vitro* de células progenitoras hematopoiéticas humanas CD34 positivas provenientes de populações de células hematológicas heterogéneas.

6.1.1 PASSO 1: Preparação das células e marcação magnética

Primeiras medidas necessárias

Capacidade da aplicação

- Aplicação em escala normal: até $0{,}6\times10^9$ células CD34 positivas de até 60×10^9 células no total (WBC)
- Aplicação em escala grande: mais de $0{,}6\times10^9$ e até $1{,}2\times10^9$ células CD34 positivas de até 120×10^9 células no total (WBC)

⚠ CUIDADO

Risco de desempenho de separação insuficiente das células marcadas. Se as especificações da aplicação forem excedidas, existe o risco de marcação específica insuficiente. Utilizar a quantidade necessária de células e reagente, tal como descrito na respetiva aplicação.

Materiais CliniMACS necessários

Material	Número de catálogo	Quantidade	Programa de separação
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1	–
CliniMACS CD34 Reagent	171-01	• 1 frasco (escala normal) • 2 frascos (escala grande)	–
CliniMACS Tubing Set	161-01	1 conjunto de tubos	CD34 SELECTION 1
CliniMACS Tubing Set LS	162-01	1 conjunto de tubos	CD34 SELECTION 2
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	3× bolsas de 1 000 mL[1]	–

1 Antes da utilização, suplementar o CliniMACS PBS/EDTA Buffer com HSA para uma concentração final de 0,5% (p/v).

Tabela 6.1: Materiais CliniMACS necessários para o enriquecimento de células CD34 positivas

Outros materiais necessários

- **Cell Preparation Bag:**
  Uma bolsa de transferência de 600 mL, indicada para centrifugação, bem como um acoplador do local de amostragem e dois conjuntos de transferência de plasma, para utilizar durante o procedimento de preparação das células
- **Plasma Waste Bag e Wash Waste Bags:**
  Três bolsas de transferência de 600 mL, indicadas para centrifugação
- **Cell Collection Bag:**
  Uma bolsa de transferência de 150 mL em combinação com um Luer/Spike Interconnector para ligar a Cell Collection Bag ao conjunto de tubos
- Um filtro pré-sistema
- Pinça de bloqueio
- Seringas apropriadas (vários tamanhos) e agulhas hipodérmicas de calibre 20
- Albumina do soro humano (HSA) a adicionar ao CliniMACS PBS/EDTA Buffer para uma concentração final de 0,5% (p/v)
- Tubos de amostra

▶ Preparação das bolsas

Determinar o peso da Cell Collection Bag e da Cell Preparation Bag vazias, tal como descrito na secção 7.1.1 na página 123.

Marcação magnética de células

Consultar a secção 7.1 "PASSO 1: Preparação das células e marcação magnética" na página 123 para uma descrição detalhada dos seguintes passos.

▶ Análise do produto celular inicial

▶ Transferência do produto celular inicial para a Cell Preparation Bag

Se o peso do produto celular inicial for superior a 200 g, mas o número de células for inferior a 120×10^9 células totais e $1{,}2 \times 10^9$ células CD34 positivas, centrifugar a amostra para reduzir o volume para 200 g, no máximo, e depois prosseguir com os seguintes passos

▶ Diluição do produto celular inicial

Adicionar solução tampão: Peso da solução tampão a adicionar = peso do produto celular inicial × 2

▶ Centrifugação

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

▶ Ajuste do volume: volume da marcação 95 g (±5 g) (aplicação em escala normal) ou 190 g (±5 g) (aplicação em escala grande)

1. Remover o sobrenadante para ajustar a amostra mediante a seguinte equação: Peso do sobrenadante a remover = peso do produto celular diluído – volume da marcação
2. Ressuspender o pellet de células.

▶ Incubação com o CliniMACS CD34 Reagent

1. Adicionar 1 ou 2 frascos de CliniMACS CD34 Reagent (ver Tabela 6.1). Misturar o conteúdo cuidadosamente.
2. Incubar no rotador orbital (25 rpm) durante 30 minutos à TA.

▶ Remoção do excesso de reagente

1. Encher a Cell Preparation Bag com solução tampão.
2. Centrifugar (200×g, continuamente, 15 minutos, TA).
3. Remover o sobrenadante tanto quanto possível. **Nota:** Remover, pelo menos, 500 g de sobrenadante. Se o sobrenadante removido for inferior a estes valores, recomenda-se um total de três passos de lavagem (em vez de apenas dois). Caso contrário, a remoção de reagente não ligado pode ser insuficiente.
4. Ressuspender o pellet de células.
5 Encher a Cell Preparation Bag com solução tampão.
6. Centrifugar (200×g, continuamente, 15 minutos, TA).
7. Remover o sobrenadante tanto quanto possível.
8. Ressuspender o pellet de células.
9. Ajustar o volume da amostra carregada para 150 g (aplicação em escala normal) ou 275 g (aplicação em escala grande).

Nota: Retirar uma amostra depois de removido o excesso de reagente para posterior análise (opcional).

6.1.2 PASSO 2: Escolha do programa de separação

▶ Ligar o CliniMACS Plus Instrument

▶ Escolha do programa de separação CD34 SELECTION 1/2

(com 1 frasco: CD34 SELECTION 1, ou com 2 frascos: CD34 SELECTION 2)

Ver secção 7.2.2 na página 136.

6.1.3 PASSO 3: Instalação dos conjuntos de tubos CliniMACS

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

Ver secção 7.3.1 na página 156.

6.1.4 PASSO 4: Separação CliniMACS Plus

- **Procedimento de separação**
- **Desprender as bolsas e registar o código do processo**
- **Descarregar o conjunto de tubos e encerrar**
- **Análise das células**

Ver secção 7.4.1 na página 191.

6.2 Enriquecimento de células CD14 positivas

O sistema CliniMACS Plus CD14, incluindo o CliniMACS Plus Instrument, o CliniMACS CD14 Reagent, o CliniMACS Tubing Set e o CliniMACS PBS/EDTA Buffer, destina-se ao enriquecimento *in vitro* de células humanas CD14 positivas provenientes de populações de células hematológicas heterogéneas.

6.2.1 PASSO 1: Preparação das células e marcação magnética

Primeiras medidas necessárias

Capacidade da aplicação

Até 4×10^9 células CD14 positivas de até 20×10^9 células no total (WBC)

⚠ CUIDADO

Risco de desempenho de separação insuficiente das células marcadas. Se as especificações da aplicação forem excedidas, existe o risco de marcação específica insuficiente. Utilizar a quantidade necessária de células e reagente, tal como descrito na respetiva aplicação.

Materiais CliniMACS necessários

Material	Número de catálogo	Quantidade
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS CD14 Reagent	272-01	1 frasco
CliniMACS Tubing Set	161-01	1 conjunto de tubos
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	3× bolsas de 1 000 mL[1]

1 Ver Tabela 6.3 e Tabela 6.4. Antes da utilização, suplementar o CliniMACS PBS/EDTA Buffer com HSA para uma concentração final de 0,5% (p/v).

Tabela 6.2: Materiais CliniMACS necessários para o enriquecimento de células CD14 positivas

Outros materiais necessários

- **Cell Preparation Bag:**
  Uma bolsa de transferência de 600 mL, indicada para centrifugação, bem como um acoplador do local de amostragem e um conjunto de transferência de plasma, para utilizar durante o procedimento de preparação das células
- **Plasma Waste Bag e Wash Waste Bag:**
  Duas bolsas de transferência de 600 mL, indicadas para centrifugação
- **Cell Collection Bag:**
  Uma bolsa de transferência de 150 mL ou de 600 mL em combinação com um Luer/Spike Interconnector para ligar a Cell Collection Bag ao conjunto de tubos (ver Tabela 6.4)
- **Se for necessária a substituição da Negative Fraction Bag e da Buffer Waste Bag:**
  Duas bolsas de transferência de 1 000 mL em combinação com dois Luer/Spike Interconnector para ligar as bolsas ao conjunto de tubos (ver Tabela 6.4)
- **Se for necessário mais de um litro de solução tampão para a separação:**
  Um conjunto de transferência de plasma para ligar as bolsas de solução tampão (ver Tabela 6.4)
- Um filtro pré-sistema
- Pinça de bloqueio
- Seringas apropriadas (vários tamanhos) e agulhas hipodérmicas de calibre 20

Visão geral dos materiais necessários

Preparação das células	
Células no total (WBC)	$\leq 20\times10^9$
Células marcadas	$\leq 4\times10^9$
Número de frascos de reagente	1–2
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1 000 mL
Conjunto de transferência de plasma	1

Tabela 6.3: Material necessário para a preparação das células CD14 positivas

Separação		
Células marcadas	≤2×10^9	>2–4×10^9
Negative Fraction Bag	–	Substituir as bolsas originais do conjunto de tubos por bolsas de transferência de 1 000 mL
Buffer Waste Bag	–	
Priming Waste Bag	–	–
Cell Collection Bag	150 mL	600 mL
Luer/Spike Interconnector	1	3
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1 000 mL	2 000 mL
Conjunto de transferência de plasma	–	1

Tabela 6.4: Material necessário para o enriquecimento de células CD14 positivas

▶ Preparação das bolsas

Determinar o peso da Cell Collection Bag e da Cell Preparation Bag vazias, tal como descrito na secção 7.1.1 na página 123.

Marcação magnética de células

Consultar a secção 7.1 "PASSO 1: Preparação das células e marcação magnética" na página 123 para uma descrição detalhada dos seguintes passos.

▶ Análise do produto celular inicial

▶ Transferência do produto celular inicial para a Cell Preparation Bag

▶ Diluição do produto celular inicial

Adicionar solução tampão: Peso da solução tampão a adicionar = 600 g – peso do produto celular inicial

▶ Centrifugação

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

▶ Ajuste do volume: volume da marcação 50 g (±5 g)

1. Remover o sobrenadante para ajustar a amostra mediante a seguinte equação: Peso do sobrenadante a remover = peso do produto celular inicial diluído – volume da marcação
2. Ressuspender o pellet de células.

▶ Incubação com o CliniMACS CD14 Reagent

1. Adicionar 1 frasco de CliniMACS CD14 Reagent. Misturar o conteúdo cuidadosamente.
2. Incubar no rotador orbital (25 rpm) durante 15 minutos à TA.

▶ **Remoção do excesso de reagente**

1. Encher a Cell Preparation Bag com solução tampão.
2. Centrifugar (300×g, continuamente, 15 minutos, TA).
3. Remover o sobrenadante tanto quanto possível. **Nota**: Remover, pelo menos, 500 g de sobrenadante. Se o sobrenadante removido for inferior a 500 g, recomenda-se um total de dois passos de lavagem (em vez de apenas um). Caso contrário, a remoção de reagente não ligado pode ser insuficiente.
4. Ressuspender o pellet de células.
5. Ajustar o volume da amostra carregada para 100 g.

Nota: Retirar uma amostra depois de removido o excesso de reagente para posterior análise (opcional).

6.2.2 PASSO 2: Escolha do programa de separação

▶ **Ligar o CliniMACS Plus Instrument**

▶ **Escolha do programa de separação ENRICHMENT 1.1**

▶ **Introdução dos parâmetros da amostra**

Ver secção 7.2.3 na página 138.

6.2.3 PASSO 3: Instalação dos conjuntos de tubos CliniMACS

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

Ver secção 7.3.1 na página 156.

6.2.4 PASSO 4: Separação CliniMACS Plus

▶ **Procedimento de separação**

▶ **Desprender as bolsas e registar o código do processo**

▶ **Descarregar o conjunto de tubos e encerrar**

▶ **Análise das células**

Ver secção 7.4.2 na página 195.

6.3 Enriquecimento/empobrecimento com o CliniMACS Anti-Biotin Reagent

O sistema CliniMACS Plus Anti-Biotin, incluindo o CliniMACS Plus Instrument, o CliniMACS Anti-Biotin Reagent, o CliniMACS Tubing Set ou o CliniMACS Tubing Set LS e o CliniMACS PBS/EDTA Buffer, destina-se ao enriquecimento ou empobrecimento *in vitro* de células humanas anteriormente marcadas com anticorpos biotinilados.

6.3.1 PASSO 1: Preparação das células e marcação magnética

Primeiras medidas necessárias

Capacidade da aplicação

- **Enriquecimento:** até 40×10^9 células no total (WBC)
- **Empobrecimento:**
  Aplicação em escala normal: até 40×10^9 células no total (WBC)
  Aplicação em escala grande: mais de 40×10^9 e até 80×10^9 células no total (WBC)

⚠ CUIDADO

Risco de desempenho de separação insuficiente das células marcadas. Se as especificações da aplicação forem excedidas, existe o risco de marcação específica insuficiente. Utilizar a quantidade necessária de células e reagente, tal como descrito na respetiva aplicação.

Materiais CliniMACS necessários

Material	Número de catálogo	Quantidade	Programa de separação
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1	–
CliniMACS Anti-Biotin Reagent	173-01	• 1 frasco (escala normal) • 2 frascos (escala grande)	–
CliniMACS Tubing Set	161-01	1 conjunto de tubos	ENRICHMENT 1.1
CliniMACS Tubing Set LS	162-01	1 conjunto de tubos	DEPLETION 2.1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	• 3× bolsas de 1 000 mL[1] (escala normal) • 4× bolsas de 1 000 mL[1] (escala grande)	–

1 A quantidade de solução tampão depende do programa de separação selecionado e do número de células marcadas (ver Tabela 6.6 a Tabela 6.9). Antes da utilização, suplementar o CliniMACS PBS/EDTA Buffer com HSA para uma concentração final de 0,5% (p/v).

Tabela 6.5: Materiais CliniMACS necessários para enriquecimento/empobrecimento com o CliniMACS Anti-Biotin Reagent

Outros materiais necessários

- **Cell Preparation Bag:**
  Uma bolsa de transferência de 600 mL, indicada para centrifugação, bem como um acoplador do local de amostragem e dois conjuntos de transferência de plasma, para utilizar durante o procedimento de preparação das células
- **Plasma Waste Bag e Wash Waste Bag:**
  Duas bolsas de transferência de 600 mL, indicadas para centrifugação
- **Cell Collection Bag:**
  Uma bolsa de transferência de 600 mL ou de 1 000 mL em combinação com um Luer/Spike Interconnector para ligar a Cell Collection Bag ao conjunto de tubos (ver Tabela 6.7 e Tabela 6.9)
- **Se for necessária a substituição da Negative Fraction Bag, da Buffer Waste Bag e/ou da Priming Waste Bag:**
  Duas a três bolsas de transferência de 1 000 mL em combinação com dois Luer/Spike Interconnectors para ligar as bolsas ao conjunto de tubos (ver Tabela 6.7 e Tabela 6.9). Substituir a Priming Waste Bag com o conector de tubos estéril.
- **Se for necessário mais de um litro de solução tampão para a separação:**
  Um ou dois conjuntos de transferência de plasma para ligar as bolsas de solução tampão (ver Tabela 6.7 e Tabela 6.9)
- Um filtro pré-sistema
- Pinça de bloqueio
- Seringas apropriadas (vários tamanhos) e agulhas hipodérmicas de calibre 20
- Albumina do soro humano (HSA) a adicionar ao CliniMACS PBS/EDTA Buffer para uma concentração final de 0,5% (p/v)
- Tubos de amostra
- Anticorpo biotinilado específico para células ou ligando individual

Visão geral dos materiais

Preparação das células (ENRICHMENT 1.1)	
Células no total (WBC)	≤40×10^9
Número de frascos de reagente	1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	2 000 mL
Conjunto de transferência de plasma	2

Tabela 6.6: Materiais necessários para a preparação das células (ENRICHMENT 1.1)

Separação (ENRICHMENT 1.1)		
Células marcadas	≤2×10^9	>2–5×10^9
Negative Fraction Bag	–	Substituir as bolsas originais do conjunto de tubos por bolsas de transferência de 1 000 mL
Buffer Waste Bag	–	
Priming Waste Bag	–	–
Cell Collection Bag	600 mL	600 mL
Luer/Spike Interconnector	1	3
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1 000 mL	2 000 mL
Conjunto de transferência de plasma	–	1

Tabela 6.7: Materiais necessários para o enriquecimento (ENRICHMENT 1.1)

Preparação das células (DEPLETION 2.1)		
Células no total (WBC)	≤40×10^9	>40–80×10^9
Número de frascos de reagente	1	2
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	2 000 mL	2 000 mL
Conjunto de transferência de plasma	2	2

Tabela 6.8: Materiais necessários para a preparação das células (DEPLETION 2.1)

Separação (DEPLETION 2.1)			
Células marcadas	<5×10^9	5–13×10^9	>13–20×10^9
Negative Fraction Bag	–	Substituir as bolsas originais do conjunto de tubos por bolsas de transferência de 1 000 mL	Substituir as bolsas originais do conjunto de tubos por bolsas de transferência de 1 000 mL
Buffer Waste Bag	–		
Priming Waste Bag	–	–	
Cell Collection Bag	600 mL	1 000 mL	1 000 mL
Luer/Spike Interconnector	1	3	4
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1 000 mL	2 000 mL	3 000 mL
Conjunto de transferência de plasma	–	1	2

Tabela 6.9: Materiais necessários para o empobrecimento (DEPLETION 2.1)

▶ Preparação das bolsas

Determinar o peso da Cell Collection Bag e da Cell Preparation Bag vazias, tal como descrito na secção 7.1.1 na página 123.

Marcação magnética de células

Consultar a secção 7.1 "PASSO 1: Preparação das células e marcação magnética" na página 123 para uma descrição detalhada dos seguintes passos.

▶ Análise do produto celular inicial

▶ Transferência do produto celular inicial para a Cell Preparation Bag

Diluição do produto celular inicial

Adicionar solução tampão: Peso da solução tampão a adicionar = peso do produto celular inicial × 2

Centrifugação

1. Centrifugar a 300×g, continuamente, 15 minutos, temperatura ambiente (TA: +19 a +25 °C [+66 a +77 °F]).
2. Remover o sobrenadante para ajustar o volume para marcação do anticorpo primário, tal como recomendado pelo fabricante do anticorpo primário.
3. Ressuspender o pellet de células.

Marcação das células: incubação com o anticorpo primário

Observar as instruções de utilização do fabricante do anticorpo primário.

Remoção do excesso de conjugado (1.ª lavagem)

1. Adicionar solução tampão: Peso da solução tampão a adicionar = 600g – peso do produto celular
2. Centrifugar a 300×g, continuamente, 15 minutos, temperatura ambiente (TA: +19 a +25 °C [+66 a +77 °F]).

Ajuste do volume: volume da marcação 95 g (±5 g) (aplicação em escala normal) ou 190 g (±5 g) (aplicação em escala grande)

1. Remover o sobrenadante para ajustar a amostra mediante a seguinte equação: Peso do sobrenadante a remover = peso do produto celular diluído – volume da marcação

   Nota: Remover, pelo menos, 500 g de sobrenadante. Se o sobrenadante removido for inferior a 500 g, recomenda-se um total de dois passos de lavagem (em vez de apenas um). Caso contrário, a remoção de reagente não ligado pode ser insuficiente.

2. Ressuspender o pellet de células.

Marcação magnética das células: incubação com o CliniMACS Anti-Biotin Reagent

1. Adicionar 1 ou 2 frascos de CliniMACS Anti-Biotin Reagent (ver Tabela 6.6 e Tabela 6.8). Misturar o conteúdo cuidadosamente.
2. Incubar no rotador orbital (25 rpm) durante 30 minutos à TA.

- **Remoção do excesso de reagente (2.ª lavagem)**

1. Encher a Cell Preparation Bag com solução tampão.
2. Centrifugar (300×g, continuamente, 15 minutos, TA).
3. Remover o sobrenadante tanto quanto possível. **Nota:** Remover, pelo menos, 500 g de sobrenadante. Se o sobrenadante removido for inferior ao valor acima indicado, recomenda-se um total de dois passos de lavagem (em vez de apenas um). Caso contrário, a remoção de reagente não ligado pode ser insuficiente.
4. Ressuspender o pellet de células.
5. Ajustar o volume da amostra carregada para 100 g (aplicação em escala normal) ou 200 g (aplicação em escala grande).

Nota: Retirar uma amostra depois de removido o excesso de reagente para posterior análise (opcional).

6.3.2 PASSO 2: Escolha do programa de separação

- **Ligar o CliniMACS Plus Instrument**
- **Escolha do programa de separação ENRICHMENT 1.1 ou DEPLETION 2.1**
- **Introdução dos parâmetros da amostra**

Ver secção 7.2.3 na página 138 ou 7.2.5 na página 145.

6.3.3 PASSO 3: Instalação dos conjuntos de tubos CliniMACS

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

Ver secção 7.3.1 na página 156.

6.3.4 PASSO 4: Separação CliniMACS Plus

- **Procedimento de separação**
- **Desprender as bolsas e registar o código do processo**
- **Descarregar o conjunto de tubos e encerrar**
- **Análise das células**

Ver secção 7.4.2 na página 195 e 7.4.4 na página 203.

6.4 Enriquecimento de células CD56 positivas

O sistema CliniMACS Plus CD56, incluindo o CliniMACS Plus Instrument, o CliniMACS CD56 Reagent, o CliniMACS Tubing Set e o CliniMACS PBS/EDTA Buffer, destina-se ao enriquecimento *in vitro* de células humanas CD56 positivas provenientes de populações de células hematológicas heterogéneas.

6.4.1 PASSO 1: Preparação das células e marcação magnética

Primeiras medidas necessárias

Capacidade da aplicação

Até 5×10^9 células CD56 positivas de até 40×10^9 células no total (WBC)

⚠ CUIDADO

Risco de desempenho de separação insuficiente das células marcadas. Se as especificações da aplicação forem excedidas, existe o risco de marcação específica insuficiente. Utilizar a quantidade necessária de células e reagente, tal como descrito na respetiva aplicação.

Materiais CliniMACS necessários

Material	Número de catálogo	Quantidade
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS CD56 Reagent	271-01	1 frasco
CliniMACS Tubing Set	161-01	1 conjunto de tubos
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	3× bolsas de 1 000 mL[1]

1 Ver Tabela 6.11 e Tabela 6.12. Antes da utilização, suplementar o CliniMACS PBS/EDTA Buffer com HSA para uma concentração final de 0,5% (p/v).

Tabela 6.10: Materiais CliniMACS necessários para o enriquecimento de células CD56 positivas

Outros materiais necessários

- **Cell Preparation Bag:**
  Uma bolsa de transferência de 600 mL, indicada para centrifugação, bem como um acoplador do local de amostragem e um conjunto de transferência de plasma, para utilizar durante o procedimento de preparação das células
- **Plasma Waste Bag e Wash Waste Bag:**
  Duas bolsas de transferência de 600 mL, indicadas para centrifugação
- **Cell Collection Bag:**
  Uma bolsa de transferência de 150 mL ou de 600 mL em combinação com um Luer/Spike Interconnector para ligar a Cell Collection Bag ao conjunto de tubos (ver Tabela 6.12)

- **Se for necessária a substituição da Negative Fraction Bag e da Buffer Waste Bag:**
  Duas bolsas de transferência de 1 000 mL em combinação com dois Luer/Spike Interconnectors para ligar as bolsas ao conjunto de tubos (ver Tabela 6.12)
- **Se for necessário mais de um litro de solução tampão para a separação:**
  Um conjunto de transferência de plasma para ligar as bolsas de solução tampão (ver Tabela 6.12)
- Um filtro pré-sistema
- Pinça de bloqueio
- Seringas (vários tamanhos) e agulhas hipodérmicas de calibre 20
- Albumina do soro humano (HSA) a adicionar ao CliniMACS PBS/EDTA Buffer para uma concentração final de 0,5% (p/v)
- Tubos de amostra

Visão geral dos materiais necessários

Preparação das células	
Células no total (WBC)	≤40×10^9
Número de frascos de reagente	1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1 000 mL
Conjunto de transferência de plasma	1

Tabela 6.11: Materiais necessários para a preparação de células CD56 positivas

Separação		
Células marcadas	≤2×10^9	>2–5×10^9
Negative Fraction Bag	–	Substituir as bolsas originais do conjunto de tubos por bolsas de transferência de 1 000 mL
Buffer Waste Bag	–	
Priming Waste Bag	–	–
Cell Collection Bag	150 mL	600 mL
Luer/Spike Interconnector	1	3
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1 000 mL	2 000 mL
Conjunto de transferência de plasma	–	1

Tabela 6.12: Materiais necessários para o enriquecimento de células CD56 positivas

▶ Preparação das bolsas

Determinar o peso da Cell Collection Bag e da Cell Preparation Bag vazias, tal como descrito na secção 7.1.1 na página 123.

Marcação magnética de células

Consultar a secção 7.1 "PASSO 1: Preparação das células e marcação magnética" na página 123 para uma descrição detalhada dos seguintes passos.

▶ Análise do produto celular inicial

▶ Transferência do produto celular inicial para a Cell Preparation Bag

▶ Diluição do produto celular inicial

Adicionar solução tampão: Peso da solução tampão a adicionar = 600 g – peso do produto celular inicial

▶ Centrifugação

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

▶ Ajuste do volume: volume da marcação 95 g (±5 g)

1. Remover completamente o sobrenadante tendo o cuidado de não ressuspender o pellet de células.
2. Ressuspender cuidadosamente o pellet de células depois de removido o sobrenadante.
3. Ajustar o peso da Cell Preparation Bag (CPB) adicionando solução tampão mediante a seguinte equação: Peso-alvo da CPB cheia = 95 g + peso da CPB vazia.
4. Ressuspender as células.

▶ Incubação com o CliniMACS CD56 Reagent

1. Adicionar 1 frasco de CliniMACS CD56 Reagent. Misturar o conteúdo cuidadosamente.
2. Incubar no rotador orbital (25 rpm) durante 30 minutos à TA.

▶ **Remoção do excesso de reagente**

1. Encher a Cell Preparation Bag com solução tampão.
2. Centrifugar (300×g, continuamente, 15 minutos, TA).
3. Remover o sobrenadante tanto quanto possível. **Nota:** Remover, pelo menos, 500 g de sobrenadante. Se o sobrenadante removido for inferior a 500 g, recomenda-se um total de dois passos de lavagem (em vez de apenas um). Caso contrário, a remoção de reagente não ligado pode ser insuficiente.
4. Ressuspender cuidadosamente o pellet de células depois de removido o sobrenadante.
5. Ajustar o volume da amostra carregada para 150 g.

Nota: Retirar uma amostra depois de removido o excesso de reagente para posterior análise (opcional).

6.4.2 PASSO 2: Escolha do programa de separação

▶ **Ligar o CliniMACS Plus Instrument**

▶ **Escolha do programa de separação ENRICHMENT 1.1**

▶ **Introdução dos parâmetros da amostra**

Ver secção 7.2.3 na página 138.

6.4.3 PASSO 3: Instalação dos conjuntos de tubos CliniMACS

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

Ver secção 7.3.1 na página 156.

6.4.4 PASSO 4: Separação CliniMACS Plus

▶ **Procedimento de separação**

▶ **Desprender as bolsas e registar o código do processo**

▶ **Descarregar o conjunto de tubos e encerrar**

▶ **Análise das células**

Ver secção 7.4.2 na página 195.

6.5 Empobrecimento de células CD3 positivas

O sistema CliniMACS Plus CD3, incluindo o CliniMACS Plus Instrument, o CliniMACS CD3 Reagent, o CliniMACS Tubing Set LS ou o CliniMACS Depletion Tubing Set e o CliniMACS PBS/EDTA Buffer, destina-se ao empobrecimento *in vitro* de células humanas CD3 positivas provenientes de populações de células hematológicas heterogéneas.

6.5.1 PASSO 1: Preparação das células e marcação magnética

Primeiras medidas necessárias

Capacidade da aplicação

- Aplicação em escala normal: até 15×10^9 células CD3 positivas de até 40×10^9 células no total (WBC) com o CliniMACS Tubing Set LS ou o CliniMACS Depletion Tubing Set
- Aplicação em escala grande: mais de 15×10^9 e até 20×10^9 células CD3 positivas de mais de 40×10^9 e até 80×10^9 células no total (WBC) com o CliniMACS Tubing Set LS, ou mais de 15×10^9 e até 30×10^9 células CD3 positivas de mais de 40×10^9 e até 80×10^9 células no total (WBC) com o CliniMACS Depletion Tubing Set

⚠ CUIDADO

Risco de desempenho de separação insuficiente das células marcadas. Se as especificações da aplicação forem excedidas, existe o risco de marcação específica insuficiente. Utilizar a quantidade necessária de células e reagente, tal como descrito na respetiva aplicação.

Materiais CliniMACS necessários

Material	Número de catálogo	Quantidade	Programa de separação
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1	
CliniMACS CD3 Reagent	273-01	• 1 frasco (escala normal) • 2 frascos (escala grande)	
CliniMACS Tubing Set LS	162-01	1 conjunto de tubos	DEPLETION 2.1
CliniMACS Depletion Tubing Set	261-01	1 conjunto de tubos	DEPLETION 3.1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	Até 5× bolsas de 1 000 mL[1]	

1 Ver Tabela 6.14 a Tabela 6.16. Antes da utilização, suplementar o CliniMACS PBS/EDTA Buffer com HSA para uma concentração final de 0,5% (p/v).

2 **Nota:** Para números maiores de células marcadas, recomenda-se a utilização de um CliniMACS Depletion Tubing Set para reduzir o tempo de processamento (p. ex., 20×10^9 células marcadas irão ser processadas em cinco horas com o CliniMACS Tubing Set LS em vez das duas horas com o CliniMACS Depletion Tubing Set).

Tabela 6.13: Materiais CliniMACS necessários para o empobrecimento de células CD3 positivas

Outros materiais necessários

- **Cell Preparation Bag:**
  Uma bolsa de transferência de 600 mL, indicada para centrifugação, bem como um acoplador do local de amostragem e dois conjuntos de transferência de plasma, para utilizar durante o procedimento de preparação das células
- **Plasma Waste Bag e Wash Waste Bag:**
  Duas bolsas de transferência de 600 mL, indicadas para centrifugação
- **Cell Collection Bag:**
  Uma ou duas bolsas de transferência de 600 mL em combinação com um Luer/Spike Interconnector para ligar a Cell Collection Bag ao conjunto de tubos

  Se forem necessárias duas Cell Collection Bags para a separação, utilizar um conjunto de transferência de plasma para as ligar. Uma bolsa de transferência de 600 mL já se encontra fixada no CliniMACS Depletion Tubing Set (ver Tabela 6.15 e Tabela 6.16).
- **Se for necessária a substituição da Negative Fraction Bag, da Buffer Waste Bag e/ou da Priming Waste Bag:**
  Duas a três bolsas de transferência de 1 000 mL em combinação com dois Luer/Spike Interconnectors para ligar as bolsas ao conjunto de tubos (ver Tabela 6.15 e Tabela 6.16)

  Substituir a Priming Waste Bag com o conector de tubos estéril.
- **Se for necessário mais de um litro de solução tampão para a separação:**
  Um ou dois conjuntos de transferência de plasma para ligar as bolsas de solução tampão (ver Tabela 6.15 e Tabela 6.16)
- Um filtro pré-sistema
- Pinça de bloqueio
- Seringas (vários tamanhos) e agulhas hipodérmicas de calibre 20
- Albumina do soro humano (HSA) a adicionar ao CliniMACS PBS/EDTA Buffer para uma concentração final de 0,5% (p/v)
- Imunoglobulina G de grau médico
- Tubos de amostra

IMPORTANTE

Uma vez introduzidos os parâmetros da amostra (PASSO 2), o software CliniMACS Plus calcula os volumes a reunir na Reapplication Bag, na Cell Collection Bag, na Non-Target Cell Bag e na Buffer Waste Bag. Se o volume do líquido calculado exceder o volume padrão de 500 mL, as bolsas têm de ser substituídas.

Visão geral dos materiais necessários

Preparação das células		
Células no total (WBC)	≤40×10^9	>40–80×10^9
Células marcadas	≤15×10^9	>15–30×10^9
Número de frascos de reagente	1	2
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	2 000 mL	2 000 mL
Conjunto de transferência de plasma	2	2
Volume da amostra carregada	150 mL	250–300 mL

Tabela 6.14: Materiais necessários para a preparação de células CD3 positivas

Separação (DEPLETION 2.1)			
Células marcadas	≤5×10^9	>5–13×10^9	>13–20×10^9
Negative Fraction Bag	–	Substituir as bolsas originais do conjunto de tubos por bolsas de transferência de 1 000 mL	Substituir as bolsas originais do conjunto de tubos por bolsas de transferência de 1 000 mL
Buffer Waste Bag	–		
Priming Waste Bag	–	–	
Cell Collection Bag	600 mL	1–2×600 mL	2×600 mL
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1 000 mL	2 000 mL	3 000 mL
Luer/Spike Interconnector	1	3	3
Conjunto de transferência de plasma	–	1–2	3

Tabela 6.15: Materiais necessários para o empobrecimento de células CD3 positivas (DEPLETION 2.1)

Separação (DEPLETION 3.1)		
Células marcadas	≤29×10^9	>29–30×10^9
Non-Target Cell Bag	Não é necessário substituir a bolsa	
Buffer Waste Bag		
Reapplication Bag		
Cell Collection Bag	–	1×600 mL (adicionalmente)
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1 000 mL	
Conjunto de transferência de plasma	–	1

Tabela 6.16: Materiais necessários para o empobrecimento de células CD3 positivas (DEPLETION 3.1)

Nota: Os materiais necessários para a separação também podem ser determinados ligando o CliniMACS Plus Instrument, selecionando o programa de separação a usar (DEPLETION 2.1 para o CliniMACS Tubing Set LS e DEPLETION 3.1 para o CliniMACS Depletion Tubing Set) e introduzindo os parâmetros da amostra. O software CliniMACS Plus irá calcular os tamanhos necessários das bolsas a ligar ao conjunto de tubos e o peso necessário da solução tampão.

▶ Preparação das bolsas

Determinar o peso da Cell Collection Bag e da Cell Preparation Bag vazias, tal como descrito na secção 7.1.1 na página 123.

Marcação magnética de células

Consultar a secção 7.1 "PASSO 1: Preparação das células e marcação magnética" na página 123 para uma descrição detalhada dos seguintes passos.

▶ Análise do produto celular inicial

Determinar o número de todas as células CD3 marcadas (incluindo ligação CD3 não-específica, não apenas células T efetivas). Considerar este número para as especificações da aplicação e a introdução de parâmetros da amostra (ver PASSO 2).

▶ Transferência do produto celular inicial para a Cell Preparation Bag

▶ Diluição do produto celular inicial

Adicionar solução tampão: Peso da solução tampão a adicionar = 600 g – peso do produto celular inicial

▶ Centrifugação

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

▶ Ajuste do volume: volume da marcação 95 g (±5 g) (aplicação em escala normal) ou 190 g (±5 g) (aplicação em escala grande)

1. Remover completamente o sobrenadante tendo o cuidado de não ressuspender o pellet de células.
2. Ressuspender cuidadosamente o pellet de células depois de removido o sobrenadante.
3. Ajustar o peso da Cell Preparation Bag (CPB) adicionando solução tampão mediante a seguinte equação (considerar o peso IgG): Peso-alvo da CPB cheia = volume da marcação – IgG + peso da CPB vazia.
4. Ressuspender o pellet de células.

▶ Incubação com imunoglobulina de grau médico

1. Adicionar IgG (1,5 mg/mL).
2. Incubar no rotador orbital (25 rpm) durante 5 minutos à TA.

▶ Incubação com o CliniMACS CD3 Reagent

1. Adicionar 1 ou 2 frascos de CliniMACS CD3 Reagent (ver Tabela 6.14). Misturar o conteúdo cuidadosamente.
2. Incubar no rotador orbital (25 rpm) durante 30 minutos à TA.

▶ **Remoção do excesso de reagente**

1. Encher a Cell Preparation Bag com solução tampão.
2. Centrifugar (300×g, continuamente, 15 minutos, TA).
3. Remover o sobrenadante tanto quanto possível. **Nota**: Remover, pelo menos, 500 g de sobrenadante. Se o sobrenadante removido for inferior a 500 g, recomenda-se um total de dois passos de lavagem (em vez de apenas um). Caso contrário, a remoção de reagente não ligado pode ser insuficiente.
4. Ressuspender o pellet de células.
5. Ajustar o volume da amostra carregada para 150 g (aplicação em escala normal) ou 250–300 g (aplicação em escala grande).

6.5.2 PASSO 2: Escolha do programa de separação

▶ **Ligar o CliniMACS Plus Instrument**

▶ **Escolha do programa de separação DEPLETION 2.1 ou DEPLETION 3.1**
(ao utilizar o CliniMACS Tubing Set LS ou o CliniMACS Depletion Tubing Set, respetivamente)

▶ **Introdução dos parâmetros da amostra**
(de acordo com a análise do produto celular inicial [ver PASSO 1])

Ver secção 7.2.5 na página 145 ou 7.2.6 na página 150.

6.5.3 PASSO 3: Instalação dos conjuntos de tubos CliniMACS

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

ou

▶ **CliniMACS Depletion Tubing Set**

Ver secção 7.3.1 na página 156 ou 7.3.3 na página 176.

6.5.4 PASSO 4: Separação CliniMACS Plus

▶ **Procedimento de separação**

▶ **Desprender as bolsas e registar o código do processo**

▶ **Descarregar o conjunto de tubos e encerrar**

▶ **Análise das células**

Ver secção 7.4.4 na página 203 e 7.4.5 na página 207.

6.6 Empobrecimento de células CD19 positivas

O sistema CliniMACS Plus CD19, incluindo o CliniMACS Plus Instrument, o CliniMACS CD19 Reagent, o CliniMACS Tubing Set LS e o CliniMACS PBS/EDTA Buffer, destina-se ao empobrecimento *in vitro* de células humanas CD19 positivas provenientes de populações de células hematológicas heterogéneas.

6.6.1 PASSO 1: Preparação das células e marcação magnética

Primeiras medidas necessárias

Capacidade da aplicação

Até 5×10^9 células CD19 positivas de até 40×10^9 células no total (WBC)

⚠ CUIDADO

Risco de desempenho de separação insuficiente das células marcadas. Se as especificações da aplicação forem excedidas, existe o risco de marcação específica insuficiente. Utilizar a quantidade necessária de células e reagente, tal como descrito na respetiva aplicação.

Materiais CliniMACS necessários

Material	Número de catálogo	Quantidade
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS CD19 Reagent	179-01	1 frasco
CliniMACS Tubing Set LS	162-01	1 conjunto de tubos
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	2× bolsas de 1 000 mL[1]

1 Antes da utilização, suplementar o CliniMACS PBS/EDTA Buffer com HSA para uma concentração final de 0,5% (p/v).

Tabela 6.17: Materiais CliniMACS necessários para o empobrecimento de células CD19 positivas

Outros materiais necessários

- **Cell Preparation Bag:**
  Uma bolsa de transferência de 600 mL, indicada para centrifugação, bem como um acoplador do local de amostragem e um conjunto de transferência de plasma, para utilizar durante o procedimento de preparação das células
- **Plasma Waste Bag e Wash Waste Bag:**
  Duas bolsas de transferência de 600 mL, indicadas para centrifugação
- **Cell Collection Bag:**
  Uma bolsa de transferência de 600 mL em combinação com um Luer/Spike Interconnector para ligar a Cell Collection Bag ao conjunto de tubos

- Um filtro pré-sistema
- Pinça de bloqueio
- Seringas (vários tamanhos) e agulhas hipodérmicas de calibre 20
- Albumina do soro humano (HSA) a adicionar ao CliniMACS PBS/EDTA Buffer para uma concentração final de 0,5% (p/v)
- Tubos de amostra

▶ Preparação das bolsas

Determinar o peso da Cell Collection Bag e da Cell Preparation Bag vazias, tal como descrito na secção 7.1.1 na página 123.

Marcação magnética de células

Consultar a secção 7.1 "PASSO 1: Preparação das células e marcação magnética" na página 123 para uma descrição detalhada dos seguintes passos.

▶ Análise do produto celular inicial

▶ Transferência do produto celular inicial para a Cell Preparation Bag

▶ Diluição do produto celular inicial

Adicionar solução tampão: Peso da solução tampão a adicionar = 600 g – peso do produto celular inicial

▶ Centrifugação

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

▶ Ajuste do volume: volume da marcação 95 g (±5 g)

1. Remover completamente o sobrenadante tendo o cuidado de não ressuspender o pellet de células.
2. Ressuspender cuidadosamente o pellet de células depois de removido o sobrenadante.
3. Ajustar o peso da Cell Preparation Bag (CPB) adicionando solução tampão mediante a seguinte equação: Peso-alvo da CPB cheia = 95 g + peso da CPB vazia.
4. Ressuspender o pellet de células.

▶ Incubação com o CliniMACS CD19 Reagent

1. Adicionar 1 frasco de CliniMACS CD19 Reagent. Misturar o conteúdo cuidadosamente.
2. Incubar no rotador orbital (25 rpm) durante 30 minutos à TA.

▶ **Remoção do excesso de reagente**

1. Encher a Cell Preparation Bag com solução tampão.
2. Centrifugar (300×g, continuamente, 15 minutos, TA).
3. Remover o sobrenadante tanto quanto possível. **Nota**: Remover, pelo menos, 500 g de sobrenadante. Se o sobrenadante removido for inferior a 500 g, recomenda-se um total de dois passos de lavagem (em vez de apenas um). Caso contrário, a remoção de reagente não ligado pode ser insuficiente.
4. Ressuspender o pellet de células.
5. Ajustar o volume da amostra carregada para 100 g.

6.6.2 PASSO 2: Escolha do programa de separação

▶ **Ligar o CliniMACS Plus Instrument**

▶ **Escolha do programa de separação DEPLETION 2.1**

▶ **Introdução dos parâmetros da amostra**

Ver secção 7.2.5 na página 145.

6.6.3 PASSO 3: Instalação dos conjuntos de tubos CliniMACS

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

Ver secção 7.3.1 na página 156.

6.6.4 PASSO 4: Separação CliniMACS Plus

▶ **Procedimento de separação**

▶ **Desprender as bolsas e registar o código do processo**

▶ **Descarregar o conjunto de tubos e encerrar**

▶ **Análise das células**

Ver secção 7.4.4 na página 203.

6.7 Empobrecimento de células CD3 positivas e de células CD19 positivas

O sistema CliniMACS Plus CD3/CD19, incluindo o CliniMACS Plus Instrument, o CliniMACS CD3 Reagent, o CliniMACS CD19 Reagent, o CliniMACS Depletion Tubing Set e o CliniMACS PBS/EDTA Buffer, destina-se ao empobrecimento *in vitro* de células humanas CD3 positivas e de células humanas CD19 positivas provenientes de populações de células hematológicas heterogéneas.

6.7.1 PASSO 1: Preparação das células e marcação magnética

Primeiras medidas necessárias

Capacidade da aplicação

Até 15×10^9 células CD3 positivas e até 5×10^9 células CD19 positivas de até 40×10^9 células no total (WBC)

⚠ CUIDADO

Risco de desempenho de separação insuficiente das células marcadas. Se as especificações da aplicação forem excedidas, existe o risco de marcação específica insuficiente. Utilizar a quantidade necessária de células e reagente, tal como descrito na respetiva aplicação.

Materiais CliniMACS necessários

Material	Número de catálogo	Quantidade
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS CD3 Reagent	273-01	1 frasco
CliniMACS CD19 Reagent	179-01	1 frasco
CliniMACS Depletion Tubing Set	261-01	1 conjunto de tubos
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	4× bolsas de 1 000 mL[1]

1 Antes da utilização, suplementar o CliniMACS PBS/EDTA Buffer com HSA para uma concentração final de 0,5% (p/v).

Tabela 6.18: Materiais CliniMACS necessários para o empobrecimento de células CD3 positivas e de células CD19 positivas

Outros materiais necessários

- **Cell Preparation Bag:**
  Uma bolsa de transferência de 600 mL, indicada para centrifugação, bem como um acoplador do local de amostragem e dois conjuntos de transferência de plasma, para utilizar durante o procedimento de preparação das células
- **Plasma Waste Bag e Wash Waste Bag:**
  Duas bolsas de transferência de 600 mL, indicadas para centrifugação
- **Cell Collection Bag:**
  Uma ou duas bolsas de transferência de 600 mL em combinação com um Luer/Spike Interconnector para ligar a Cell Collection Bag ao conjunto de tubos
- Um filtro pré-sistema
- Pinça de bloqueio
- Seringas (vários tamanhos) e agulhas hipodérmicas de calibre 20
- Albumina do soro humano (HSA) a adicionar ao CliniMACS PBS/EDTA Buffer para uma concentração final de 0,5% (p/v)
- Imunoglobulina G de grau médico
- Tubos de amostra

IMPORTANTE
Uma vez introduzidos os parâmetros da amostra (PASSO 2), o software CliniMACS Plus calcula os volumes a reunir na Reapplication Bag, na Cell Collection Bag, na Non-Target Cell Bag e na Buffer Waste Bag. Se o volume do líquido calculado exceder o volume padrão de 500 mL, as bolsas necessárias têm de ser substituídas.

▶ Preparação das bolsas

Determinar o peso da Cell Collection Bag e da Cell Preparation Bag vazias, tal como descrito na secção 7.1.1 na página 123.

Marcação magnética de células

Consultar a secção 7.1 "PASSO 1: Preparação das células e marcação magnética" na página 123 para uma descrição detalhada dos seguintes passos.

▶ Análise do produto celular inicial

Determinar o número de todas as células CD3 e CD19 marcadas (incluindo ligações CD3 e CD19 não-específicas, não apenas células T e B efetivas). Considerar este número para as especificações da aplicação e a introdução de parâmetros da amostra (ver PASSO 2).

▶ Transferência do produto celular inicial para a Cell Preparation Bag

▶ Diluição do produto celular inicial

Adicionar solução tampão: Peso da solução tampão a adicionar = 600 g – peso do produto celular inicial

Centrifugação

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

Ajuste do volume: volume da marcação 87,5 g (±5 g)

1. Remover completamente o sobrenadante tendo o cuidado de não ressuspender o pellet de células.
2. Ressuspender cuidadosamente o pellet de células depois de removido o sobrenadante.
3. Ajustar o peso da Cell Preparation Bag (CPB) adicionando solução tampão mediante a seguinte equação (considerar o peso IgG): Peso-alvo da CPB cheia = 87,5 g – IgG + peso da CPB vazia.
4. Ressuspender o pellet de células.

Incubação com imunoglobulina de grau médico

1. Adicionar IgG (1,5 mg/mL).
2. Incubar no rotador orbital (25 rpm) durante 5 minutos à TA.

Incubação com o CliniMACS CD3 Reagent e o CliniMACS CD19 Reagent

1. Adicionar 1 frasco de CliniMACS CD3 Reagent e 1 frasco de CliniMACS CD19 Reagent. Misturar o conteúdo cuidadosamente.
2. Incubar no rotador orbital (25 rpm) durante 30 minutos à TA.

Remoção do excesso de reagente

1. Encher a Cell Preparation Bag com solução tampão.
2. Centrifugar (300×g, continuamente, 15 minutos, TA).
3. Remover o sobrenadante tanto quanto possível. **Nota:** Remover, pelo menos, 500 g de sobrenadante. Se o sobrenadante removido for inferior a 500 g, recomenda-se um total de dois passos de lavagem (em vez de apenas um). Caso contrário, a remoção de reagente não ligado pode ser insuficiente.
4. Ressuspender o pellet de células.
5. Ajustar o volume da amostra carregada para 150 g.

6.7.2 PASSO 2: Escolha do programa de separação

- **Ligar o CliniMACS Plus Instrument**
- **Escolha do programa de separação DEPLETION 3.1**
- **Introdução dos parâmetros da amostra**
  (de acordo com a análise do produto celular inicial (ver PASSO 1))

Ver secção 7.2.6 na página 150.

6.7.3 PASSO 3: Instalação dos conjuntos de tubos CliniMACS

- **CliniMACS Depletion Tubing Set**

Ver secção 7.3.3 na página 176.

6.7.4 PASSO 4: Separação CliniMACS Plus

- **Procedimento de separação**
- **Desprender as bolsas e registar o código do processo**
- **Descarregar o conjunto de tubos e encerrar**
- **Análise das células**

Ver secção 7.4.5 na página 207.

6.8 Enriquecimento/empobrecimento de células CD8 positivas

O sistema CliniMACS Plus CD8, incluindo o CliniMACS Plus Instrument, o CliniMACS CD8 Reagent, o CliniMACS Tubing Set ou o CliniMACS Tubing Set LS e o CliniMACS PBS/EDTA Buffer, destina-se ao enriquecimento ou empobrecimento *in vitro* de células humanas CD8 positivas provenientes de populações de células hematológicas heterogéneas.

6.8.1 PASSO 1: Preparação das células e marcação magnética

Primeiras medidas necessárias

Capacidade da aplicação

- **Enriquecimento:** até 4×10^9 células marcadas de até 40×10^9 células no total (WBC) com o CliniMACS Tubing Set
- **Empobrecimento:** até 4×10^9 células marcadas de até 40×10^9 células no total (WBC) com o CliniMACS Tubing Set LS

⚠ CUIDADO

Risco de desempenho de separação insuficiente das células marcadas. Se as especificações da aplicação forem excedidas, existe o risco de marcação específica insuficiente. Utilizar a quantidade necessária de células e reagente, tal como descrito na respetiva aplicação.

Materiais CliniMACS necessários

Material	Número de catálogo	Quantidade	Programa de separação
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1	–
CliniMACS CD8 Reagent	275-01	1 frasco	–
CliniMACS Tubing Set	161-01	1 conjunto de tubos	ENRICHMENT 1.1
CliniMACS Tubing Set LS	162-01	1 conjunto de tubos	DEPLETION 2.1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	Até 3× bolsas de 1 000 mL[1]	–

1 Ver Tabela 6.20 a Tabela 6.22. Antes da utilização, suplementar o CliniMACS PBS/EDTA Buffer com HSA para uma concentração final de 0,5% (p/v).

Tabela 6.19: Materiais CliniMACS necessários para o enriquecimento/empobrecimento de células CD8 positivas

Outros materiais necessários

- **Cell Preparation Bag:**
  Uma bolsa de transferência de 600 mL, indicada para centrifugação, bem como um acoplador do local de amostragem e um conjunto de transferência de plasma, para utilizar durante o procedimento de preparação das células
- **Plasma Waste Bag e Wash Waste Bag:**
  Duas bolsas de transferência de 600 mL, indicadas para centrifugação
- **Cell Collection Bag:**
  Uma bolsa de transferência de 600 mL em combinação com um Luer/Spike Interconnector para ligar a Cell Collection Bag ao conjunto de tubos (ver Tabela 6.21 e Tabela 6.22)
- **Se for necessária a substituição da Negative Fraction Bag e da Buffer Waste Bag:**
  Duas bolsas de transferência de 1 000 mL em combinação com dois Luer/Spike Interconnectors para ligar as bolsas ao conjunto de tubos (ver Tabela 6.21 e Tabela 6.22)
- **Se for necessário mais de um litro de solução tampão para a separação:**
  Um conjunto de transferência de plasma para ligar as bolsas de solução tampão (ver Tabela 6.21 e Tabela 6.22)
- Um filtro pré-sistema
- Pinça de bloqueio
- Seringas (vários tamanhos) e agulhas hipodérmicas de calibre 20
- Albumina do soro humano (HSA) a adicionar ao CliniMACS PBS/EDTA Buffer para uma concentração final de 0,5% (p/v)
- Tubos de amostra

IMPORTANTE

Uma vez introduzidos os parâmetros da amostra (PASSO 2), o software CliniMACS Plus calcula os volumes a reunir na Priming Waste Bag, na Cell Collection Bag, na Negative Fraction Bag e na Buffer Waste Bag. Se o volume do líquido calculado exceder o volume padrão de 500 mL, as bolsas têm de ser substituídas de acordo com a seguinte visão geral dos materiais necessários.

Visão geral dos materiais necessários

Preparação das células	
Células no total	≤40×10^9
Células marcadas	≤4×10^9
Número de frascos de reagente	1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1 000 mL
Conjunto de transferência de plasma	1
Volume da amostra carregada	100 mL

Tabela 6.20: Materiais necessários para a preparação de células CD8 positivas

Separação (ENRICHMENT 1.1)		
Células marcadas	<2×10^9	2–4×10^9
Negative Fraction Bag	–	Substituir as bolsas originais do conjunto de tubos por bolsas de transferência de 1 000 mL
Buffer Waste Bag	–	
Priming Waste Bag	–	–
Cell Collection Bag	600 mL	600 mL
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1 000 mL	2 000 mL
Luer/Spike Interconnector	1	3
Conjunto de transferência de plasma	–	1

Tabela 6.21: Materiais necessários para o enriquecimento de células CD8 positivas

Separação (DEPLETION 2.1)	
Células marcadas	≤4×10^9
Negative Fraction Bag	Não é necessário substituir a bolsa
Buffer Waste Bag	
Priming Waste Bag	
Cell Collection Bag	600 mL
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1 000 mL
Luer/Spike Interconnector	1

Tabela 6.22: Materiais necessários para o empobrecimento das células CD8 positivas

▶ Preparação das bolsas

Determinar o peso da Cell Collection Bag e da Cell Preparation Bag vazias, tal como descrito na secção 7.1.1 na página 123.

Marcação magnética de células

Consultar a secção 7.1 "PASSO 1: Preparação das células e marcação magnética" na página 123 para uma descrição detalhada dos seguintes passos.

▶ Análise do produto celular inicial

▶ Transferência do produto celular inicial para a Cell Preparation Bag

▶ Diluição do produto celular inicial

Adicionar solução tampão: Peso da solução tampão a adicionar = peso do produto celular inicial × 2

▶ Centrifugação

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

▶ Ajuste do volume: volume da marcação 95 g (±5 g)

1. Remover completamente o sobrenadante tendo o cuidado de não ressuspender o pellet de células.
2. Ressuspender cuidadosamente o pellet de células depois de removido o sobrenadante.
3. Ajustar o peso da Cell Preparation Bag (CPB) adicionando solução tampão. Calcular o peso-alvo da CPB cheia de produto celular diluído mediante a equação: Peso-alvo da CPB cheia = 95 g – peso da CPB vazia.
4. Ressuspender o pellet de células.

▶ Incubação com o CliniMACS CD8 Reagent

1. Adicionar 1 frasco de CliniMACS CD8 Reagent. Misturar o conteúdo cuidadosamente.
2. Incubar no rotador orbital (25 rpm) durante 30 minutos à TA.

▶ Remoção do excesso de reagente

1. Encher a Cell Preparation Bag com solução tampão.
2. Centrifugar (300×g, continuamente, 15 minutos, TA).
3. Remover o sobrenadante tanto quanto possível. **Nota:** Remover, pelo menos, 500 g de sobrenadante. Se o sobrenadante removido for inferior a 500 g, recomenda-se um total de dois passos de lavagem (em vez de apenas um). Caso contrário, a remoção de reagente não ligado pode ser insuficiente.
4. Ressuspender o pellet de células.
5. Ajustar o volume da amostra carregada para 100 g.

6.8.2 PASSO 2: Escolha do programa de separação

- **Ligar o CliniMACS Plus Instrument**
- **Escolha do programa de separação ENRICHMENT 1.1 ou DEPLETION 2.1**
- **Introdução dos parâmetros da amostra**

Ver secção 7.2.3 na página 138 ou 7.2.5 na página 145.

6.8.3 PASSO 3: Instalação dos conjuntos de tubos CliniMACS

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

Ver secção 7.3.1 na página 156.

6.8.4 PASSO 4: Separação CliniMACS Plus

- **Procedimento de separação**
- **Desprender as bolsas e registar o código do processo**
- **Descarregar o conjunto de tubos e encerrar**
- **Análise das células**

Ver secção 7.4.2 na página 195 ou 7.4.4 na página 203.

6.9 Enriquecimento/empobrecimento das células CD25 positivas

O sistema CliniMACS Plus CD25, incluindo o CliniMACS Plus Instrument, o CliniMACS CD25 Reagent, o CliniMACS Tubing Set ou o CliniMACS Tubing Set LS e o CliniMACS PBS/EDTA Buffer, destina-se ao enriquecimento ou empobrecimento *in vitro* de células humanas CD25 positivas – de preferência células com alta expressão de CD25 – provenientes de populações de células hematológicas heterogéneas.

6.9.1 PASSO 1: Preparação das células e marcação magnética

Primeiras medidas necessárias

Capacidade da aplicação

- **Enriquecimento:** Células CD25 positivas ou células com alta expressão de CD25: até $0{,}6\times10^9$ células marcadas de até 40×10^9 células no total (WBC) com o CliniMACS Tubing Set
- **Empobrecimento:**
  Aplicação em escala normal: até 6×10^9 células marcadas CD25 positivas de até 40×10^9 células no total (WBC) com o CliniMACS Tubing Set LS
  Aplicação em escala grande: mais de 6×10^9 e até 12×10^9 células CD25 positivas de mais de 40×10^9 e até 80×10^9 células no total (WBC) com o CliniMACS Tubing Set LS

⚠ CUIDADO

Risco de desempenho de separação insuficiente das células marcadas. Se as especificações da aplicação forem excedidas, existe o risco de marcação específica insuficiente. Utilizar a quantidade necessária de células e reagente, tal como descrito na respetiva aplicação.

Materiais CliniMACS necessários

Material	Número de catálogo	Quantidade	Programa de separação
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1	–
CliniMACS CD25 Reagent	274-01	• 1 frasco (escala normal) • 2 frascos (escala grande)	–
CliniMACS Tubing Set	161-01	1 conjunto de tubos	ENRICHMENT 3.2
CliniMACS Tubing Set LS	162-01	1 conjunto de tubos	DEPLETION 2.1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	Até 4× bolsas de 1 000 mL[1]	–

1 Ver Tabela 6.24 a Tabela 6.27. Antes da utilização, suplementar o CliniMACS PBS/EDTA Buffer com HSA para uma concentração final de 0,5% (p/v).

Tabela 6.23: Materiais CliniMACS necessários para o enriquecimento/empobrecimento de células CD25 positivas

Outros materiais necessários

- **Cell Preparation Bag:**
  Uma bolsa de transferência de 600 mL, indicada para centrifugação, bem como um acoplador do local de amostragem e um a dois conjuntos de transferência de plasma, para utilizar durante o procedimento de preparação das células
- **Plasma Waste Bag e Wash Waste Bag:**
  Duas bolsas de transferência de 600 mL (ou duas de 1 000 mL), indicadas para centrifugação
- **Cell Collection Bag:**
  Uma bolsa de transferência de 150 mL ou uma a duas bolsas de transferência de 600 mL em combinação com um Luer/Spike Interconnector para ligar a Cell Collection Bag ao conjunto de tubos

  Se forem necessárias duas Cell Collection Bags para a separação, utilizar um conjunto de transferência de plasma para ligar as duas bolsas (ver Tabela 6.25 e Tabela 6.27).
- **Se for necessária a substituição da Negative Fraction Bag e da Buffer Waste Bag:**
  Duas bolsas de transferência de 1 000 mL em combinação com dois Luer/Spike Interconnectors para ligar as bolsas ao conjunto de tubos (ver Tabela 6.25 e Tabela 6.27)
- **Se for necessário mais de um litro de solução tampão para a separação:**
  Um conjunto de transferência de plasma para ligar as bolsas de solução tampão (ver Tabela 6.25 e Tabela 6.27)
- Um filtro pré-sistema
- Pinça de bloqueio
- Seringas (vários tamanhos) e agulhas hipodérmicas de calibre 20
- Albumina do soro humano (HSA) a adicionar ao CliniMACS PBS/EDTA Buffer para uma concentração final de 0,5% (p/v)
- Tubos de amostra

IMPORTANTE

Uma vez introduzidos os parâmetros da amostra (PASSO 2), o software CliniMACS Plus calcula os volumes a reunir na Priming Waste Bag, na Cell Collection Bag, na Negative Fraction Bag e na Buffer Waste Bag. Se o volume do líquido calculado exceder o volume padrão de 500 mL, as bolsas têm de ser substituídas de acordo com a seguinte visão geral dos materiais necessários.

Visão geral dos materiais necessários

Preparação das células (ENRICHMENT 3.2)		
Aplicação	**Enriquecimento das células CD25 positivas**	**Enriquecimento das células com alta expressão de CD25**
Células no total (WBC)	≤40×10^9	≤40×10^9
Células marcadas	≤0,6×10^9	≤0,6×10^9
Número de frascos de reagente	1	1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1 000–2 000 mL	2 000 mL
Conjunto de transferência de plasma	1–2	2
Volume da marcação	190 mL	380 mL
Temperatura de marcação	Temperatura ambiente	+4 a +8 °C (+39 °F a +46 °F)

Tabela 6.24: Materiais necessários para a preparação das células CD25 positivas/células com alta expressão de CD25 (ENRICHMENT 3.2)

Separação (ENRICHMENT 3.2)		
Aplicação	**Enriquecimento das células CD25 positivas**	**Enriquecimento das células com alta expressão de CD25**
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1 000 mL	1 000 mL
Negative Fraction Bag	Não é necessário substituir a bolsa	
Buffer Waste Bag		
Priming Waste Bag		
Cell Collection Bag	150 mL	150 mL
Luer/Spike Interconnector	1	1

Tabela 6.25: Materiais necessários para o enriquecimento das células CD25 positivas/células com alta expressão de CD25 (ENRICHMENT 3.2)

Preparação das células (DEPLETION 2.1)		
Células no total (WBC)	≤40×10^9	>40–80×10^9
Células marcadas	≤6×10^9	>6–12×10^9
Número de frascos de reagente	1	2
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1 000–2 000 mL	1 000–2 000 mL
Conjunto de transferência de plasma	1–2	1–2
Volume da marcação	95 mL	190 mL
Temperatura de marcação	Temperatura ambiente	Temperatura ambiente

Tabela 6.26: Materiais necessários para a preparação de células CD25 positivas (DEPLETION 2.1)

Separação (DEPLETION 2.1)		
Células no total (WBC)	≤40×10^9	>40–80×10^9
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1 000 mL para <5×10^9 células marcadas	2 000 mL para 5–12×10^9 células marcadas
Negative Fraction Bag	–	Substituir as bolsas originais do conjunto de tubos por bolsas de transferência de 1 000 mL
Buffer Waste Bag	–	
Priming Waste Bag	–	–
Cell Collection Bag	600 mL	2×600 mL
Luer/Spike Interconnector	1	3
Conjunto de transferência de plasma	–	2

Tabela 6.27: Materiais necessários para o empobrecimento das células CD25 positivas (DEPLETION 2.1)

▶ Preparação das bolsas

Determinar o peso da Cell Collection Bag e da Cell Preparation Bag vazias, tal como descrito na secção 7.1.1 na página 123.

Marcação magnética de células

Consultar a secção 7.1 "PASSO 1: Preparação das células e marcação magnética" na página 123 para uma descrição detalhada dos seguintes passos.

IMPORTANTE

- Guardar a solução tampão para a preparação das células para o enriquecimento ou o empobrecimento de células CD25 positivas entre +19 a +25 °C (+66 a +77 °F).
- A marcação magnética durante a preparação das células para o enriquecimento de células com expressão de altos níveis de CD25 tem de ser realizada com solução tampão fria (+4 a +8 °C [+39 a +46 °F]). Temperaturas mais altas ou mais baixas podem resultar em menor pureza e menor rendimento das células-alvo.

▶ Análise do produto celular inicial

▶ Transferência do produto celular inicial para a Cell Preparation Bag

▶ Diluição do produto celular inicial

Adicionar solução tampão: Peso da solução tampão a adicionar = peso do produto celular inicial × 2

▶ Centrifugação

Centrifugar a 300×g, continuamente, 15 minutos, temperatura ambiente (TA: +19 a +25 °C (+66 a +77 °F).

Ajuste do volume: volume da marcação para

enriquecimento das células CD25 positivas: 190 g (±5 g)
enriquecimento das células com alta expressão de CD25: 380 g (±5 g)[1]
empobrecimento das células CD25 positivas (aplicação em escala normal): 95 g
empobrecimento das células CD25 positivas (aplicação em escala grande): 190 g

1. Remover completamente o sobrenadante tendo o cuidado de não ressuspender o pellet de células.
2. Ressuspender cuidadosamente o pellet de células depois de removido o sobrenadante.
3. Ajustar o peso da Cell Preparation Bag (CPB) adicionando solução tampão mediante a seguinte equação: Peso-alvo da CPB cheia = volume da marcação + peso da CPB vazia.
4. Ressuspender o pellet de células.

Incubação com o CliniMACS CD25 Reagent

1. Adicionar 1 ou 2 frascos de CliniMACS CD25 Reagent (ver Tabela 6.24 e Tabela 6.26). Misturar o conteúdo cuidadosamente.
2. Incubar no rotador orbital (25 rpm):
   a) enriquecimento ou empobrecimento das células CD25 positivas: 30 minutas à TA
   b) enriquecimento de células com alta expressão de CD25: 15 minutos a +4 a +8 °C (+39 a +46 °F)

Remoção do excesso de reagente

1. Encher a Cell Preparation Bag com solução tampão.
2. Centrifugar (300×g, continuamente, 15 minutos, TA).
3. Remover o sobrenadante tanto quanto possível. **Nota:** Remover, pelo menos, 500 g de sobrenadante. Se o sobrenadante removido for inferior a 500 g, recomenda-se um total de dois passos de lavagem (em vez de apenas um). Caso contrário, a remoção de reagente não ligado pode ser insuficiente.
4. Ressuspender o pellet de células.
5. Ajustar o volume da amostra carregada para 100 g (aplicação em escala normal) ou 200 g (aplicação em escala grande).

1 A marcação magnética para o enriquecimento de células com alta expressão de CD25 tem de ser realizada com solução tampão fria (+4 a +8 °C [+39 a +46 °F]).

6.9.2 PASSO 2: Escolha do programa de separação

- **Ligar o CliniMACS Plus Instrument**
- **Escolha do programa de separação ENRICHMENT 3.2 ou DEPLETION 2.1**
- **Introdução dos parâmetros da amostra**
  (não para ENRICHMENT 3.2)

Ver secção 7.2.4 na página 143 ou 7.2.5 na página 145.

6.9.3 PASSO 3: Instalação dos conjuntos de tubos CliniMACS

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

Ver secção 7.3.1 na página 156.

6.9.4 PASSO 4: Separação CliniMACS Plus

- **Procedimento de separação**
- **Desprender as bolsas e registar o código do processo**
- **Descarregar o conjunto de tubos e encerrar**
- **Análise das células**

Ver secção 7.4.3 na página 199 ou 7.4.4 na página 203.

6.10 Enriquecimento/empobrecimento das células CD4 positivas

O sistema CliniMACS Plus CD4, incluindo o CliniMACS Plus Instrument, o CliniMACS CD4 Reagent, o CliniMACS Tubing Set ou o CliniMACS Tubing Set LS e o CliniMACS PBS/EDTA Buffer, destina-se ao enriquecimento ou empobrecimento *in vitro* de células humanas CD4 positivas provenientes de populações de células hematológicas heterogéneas.

6.10.1 PASSO 1: Preparação das células e marcação magnética

Primeiras medidas necessárias

Capacidade da aplicação

- **Enriquecimento:** até 5×10^9 células marcadas de até 40×10^9 células no total (WBC) com o CliniMACS Tubing Set
- **Empobrecimento:** até 12×10^9 células marcadas de até 40×10^9 células no total (WBC) com o CliniMACS Tubing Set LS

Nota: Se o número de células calculadas exceder a capacidade da aplicação, dividir a amostra e continuar com cada amostra em separado, utilizando um novo conjunto de tubos para cada corrida com o CliniMACS Plus Instrument.

⚠ CUIDADO

Risco de desempenho de separação insuficiente das células marcadas. Se as especificações da aplicação forem excedidas, existe o risco de marcação específica insuficiente. Utilizar a quantidade necessária de células e reagente, tal como descrito na respetiva aplicação.

Materiais CliniMACS necessários

Material	Número de catálogo	Quantidade	Programa de separação
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1	–
CliniMACS CD4 Reagent	276-01	1 frasco	–
CliniMACS Tubing Set	161-01	1 conjunto de tubos	ENRICHMENT 1.1
CliniMACS Tubing Set LS	162-01	1 conjunto de tubos	DEPLETION 2.1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	Até 4× bolsas de 1 000 mL[1]	–

1 Ver Tabela 6.29 a Tabela 6.32. Antes da utilização, suplementar o CliniMACS PBS/EDTA Buffer com HSA para uma concentração final de 0,5% (p/v).

Tabela 6.28: Materiais CliniMACS necessários para o enriquecimento/empobrecimento de células CD4 positivas

Outros materiais necessários

- **Cell Preparation Bag:**
  Uma bolsa de transferência de 600 mL, indicada para centrifugação, bem como um acoplador do local de amostragem e um conjunto de transferência de plasma, para utilizar durante o procedimento de preparação das células
- **Plasma Waste Bag e Wash Waste Bag:**
  Duas bolsas de transferência de 600 mL (ou duas de 1 000 mL), indicadas para centrifugação
- **Cell Collection Bag:**
  Uma bolsa de transferência de 150 mL ou uma a duas bolsas de transferência de 600 mL em combinação com um Luer/Spike Interconnector para ligar a Cell Collection Bag ao conjunto de tubos

  Se forem necessárias duas Cell Collection Bags para a separação, utilizar um conjunto de transferência de plasma para ligar as duas bolsas (ver Tabela 6.30 e Tabela 6.32).
- **Se for necessária a substituição da Negative Fraction Bag, da Buffer Waste Bag e/ou da Priming Waste Bag:**
  Até três bolsas de transferência de 1 000 mL em combinação com dois Luer/Spike Interconnectors para ligar as bolsas ao conjunto de tubos (ver Tabela 6.30 e Tabela 6.32)

  Substituir a Priming Waste Bag com o conector de tubos estéril.
- **Se for necessário mais de um litro de solução tampão para a separação:**
  Um ou dois conjuntos de transferência de plasma para ligar as bolsas de solução tampão (ver Tabela 6.30 e Tabela 6.32)
- Um filtro pré-sistema
- Pinça de bloqueio
- Seringas (vários tamanhos) e agulhas hipodérmicas de calibre 20
- Albumina do soro humano (HSA) a adicionar ao CliniMACS PBS/EDTA Buffer para uma concentração final de 0,5% (p/v)
- Tubos de amostra

IMPORTANTE

Uma vez introduzidos os parâmetros da amostra (PASSO 2), o software CliniMACS Plus calcula os volumes a reunir na Priming Waste Bag, na Cell Collection Bag, na Negative Fraction Bag e na Buffer Waste Bag. Se o volume do líquido calculado exceder o volume padrão de 500 mL, as bolsas têm de ser substituídas de acordo com a seguinte visão geral dos materiais necessários.

Visão geral dos materiais necessários

Preparação das células (ENRICHMENT 1.1)	
Células no total (WBC)	≤40×10^9
Células marcadas	≤5×10^9
Número de frascos de reagente	1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1 000 mL
Conjunto de transferência de plasma	1

Tabela 6.29: Materiais necessários para a preparação de células CD4 positivas (ENRICHMENT 1.1)

Separação (ENRICHMENT 1.1)		
Células marcadas	≤2×10^9	>2–5×10^9
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1 000 mL	2 000 mL
Negative Fraction Bag	–	Substituir as bolsas originais do conjunto de tubos por bolsas de transferência de 1 000 mL
Buffer Waste Bag	–	
Priming Waste Bag	–	–
Cell Collection Bag	150 mL	600 mL
Luer/Spike Interconnector	1	3
Conjunto de transferência de plasma	–	1

Tabela 6.30: Materiais necessários para o enriquecimento das células CD4 positivas (ENRICHMENT 1.1)

Preparação das células (DEPLETION 2.1)	
Células no total (WBC)	≤40×10^9
Células marcadas	≤12×10^9
Número de frascos de reagente	1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1 000 mL
Conjunto de transferência de plasma	1

Tabela 6.31: Materiais necessários para a preparação de células CD4 positivas (DEPLETION 2.1)

Separação (DEPLETION 2.1)		
Células marcadas	<5×10^9	5–12×10^9
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1 000 mL	2 000 mL
Negative Fraction Bag	–	Substituir as bolsas originais do conjunto de tubos por bolsas de transferência de 1 000 mL
Buffer Waste Bag	–	
Priming Waste Bag	–	–
Cell Collection Bag	1×600 mL	1–2×600 mL
Luer/Spike Interconnector	1	3
Conjunto de transferência de plasma	–	1–2

Tabela 6.32: Materiais necessários para o empobrecimento das células CD4 positivas (DEPLETION 2.1)

▶ Preparação das bolsas

Determinar o peso da Cell Collection Bag e da Cell Preparation Bag vazias, tal como descrito na secção 7.1.1 na página 123.

Marcação magnética de células

Consultar a secção 7.1 "PASSO 1: Preparação das células e marcação magnética" na página 123 para uma descrição detalhada dos seguintes passos.

▶ Análise do produto celular inicial

▶ Transferência do produto celular inicial para a Cell Preparation Bag

▶ Diluição do produto celular inicial

Adicionar solução tampão: Peso da solução tampão a adicionar = peso do produto celular inicial × 2

▶ Centrifugação

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

▶ Ajuste do volume: volume da marcação 95 g (±5 g)

1. Remover o sobrenadante para ajustar a amostra mediante a seguinte equação: Peso do sobrenadante a remover = peso do produto celular diluído – 95 g
2. Ressuspender o pellet de células.

▶ Incubação com o CliniMACS CD4 Reagent

1. Adicionar 1 frasco de CliniMACS CD4 Reagent. Misturar o conteúdo cuidadosamente.
2. Incubar no rotador orbital (25 rpm) durante 30 minutos à TA.

▶ Remoção do excesso de reagente

1. Encher a Cell Preparation Bag com solução tampão.
2. Centrifugar (300×g, continuamente, 15 minutos, TA).
3. Remover o sobrenadante tanto quanto possível. **Nota:** Remover, pelo menos, 500 g de sobrenadante. Se o sobrenadante removido for inferior a 500 g, recomenda-se um total de dois passos de lavagem (em vez de apenas um). Caso contrário, a remoção de reagente não ligado pode ser insuficiente.
4. Ressuspender o pellet de células.
5. Ajustar o volume da amostra carregada para 100 g.

6.10.2 PASSO 2: Escolha do programa de separação

- **Ligar o CliniMACS Plus Instrument**
- **Escolha do programa de separação ENRICHMENT 1.1 ou DEPLETION 2.1**
- **Introdução dos parâmetros da amostra**

Ver secção 7.2.3 na página 138 e 7.2.5 na página 145.

6.10.3 PASSO 3: Instalação dos conjuntos de tubos CliniMACS

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

Ver secção 7.3.1 na página 156.

6.10.4 PASSO 4: Separação CliniMACS Plus

- **Procedimento de separação**
- **Desprender as bolsas e registar o código do processo**
- **Descarregar o conjunto de tubos e encerrar**
- **Análise das células**

Ver secção 7.4.2 na página 195 ou 7.4.4 na página 203.

6.11 Empobrecimento de células CD4 positivas e de células CD8 positivas

O sistema CliniMACS Plus CD4/CD8, incluindo o CliniMACS Plus Instrument, o CliniMACS CD4 Reagent, o CliniMACS CD8 Reagent, o CliniMACS Tubing Set LS e o CliniMACS PBS/EDTA Buffer, destina-se ao empobrecimento simultâneo *in vitro* de células humanas CD4 positivas e CD8 positivas provenientes de populações de células hematológicas heterogéneas.

6.11.1 PASSO 1: Preparação das células e marcação magnética

Primeiras medidas necessárias

Capacidade da aplicação

Até 12×10^9 células CD4 positivas e até 4×10^9 células CD8 positivas de até 40×10^9 células no total (WBC)

Nota: Se o número de células calculadas exceder a capacidade da aplicação, dividir a amostra e continuar com cada amostra em separado, utilizando um novo conjunto de tubos para cada corrida com o CliniMACS Plus Instrument.

⚠ CUIDADO

Risco de desempenho de separação insuficiente das células marcadas. Se as especificações da aplicação forem excedidas, existe o risco de marcação específica insuficiente. Utilizar a quantidade necessária de células e reagente, tal como descrito na respetiva aplicação.

Materiais CliniMACS necessários

Material	Número de catálogo	Quantidade
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS CD4 Reagent	276-01	1 frasco
CliniMACS CD8 Reagent	275-01	1 frasco
CliniMACS Tubing Set LS	162-01	1 conjunto de tubos
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	Até 4× bolsas de 1 000 mL[1]

1 Ver Tabela 6.34 e Tabela 6.35. Antes da utilização, suplementar o CliniMACS PBS/EDTA Buffer com HSA para uma concentração final de 0,5% (p/v).

Tabela 6.33: Materiais CliniMACS necessários para o empobrecimento de células CD4 positivas e de células CD8 positivas

Outros materiais necessários

- **Cell Preparation Bag:**
  Uma bolsa de transferência de 600 mL, indicada para centrifugação, bem como um acoplador do local de amostragem e um conjunto de transferência de plasma, para utilizar durante o procedimento de preparação das células
- **Plasma Waste Bag e Wash Waste Bag:**
  Duas bolsas de transferência de 600 mL (ou duas de 1 000 mL), indicadas para centrifugação
- **Cell Collection Bag:**
  Uma a duas bolsas de transferência de 600 mL em combinação com um Luer/Spike Interconnector para ligar a Cell Collection Bag ao conjunto de tubos

Se forem necessárias duas Cell Collection Bags para a separação, utilizar um conjunto de transferência de plasma para ligar as duas bolsas (ver Tabela 6.35).

- **Se for necessária a substituição da Negative Fraction Bag, da Buffer Waste Bag e/ou da Priming Waste Bag:**
  Até três bolsas de transferência de 1 000 mL em combinação com dois Luer/Spike Interconnectors para ligar as bolsas ao conjunto de tubos (ver Tabela 6.35)

  Substituir a Priming Waste Bag com o conector de tubos estéril.
- **Se for necessário mais de um litro de solução tampão para a separação:**
  Um ou dois conjuntos de transferência de plasma para ligar as bolsas de solução tampão (ver Tabela 6.35)
- Um filtro pré-sistema
- Pinça de bloqueio
- Seringas (vários tamanhos) e agulhas hipodérmicas de calibre 20
- Albumina do soro humano (HSA) a adicionar ao CliniMACS PBS/EDTA Buffer para uma concentração final de 0,5% (p/v)
- Tubos de amostra

IMPORTANTE

Uma vez introduzidos os parâmetros da amostra (PASSO 2), o software CliniMACS Plus calcula os volumes a reunir na Priming Waste Bag, na Cell Collection Bag, na Negative Fraction Bag e na Buffer Waste Bag. Se o volume do líquido calculado exceder o volume padrão de 500 mL, as bolsas têm de ser substituídas de acordo com a seguinte visão geral dos materiais necessários.

Visão geral dos materiais necessários

Preparação das células	
Células no total (WBC)	$\leq 40\times10^9$
Células marcadas	$\leq 12\times10^9$ células CD4 positivas e $\leq 4\times10^9$ células CD8 positivas
Número de frascos de reagente	1 frasco de CliniMACS CD4 Reagent e 1 frasco de CliniMACS CD8 Reagent
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1 000 mL
Conjunto de transferência de plasma	1

Tabela 6.34: Materiais necessários para a preparação de células CD4 positivas e CD8 positivas

Separação			
Células marcadas	$<5\times10^9$	$5–13\times10^9$	$>13–16\times10^9$
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1 000 mL	2 000 mL	3 000 mL
Negative Fraction Bag	–	Substituir as bolsas originais do conjunto de tubos por bolsas de transferência de 1 000 mL	Substituir as bolsas originais do conjunto de tubos por bolsas de transferência de 1 000 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
Conjunto de transferência de plasma	–	1–2	3

Tabela 6.35: Materiais necessários para o empobrecimento de células CD4 positivas e CD8 positivas

▶ Preparação das bolsas

Determinar o peso da Cell Collection Bag e da Cell Preparation Bag vazias, tal como descrito na secção 7.1.1 na página 123.

Marcação magnética de células

Consultar a secção 7.1 "PASSO 1: Preparação das células e marcação magnética" na página 123 para uma descrição detalhada dos seguintes passos.

▶ Análise do produto celular inicial

▶ Transferência do produto celular inicial para a Cell Preparation Bag

▶ Diluição do produto celular inicial

Adicionar solução tampão: Peso da solução tampão a adicionar = peso do produto celular inicial × 2

▶ Centrifugação

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

▶ Ajuste do volume: volume da marcação 88 g (±5 g)

1. Remover o sobrenadante para ajustar a amostra mediante a seguinte equação: Peso do sobrenadante a remover = peso do produto celular diluído – volume da marcação
2. Ressuspender o pellet de células.

▶ Incubação com o CliniMACS CD4 Reagent e o CliniMACS CD8 Reagent

1. Adicionar 1 frasco de CliniMACS CD4 Reagent e 1 frasco de CliniMACS CD8 Reagent. Misturar o conteúdo cuidadosamente.
2. Incubar no rotador orbital (25 rpm) durante 30 minutos à TA.

▶ **Remoção do excesso de reagente**

1. Encher a Cell Preparation Bag com solução tampão.
2. Centrifugar (300×g, continuamente, 15 minutos, TA).
3. Remover o sobrenadante tanto quanto possível. **Nota:** Remover, pelo menos, 500 g de sobrenadante. Se o sobrenadante removido for inferior a 500 g, recomenda-se um total de dois passos de lavagem (em vez de apenas um). Caso contrário, a remoção de reagente não ligado pode ser insuficiente.
4. Ressuspender o pellet de células.
5. Ajustar o volume da amostra carregada para 100 g.

6.11.2 PASSO 2: Escolha do programa de separação

▶ **Ligar o CliniMACS Plus Instrument**

▶ **Escolha do programa de separação DEPLETION 2.1**

▶ **Introdução dos parâmetros da amostra**

Ver secção 7.2.5 na página 145.

6.11.3 PASSO 3: Instalação dos conjuntos de tubos CliniMACS

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

Ver secção 7.3.1 na página 156.

6.11.4 PASSO 4: Separação CliniMACS Plus

▶ **Procedimento de separação**

▶ **Desprender as bolsas e registar o código do processo**

▶ **Descarregar o conjunto de tubos e encerrar**

▶ **Análise das células**

Ver secção 7.4.4 na página 203.

6.12 Enriquecimento de células CD1c (BDCA-1) positivas – Parte 1: Empobrecimento de células CD19 positivas e marcação de células CD1c (BDCA-1) positivas

O sistema CliniMACS Plus CD1c (BDCA-1)-Biotin, incluindo o CliniMACS Plus Instrument, o CliniMACS CD1c (BDCA-1)-Biotin, o CliniMACS CD19 Reagent, o CliniMACS Anti-Biotin Reagent, o CliniMACS Tubing Set LS, o CliniMACS Tubing Set e o CliniMACS PBS/EDTA Buffer, destina-se ao enriquecimento *in vitro* de células humanas CD1c (BDCA-1) positivas provenientes de populações de células hematológicas heterogéneas após o empobrecimento das células CD19 positivas.

6.12.1 PASSO 1: Preparação das células e marcação magnética

Primeiras medidas necessárias

Capacidade da aplicação

Empobrecimento de até 5×10^9 células CD19 positivas e marcação de até $0{,}2\times10^9$ células CD1c (BDCA-1) positivas de até 40×10^9 células no total (WBC)

⚠ CUIDADO

Risco de desempenho de separação insuficiente das células marcadas. Se as especificações da aplicação forem excedidas, existe o risco de marcação específica insuficiente. Utilizar a quantidade necessária de células e reagente, tal como descrito na respetiva aplicação.

Materiais CliniMACS necessários

Material	Número de catálogo	Quantidade
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS CD1c (BDCA-1)-Biotin	277-01	1 frasco
CliniMACS CD19 Reagent	179-01	1 frasco
CliniMACS Tubing Set LS	162-01	1 conjunto de tubos
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	2× bolsas de 1 000 mL[1]

1 Antes da utilização, suplementar a solução tampão com HSA para uma concentração final de 0,5% (p/v).

Tabela 6.36: Materiais CliniMACS necessários para o enriquecimento de células CD1c (BDCA-1) positivas (Parte 1)

Outros materiais necessários (para Parte 1 e Parte 2)

- **Cell Preparation Bag:**
  Duas bolsas de transferência de 600 mL, indicadas para centrifugação, bem como dois acopladores do local de amostragem e três conjuntos de transferência de plasma, para utilizar durante os procedimentos de preparação das células
- **Plasma Waste Bags e Wash Waste Bags:**
  Cinco bolsas de transferência de 600 mL indicadas para centrifugação
- **Cell Collection Bag (Parte 1):**
  Uma bolsa de transferência de 600 mL, indicada para centrifugação, em combinação com um Luer/Spike Interconnector para ligar a Cell Collection Bag ao conjunto de tubos
- **Cell Collection Bag (Parte 2):**
  Uma bolsa de transferência de 150 mL, indicada para centrifugação, em combinação com umLuer/Spike Interconnector para ligar a bolsa de transferência ao conjunto de tubos
- Dois filtros pré-sistema
- Pinça de bloqueio
- Seringas (vários tamanhos) e agulhas hipodérmicas de calibre 20
- Albumina do soro humano (HSA) a adicionar ao CliniMACS PBS/EDTA Buffer para uma concentração final de 0,5% (p/v)
- Tubos de amostra

Marcação magnética de células (Parte 1)

Consultar a secção 7.1 "PASSO 1: Preparação das células e marcação magnética" na página 123 para uma descrição detalhada dos seguintes passos.

▶ Análise do produto celular inicial

▶ Transferência do produto celular inicial para a Cell Preparation Bag

▶ Diluição do produto celular inicial

Adicionar solução tampão: Peso da solução tampão a adicionar = peso do produto celular inicial × 2

▶ Centrifugação

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

▶ Ajuste do volume: volume da marcação 90 g (±5 g)

1. Ressuspender cuidadosamente o pellet de células depois de removido o sobrenadante.

2. Ajustar o peso da Cell Preparation Bag Parte 1 (CPB) adicionando solução tampão mediante a seguinte equação: Peso-alvo da CPB Parte 1 cheia = 90 g + peso da CPB vazia.
3. Ressuspender o pellet de células.

▶ **Incubação com o CliniMACS CD19 Reagent e o CliniMACS CD1c (BDCA-1)-Biotin**

1. Adicionar 1 frasco de CliniMACS CD19 Reagent e 1 frasco de CliniMACS CD1c (BDCA-1)-Biotin. Misturar o conteúdo cuidadosamente.
2. Incubar no rotador orbital (25 rpm) durante 30 minutos à TA.

▶ **Remoção do excesso de reagente**

1. Encher a Cell Preparation Bag Parte 1 com solução tampão.
2. Centrifugar (300×g, continuamente, 15 minutos, TA).
3. Remover o sobrenadante tanto quanto possível. **Nota:** Remover, pelo menos, 500 g de sobrenadante. Se o sobrenadante removido for inferior a 500 g, recomenda-se um total de dois passos de lavagem (em vez de apenas um). Caso contrário, a remoção de reagente não ligado pode ser insuficiente.
4. Ressuspender o pellet de células.
5. Ajustar o volume da amostra carregada para 100 g.

6.12.2 PASSO 2: Escolha do programa de separação

▶ **Ligar o CliniMACS Plus Instrument**

▶ **Escolha do programa de separação DEPLETION 2.1**

▶ **Introdução dos parâmetros da amostra**

Ver secção 7.2.5 na página 145.

6.12.3 PASSO 3: Instalação dos conjuntos de tubos CliniMACS

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

Ver secção 7.3.1 na página 156.

6.12.4 PASSO 4: Separação CliniMACS Plus

- **Procedimento de separação**
- **Desprender as bolsas e registar o código do processo**
- **Descarregar o conjunto de tubos e encerrar**
- **Análise das células**

Ver secção 7.4.4 na página 203.

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

O sistema CliniMACS Plus CD1c (BDCA-1)-Biotin, incluindo o CliniMACS Plus Instrument, o CliniMACS CD1c (BDCA-1)-Biotin, o CliniMACS CD19 Reagent, o CliniMACS Anti-Biotin Reagent, o CliniMACS Tubing Set LS, o CliniMACS Tubing Set e o CliniMACS PBS/EDTA Buffer, destina-se ao enriquecimento *in vitro* de células humanas CD1c (BDCA-1) positivas provenientes de populações de células hematológicas heterogéneas após o empobrecimento das células CD19 positivas.

6.13.1 PASSO 1: Preparação das células e marcação magnética

Primeiras medidas necessárias

Capacidade da aplicação

Até $0{,}2\times10^9$ células CD1c (BDCA-1) positivas de até 40×10^9 células no total (WBC)

⚠ CUIDADO

Risco de desempenho de separação insuficiente das células marcadas. Se as especificações da aplicação forem excedidas, existe o risco de marcação específica insuficiente. Utilizar a quantidade necessária de células e reagente, tal como descrito na respetiva aplicação.

Materiais CliniMACS necessários

Material	Número de catálogo	Quantidade
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS Anti-Biotin Reagent	173-01	1 frasco
CliniMACS Tubing Set	161-01	1 conjunto de tubos
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	3× bolsas de 1 000 mL[1]

1 Antes da utilização, suplementar a solução tampão com HSA para uma concentração final de 0,5% (p/v).

Tabela 6.37: Materiais CliniMACS necessários para o enriquecimento de células CD1c (BDCA-1) positivas (Parte 2)

Outros materiais necessários

Consultar a Parte 1 para outros materiais necessários.

▶ Preparação das bolsas

Determinar o peso da Cell Collection Bag e da Cell Preparation Bag vazias, tal como descrito na secção 7.1.1 na página 123.

Marcação magnética de células (produto celular empobrecido de CD19 [Parte 2])

Consultar a secção 7.1 "PASSO 1: Preparação das células e marcação magnética" na página 123 para uma descrição detalhada dos seguintes passos.

▶ Transferência do produto celular inicial empobrecido de CD19 para a Cell Preparation Bag Parte 2

▶ Diluição do produto celular inicial empobrecido de CD19

Adicionar solução tampão: Peso da solução tampão a adicionar = 600 g – peso do produto celular inicial empobrecido de CD19

▶ Centrifugação

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

▶ Ajuste do volume: volume da marcação 95 g (±5 g)

1. Remover o sobrenadante para ajustar a amostra mediante a seguinte equação: Peso do sobrenadante a remover = peso do produto celular diluído – volume da marcação
2. Ressuspender o pellet de células.

▶ **Incubação com o CliniMACS Anti-Biotin Reagent**

1. Adicionar 1 frasco de CliniMACS Anti-Biotin Reagent. Misturar o conteúdo cuidadosamente.
2. Incubar no rotador orbital (25 rpm) durante 30 minutos à TA.

▶ **Remoção do excesso de reagente**

1. Encher a Cell Preparation Bag Parte 2 com solução tampão.
2. Centrifugar (300×g, continuamente, 15 minutos, TA).
3. Remover o sobrenadante tanto quanto possível.
4. Ressuspender o pellet de células.
5. Encher a Cell Preparation Bag Parte 2 com solução tampão.
6. Centrifugar (300×g, continuamente, 15 minutos, TA).
7. Remover o sobrenadante tanto quanto possível.
8. Ressuspender o pellet de células.
9. Ajustar o volume da amostra carregada para 100 g.

6.13.2 PASSO 2: Escolha do programa de separação

▶ **Ligar o CliniMACS Plus Instrument**

▶ **Escolha do programa de separação ENRICHMENT 3.2**

Ver secção 7.2.4 na página 143.

6.13.3 PASSO 3: Instalação dos conjuntos de tubos CliniMACS

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

Ver secção 7.3.1 na página 156.

6.13.4 STEP 4: Separação CliniMACS Plus

- **Procedimento de separação**
- **Desprender as bolsas e registar o código do processo**
- **Descarregar o conjunto de tubos e encerrar**
- **Análise das células**

Ver secção 7.4.3 na página 199.

6.14 Enriquecimento de células CD304 (BDCA-4) positivas

O sistema CliniMACS Plus CD304 (BDCA-4), incluindo o CliniMACS Plus Instrument, o CliniMACS CD304 (BDCA-4) Reagent, o CliniMACS Tubing Set e o CliniMACS PBS/EDTA Buffer, destina-se ao enriquecimento *in vitro* de células humanas CD304 (BDCA-4) positivas provenientes de populações de células hematológicas heterogéneas.

6.14.1 PASSO 1: Preparação das células e marcação magnética

Primeiras medidas necessárias

Capacidade da aplicação

Até $0{,}2\times10^9$ células CD304 (BDCA-4) positivas de até 40×10^9 células no total (WBC)

⚠ CUIDADO

Risco de desempenho de separação insuficiente das células marcadas. Se as especificações da aplicação forem excedidas, existe o risco de marcação específica insuficiente. Utilizar a quantidade necessária de células e reagente, tal como descrito na respetiva aplicação.

Materiais CliniMACS necessários

Material	Número de catálogo	Quantidade
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS CD304 (BDCA-4) Reagent	278-01	1 frasco
CliniMACS Tubing Set	161-01	1 conjunto de tubos
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	4× bolsas de 1 000 mL[1]

1 Antes da utilização, suplementar o CliniMACS PBS/EDTA Buffer com HSA para uma concentração final de 0,5% (p/v).

Tabela 6.38: Materiais CliniMACS necessários para o enriquecimento de células CD304 (BDCA-4) positivas

Outros materiais necessários

- **Cell Preparation Bag:**
  Uma bolsa de transferência de 600 mL, indicada para centrifugação, bem como um acoplador do local de amostragem e três conjuntos de transferência de plasma, para utilizar durante os procedimentos de preparação das células
- **Plasma Waste Bags e Wash Waste Bags:**
  Cinco bolsas de transferência de 600 mL indicadas para centrifugação
- **Cell Collection Bag:**
  Uma bolsa de transferência de 150 mL em combinação com um Luer/Spike Interconnector para ligar a Cell Collection Bag ao conjunto de tubos
- Um filtro pré-sistema
- Pinça de bloqueio
- Seringas (vários tamanhos) e agulhas hipodérmicas de calibre 20
- Albumina do soro humano (HSA) a adicionar ao CliniMACS PBS/EDTA Buffer para uma concentração final de 0,5% (p/v)
- Tubos de amostra

▶ Preparação das bolsas

Determinar o peso da Cell Collection Bag e da Cell Preparation Bag vazias, tal como descrito na secção 7.1.1 na página 123.

Marcação magnética de células

Consultar a secção 7.1 "PASSO 1: Preparação das células e marcação magnética" na página 123 para uma descrição detalhada dos seguintes passos.

▶ Análise do produto celular inicial

▶ Transferência do produto celular inicial para a Cell Preparation Bag

Diluição do produto celular inicial empobrecido

Adicionar solução tampão: Peso da solução tampão a adicionar = 600 g – peso do produto celular inicial

Centrifugação

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

Repetir os passos "Diluição do produto celular inicial" e "Centrifugação" duas vezes

1. Encher uma bolsa de transferência até 600 g
2. Centrifugar a 300×g, continuamente, 15 minutos, temperatura ambiente (TA: +19 a +25 °C [+66 a +77 °F]).
3. Remover o sobrenadante.

Ajuste do volume: volume da marcação 95 g (±5 g)

1. Remover completamente o sobrenadante tendo o cuidado de não ressuspender o pellet de células.
2. Ressuspender cuidadosamente o pellet de células depois de removido o sobrenadante.
3. Ajustar o peso da Cell Preparation Bag (CPB) adicionando solução tampão mediante a seguinte equação: Peso-alvo da CPB cheia = 95 g + peso da CPB vazia.
4. Ressuspender o pellet de células.

Incubação com o CliniMACS CD304 (BDCA-4) Reagent

1. Adicionar 1 frasco de CliniMACS CD304 (BDCA-4) Reagent. Misturar o conteúdo cuidadosamente.
2. Incubar no rotador orbital (25 rpm) durante 30 minutos à TA.

Remoção do excesso de reagente

1. Encher a Cell Preparation Bag com solução tampão.
2. Centrifugar (300×g, continuamente, 15 minutos, TA).
3. Remover o sobrenadante tanto quanto possível.
4. Ressuspender o pellet de células.
5. Ajustar o volume da amostra carregada para 100 g.

6.14.2 PASSO 2: Escolha do programa de separação

- **Ligar o CliniMACS Plus Instrument**
- **Escolha do programa de separação ENRICHMENT 3.2**

Ver secção 7.2.4 na página 143.

6.14.3 PASSO 3: Instalação dos conjuntos de tubos CliniMACS

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

Ver secção 7.3.1 na página 156.

6.14.4 PASSO 4: Separação CliniMACS Plus

- **Procedimento de separação**
- **Desprender as bolsas e registar o código do processo**
- **Descarregar o conjunto de tubos e encerrar**
- **Análise das células**

Ver secção 7.4.3 na página 199.

6.15 Empobrecimento de células TCRα/β positivas

O sistema CliniMACS Plus TCRα/β-Biotin, incluindo o CliniMACS Plus Instrument, o CliniMACS TCRα/β-Biotin, o CliniMACS Anti-Biotin Reagent, o CliniMACS Depletion Tubing Set e o CliniMACS PBS/EDTA Buffer, destina-se ao empobrecimento *in vitro* de células TCRα/β positivas provenientes de populações de células hematológicas heterogéneas.

6.15.1 PASSO 1: Preparação das células e marcação magnética

Primeiras medidas necessárias

Capacidade da aplicação

Até 24×10^9 células TCRα/β positivas de até 60×10^9 células no total (WBC)

⚠ CUIDADO

Risco de desempenho de separação insuficiente das células marcadas. Se as especificações da aplicação forem excedidas, existe o risco de marcação específica insuficiente. Utilizar a quantidade necessária de células e reagente, tal como descrito na respetiva aplicação.

Materiais CliniMACS necessários

Material	Número de catálogo	Quantidade
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS TCRα/β-Biotin	701-48	1 frasco
CliniMACS Anti-Biotin Reagent	173-01	2 frascos
CliniMACS Depletion Tubing Set	261-01	1 conjunto de tubos
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	Até 4× bolsas de 1 000 mL[1]

1 Antes da utilização, suplementar o CliniMACS PBS/EDTA Buffer com HSA para uma concentração final de 0,5% (p/v).

Tabela 6.39: Materiais CliniMACS necessários para o empobrecimento de células TCRα/β positivas

Outros materiais necessários

- **Cell Preparation Bag:**
  Uma bolsa de transferência de 600 mL, indicada para centrifugação, bem como um acoplador do local de amostragem e dois conjuntos de transferência de plasma, para utilizar durante o procedimento de preparação das células
- **Plasma Waste Bags e Wash Waste Bags:**
  Quatro bolsas de transferência de 600 mL (ou de 1 000 mL) indicadas para centrifugação
- **Cell Collection Bag:**
  Uma Cell Collection Bag de 600 mL já se encontra montada no CliniMACS Depletion Tubing Set.
- Um filtro pré-sistema
- Pinça de bloqueio
- Seringas (vários tamanhos) e agulhas hipodérmicas de calibre 20
- Albumina do soro humano (HSA) a adicionar ao CliniMACS PBS/EDTA Buffer para uma concentração final de 0,5% (p/v)
- Tubos de amostra

▶ Preparação das bolsas

Determinar o peso da Cell Collection Bag e da Cell Preparation Bag vazias, tal como descrito na secção 7.1.1 na página 123.

Marcação magnética de células

Consultar a secção 7.1 "PASSO 1: Preparação das células e marcação magnética" na página 123 para uma descrição detalhada dos seguintes passos.

▶ Análise do produto celular inicial

Determinar a percentagem/o número total de todas as células TCRα/β marcadas (incluindo ligação TCRα/β não-específica, não apenas células TCRα/β positivas efetivas). Considerar este número para as especificações da aplicação e a introdução de parâmetros da amostra (ver PASSO 2).

▶ Transferência do produto celular inicial para a Cell Preparation Bag

▶ Diluição do produto celular inicial

Adicionar solução tampão: Peso da solução tampão a adicionar = peso do produto celular inicial × 2

▶ Centrifugação

1. Centrifugar a 200×g, continuamente, 15 minutos, temperatura ambiente (TA: +19 a +25 °C [+66 a +77 °F]).
2. Remover o sobrenadante.

▶ Ajuste do volume: volume da marcação 95 g (±5 g)

1. Remover completamente o sobrenadante tendo o cuidado de não ressuspender o pellet de células.
2. Ressuspender cuidadosamente o pellet de células depois de removido o sobrenadante.
3. Ajustar o peso da Cell Preparation Bag (CPB) adicionando solução tampão mediante a seguinte equação: Peso-alvo da CPB cheia = 95 g + peso da CPB vazia.
4. Ressuspender o pellet de células.

▶ Marcação das células: incubação com o CliniMACS TCRα/β-Biotin

1. Adicionar 1 frasco de CliniMACS TCRα/β-Biotin. Misturar o conteúdo cuidadosamente.
2. Incubar no rotador orbital (25 rpm) durante 30 minutos à TA.

▶ **Remoção do excesso de conjugado: repetir este passo**

1. Encher a Cell Preparation Bag com solução tampão.
2. Centrifugar (300×g, continuamente, 15 minutos, TA).
3. Remover o sobrenadante tanto quanto possível.
4. Ressuspender o pellet de células e ajustar o peso para 190 g após a segunda lavagem.

▶ **Marcação magnética das células: incubação com o CliniMACS Anti-Biotin Reagent**

1. Adicionar 2 frascos de CliniMACS Anti-Biotin Reagent. Misturar o conteúdo cuidadosamente.
2. Incubar no rotador orbital (25 rpm) durante 30 minutos à TA.

▶ **Remoção do excesso de reagente**

1. Encher a Cell Preparation Bag com solução tampão.
2. Centrifugar (300×g, continuamente, 15 minutos, TA).
3. Remover o sobrenadante tanto quanto possível. **Nota**: Remover, pelo menos, 500 g de sobrenadante. Se o sobrenadante removido for inferior a 500 g, recomenda-se um total de dois passos de lavagem (em vez de apenas um). Caso contrário, a remoção de reagente não ligado pode ser insuficiente.
4. Ressuspender o pellet de células.
5. Ajustar o volume da amostra carregada para 150 g. Recomenda-se uma concentração máxima de WBC de $0{,}4\times10^9$ WBC/mL.

6.15.2 PASSO 2: Escolha do programa de separação

▶ **Ligar o CliniMACS Plus Instrument**

▶ **Escolha do programa de separação DEPLETION 3.1**

▶ **Introdução dos parâmetros da amostra**

Ver secção 7.2.6 na página 150.

6.15.3 PASSO 3: Instalação dos conjuntos de tubos CliniMACS

▶ **CliniMACS Depletion Tubing Set**

Ver secção 7.3.3 na página 176.

6.15.4 PASSO 4: Separação CliniMACS Plus

- **Procedimento de separação**
- **Desprender as bolsas e registar o código do processo**
- **Descarregar o conjunto de tubos e encerrar**
- **Análise das células**

Ver secção 7.4.5 na página 207.

6.16 Empobrecimento de células CD45RA positivas

O sistema CliniMACS Plus CD45RA, incluindo o CliniMACS Plus Instrument, o CliniMACS CD45RA Reagent, o CliniMACS Depletion Tubing Set e o CliniMACS PBS/EDTA Buffer, destina-se ao empobrecimento *in vitro* de células humanas CD45RA positivas provenientes de populações de células hematológicas heterogéneas.

6.16.1 PASSO 1: Preparação das células e marcação magnética

Primeiras medidas necessárias

Capacidade da aplicação

Até 20×10^9 células CD45RA positivas de até 50×10^9 células no total (WBC)

⚠ CUIDADO

Risco de desempenho de separação insuficiente das células marcadas. Se as especificações da aplicação forem excedidas, existe o risco de marcação específica insuficiente. Utilizar a quantidade necessária de células e reagente, tal como descrito na respetiva aplicação.

Materiais CliniMACS necessários

Material	Número de catálogo	Quantidade
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS CD45RA Reagent	701-46	1 frasco
CliniMACS Depletion Tubing Set	261-01	1 conjunto de tubos
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	3× bolsas de 1 000 mL[1]

1 Antes da utilização, suplementar o CliniMACS PBS/EDTA Buffer com HSA para uma concentração final de 0,5% (p/v).

Tabela 6.40: Materiais CliniMACS necessários para o empobrecimento de células CD45RA positivas

Outros materiais necessários

- **Cell Preparation Bags:**
  Uma bolsa de transferência de 600 mL, indicada para centrifugação, bem como um acoplador do local de amostragem e dois conjuntos de transferência de plasma, para utilizar durante o procedimento de preparação das células
- **Plasma Waste Bags e Wash Waste Bags:**
  Duas bolsas de transferência de 600 mL indicadas para centrifugação
- **Cell Collection Bag:**
  Uma Cell Collection Bag de 600 mL já se encontra montada no CliniMACS Depletion Tubing Set.
- Um filtro pré-sistema
- Pinça de bloqueio
- Seringas (vários tamanhos) e agulhas hipodérmicas de calibre 20
- Albumina do soro humano (HSA) a adicionar ao CliniMACS PBS/EDTA Buffer para uma concentração final de 0,5% (p/v)
- Tubos de amostra

IMPORTANTE

Uma fonte alternativa de células iniciais pode ser a fração celular não-alvo de uma separação CliniMACS Plus CD34. A utilização do CliniMACS CD45RA Reagent é apenas recomendada para produtos celulares iniciais contendo células CD45RA positivas dentro do intervalo de frequência normal (até 80%). Foram observadas frequências mais elevadas em alguns dadores em que o CD45RA é expresso por quase todas as PBMC devido a uma mutação rara no gene CD45. Nesses casos, a eficiência do empobrecimento e/ou a recuperação podem tornar-se inadequadas.

▶ Preparação das bolsas

Determinar o peso da Cell Collection Bag e da Cell Preparation Bag vazias, tal como descrito na secção 7.1.1 na página 123.

Marcação magnética de células

Consultar a secção 7.1 "PASSO 1: Preparação das células e marcação magnética" na página 123 para uma descrição detalhada dos seguintes passos.

▶ Análise do produto celular inicial

Determinar a percentagem/o número total de todas as células CD45RA marcadas (incluindo ligação CD45RA não-específica, não apenas células CD45RA positivas efetivas). Considerar este número para as especificações da aplicação e a introdução de parâmetros da amostra (ver PASSO 2).

▶ Transferência do produto celular inicial para a Cell Preparation Bag

▶ Diluição do produto celular inicial empobrecido

Adicionar solução tampão: Peso da solução tampão a adicionar = peso do produto celular inicial × 2

▶ Centrifugação

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

Se for utilizada a fração celular não-alvo de uma separação CliniMACS CD34 como fonte alternativa de células iniciais, o passo de diluição pode ser ignorado. Continuar com o passo de centrifugação e centrifugar as células a 300×g (continuamente) durante 15 minutos à TA.

▶ Ajuste do volume: volume da marcação 95 g (±5 g)

1. Remover completamente o sobrenadante tendo o cuidado de não ressuspender o pellet de células.
2. Ressuspender cuidadosamente o pellet de células depois de removido o sobrenadante.
3. Ajustar o peso da Cell Preparation Bag (CPB) adicionando solução tampão mediante a seguinte equação: Peso-alvo da CPB cheia = 95 g + peso da CPB vazia.
4. Ressuspender o pellet de células.

▶ Incubação com o CliniMACS CD45RA Reagent

1. Adicionar 1 frasco de CliniMACS CD45RA Reagent. Misturar o conteúdo cuidadosamente.
2. Incubar no rotador orbital (25 rpm) durante 30 minutos à TA.

▶ Remoção do excesso de reagente

1. Encher a Cell Preparation Bag com solução tampão.
2. Centrifugar (300×g, continuamente, 15 minutos, TA).

3. Remover o sobrenadante tanto quanto possível. **Nota**: Remover, pelo menos, 500 g de sobrenadante. Se o sobrenadante removido for inferior a 500 g, recomenda-se um total de dois passos de lavagem (em vez de apenas um). Caso contrário, a remoção de reagente não ligado pode ser insuficiente.
4. Ressuspender o pellet de células.
5. Ajustar o volume da amostra carregada. Calcular o peso de solução tampão necessária para ajustar o peso da suspensão de células para cerca de 125 g. A concentração de células não deve exceder $0{,}4\times10^9$ WBC/mL: Peso da solução tampão a adicionar (g) = 125 g – peso do produto celular após a lavagem (g)

6.16.2 PASSO 2: Escolha do programa de separação

- **Ligar o CliniMACS Plus Instrument**
- **Escolha do programa de separação DEPLETION 3.1**
- **Introdução dos parâmetros da amostra**

Ver secção 7.2.6 na página 150.

6.16.3 PASSO 3: Instalação dos conjuntos de tubos CliniMACS

- **CliniMACS Depletion Tubing Set**

Ver secção 7.3.3 na página 176.

6.16.4 PASSO 4: Separação CliniMACS Plus

- **Procedimento de separação**
- **Desprender as bolsas e registar o código do processo**
- **Descarregar o conjunto de tubos e encerrar**
- **Análise das células**

Ver secção 7.4.5 na página 207.

6.17 Enriquecimento de células humanas secretoras de IFN-gama com o CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma)

O sistema CliniMACS Plus CCS (IFN-gamma), incluindo o CliniMACS Plus Instrument, o CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma), o CliniMACS Tubing Set e o CliniMACS PBS/EDTA Buffer, destina-se ao enriquecimento *in vitro* de células humanas secretoras de IFN-gama provenientes de populações de células hematológicas heterogéneas.

6.17.1 PASSO 1: Preparação das células e marcação magnética

Primeiras medidas necessárias

Capacidade da aplicação

Células secretoras de IFN-gama de até 1×10^9 células no total (WBC)

⚠ CUIDADO

Risco de desempenho de separação insuficiente das células marcadas. Se as especificações da aplicação forem excedidas, existe o risco de marcação específica insuficiente. Utilizar a quantidade necessária de células e reagente, tal como descrito na respetiva aplicação.

Materiais CliniMACS necessários

Material	Número de catálogo	Quantidade
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma)	279-01	1 conjunto
CliniMACS Tubing Set	161-01	1 conjunto de tubos
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	3× bolsas de 1 000 mL[1]

1 Antes da utilização, suplementar o CliniMACS PBS/EDTA Buffer com HSA para uma concentração final de 0,5% (p/v).

Tabela 6.41: Materiais CliniMACS necessários para o enriquecimento de células humanas secretoras de IFN-gama

IMPORTANTE

Armazenar a solução tampão para preparação das células no frio entre +2 e +8 °C (+36 a +46 °F). Temperaturas ambiente superiores ou inferiores podem resultar em menor pureza e menor rendimento das células-alvo.

Outros materiais necessários

- **Cell Preparation Bags:**
  Duas bolsas de transferência de 600 mL, indicadas para centrifugação, bem como dois acopladores do local de amostragem e dois conjuntos de transferência de plasma, para utilizar durante os procedimentos de preparação das células
- **Plasma Waste Bags e Wash Waste Bags:**
  Nove bolsas de transferência de 600 mL indicadas para centrifugação
- **Bolsa de meio:**
  Oito bolsas de transferência de 600 mL indicadas para centrifugação
- **Cell Collection Bag (Parte 2):**
  Uma bolsa de transferência de 150 mL, indicada para centrifugação, em combinação com um Luer/Spike Interconnector para ligar a bolsa de transferência ao conjunto de tubos
- Uma bolsa de cultura de células permeável ao gás de 100 mL
- Um filtro pré-sistema
- Pinça de bloqueio
- Seringas (vários tamanhos) e agulhas hipodérmicas de calibre 20
- Albumina do soro humano (HSA) a adicionar ao CliniMACS PBS/EDTA Buffer para uma concentração final de 0,5% (p/v)
- Tubos de amostra
- 120 mL de soro AB ou, em alternativa, soro autólogo, como suplemento ao meio utilizado
- 1 000 mL de meio de cultura de células (RPMI 1640), +4 °C (+39 °F)
- 1 100 mL de meio de cultura de células (RPMI 1640), +37 °C (+99 °F) suplementado com 10% (v/v) de soro AB ou, em alternativa, soro autólogo
- 500 mL de meio de cultura de células (RPMI 1640), +4 °C (+39 °F) suplementado com 2% (v/v) de soro AB ou, em alternativa, soro autólogo

▶ Equipamento necessário

Para informações sobre o equipamento necessário para uma separação CliniMACS Plus, ver a secção 4.7.

Equipamento adicional necessário para uma aplicação com o sistema CliniMACS Plus CCS (IFN-gamma):

- Placa de cultura de 24 poços
- MiniMACS Separation Unit
- MS Columns
- Pre-Separation Filter (apenas para MS Columns)
- MACSmix Tube Rotator

▶ Preparação das bolsas

Determinar o peso da Cell Collection Bag e da Cell Preparation Bag vazias, tal como descrito na secção 7.1.1 na página 123.

Nota: Pré-arrefecer a centrífuga para +4 °C (+39 °F). Depois da fase de secreção, é necessária uma terceira Cell Preparation Bag para recombinar as suspensões de células. Por isso, rotular uma das quatro bolsas de transferência de 600 mL (preparada com 125 mL de meio (RPMI) suplementado com soro AB a 10%) como **Preparação de células n.º 3 (separação)**.

Preparação do produto celular inicial

As secções seguintes descrevem o procedimento dentro da bolsa recomendado para a preparação do produto celular inicial com o conector de tubos estéril.

- O operador tem de estar familiarizado com a operação e a utilização do conector de tubos estéril.
- Antes de iniciar a marcação das células e o procedimento de separação, confirmar se estão disponíveis todos os consumíveis e equipamentos.

Transferência do produto celular inicial para a Cell Preparation Bag n.º 1

1. Registar a data e a hora de início antes de começar a preparação do produto celular inicial.
2. Determinar o volume do produto celular inicial original estimando 1 mL do produto original como equivalente a 1 g (1 g ≙ 1 mL).
3. Segurando com as duas mãos na bolsa com o produto celular inicial, misturar bem o conteúdo com um suave movimento rotativo.
4. Com o conector de tubos estéril, ligar a Cell Preparation Bag n.º 1 à bolsa com o produto celular inicial.
5. Abrir a pinça de bloqueio para transferir o peso adequado do produto celular inicial (com um máximo de 1×10^9 células, de acordo com a frequência de leucócitos anteriormente determinada) para a Cell Preparation Bag n.º 1. Verificar visualmente (monitorizando a balança) se foi transferido o peso adequado. Fechar a pinça de bloqueio junto à Cell Preparation Bag.

6. Selar o tubo e separar as bolsas, deixando, pelo menos, 15 cm do tubo na Cell Preparation Bag n.º 1 para outras ligações (ver Figura 6.1). Utilizar o selador térmico para produzir três selagens adjacentes no tubo. Verificar se as selagens ficaram em condições. Separar na selagem central. Manter a bolsa que continha o produto celular inicial até à conclusão da separação e da análise final de todas as células.

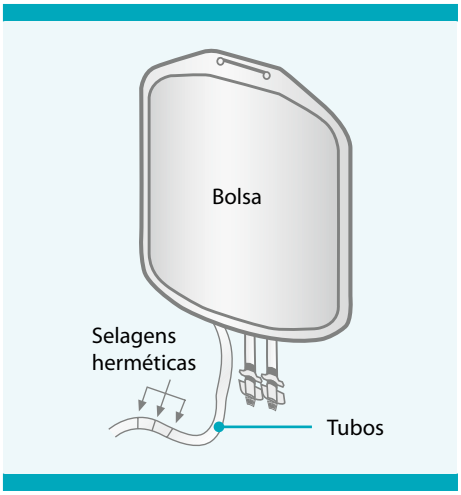


Figura 6.1: Selagem de uma bolsa

7. Tarar a balança. Colocar a Cell Preparation Bag n.º 1 cheia na balança e o tubo sobre a mesa. Registar o peso da Cell Preparation Bag n.º 1 cheia.

8. Determinar o peso do produto celular inicial subtraindo o peso da Cell Preparation Bag n.º 1 vazia do peso da Cell Preparation Bag n.º 1 cheia de produto celular inicial original. Registar o peso calculado.

Peso do produto celular inicial (g)	=	Peso da Cell Preparation Bag n.º 1 (g) cheia	–	Peso da Cell Preparation Bag n.º 1 (g) vazia

Diluição do produto celular inicial

O produto celular inicial tem de ser diluído com meio de cultura. Diluir o produto com meio frio (+2 a +8 °C [+36 a +46 °F]) até um volume total de 500 mL. Calcular o peso do meio a adicionar mediante a seguinte equação, e registar o mesmo.

Peso do meio a adicionar (g)	=	500 g	–	Peso do produto celular inicial diluído (g)

1. Tomar uma das bolsas de meio e ligar à Cell Preparation Bag n.º 1 com o conector de tubos estéril.

2. Colocar a Cell Preparation Bag n.º 1 na balança e tarar a balança. Suspender a bolsa de meio num suporte da bolsa.

3. Abrir a pinça de bloqueio junto à Cell Preparation Bag n.º 1. Monitorizando visualmente a escala na balança, transferir o peso calculado do meio para a Cell Preparation Bag n.º 1.

4. Uma vez transferido o peso adequado de meio, fechar a pinça de bloqueio junto à Cell Preparation Bag n.º 1 para parar o fluxo de líquido.

5. Com o selador térmico, selar o tubo deixando, pelo menos, 15 cm do tubo na Cell Preparation Bag n.º 1 para outras ligações. Desprender a bolsa de meio.

6. Segurando com as duas mãos na Cell Preparation Bag n.º 1, misturar bem o conteúdo com um suave movimento rotativo. Evitar uma mistura intensiva das células.

7. Tarar a balança e pesar a Cell Preparation Bag n.º 1 cheia. Registar o peso.
8. Determinar o peso do produto celular inicial diluído subtraindo o peso da Cell Preparation Bag n.º 1 vazia do peso da Cell Preparation Bag n.º 1 cheia. Registar o peso calculado.

Peso do produto celular inicial diluído (g)	=	Peso da Cell Preparation Bag n.º 1 (g) cheia	–	Peso da Cell Preparation Bag n.º 1 (g) vazia

⚠ ADVERTÊNCIA

Risco de contaminação. Se as bolsas não forem indicadas para a preparação das células ou se não forem corretamente colocadas no copo da centrífuga, existe o risco de contaminação devido a danos nas bolsas. Utilizar bolsas adequadas, dobrar para baixo todas as partes soltas das bolsas ou dos tubos, tendo o cuidado de não interferir na integridade das bolsas, e colocar as bolsas de forma segura no copo da centrífuga.

⚠ CUIDADO

Risco de menor desempenho da separação de células. Se as bolsas não ficarem corretamente colocadas no copo da centrífuga, existe o risco de se perderem células ao remover o sobrenadante. Dobrar para baixo todas as partes soltas das bolsas ou dos tubos e colocar as bolsas de forma segura no copo da centrífuga.

Centrifugação

1. Com o conector de tubos estéril, ligar a Plasma Waste Bag n.º 1 vazia à Cell Preparation Bag n.º 1.
2. Dobrar para baixo todas as partes soltas da Cell Preparation Bag n.º 1 ou dos tubos. Colocar as duas bolsas de forma segura no copo da centrífuga.
3. Equilibrar o copo carregado com um copo com o peso aferido. É essencial que a centrífuga seja equilibrada com exatidão.
4. Centrifugar as células a 200×g (continuamente) durante 10 minutos à temperatura ambiente (+19 a +25 °C [+66 a +77 °F]).
5. Remover as bolsas da centrífuga, tendo o cuidado de não perturbar o pellet de células. Carregar a Cell Preparation Bag n.º 1 no extrator de plasma.
6. Abrir a pinça de bloqueio junto à Cell Preparation Bag n.º 1. Remover completamente o sobrenadante tendo o cuidado de não ressuspender o pellet de células durante o procedimento. Uma vez removido o sobrenadante, fechar a pinça de bloqueio junto à Cell Preparation Bag n.º 1 para parar o fluxo de líquido.
7. Com o selador térmico, selar o tubo deixando, pelo menos, 15 cm do tubo na Cell Preparation Bag n.º 1 para outras ligações. Desprender a Plasma Waste Bag n.º 1.
8. Repetir a diluição e a centrifugação com a segunda bolsa de meio preparada com meio frio e a Plasma Waste Bag n.º 2.

9. Manter as Plasma Waste Bags até à conclusão da separação e da análise final de todas as células.

Ajuste do volume

1. Para a reestimulação *in vitro* das células, o volume da amostra de células tem de ser ajustado para 100 mL. Uma vez removido o sobrenadante, ressuspender o pellet cuidadosamente.

2. Ajustar o peso da Cell Preparation Bag n.º 1 adicionando meio de cultura. Calcular o peso do meio a adicionar, mediante a seguinte equação:

Peso da Cell Preparation Bag n.º 1 depois do ajuste do volume (g)	=	100 g	+	Peso da Cell Preparation Bag n.º 1 (g) vazia

3. Com o conector de tubos estéril, ligar a Cell Preparation Bag n.º 1 à Medium Bag 10% preparada (contendo 600 mL de meio de cultura pré-aquecido suplementado com soro AB a 10%). Suspender a Medium Bag 10% num suporte da bolsa.

4. Tarar a balança. Colocar a Cell Preparation Bag n.º 1 com o pellet de células na balança.

5. Abrir a pinça de bloqueio junto à Cell Preparation Bag n.º 1. Encher a Cell Preparation Bag n.º 1 com meio até se alcançar o "Peso da Cell Preparation Bag n.º 1 após o ajuste do volume" calculado. Fechar a pinça de bloqueio junto à Cell Preparation Bag n.º 1 para parar o fluxo de líquido.

6. Com o selador térmico, selar o tubo deixando, pelo menos, 15 cm do tubo na Cell Preparation Bag para outras ligações. Desprender a Medium Bag 10%.

7. Com o conector de tubos estéril, ligar a Cell Preparation Bag n.º 1 cheia a uma bolsa de cultura permeável ao gás de 100 mL. Abrir a pinça de bloqueio junto à Cell Preparation Bag n.º 1 e transferir todo o conteúdo.

⚠ CUIDADO

Risco de menor desempenho. Se as bolsas não forem indicadas para a preparação das células, existe o risco de contaminação devido a danos nas bolsas. Utilizar bolsas de cultura permeáveis ao gás indicadas para a preparação das células.

Marcação de células

Um CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma), consistindo em dois frascos (de 7,5 mL cada), está pronto a utilizar e é suficiente para uma aplicação tal como abaixo descrito. Os reagentes não se destinam a administração parenteral.

Amostra-alvo e amostra de controlo

O protocolo descreve o procedimento de marcação da "amostra-alvo" e da "amostra de controlo". As duas amostras são processadas em paralelo, sendo a amostra de controlo tratada exatamente da mesma forma que a amostra-alvo, mas sem adição do antigénio. Por isso, a análise da amostra de controlo fornece informações sobre a secreção espontânea de citocinas.

Reestimulação *in vitro*

IMPORTANTE

- Para aferir a secreção espontânea de citocinas, deve ser incluída uma pequena amostra de controlo negativo (amostra de controlo), tratada exatamente da mesma forma que a amostra-alvo estimulada com antigénio, mas sem adição de antigénio.
- Para a reestimulação *in vitro*, a densidade ideal das células é de 0,5–1×10^9 células/cm^2 e de 1×10^9 células/mL.

1. Com uma seringa estéril (1 mL) com uma agulha de calibre 20, colher uma pequena alíquota (p. ex., 1 mL = aprox. 1×10^9 células) das células para servir de **amostra de controlo (não estimulada)**.
2. Cultivar a alíquota em condições ideais num poço de uma placa de cultura de 24 poços.
3. Com uma seringa, injetar o antigénio nas células na bolsa de cultura permeável ao gás **(amostra-alvo)** numa concentração predeterminada através de uma das portas.
4. Incubar as duas amostras a +37 °C (+99 °F) e 5–7,5% CO^2 durante um tempo adequado na incubadora. Se forem utilizadas proteínas ou lisados de células como antigénios, o tempo de incubação situa-se entre 4 e 16 horas. Para os peptídeos, o tempo de incubação situa-se entre 3 e 6 horas. Dado que o tempo de estimulação ideal é influenciado pelas características específicas do antigénio, para os melhores resultados, a Miltenyi Biotec recomenda a execução de procedimentos de validação próprios.

Marcação com o CliniMACS IFN-gamma Catchmatrix Reagent

Registar o número do lote e a data de validade do CliniMACS IFN-gamma Catchmatrix Reagent.

Amostra-alvo

IMPORTANTE

Para a fase de secreção, deve optar-se por um recipiente de tamanho suficiente para permitir a adição de, pelo menos, 1 volume de solução tampão fria no final da fase de secreção. A densidade das células não pode exceder 1×10^6 células/mL. Por isso, 1×10^9 células têm de ser incubadas para a secreção num total de 1 000 mL de meio de cultura tépido.

1. Utilizar o conector de tubos estéril para ligar a bolsa de cultura à Cell Preparation Bag n.º 2 (secreção) e transferir as células. Verificar se todas as células foram transferidas para a Cell Preparation Bag n.º 2. Fechar a pinça de bloqueio junto à Cell Preparation Bag n.º 2 para parar o fluxo de líquido.
2. Com o selador térmico, selar o tubo deixando, pelo menos, 15 cm do tubo na Cell Preparation Bag n.º 2 para outras ligações. Desprender a bolsa de cultura vazia.
3. Utilizar o conector de tubos estéril para ligar a Medium Bag 2% preparada (contendo 500 mL de meio de cultura frio (+2 a +8 °C [+36 a +46 °F]) suplementado com soro AB a 2%) à Cell Preparation Bag n.º 2.
4. Abrir a pinça de bloqueio junto à Cell Preparation Bag n.º 2. Encher a Cell Preparation Bag n.º 2 até 600 mL. Uma vez transferido o peso adequado de meio, fechar a pinça de bloqueio junto à Cell Preparation Bag n.º 2 para parar o fluxo de líquido.
5. Com o selador térmico, selar o tubo deixando, pelo menos, 15 cm do tubo na Cell Preparation Bag n.º 2 para outras ligações. Desprender a Medium Bag 2%.
6. Utilizar o selador térmico para ligar a Wash Waste Bag n.º 1 vazia à Cell Preparation Bag n.º 2.
7. Dobrar para baixo todas as partes soltas da bolsa ou dos tubos. Colocar as duas bolsas de forma segura no copo da centrífuga.
8. Equilibrar o copo carregado com um copo com o peso aferido. É essencial que a centrífuga seja equilibrada com exatidão.
9. Centrifugar as células a 300×g (continuamente) durante 10 minutos entre +4 a +8 °C (+39 a +46 °F).
10. Colocar a Cell Preparation Bag n.º 2 no extrator de plasma. Abrir a pinça de bloqueio junto à Cell Preparation Bag n.º 2. Remover completamente o sobrenadante tendo o cuidado de não perturbar o pellet de células. Fechar a pinça de bloqueio junto à Cell Preparation Bag n.º 2 para parar o fluxo de líquido.
11. Com o selador térmico, selar o tubo deixando, pelo menos, 15 cm do tubo na Cell Preparation Bag n.º 2 para outras ligações. Desprender a Wash Waste Bag n.º 1.
12. Ressuspender o pellet de células no volume residual depois de removido o sobrenadante.
13. Fixar um acoplador do local de amostragem à Cell Preparation Bag n.º 2 e desinfetar o septo. Utilizar uma seringa estéril adequada e uma agulha para remover 7,425 mL do frasco de CliniMACS IFN-gamma Catchmatrix Reagent. Basta uma seringa de 10 mL para remover o conteúdo de um frasco de reagente. A seringa deve ter uma agulha de calibre 20.
14. Segurando com as duas mãos na Cell Preparation Bag n.º 2, misturar bem o conteúdo com um suave movimento rotativo.

15. Utilizando o orifício de injeção do acoplador do local de amostragem, injetar todo o volume do reagente na Cell Preparation Bag n.º 2. Cuidado para não furar a bolsa.

16. Ressuspender as células e incubar durante 5 minutos em gelo. Registar o tempo de incubação.

Amostra de controlo (não estimulada)

1. Transferir as células para um tubo de 15 mL que possa ser fechado.

2. Adicionar meio de cultura frio (+2 a +8 °C [+36 a +46 °F]) suplementado com 2% de soro AB até perfazer 15 mL.

3. Centrifugar as células a 300×g (continuamente) durante 10 minutos entre +4 e +8 °C (+39 a +46 °F) e remover cuidadosamente todo o sobrenadante.

4. Ressuspender o pellet de células em 100 µl de meio de cultura frio (+2 a +8 °C [+36 a +46 °F]) suplementado com 2% de soro AB.

5. Adicionar os restantes 75 µl do CliniMACS IFN-gamma Catchmatrix Reagent e incubar a suspensão durante 5 minutos em gelo.

Fase de secreção

Amostra-alvo

1. Tomar as quatro bolsas de transferência pré-cheias (incluindo a Cell Preparation Bag n.º 3 rotulada) contendo 125 mL de meio de cultura tépido (+37 °C [+99 °F]) suplementado com soro AB a 10%.

2. Com o conector de tubos estéril, ligar a Cell Preparation Bag n.º 2 à Medium Bag 10% preparada (contendo 600 mL de meio de cultura pré-aquecido (+37 °C [+99 °F]) suplementado com soro AB a 10%).

3. Adicionar 500 mL de meio de cultura pré-aquecido à amostra de células na Cell Preparation Bag n.º 2. Começar a medir imediatamente os 45 minutos de tempo de incubação.

4. Distribuir 125 mL da suspensão de células resultante por cada uma das quatro bolsas de transferência por fixação em série das bolsas de transferência à Cell Preparation Bag n.º 2 utilizando o conector de tubos estéril. Monitorizando visualmente a escala na balança, transferir o peso adequado da suspensão das células. Este procedimento resulta num total de 250 g de suspensão das células em cada uma das quatro bolsas de transferência. Depois da transferência, selar o tubo com o selador térmico para desprender as bolsas de transferência.

5. Incubar as células a +37 °C [+99 °F] durante o tempo que restar dos 45 minutos numa rotação lenta e contínua (máx. 50 rpm) até ao final do tempo de incubação. Registar o tempo de incubação.

6. Tomar um conjunto de transferência de plasma e garantir que a pinça está na posição de fechado. Inserir o espigão do conjunto de transferência de plasma no orifício da bolsa de solução tampão.

7. Passados 45 minutos, ligar a bolsa de solução tampão à Cell Preparation Bag n.º 3 com o conector de tubos estéril. Adicionar solução tampão fria (+2 a +8 °C [+36 a +46 °F]) a cada uma das quatro bolsas de transferência (pelo menos um volume, ou seja, 250 mL cada) por fixação em série das bolsas de transferência à bolsa de solução tampão. Deixar as células arrefecer colocando as bolsas em gelo durante 10 minutos.
8. Com o conector de tubos estéril, ligar uma Wash Waste Bag (Wash Waste Bags números 2 a 5) a cada uma das quatro bolsas de transferência.
9. Centrifugar as células a 300×g (continuamente) durante 10 minutos a +4 °C (+39 °F). Com o extrator de plasma, remover todo o sobrenadante de todas as bolsas.
10. Com o selador térmico, selar os tubos de cada uma das bolsas. Desprender as Wash Waste Bags.
11. Tomar um conjunto de transferência de plasma e garantir que a pinça está na posição de fechado. Inserir o espigão do conjunto de transferência de plasma no orifício de uma bolsa de solução tampão.
12. Com o conector de tubos estéril, ligar a bolsa de solução tampão à Cell Preparation Bag n.º 3.
13. Empurrar a pinça no conjunto de transferência de plasma para a posição de aberto e encher a Cell Preparation Bag n.º 3 com 200 mL de solução tampão.
14. Uma vez transferido o peso adequado de solução tampão, empurrar a pinça no conjunto de transferência de plasma para a posição de fechado para parar o fluxo de líquido.
15. Com o selador térmico, selar o tubo deixando, pelo menos, 15 cm do tubo na Cell Preparation Bag n.º 3. Desprender a bolsa de solução tampão.
16. Com o conector de tubos estéril, fixar uma das três bolsas de transferência contendo as células na Cell Preparation Bag n.º 3 e recombinar as duas suspensões.

    IMPORTANTE
    As amostras divididas têm de ser recombinadas na Cell Preparation Bag n.º 3 antes da centrifugação.

17. Repetir este procedimento até as suspensões de células das quatro bolsas de transferência serem recombinadas na Cell Preparation Bag n.º 3.
18. Uma vez recombinadas todas as células, ligar a bolsa de solução tampão à Cell Preparation Bag n.º 3 com o conector de tubos estéril.
19. Empurrar a pinça no conjunto de transferência de plasma para a posição de aberto. Encher a Cell Preparation Bag com solução tampão até 500 mL.
20. Uma vez transferido o peso adequado de solução tampão, empurrar a pinça no conjunto de transferência de plasma para a posição de fechado para parar o fluxo de líquido. Fechar a pinça de bloqueio junto à Cell Preparation Bag n.º 3.

21. Com o selador térmico, selar o tubo entre as duas pinças deixando, pelo menos, 15 cm do tubo na Cell Preparation Bag n.º 3 para outras ligações. Desprender a bolsa de solução tampão.
22. Com o conector de tubos estéril, ligar a Wash Waste Bag n.º 6 vazia à Cell Preparation Bag n.º 3.
23. Dobrar para baixo todas as partes soltas da Cell Preparation Bag n.º 3 ou dos tubos. Colocar as duas bolsas de forma segura no copo da centrífuga.
24. Equilibrar o copo carregado com um copo com o peso aferido. É essencial que a centrífuga seja equilibrada com exatidão.
25. Centrifugar as células a 300×g (continuamente) durante 10 minutos a +4 °C (+39 °F).

Amostra de controlo (não estimulada)

1. Adicionar meio de cultura tépido (+37 °C [+99 °F]) suplementado com soro AB a 10% para diluir a amostra para um máximo de 1×10^6 células/mL, ou seja, tem de ser utilizado um volume total de 10 mL para 1×10^9 células.
2. Incubar as células num tubo fechado durante 45 minutos a +37 °C (+99 °F) numa rotação lenta e contínua (máx. 50 rpm) com o MACSmix Tube Rotator.
3. Passados 45 minutos, encher o tubo com solução tampão fria (+4 °C [+39 °F]) e colocar o tubo em gelo durante 5–10 minutos.
4. Centrifugar as células a 300×g (continuamente) durante 10 minutos entre +4 e +8 °C (+39 a +46 °F).

Marcação magnética de células com o CliniMACS IFN-gamma Enrichment Reagent

Registar o número do lote e a data de validade do CliniMACS IFN-gamma Enrichment Reagent.

Amostra-alvo

1. Após o passo de centrifugação, remover cuidadosamente o sobrenadante, com o extrator de plasma, tal como acima descrito, e ressuspender o pellet de células em volume residual. Fechar a pinça de bloqueio junto à Cell Preparation Bag n.º 3 após a remoção.
2. Com o selador térmico, selar o tubo deixando, pelo menos, 15 cm do tubo na Cell Preparation Bag n.º 3 para outras ligações. Desprender a Wash Waste Bag n.º 6.
3. Fixar um acoplador do local de amostragem à Cell Preparation Bag n.º 3 e desinfetar o septo. Utilizar uma seringa estéril adequada e uma agulha para remover 7,425 mL do frasco de CliniMACS IFN-gamma Enrichment Reagent. Basta uma seringa de 10 mL para remover o conteúdo de um frasco de reagente. A seringa deve ter uma agulha de calibre 20.

4. Utilizando o orifício de injeção no acoplador do local de amostragem, injetar todo o volume do reagente na Cell Preparation Bag n.º 3. Cuidado para não furar a bolsa. Começar imediatamente a contar o tempo de incubação de 15 minutos. Registar a hora de início da incubação.
5. Segurando com as duas mãos na Cell Preparation Bag, misturar bem o conteúdo com um suave movimento rotativo.
6. Incubar as células durante 15 minutos em gelo. Registar a hora do final da incubação.
7. Com o conector de tubos estéril, ligar a bolsa de solução tampão à Cell Preparation Bag n.º 3.
8. Abrir a pinça de bloqueio junto à Cell Preparation Bag n.º 3. Empurrar a pinça no conjunto de transferência de plasma para a posição de aberto. Encher a Cell Preparation Bag n.º 3 até 500 mL com solução tampão fria (+2 a +8 °C [+36 a +46 °F]).
9. Uma vez transferido o peso adequado de solução tampão, empurrar a pinça no conjunto de transferência de plasma para a posição de fechado. Fechar a pinça de bloqueio junto à Cell Preparation Bag n.º 3. Com o selador térmico, selar o tubo entre as duas bolsas. Desprender a bolsa de solução tampão.
10. Com o conector de tubos estéril, ligar a Wash Waste Bag n.º 7 vazia à Cell Preparation Bag n.º 3.
11. Dobrar para baixo todas as partes soltas da bolsa ou dos tubos. Colocar as duas bolsas de forma segura no copo da centrífuga.
12. Equilibrar o copo carregado com um copo com o peso aferido. É essencial que a centrífuga seja equilibrada com exatidão.
13. Centrifugar a 300×g (continuamente) durante 10 minutos a +4 °C (+39 °F).
14. Remover cuidadosamente o sobrenadante tal como acima descrito e ressuspender as células em 100 mL de solução tampão fria (+2 a +8 °C [+36 a +46 °F]).
15. Desinfetar o septo do acoplador do local de amostragem. Inserir uma agulha com a seringa adequada no acoplador do local de amostragem da Cell Preparation Bag e remover um volume de 0,5 mL do produto marcado. Cuidado para não furar a bolsa. Transferir a amostra para um tubo de amostra. Rotular o tubo como AMOSTRA-ALVO ORIGINAL (deve incluir a identificação do paciente).

   IMPORTANTE
   As células têm de ser bem misturadas antes da colheita da amostra. Para obter uma amostra representativa, utilizar uma seringa com uma capacidade de, pelo menos, 5 mL.
16. Manter a amostra de células para análise no frio (+2 a +8 °C [+36 a +46 °F]).

Amostra de controlo (não estimulada)

1. Após a centrifugação, remover cuidadosamente o sobrenadante.
2. Ressuspender as células em 100 µl de solução tampão fria (+2 a +8 °C [+36 a +46 °F]).
3. Adicionar 75 µl do CliniMACS IFN-gamma Enrichment Reagent restante.
4. Incubar as células durante 15 minutos em gelo.
5. Encher o recipiente com solução tampão fria (+2 a +8 °C [+36 a +46 °F]) e centrifugar a 300×g (continuamente) durante 10 minutos a +4 °C (+39 °F).
6. Remover cuidadosamente o sobrenadante e ressuspender as células em 1 mL de solução tampão fria (+2 a +8 °C [+36 a +46 °F]).
7. Remover uma amostra pequena (aprox. 100 µl) da suspensão de células e transferi-la para um tubo, rotulado como fração de AMOSTRA DE CONTROLO ORIGINAL, antes da separação. Armazenar no frio até à análise.

Separação magnética

Amostra-alvo

A separação magnética da amostra-alvo é feita com o CliniMACS Plus Instrument. Após a separação, processar a amostra de controlo tal como abaixo descrito.

Amostra de controlo (não estimulada)

1. Preparar duas MS Columns enxaguando-as com 500 µl de solução tampão fria (+2 a +8 °C [+36 a +46 °F]) e eliminar o efluente.
2. Colocar a primeira coluna no campo magnético do MiniMACS Separator.
3. Passar as células por um Pre-Separation Filter para remover os grumos.
4. Aplicar a suspensão de células na coluna.
5. Colher o efluente total (contendo a fração de células não marcadas). Lavar a coluna adicionando 500 µl de solução tampão fria na coluna. Executar um total de três passos de lavagem aplicando sucessivamente 500 µl da solução tampão na coluna assim que o respetivo reservatório estiver vazio.
6. Remover a coluna do separador, colocar a segunda coluna no separador e colocar a primeira coluna em cima da segunda.
7. Pipetar 1 mL de solução tampão fria para a primeira coluna. Enxaguar imediatamente a fração com as células marcadas magneticamente aplicando, com firmeza, o êmbolo fornecido com a coluna, diretamente na segunda coluna.
8. Colher as células não marcadas que atravessarem e lavar a coluna com 500 µl de solução tampão fria. Executar um total de três passos de lavagem aplicando sucessivamente 500 µl da solução tampão na coluna, assim que o respetivo reservatório estiver vazio.

9. Remover a segunda coluna do separador e colocá-la num tubo de colheita adequado rotulado como fração positiva.
10. Pipetar 0,5 mL de solução tampão fria para a coluna. Enxaguar imediatamente a fração com as células marcadas magneticamente aplicando, com firmeza, o êmbolo fornecido com a coluna.
11. Manter a fração de células-alvo no frio até à análise.

6.17.2 PASSO 2: Escolha do programa de separação

- **Escolha do programa de separação ENRICHMENT 3.2**

Ver secção 7.2.4 na página 143.

6.17.3 PASSO 3: Instalação dos conjuntos de tubos CliniMACS

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

Ver secção 7.3.1 na página 156.

6.17.4 PASSO 4: Separação CliniMACS Plus

- **Procedimento de separação**
- **Desprender as bolsas e registar o código do processo**
- **Descarregar o conjunto de tubos e encerrar**
- **Análise das células**

Ver secção 7.4.3 na página 199.

7 Explicação detalhada dos PASSOS 1–4

7.1 PASSO 1: Preparação das células e marcação magnética

Este capítulo explica detalhadamente os procedimentos necessários para a separação de células com o sistema CliniMACS Plus.

7.1.1 Primeiras medidas necessárias

Para os materiais necessários para uma determinada aplicação, consultar a secção específica da aplicação (ver secção 5.2 na página 39).

Preparação do CliniMACS PBS/EDTA Buffer

Suplementar o CliniMACS PBS/EDTA Buffer com HSA para uma concentração final de 0,5% (p/v).

Preparação das bolsas

Consultar a secção específica da aplicação para as bolsas necessárias:

- **Cell Preparation Bag:** Inserir um acoplador do local de amostragem (ou equivalente) no orifício exterior da Cell Preparation Bag. Colocar uma pinça de bloqueio no tubo, perto da bolsa, e fechar a pinça. Pesar a Cell Preparation Bag vazia com a pinça de bloqueio posicionada junto à bolsa e o tubo suspenso na mesa ao lado da balança. Registar o peso.

  IMPORTANTE
  Dado que o comprimento do tubo pode variar durante o procedimento de preparação, cuidado ao determinar o peso da Cell Preparation Bag. Para uma leitura exata, confirmar se as pinças de bloqueio estão sempre posicionadas junto à bolsa e assentes na balança, bem como se o resto do tubo está assente na mesa ao lado da balança.

- **Cell Collection Bag:**
  - CliniMACS Tubing Set/CliniMACS Tubing Set LS: Inserir um Luer/Spike Interconnector (ou equivalente) no orifício exterior da Cell Collection Bag. Colocar uma pinça de bloqueio no tubo, perto da bolsa, e fechar a pinça. Pesar a Cell Collection Bag vazia com a pinça de bloqueio posicionada junto à bolsa e o tubo suspenso na mesa ao lado da balança. Registar o peso.
  - CliniMACS Depletion Tubing Set: Uma Cell Collection Bag já se encontra fixada no conjunto de tubos. Inserir um Luer/Spike Interconnector (ou equivalente) no orifício exterior da Cell Collection Bag. Colocar uma pinça de bloqueio no tubo, perto da bolsa, e fechar a pinça. Pesar a Cell Collection Bag vazia com a pinça de bloqueio posicionada junto à bolsa e o tubo suspenso na mesa ao lado da balança. Registar o peso.

7.1.2 Marcação magnética de células

As secções seguintes descrevem o procedimento dentro da bolsa recomendado para a preparação do produto celular com o conector de tubos estéril.

- O operador tem de estar familiarizado com a operação e a utilização do conector de tubos estéril.
- Antes de iniciar a marcação das células e o procedimento de separação, confirmar se estão disponíveis todos os consumíveis e equipamentos.

IMPORTANTE

- As bolsas têm de ser sempre manuseadas em ambiente estéril (p. ex., campânula de fluxo laminar) por meio de técnicas asséticas. A ligação do tubo através do conector de tubos estéril pode ser feita fora da campânula de fluxo laminar.
- Executar a preparação da amostra e a separação de células nas condições de temperatura definidas na secção específica da aplicação. Temperaturas superiores ou inferiores resultarão em menor pureza e menor rendimento das células-alvo.

Resumindo, a marcação magnética do produto celular é feita mediante os seguintes passos:

1. Análise do produto celular inicial
2. Transferência do produto celular inicial para a Cell Preparation Bag
3. Diluição do produto celular inicial
4. Centrifugação
5. Apenas para o CliniMACS Plus Anti-Biotin System e o CliniMACS Plus TCRα/β-Biotin System: marcação das células (incubação com o anticorpo primário/CliniMACS TCRα/β-Biotin) e remoção do excesso de conjugado (1.ª lavagem)
6. Ajuste do volume
7. Apenas para o sistema CliniMACS Plus CD3 e o sistema CD3/CD19: incubação com imunoglobulina de grau clínico
8. Marcação magnética das células (incubação com reagente CliniMACS)
9. Remoção do excesso de reagente
10. Ajuste do volume para a separação de células

Análise do produto celular inicial

Antes de começar a preparação do produto celular inicial, determinar os seguintes parâmetros:

- Número total de leucócitos
- Percentagem de células a rotular
- Número total de leucócitos a rotular
- Viabilidade

Garantir que o trabalho é executado dentro da especificação da aplicação.

Confirmar os parâmetros após o procedimento de marcação. Isto é necessário para os programas de carregamento por fases (ENRICHMENT 1.1/DEPLETION 2.1/ DEPLETION 3.1), dado que os três parâmetros da amostra que se seguem têm de ser introduzidos no software durante a configuração do CliniMACS Plus Instrument antes de carregar o conjunto de tubos no aparelho:

- Concentração de leucócitos por mL
- Percentagem de células a rotular
- Volume final da amostra de células (volume da amostra carregada)

Podem ser necessários outros testes dependendo da utilização prevista das células (p. ex., número de células T, fenótipo). Registar todos os dados.

Transferência do produto celular inicial para a Cell Preparation Bag

1. Registar a data e a hora de início antes de começar a preparação do produto celular inicial.
2. Determinar o volume do produto celular inicial presumindo que 1 mL do produto celular inicial é equivalente a 1 g (1 g ≙ 1 mL).
3. Segurando com as duas mãos na bolsa do produto celular inicial, misturar bem o conteúdo com um suave movimento rotativo.
4. Com o conector de tubos estéril, ligar a Cell Preparation Bag à bolsa do produto celular inicial original.
5. Abrir a pinça de bloqueio para transferir o produto celular inicial para a Cell Preparation Bag. Utilizar um abre-tubos para limpar o tubo de eventuais restos de sangue. Fechar a pinça de bloqueio no tubo o mais perto possível da bolsa.

6. Selar o tubo e separar as bolsas, deixando, pelo menos, 15 cm do tubo na Cell Preparation Bag para outras ligações (ver Figura 7.1). Utilizar o selador térmico para produzir três selagens adjacentes no tubo. Verificar se as selagens ficaram em condições. Separar na selagem central. Manter a bolsa de leucaférese/produto celular inicial original até à conclusão da separação e da análise final de todas as células.

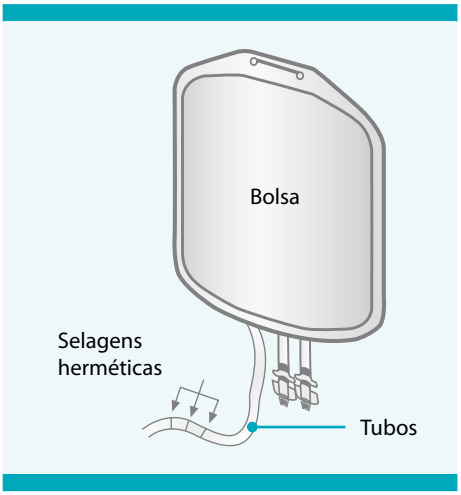


Figura 7.1: Selagem de uma bolsa.

7. Para colher uma amostra, desinfetar o septo do acoplador do local de amostragem. Misturar o conteúdo da bolsa. Inserir uma agulha com a seringa adequada no acoplador do local de amostragem da Cell Preparation Bag e remover um volume de 0,5 mL. Transferir a amostra para um tubo de amostra. Rotular o tubo como LEUCAFÉRESE/PRODUTO CELULAR INICIAL (deve incluir a identificação do paciente) e manter para a análise das células.

   IMPORTANTE
   O produto celular inicial tem de ser bem misturado antes da colheita da amostra. Para obter uma amostra representativa, utilizar uma seringa com uma capacidade de, pelo menos, 5 mL.

8. Tarar a balança. Colocar a Cell Preparation Bag cheia na balança e o tubo sobre a mesa. Registar o peso.

9. Determinar o peso do produto celular inicial subtraindo o peso da Cell Preparation Bag vazia do peso da Cell Preparation Bag cheia de produto celular inicial. Registar o peso calculado.

Peso do produto celular inicial (g)	=	Peso da Cell Preparation Bag (g) cheia	–	Peso da Cell Preparation Bag (g) vazia

Diluição do produto celular inicial

Consultar a secção específica da aplicação para a taxa de diluição necessária.

O produto celular inicial tem de ser diluído com o CliniMACS PBS/EDTA Buffer (suplementado com HSA para uma concentração final de 0,5% (p/v)) antes da marcação magnética. Calcular o peso da solução tampão a adicionar mediante uma das seguintes equações (1 ou 2), dependendo da aplicação, e registar.

(1) Peso da solução tampão a adicionar (g)	=	600 g	–	Peso do produto celular inicial (g)
(2) Peso da solução tampão a adicionar (g)	=	Peso do produto celular inicial (g)	×	2

1. Tomar um conjunto de transferência de plasma e garantir que a pinça está na posição de fechado. Inserir o espigão do conjunto de transferência de plasma no orifício da bolsa de solução tampão.
2. Com o conector de tubos estéril, ligar a bolsa de solução tampão à Cell Preparation Bag. Suspender a bolsa de solução tampão num suporte da bolsa.
3. Colocar a Cell Preparation Bag na balança e tarar a balança.
4. Abrir a pinça de bloqueio junto à Cell Preparation Bag. Empurrar a pinça no conjunto de transferência de plasma para a posição de aberto. Monitorizando visualmente a escala na balança, transferir o peso calculado da solução tampão para a Cell Preparation Bag.
5. Uma vez transferido o peso adequado de solução tampão, empurrar a pinça no conjunto de transferência de plasma para a posição de fechado para parar o fluxo de líquido. Fechar a pinça de bloqueio no tubo o mais perto possível da bolsa.
6. Com o selador térmico, selar o tubo entre a pinça e a pinça de bloqueio deixando, pelo menos, 15 cm do tubo na Cell Preparation Bag para outras ligações. Desprender a bolsa de solução tampão.
7. Segurando com as duas mãos na Cell Preparation Bag, misturar bem o conteúdo com um suave movimento rotativo. Evitar uma mistura intensiva das células.
8. Tarar a balança e pesar a Cell Preparation Bag cheia. Registar o peso.
9. Determinar o peso do produto celular inicial diluído subtraindo o peso da Cell Preparation Bag vazia do peso da Cell Preparation Bag cheia. Registar o peso calculado.

Peso do produto celular inicial diluído (g)	=	Peso da Cell Preparation Bag (g) cheia	–	Peso da Cell Preparation Bag (g) vazia

Centrifugação

⚠ ADVERTÊNCIA

Risco de contaminação. Se as bolsas não forem indicadas para a preparação das células ou se não forem corretamente colocadas no copo da centrífuga, existe o risco de contaminação devido a danos nas bolsas. Utilizar bolsas adequadas, dobrar para baixo todas as partes soltas das bolsas ou dos tubos, tendo o cuidado de não interferir na integridade das bolsas, e colocar as bolsas de forma segura no copo da centrífuga.

⚠ CUIDADO

Risco de menor desempenho da separação de células. Se as bolsas não ficarem corretamente colocadas no copo da centrífuga, existe o risco de se perderem células ao remover o sobrenadante. Dobrar para baixo todas as partes soltas das bolsas ou dos tubos e colocar as bolsas de forma segura no copo da centrífuga.

1. Com o conector de tubos estéril, ligar a Plasma Waste Bag vazia à Cell Preparation Bag.
2. Dobrar para baixo todas as partes soltas da Cell Preparation Bag ou dos tubos. Colocar as duas bolsas de forma segura no copo da centrífuga.
3. Equilibrar o capo carregado com um copo com o peso aferido. É essencial que a centrífuga seja equilibrada com exatidão.
4. Centrifugar as células nas condições definidas na secção específica da aplicação. Registar as condições de centrifugação.
5. Remover as bolsas da centrífuga, tendo o cuidado de não perturbar o pellet de células. Carregar a Cell Preparation Bag no extrator de plasma e a Waste Bag ligada na balança de mesa.

Ajuste do volume

Para a marcação magnética das células, o peso ideal do produto celular depende da aplicação. Consultar o volume da marcação na secção específica da aplicação.

Dependendo da aplicação, pode ser necessário remover apenas uma quantidade do sobrenadante para alcançar o volume da marcação (remoção de sobrenadante à medida) ou todo o sobrenadante e adicionar solução tampão para alcançar o volume da marcação (remoção completa do sobrenadante). Consultar a secção específica da aplicação para a opção aplicável e continuar em conformidade.

IMPORTANTE

- Com o extrator de plasma: manter um controlo constante do manípulo de libertação do extrator para garantir que a pinça de bloqueio junto à Cell Preparation Bag está aberta antes de iniciar a transferência. Soltar lentamente o manípulo de libertação do extrator.
- Durante a remoção do sobrenadante, ter o cuidado de não perder células.

Remoção de sobrenadante à medida

Calcular o peso do sobrenadante a remover para ajustar a amostra ao volume da marcação mediante a seguinte equação:

Peso do sobrenadante a remover (g)	=	Peso do produto celular depois da lavagem (g)	–	Volume da marcação (g)

Registar o peso do sobrenadante a remover.

1. Colocar a Plasma Waste Bag ou a Wash Waste Bag n.º 1 vazia na balança e tarar a balança.
2. Abrir a pinça de bloqueio junto à Cell Preparation Bag. Monitorizando visualmente a escala na balança, remover o sobrenadante com o extrator de plasma. Pressionar cuidadosamente o excesso de sobrenadante para fora até que o "peso do sobrenadante a remover" calculado seja alcançado.

3. Uma vez removido o peso adequado de sobrenadante, fechar a pinça de bloqueio junto à Cell Preparation Bag para parar o fluxo de líquido. Registar o peso do sobrenadante removido.

4. Com o selador térmico, selar o tubo deixando, pelo menos, 15 cm do tubo na Cell Preparation Bag para outras ligações. Desprender a Plasma Waste Bag ou a Wash Waste Bag n.º 1.

5. Ressuspender cuidadosamente as células na Cell Preparation Bag. Evitar uma mistura intensiva das células. Verificar se as células estão ressuspensas.

6. Tarar a balança e pesar a Cell Preparation Bag cheia. Registar o peso.

7. Determinar o peso do produto celular depois do ajuste do volume subtraindo o peso da Cell Preparation Bag vazia do peso da Cell Preparation Bag cheia. Registar o peso calculado.

Peso do produto celular depois do ajuste do volume (g)	=	Peso da Cell Preparation Bag (g) cheia	–	Peso da Cell Preparation Bag (g) vazia

8. Manter a Plasma Waste Bag ou a Wash Waste Bag até à conclusão da separação e da análise final de todas as células.

Remoção completa do sobrenadante

Remover completamente o sobrenadante tendo o cuidado de não ressuspender o pellet de células durante o procedimento. Uma vez removido o sobrenadante, fechar a pinça de bloqueio junto à Cell Preparation Bag para parar o fluxo de líquido. Com o selador térmico, selar o tubo deixando, pelo menos, 15 cm do tubo na Cell Preparation Bag para outras ligações. Desprender a Plasma Waste Bag. Ressuspender cuidadosamente o pellet.

Ajustar o peso da Cell Preparation Bag adicionando solução tampão. Calcular o peso-alvo da Cell Preparation Bag (CPB) cheia de produto celular diluído mediante a seguinte equação:

Peso-alvo da CPB cheia de produto celular lavado (g)	=	Volume da marcação (g)	+	Peso da CPB vazia (g)

1. Inserir o espigão de um conjunto de transferência de plasma no orifício de uma bolsa de solução tampão. Confirmar se a pinça no conjunto de transferência de plasma está na posição de aberto.

2. Com o conector de tubos estéril, ligar a bolsa de solução tampão à Cell Preparation Bag. Suspender a bolsa de solução tampão num suporte da bolsa.

3. Tarar a balança. Colocar a Cell Preparation Bag com o pellet de células na balança.

4. Abrir a pinça de bloqueio junto à Cell Preparation Bag. Empurrar a pinça no conjunto de transferência de plasma para a posição de aberto. Encher a Cell Preparation Bag com solução tampão até se alcançar o "Peso-alvo da Cell Preparation Bag cheia de produto celular lavado" calculado. Empurrar a pinça no conjunto de transferência de plasma para a posição de fechado para parar o fluxo de líquido. Fechar a pinça de bloqueio junto à Cell Preparation Bag.

5. Com o selador térmico, selar o tubo deixando, pelo menos, 15 cm do tubo na Cell Preparation Bag para outras ligações. Desprender a bolsa de solução tampão.

6. Ressuspender cuidadosamente as células na Cell Preparation Bag. Evitar uma mistura intensiva das células. Verificar se as células estão ressuspensas.

7. Tarar a balança e pesar a Cell Preparation Bag cheia. Registar o peso.

8. Determinar o peso do produto celular depois do ajuste do volume subtraindo o peso da Cell Preparation Bag vazia do peso da Cell Preparation Bag cheia. Registar o peso calculado.

Peso do produto celular depois do ajuste do volume (g)	=	Peso da Cell Preparation Bag (g) cheia	–	Peso da Cell Preparation Bag (g) vazia

9. Manter a Plasma Waste Bag até à conclusão da separação e da análise final de todas as células.

Marcação das células (apenas para o CliniMACS Plus Anti-Biotin System e o CliniMACS Plus TCRα/β-Biotin System)

Incubação com o CliniMACS TCRα/β-Biotin

O frasco de CliniMACS TCRα/β-Biotin está pronto a utilizar e é suficiente para a aplicação tal como abaixo descrito. O conjugado não se destina a administração parenteral.

Armazenar o conjugado entre (+2 a +8 °C [+36 a +46 °F]). NÃO congelar. O conjugado tem de ser utilizado frio diretamente do frigorífico. NÃO aquecer antes de utilizar. O número do lote e a data de validade do conjugado encontram-se impressos no rótulo do frasco. NÃO utilizar o conjugado após a data de validade.

1. Registar o número do lote e a data de validade do CliniMACS TCRα/β-Biotin.

2. Desinfetar o septo do acoplador do local de amostragem. Utilizar uma seringa estéril e uma agulha estéril que sejam adequadas para remover todo o volume de um frasco (7,5 mL). Basta uma seringa de 10 mL para remover o conteúdo de um frasco. A seringa deve ter uma agulha de calibre 20.

3. Utilizando o orifício de injeção do acoplador do local de amostragem, injetar todo o volume de conjugado na Cell Preparation Bag (opcionalmente, transferir o conteúdo da Cell Preparation Bag para uma nova bolsa de transferência para assegurar uma elevada eficiência do empobrecimento). Começar imediatamente o período de incubação de 30 minutos.

4. Segurando com as duas mãos na Cell Preparation Bag, misturar bem o conteúdo com um suave movimento rotativo. Registar a hora de início da incubação.

5. Colocar a Cell Preparation Bag plana no rotador orbital, definir para uma velocidade de aproximadamente 25 rpm e verificar se a bolsa não está vincada ou dobrada. Incubar a bolsa durante um total de 30 minutos a temperatura ambiente controlada (+19 +25 °C [+66 a +77 °F]). Registar a hora do final da incubação.

Incubação com o anticorpo primário (anticorpo biotinilado de outro fabricante)

1. Ressuspender o pellet de células e rotular as células com anticorpo primário biotinilado durante o tempo e com a titulação recomendados pelo fabricante do anticorpo. Verificar se as células estão ressuspensas. (O anticorpo primário deve ser utilizado com a titulação ideal, ou seja, com a intensidade de coloração ideal e sem coloração de fundo. Observar as instruções de utilização do fabricante do anticorpo primário).
2. Incubar a Cell Preparation Bag num agitador orbital a 25 rpm. Observar as instruções de utilização do fabricante do anticorpo primário.

Remoção do excesso de conjugado (1.ª lavagem) (apenas para o CliniMACS Plus Anti-Biotin System e o CliniMACS Plus TCRα/β-Biotin System)

Diluir o produto celular com solução tampão até um peso total de 600 g. Calcular o peso da solução tampão a adicionar com a seguinte equação e registar.

Peso da solução tampão a adicionar (g)	=	600 g	–	Peso do produto celular marcado (g)

1. Diluir o produto celular seguindo os passos descritos no passo "Diluição do produto celular inicial" (passos 1–8) até um peso total de 600 g.
2. Determinar o peso do produto celular, depois da remoção do excesso de conjugado (1.ª lavagem), subtraindo o peso da Cell Preparation Bag vazia do peso da Cell Preparation Bag cheia. Registar o peso calculado.

Peso do produto celular depois da remoção do excesso de conjugado (1.ª lavagem) (g)	=	Peso da Cell Preparation Bag (g) cheia	–	Peso da Cell Preparation Bag (g) vazia

3. Com o conector de tubos estéril, ligar a Wash Waste Bag vazia à Cell Preparation Bag.
4. Dobrar para baixo todas as partes soltas da Cell Preparation Bag ou dos tubos. Colocar as duas bolsas em segurança no copo da centrífuga.
5. Equilibrar o copo carregado com um copo com o peso aferido. É essencial que a centrífuga seja equilibrada com exatidão.
6. Centrifugar as células nas condições definidas na secção específica da aplicação.

7. Remover as bolsas da centrífuga, tendo o cuidado de não ressuspender o pellet de células. Carregar a Cell Preparation Bag no extrator de plasma e a Waste Bag ligada na balança de mesa.
8. Para o número de lavagens necessárias, ver a secção específica da aplicação.
9. Ajustar o peso da suspensão de células tal como descrito na secção "Ajuste do volume" para cerca de 190 g, para marcação magnética das células com o CliniMACS Anti-Biotin Reagent.

Incubação com imunoglobulina de grau médico (apenas para o sistema CliniMACS Plus CD3 ou o sistema CD3/CD19)

IMPORTANTE

Note-se que a IgG humana não é um componente do sistema CliniMACS. Utilizar apenas IgG humana de grau farmacêutico aprovada no seu país. Ler atentamente o folheto informativo da IgG humana utilizada, sobretudo a secção sobre reações de hipersensibilidade e o risco de infeção que a IgG humana, enquanto produto derivado do sangue, representa para todos os pacientes. Todos os riscos decorrentes destes materiais têm de ser avaliados pelo utilizador.

Desinfetar o septo do acoplador do local de amostragem da Cell Preparation Bag. Utilizar uma seringa estéril e uma agulha estéril adequadas para adicionar 1,5 mg de IgG humana por mL de produto celular (p. ex., 1,6 mL de Gamunex 10% para 95 mL de produto celular). Misturar bem o conteúdo. Incubar durante 5 minutos à temperatura ambiente controlada com um suave movimento rotativo (p. ex., 25 rpm no rotador orbital).

Marcação magnética das células: incubação com reagente CliniMACS

Os frascos de reagente CliniMACS estão prontos a utilizar e são suficientes para a aplicação tal como abaixo descrito. Os reagentes não se destinam a administração parenteral.

Armazenar os reagentes entre (+2 a +8 °C [+36 a +46 °F]). NÃO congelar. Os reagentes têm de ser utilizados frios diretamente do frigorífico. NÃO aquecer antes de utilizar. O número do lote e a data de validade dos reagentes encontram-se impressos no rótulo do frasco. NÃO utilizar os reagentes após a data de validade.

1. Registar o número do lote e a data de validade do(s) reagente(s) CliniMACS.
2. Desinfetar o septo do acoplador do local de amostragem. Utilizar uma seringa estéril e uma agulha estéril adequadas para remover todo o volume de a) um frasco ou b) dois frascos de reagente (7,5 mL cada). Basta uma seringa de 10 mL para remover o conteúdo de um frasco ou uma seringa de 20 mL para remover o conteúdo de dois frascos de reagente, respetivamente. A seringa deve ter uma agulha de calibre 20.

3. Utilizando o orifício de injeção do acoplador do local de amostragem, injetar todo o volume de reagente na Cell Preparation Bag (opcionalmente, em aplicações de empobrecimento, transferir o conteúdo da Cell Preparation Bag para uma nova bolsa de transferência para assegurar uma elevada eficiência do empobrecimento). O tempo de incubação começa aqui.
4. Segurando com as duas mãos na Cell Preparation Bag, misturar bem o conteúdo com um suave movimento rotativo.
5. Colocar a Cell Preparation Bag plana no rotador orbital, definir para uma velocidade de aproximadamente 25 rpm e verificar se a bolsa não está vincada ou dobrada. Incubar a bolsa nas condições e durante o tempo definidos na secção específica da aplicação.

Remoção do excesso de reagente

Uma vez concluída a incubação, é preciso lavar as células para remover o reagente não ligado. Consultar a secção específica da aplicação para o número necessário de lavagens.

1. Inserir o espigão de um conjunto de transferência de plasma no orifício de uma bolsa de solução tampão com, pelo menos, 500 mL de solução tampão. Confirmar se a pinça no conjunto de transferência de plasma está na posição de aberto.
2. Com o conector de tubos estéril, ligar a bolsa de solução tampão à Cell Preparation Bag. Suspender a bolsa de solução tampão num suporte da bolsa.
3. Colocar a Cell Preparation Bag na balança e tarar a balança.
4. Abrir a pinça de bloqueio junto à Cell Preparation Bag. Empurrar a pinça no conjunto de transferência de plasma para a posição de aberto. Encher a Cell Preparation Bag com solução tampão até 600 mL. Empurrar a pinça no conjunto de transferência de plasma para a posição de fechado para parar o fluxo de líquido. Fechar a pinça de bloqueio junto à Cell Preparation Bag. Registar o peso da Cell Preparation Bag cheia.
5. Selar o tubo entre as duas pinças, deixando, pelo menos, 15 cm do tubo na Cell Preparation Bag para outras ligações. Desprender a bolsa de solução tampão.
6. Segurando com as duas mãos na Cell Preparation Bag, misturar bem o conteúdo com um suave movimento rotativo.
7. Com o conector de tubos estéril, ligar a Wash Waste Bag vazia à Cell Preparation Bag.
8. Dobrar para baixo todas as partes soltas das bolsas ou dos tubos. Transferir a Cell Preparation Bag e a Wash Waste Bag de forma segura para o copo da centrífuga.
9. Centrifugar as células nas condições e durante o tempo definidos na secção específica da aplicação.

10. Tendo o cuidado de não perturbar o pellet de células, remover as bolsas da centrífuga.
11. Suspender cuidadosamente a Cell Preparation Bag no extrator de plasma.
12. Colocar a Wash Waste Bag na balança e tarar a balança.
13. Abrir a pinça de bloqueio junto à Cell Preparation Bag. Com o extrator de plasma, remover tanto sobrenadante quanto possível da Cell Preparation Bag. Fechar a pinça de bloqueio junto à Cell Preparation Bag para parar o fluxo de líquido.
14. Com o selador térmico, selar o tubo deixando, pelo menos, 15 cm do tubo na Cell Preparation Bag para outras ligações. Desprender a Wash Waste Bag.
15. Manter a Wash Waste Bag até à conclusão da separação e da análise final de todas as células.
16. Ressuspender cuidadosamente o pellet de células na Cell Preparation Bag. Evitar uma mistura intensiva das células. Verificar se as células estão ressuspensas.
17. Se forem necessárias mais lavagens (p. ex., para o enriquecimento de células CD34 positivas), repetir os passos 1–16.
18. Tarar a balança e pesar a Cell Preparation Bag cheia. Registar o peso.
19. Determinar o peso do produto celular, depois da lavagem, subtraindo o peso da Cell Preparation Bag vazia do peso da Cell Preparation Bag cheia. Registar o peso calculado.

Peso do produto celular depois da lavagem (g)	=	Peso da Cell Preparation Bag (g) cheia	–	Peso da Cell Preparation Bag (g) vazia

20. Ajustar o volume da amostra carregada: Calcular o peso da solução tampão necessário para ajustar o peso da suspensão de células ao volume da amostra carregada adequado de acordo com a aplicação, através da seguinte equação. Para carregar as células marcadas e lavadas no conjunto de tubos, recomenda-se uma concentração máxima de células de $0{,}4\times10^{9}$ células por mL.

Peso da solução tampão a adicionar (g)	=	Volume da amostra carregada (de acordo com a aplicação)	–	Peso do produto celular depois da lavagem (g)

21. Com o conector de tubos estéril, ligar a bolsa de solução tampão à Cell Preparation Bag. Suspender a bolsa de solução tampão num suporte da bolsa.
22. Colocar a Cell Preparation Bag na balança e tarar a balança.
23. Abrir a pinça de bloqueio junto à Cell Preparation Bag. Empurrar a pinça no conjunto de transferência de plasma para a posição de aberto. Monitorizando visualmente a escala na balança, transferir o peso calculado da solução tampão para a Cell Preparation Bag.
24. Uma vez transferido o peso adequado da solução tampão, empurrar a pinça no conjunto de transferência de plasma para a posição de fechado para parar o fluxo de líquido. Fechar a pinça de bloqueio junto à Cell Preparation Bag.

25. Com o selador térmico, selar o tubo entre as duas bolsas. Desprender a bolsa de solução tampão.
26. Ressuspender cuidadosamente o pellet de células na Cell Preparation Bag. Evitar uma mistura intensiva das células. Verificar se as células estão ressuspensas.
27. Desinfetar o septo do acoplador do local de amostragem. Inserir uma agulha com a seringa adequada no acoplador do local de amostragem da Cell Preparation Bag e remover um volume de 0,5 mL do produto marcado. Transferir a amostra para um tubo de amostra. Rotular o tubo como ORIGINAL (deve incluir a identificação do paciente) e manter para análise.
28. Tarar a balança e pesar a Cell Preparation Bag cheia. Registar o peso.
29. Determinar o peso do produto celular depois da adição da solução tampão (volume da amostra carregada), subtraindo o peso da Cell Preparation Bag vazia do peso da Cell Preparation Bag cheia. Registar o peso calculado.

Peso do produto celular depois da adição da solução tampão (g)	=	Peso da Cell Preparation Bag (g) cheia	–	Peso da Cell Preparation Bag (g) vazia

▶ **Continuar com o PASSO 2.**

NÃO ligar a Cell Preparation Bag ao conjunto de tubos até que o visor do aparelho dê essa instrução.

7.2 PASSO 2: Escolha do programa de separação

7.2.1 Ligar o CliniMACS Plus Instrument

Ligar o CliniMACS Plus Instrument com o interruptor geral de ligar/desligar localizado no painel traseiro do aparelho. Registar a hora de início do funcionamento do aparelho.

A janela indica o ecrã principal na secção "Instalação" do manual do utilizador CliniMACS Plus Instrument.

Para ir para o menu de programas, pressionar **ENT**.

7.2.2 CD34 SELECTION 1/2

IMPORTANTE

- CD34 SELECTION 1 só pode ser utilizado em combinação com o CliniMACS Tubing Set (REF 161-01), e CD34 SELECTION 2 só pode ser utilizado em combinação com o CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01). Verificar atentamente o conjunto de tubos antes da instalação.
- Na janela de visualização irão surgir instruções no ecrã e diagramas a servir de guias do procedimento. Executar e verificar cada um dos passos de acordo com as instruções do manual antes de ir para o passo seguinte. Para a correção de erros durante a introdução de dados, pressionar a tecla "Undo" (desfazer) (ver secção "Descrição" no manual do utilizador CliniMACS Plus Instrument).

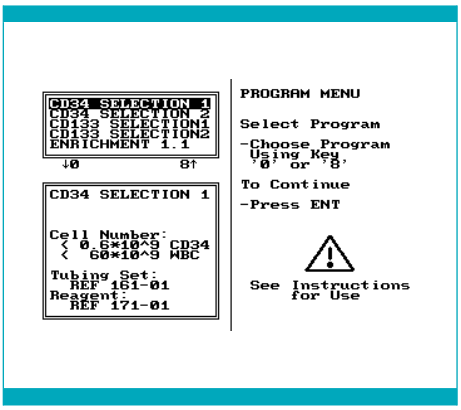
Escolha do programa de separação CD34 SELECTION 1/2

A janela indica Ecrã 7.1.

Dependendo da aplicação, escolher CD34 SELECTION 1 ou CD34 SELECTION 2.

Para escolher um programa de separação, destacar o nome do programa com a barra preta. Deslocar a barra para cima e para baixo com as teclas **0** e **8**.

Para ir para o programa destacado, pressionar **ENT**.



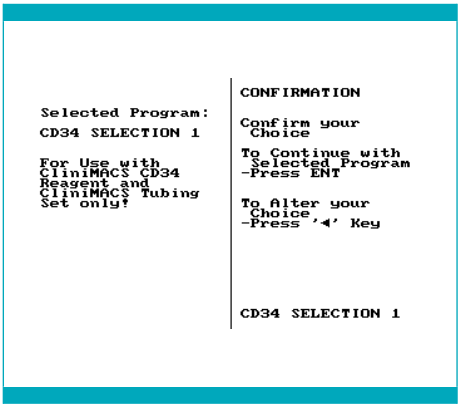
Ecrã 7.1: Escolha do programa de separação

Confirmação

A janela indica Ecrã 7.2.

Para confirmar o programa de separação e continuar, pressionar **ENT**.

Caso contrário, pressionar ◄ para voltar ao passo anterior para corrigir a escolha.



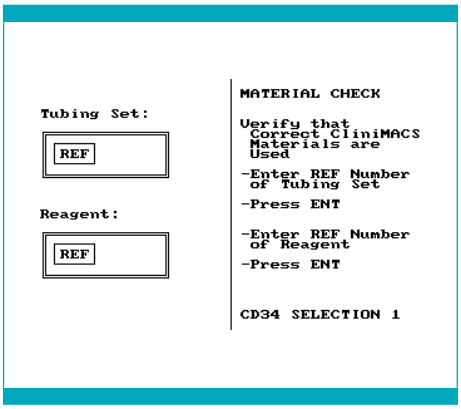
Ecrã 7.2: Confirmação

Verificação do material

A janela indica Ecrã 7.3.

CD34 SELECTION 1 e CD34 SELECTION 2 estão otimizados para o enriquecimento de células CD34 positivas.

Para confirmar que o conjunto de tubos adequado está disponível e que foi utilizado o reagente correto para a marcação de células, introduzir o respetivo número de catálogo (REF) na caixa de diálogo. O software do aparelho irá verificar se os materiais podem ser utilizados em combinação com o programa escolhido.



Ecrã 7.3: Verificação do material

1. Introduzir o número de catálogo do conjunto de tubos a utilizar para a separação de células automatizada. Para confirmar e continuar, pressionar **ENT**.
2. Introduzir o número de catálogo do reagente utilizado para a marcação de células. Para confirmar e continuar, pressionar **ENT**.

Se tiver sido introduzido o número de catálogo de um conjunto de tubos ou de um reagente não especificado para o programa de separação escolhido, surge uma mensagem. Pressionar **ENT** para confirmar e introduzir novamente o número de catálogo correto. Se o número introduzido continuar incorreto, a mensagem volta a surgir. Ao pressionar **ENT**, o programa volta ao menu de programas (ver Ecrã 7.1).

IMPORTANTE

- CD34 SELECTION 1 só pode ser utilizado em combinação com o CliniMACS Tubing Set (REF 161-01), e CD34 SELECTION 2 só pode ser utilizado em combinação com o CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01). Verificar atentamente o conjunto de tubos antes da instalação.
- Para a correção de erros durante a introdução de dados, pressionar a tecla "Undo" (desfazer) (ver secção "Descrição" no manual do utilizador CliniMACS Plus Instrument).

Se a verificação do material tiver sido bem-sucedida, o programa continua automaticamente com as instruções para instalar o conjunto de tubos.

▶ **Continuar com o PASSO 3.**

7.2.3 ENRICHMENT 1.1

IMPORTANTE

- O programa de separação ENRICHMENT 1.1 só pode ser utilizado com o CliniMACS Tubing Set (REF 161-01).
- Na janela de visualização irão surgir instruções no ecrã e diagramas a servir de guias do procedimento. Executar e verificar cada um dos passos de acordo com as instruções do manual antes de ir para o passo seguinte. Para a correção de erros durante a introdução de dados, pressionar a tecla "Undo" (desfazer) (ver secção "Descrição" no manual do utilizador CliniMACS Plus Instrument).

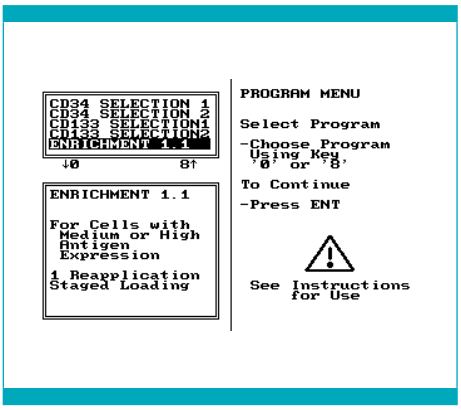
Escolha do programa de separação ENRICHMENT 1.1

A janela indica Ecrã 7.4.

Escolher ENRICHMENT 1.1.

Para escolher um programa de separação, destacar o nome do programa com a barra preta. Deslocar a barra para cima e para baixo com as teclas **0** e **8**.

Para ir para o programa destacado, pressionar **ENT**.



Ecrã 7.4: Escolha do programa de separação

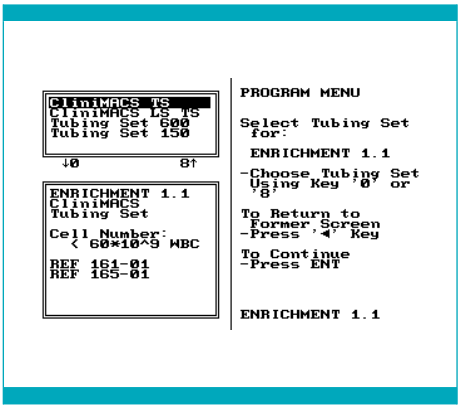
Seleção do conjunto de tubos

A janela indica Ecrã 7.5.

Confirmar que foi escolhido o programa correto. Caso contrário, pressionar ◄ para voltar ao passo anterior para corrigir a escolha.

Selecionar o conjunto de tubos destacando-o na caixa no canto superior esquerdo com a barra preta. Deslocar a barra para cima e para baixo com as teclas **0** e **8**.

A janela abaixo indica os dados relevantes, como a capacidade e o número de catálogo do conjunto de tubos selecionado.



Ecrã 7.5: Seleção do conjunto de tubos

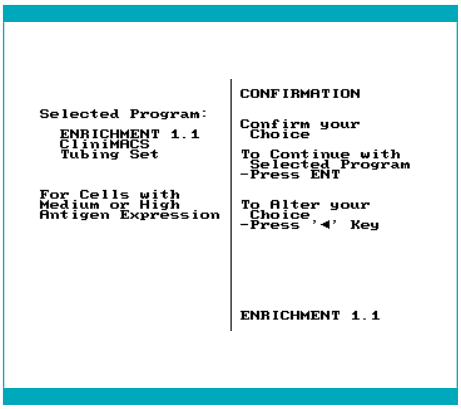
Para continuar com a combinação selecionada de programa de separação e conjunto de tubos, pressionar **ENT**.

Confirmação

A janela indica Ecrã 7.6.

Para confirmar a combinação de programa de separação e conjunto de tubos e continuar, pressionar **ENT**.

Caso contrário, pressionar ◄ para voltar ao passo anterior para corrigir a escolha.



Ecrã 7.6: Confirmação

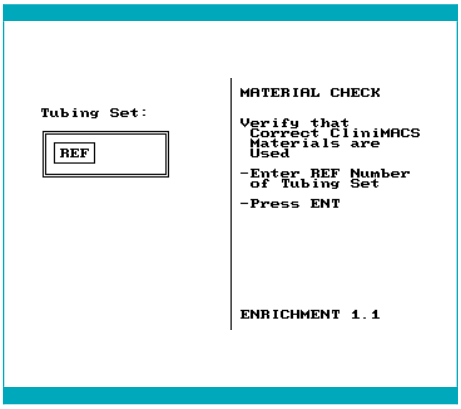
Verificação do material

A janela indica Ecrã 7.7.

A pergunta sobre o número de catálogo (REF) do conjunto de tubos serve de verificação de segurança para garantir que o conjunto de tubos selecionado pode ser utilizado com o programa selecionado.

Introduzir o número de catálogo do conjunto de tubos selecionado e pressionar **ENT** para continuar.

Se tiver sido introduzido um número de catálogo não correspondente, surge uma mensagem. Para confirmar, pressionar **ENT** e introduzir o número de catálogo correto. Se o número introduzido continuar errado, a mensagem volta a surgir. Ao pressionar **ENT**, o programa volta ao menu de programas (ver Ecrã 7.4).

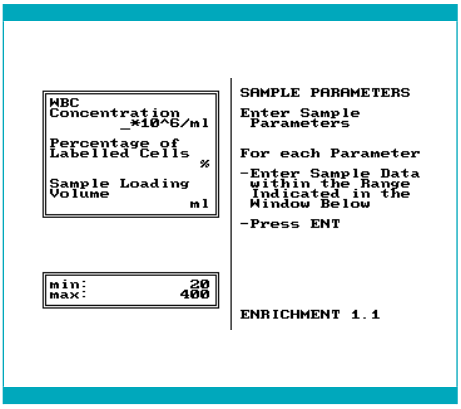


Ecrã 7.7: Verificação do material

Introdução dos parâmetros da amostra

Se a verificação do material tiver sido bem-sucedida, o programa continua automaticamente com a pergunta sobre os parâmetros da amostra necessários para ajustar a separação a cada amostra individual e para dar informações importantes ao operador relativas à solução tampão e aos volumes das bolsas necessários.

A janela indica Ecrã 7.8.



Ecrã 7.8: Introdução dos parâmetros da amostra

1. Começar por introduzir a concentração de WBC da amostra. O intervalo permitido é indicado na caixa no canto inferior esquerdo. Pressionar ◄ para corrigir uma introdução errada.

   Confirmar que o valor introduzido reflete o valor da amostra. Caso contrário, o processamento da amostra pode não ser o ideal. Para continuar com a introdução seguinte, pressionar **ENT**.

IMPORTANTE

Todos os parâmetros da amostra necessários dizem respeito à amostra após marcação das células e procedimento de lavagem. O intervalo permitido indicado na caixa no canto inferior esquerdo tem sempre em conta a introdução anterior. Após cada introdução, o software calcula e ajusta o intervalo aceite da pergunta seguinte.

⚠ CUIDADO

Especificar parâmetros errados pode resultar num processamento subótimo da amostra e aumentar o risco de perda de células-alvo. Introduzir valores da concentração de WBC e/ou percentagem de células marcadas inferiores aos valores efetivos da amostra pode resultar em perda de células devido a sobrecarga do sistema. Introduzir um volume de amostra inferior pode resultar em perda de células devido a sobrecarga ou mesmo no processamento incompleto da amostra. Se a especificação de algum dos três parâmetros for demasiado elevada, isso resultará num maior tempo de processamento e num maior volume de fração de células-alvo. Confirmar sempre que são introduzidos os parâmetros corretos.

2. Introduzir a percentagem de células marcadas. Confirmar que o valor introduzido reflete o valor da amostra. Caso contrário, o processamento da amostra pode não ser o ideal (ver "Importante"). Para continuar com a introdução seguinte, pressionar **ENT**.

3. Introduzir o volume final da amostra de células. Confirmar que o valor introduzido reflete o valor da amostra. Caso contrário, o processamento da amostra pode não ser o ideal (ver "Importante").

Para continuar, pressionar **ENT**.

Cálculo

O software CliniMACS Plus calcula o número total de células marcadas para verificar se a capacidade de separação é suficiente.

O resultado é apresentado em um de dois ecrãs possíveis:

- O resultado do cálculo é apresentado num ecrã idêntico ao Ecrã 7.9. Verificar se o número calculado de células marcadas está correto.

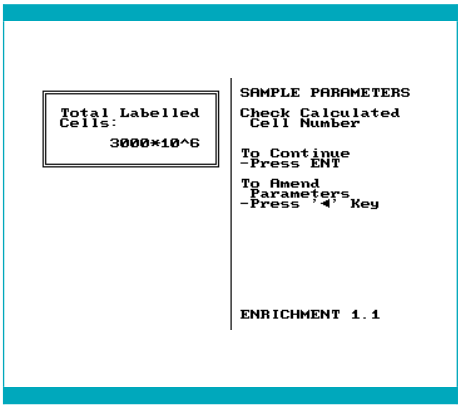
  Para continuar, pressionar **ENT**.

  Os dados podem ser corrigidos. Pressionar ◄ para voltar ao ecrã anterior para correção.

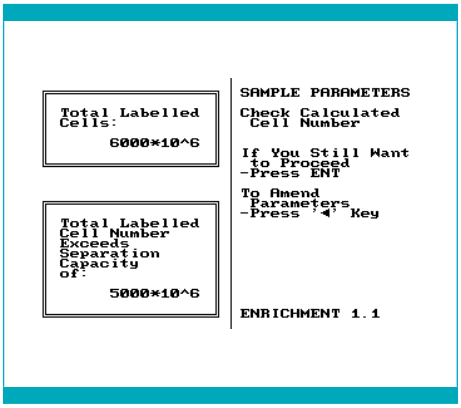
- Se o número calculado de células marcadas exceder a capacidade de separação do sistema CliniMACS Plus, surge um ecrã idêntico ao Ecrã 7.10. Verificar se foram introduzidos os parâmetros corretos da amostra e se o número calculado de células está correto. Pressionar ◄ para voltar ao Ecrã 7.8 anterior e corrigir os parâmetros da amostra.

  Para evitar sobrecarregar o sistema, dividir a amostra e determinar o volume de cada porção. Pressionar ◄ para voltar ao ecrã Ecrã 7.8 anterior. Introduzir os parâmetros da amostra para a primeira alíquota da amostra e continuar com a separação desta porção. Uma vez concluída a separação, iniciar uma segunda separação com a segunda alíquota utilizando um novo conjunto de tubos.

  Para continuar, pressionar **ENT**.



Ecrã 7.9: Cálculo



Ecrã 7.10: Cálculo: O número de células excede a capacidade de separação

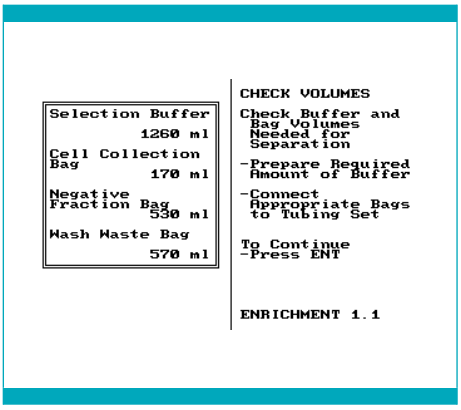
Informação do volume

A partir do número total de células marcadas (ver secção Cálculo"), o software calcula o número de fases de separação, a quantidade de solução tampão necessária para toda a separação e os volumes líquidos que irão ser reunidos na Negative Fraction Bag, na Buffer Waste Bag e na Cell Collection Bag.

Os valores padrão são os seguintes:

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

Se algum dos valores calculados exceder estes valores padrão, surge Ecrã 7.11 para informar da quantidade de líquido que irá ser necessária e acumulada durante o processo de separação. Se necessário, substituir as bolsas fornecidas com o conjunto de tubos (capacidade aproximada 500 mL) por outras alternativas de tamanho adequado. As bolsas fixadas originalmente no conjunto de tubos estão ligadas por conectores Luer. As bolsas que substituem as originais devem ter um conector Luer fêmea. As bolsas padrão podem ser ligadas por um Luer/Spike Interconnector.



Ecrã 7.11: Verificação de volumes

1. Confirmar se está disponível a quantidade de solução tampão necessária. Não carregar o suporte da bolsa com mais de três litros de solução tampão.

   ATENÇÃO

   Risco de danos no aparelho. Sobrecarregar os suportes das bolsas pode danificar o aparelho. A capacidade de carga de um único suporte da bolsa é de 3 kg. Não sobrecarregar os suportes das bolsas.

2. Abrir o tabuleiro do conjunto de tubos em condições estéreis e substituir as bolsas originais por outras maiores, se necessário. Garantir um fluxo ilimitado para estas bolsas.
3. Fixar uma Cell Collection Bag de tamanho suficiente ao conector Luer livre. Se não estiver especificado no Ecrã 7.11, o volume de eluição máximo da fração de células-alvo é de 150 mL. Garantir que é possível um fluxo ilimitado para a Cell Collection Bag.

IMPORTANTE

- Garantir que está disponível a quantidade de solução tampão necessária e que o volume das bolsas mencionado no Ecrã 7.11 é suficiente. Caso contrário, o desempenho da separação fica comprometido.
- Qualquer modificação no conjuntos de tubos CliniMACS deve ser feita em condições estéreis, p. ex., na campânula de fluxo laminar.
- Para posterior análise ou processamento de células, atender ao facto de os volumes indicados no Ecrã 7.11 não serem exatos, mas sim volumes que estão dentro dos requisitos de segurança.

4. Verificar as ligações Luer Lock nas colunas. Os Luer Locks têm de ser bem fechados.

Para continuar, pressionar **ENT**.

O programa continua automaticamente com as instruções de instalação do conjunto de tubos no aparelho.

▶ **Continuar com o PASSO 3.**

7.2.4 ENRICHMENT 3.2

IMPORTANTE

- O programa de separação ENRICHMENT 3.2 só pode ser utilizado com o CliniMACS Tubing Set (REF 161-01).
- Na janela de visualização irão surgir instruções no ecrã e diagramas a servir de guias do procedimento. Executar e verificar cada um dos passos de acordo com as instruções do manual antes de ir para o passo seguinte. Para a correção de erros durante a introdução de dados, pressionar a tecla "Undo" (desfazer) (ver secção "Descrição" no manual do utilizador CliniMACS Plus Instrument).

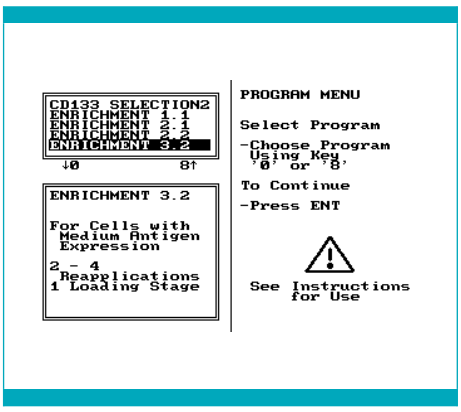
Escolha do programa de separação ENRICHMENT 3.2

A janela indica Ecrã 7.12.

Escolher ENRICHMENT 3.2.

Para escolher um programa de separação, destacar o nome do programa com a barra preta. Deslocar a barra para cima e para baixo com as teclas **0** e **8**.

Para ir para o programa destacado, pressionar **ENT**.



Ecrã 7.12: Escolha do programa de separação

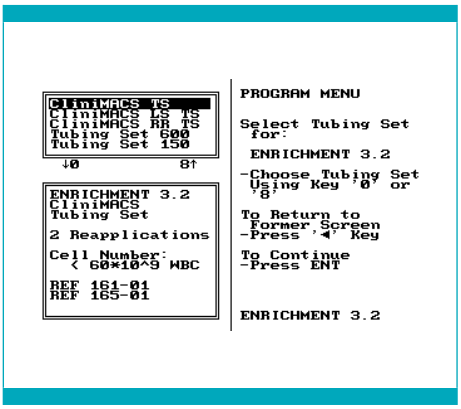
Seleção do conjunto de tubos

A janela indica Ecrã 7.13.

Confirmar que foi escolhido o programa correto. Caso contrário, pressionar ◄ para voltar ao passo anterior para corrigir a escolha.

Selecionar o conjunto de tubos destacando-o na caixa do lado esquerdo com a barra preta. Deslocar a barra para cima e para baixo com as teclas 0 e 8.

A janela abaixo indica os dados relevantes, como a capacidade e o número de catálogo do conjunto de tubos selecionado.



Ecrã 7.13: Seleção do conjunto de tubos

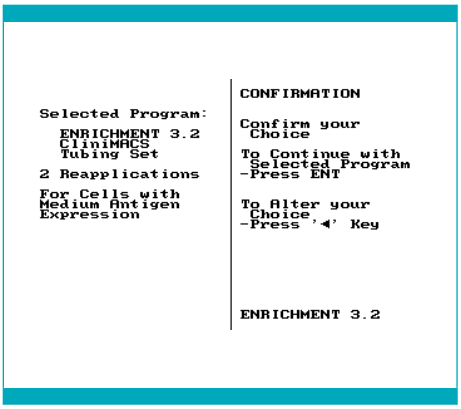
Para continuar com a combinação selecionada de programa de separação e conjunto de tubos, pressionar ENT.

Confirmação

A janela indica Ecrã 7.14.

Para confirmar a combinação de programa de separação e conjunto de tubos e continuar, pressionar ENT.

Caso contrário, pressionar ◄ para voltar ao passo anterior para corrigir a escolha.



Ecrã 7.14: Confirmação

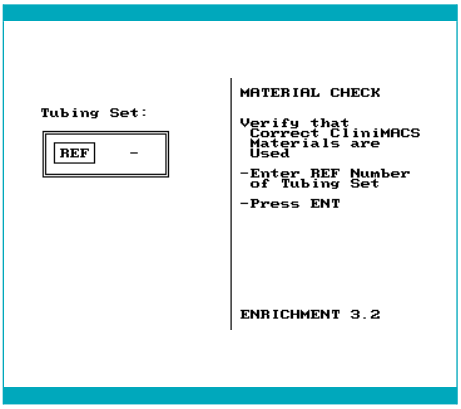
Verificação do material

A janela indica Ecrã 7.15.

A pergunta sobre o número de catálogo (REF) do conjunto de tubos serve de verificação de segurança para garantir que o conjunto de tubos selecionado pode ser utilizado com o programa selecionado.

Introduzir o número de catálogo do conjunto de tubos selecionado e pressionar ENT para continuar.

Se tiver sido introduzido um número de catálogo não correspondente, surge uma mensagem.



Ecrã 7.15: Verificação do material

Para confirmar, pressionar **ENT** e introduzir o número de catálogo correto. Se o número introduzido continuar errado, a mensagem volta a surgir. Ao pressionar **ENT**, o programa volta ao menu de programas (ver Ecrã 7.12).

Se a verificação do material tiver sido bem-sucedida, o programa continua automaticamente com as instruções para instalar o conjunto de tubos.

▶ **Continuar com o PASSO 3.**

7.2.5 DEPLETION 2.1

IMPORTANTE

- O programa de separação DEPLETION 2.1 só pode ser utilizado com o CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01).
- Na janela de visualização irão surgir instruções no ecrã e diagramas a servir de guias do procedimento. Executar e verificar cada um dos passos de acordo com as instruções do manual antes de ir para o passo seguinte. Para a correção de erros durante a introdução de dados, pressionar a tecla "Undo" (desfazer) (ver secção "Descrição" no manual do utilizador CliniMACS Plus Instrument).

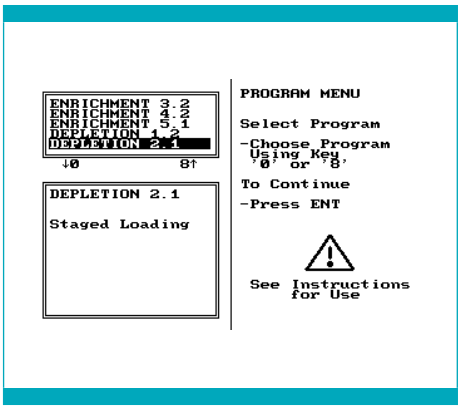
Escolha do programa de separação DEPLETION 2.1

A janela indica Ecrã 7.16.

Escolher DEPLETION 2.1.

Para escolher um programa de separação, destacar o nome do programa com a barra preta. Deslocar a barra para cima e para baixo com as teclas **0** e **8**.

Para ir para o programa destacado, pressionar **ENT**.



Ecrã 7.16: Escolha do programa de separação

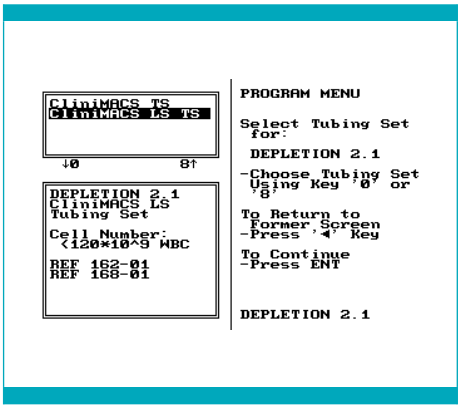
Seleção do conjunto de tubos

A janela indica Ecrã 7.17.

Confirmar que foi escolhido o programa correto.

Caso contrário, pressionar ◀ para voltar ao passo anterior para corrigir a escolha.

Selecionar o conjunto de tubos destacando-o na caixa no canto superior esquerdo com a barra preta. Deslocar a barra para cima e para baixo com as teclas **0** e **8**.



Ecrã 7.17: Seleção do conjunto de tubos

A janela abaixo indica os dados relevantes, como a capacidade e o número de catálogo do conjunto de tubos selecionado.

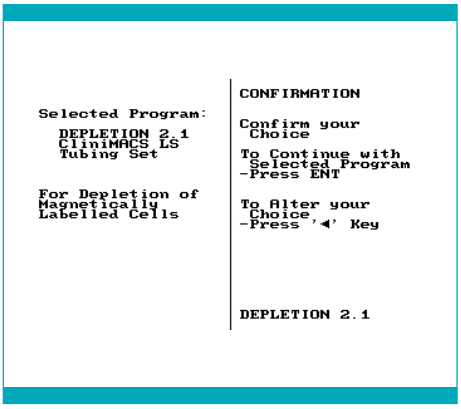
Para continuar com a combinação selecionada de programa de separação e conjunto de tubos, pressionar **ENT**.

Confirmação

A janela indica Ecrã 7.18.

Para confirmar a combinação de programa de separação e conjunto de tubos e continuar, pressionar **ENT**.

Caso contrário, pressionar ◄ para voltar ao passo anterior para corrigir a escolha.



Ecrã 7.18: Confirmação

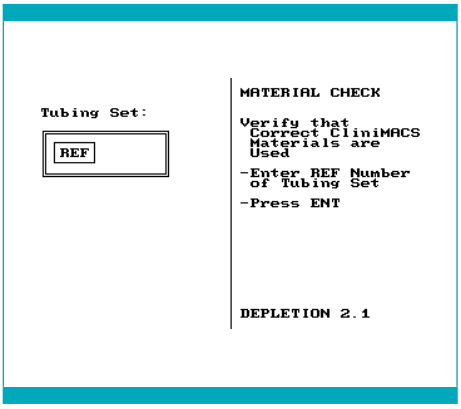
Verificação do material

A janela indica Ecrã 7.19.

A pergunta sobre o número de catálogo (REF) do conjunto de tubos serve de verificação de segurança para garantir que o conjunto de tubos selecionado pelo operador pode ser utilizado.

Introduzir o número de catálogo do conjunto de tubos selecionado e pressionar **ENT** para continuar.

Se tiver sido introduzido um número de catálogo não correspondente, surge uma mensagem.



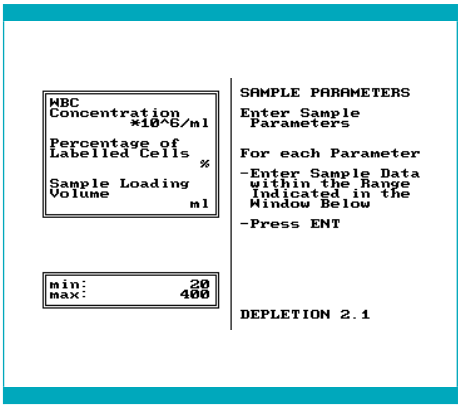
Ecrã 7.19: Verificação do material

Para confirmar, pressionar **ENT** e introduzir o número de catálogo correto. Se o número introduzido continuar errado, a mensagem volta a surgir. Ao pressionar **ENT**, o programa volta ao menu de programas (ver Ecrã 7.16).

Introdução dos parâmetros da amostra

Se a verificação do material tiver sido bem-sucedida, o programa continua automaticamente com a pergunta sobre os parâmetros da amostra necessários para ajustar a separação a cada amostra individual e para dar informações importantes ao operador relativas à solução tampão e aos volumes das bolsas necessários.

A janela indica Ecrã 7.20.



Ecrã 7.20: Introdução dos parâmetros da amostra

1. Começar por introduzir a concentração de WBC da amostra. O intervalo permitido é indicado na caixa no canto inferior esquerdo. Pressionar ◀ para corrigir uma introdução errada.

   Confirmar que o valor introduzido reflete o valor da amostra. Caso contrário, o processamento da amostra pode não ser o ideal.

   IMPORTANTE

   Todos os parâmetros da amostra necessários dizem respeito à amostra após marcação das células e procedimento de lavagem. O intervalo permitido indicado na caixa no canto inferior esquerdo tem sempre em conta a introdução anterior. Depois de cada introdução, o software calcula e ajusta o intervalo aceite da pergunta seguinte.

   ⚠ CUIDADO

   Especificar parâmetros errados pode resultar num processamento subótimo da amostra e aumentar o risco de perda de células-alvo. Introduzir valores da concentração de WBC e/ou percentagem de células marcadas inferiores aos valores efetivos da amostra pode resultar em perda de células devido a sobrecarga do sistema. Introduzir um volume de amostra inferior pode resultar em perda de células devido a sobrecarga ou mesmo no processamento incompleto da amostra. Se a especificação de algum dos três parâmetros for demasiado elevada, isso resultará num maior tempo de processamento e num maior volume de fração de células-alvo. Verificar sempre se são introduzidos os parâmetros corretos.

   Para continuar com a introdução seguinte, pressionar **ENT**.

2. Introduzir a percentagem de células marcadas. Confirmar que o valor introduzido reflete o valor da amostra. Caso contrário, o processamento da amostra pode não ser o ideal (ver "Importante").

   Para continuar com a introdução seguinte, pressionar **ENT**.

3. Introduzir o volume final da amostra de células. Confirmar que o valor introduzido reflete o valor da amostra. Caso contrário, o processamento da amostra pode não ser o ideal (ver "Importante").

Para continuar, pressionar **ENT**.

Cálculo

O software CliniMACS Plus calcula o número total de células marcadas para verificar se a capacidade de separação é suficiente.

O resultado é apresentado em um de dois ecrãs possíveis:

- O resultado do cálculo é apresentado num ecrã idêntico ao Ecrã 7.21. Verificar se o número calculado de células marcadas está correto.

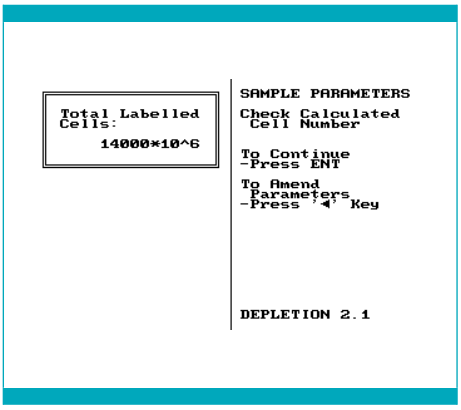
  Para continuar, pressionar **ENT**.

  Os dados podem ser corrigidos. Pressionar ◄ para voltar ao ecrã anterior para correção.

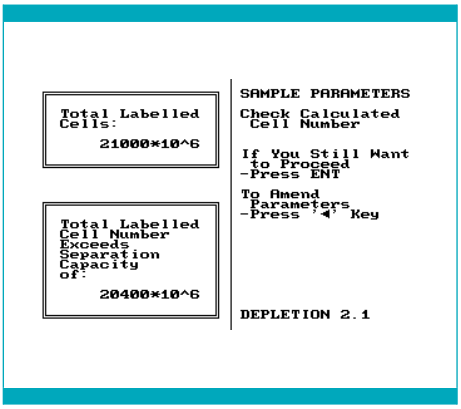
- Se o número calculado de células marcadas exceder a capacidade de separação do sistema CliniMACS Plus, surge um ecrã idêntico ao Ecrã 7.22. Verificar se foram introduzidos os parâmetros corretos da amostra e se o número calculado de células está correto. Pressionar ◄ para voltar ao ecrã anterior e corrigir os parâmetros da amostra.

  Para evitar sobrecarregar o sistema, dividir a amostra e determinar o volume de cada porção. Pressionar ◄ para voltar ao ecrã Ecrã 7.20 anterior. Introduzir os parâmetros da amostra para a primeira alíquota da amostra e continuar com a separação desta porção. Uma vez concluída a separação, iniciar uma segunda separação com a segunda alíquota utilizando um novo conjunto de tubos.

  Para continuar, pressionar **ENT**.



Ecrã 7.21: Cálculo



Ecrã 7.22: Cálculo: O número de células excede a capacidade de separação

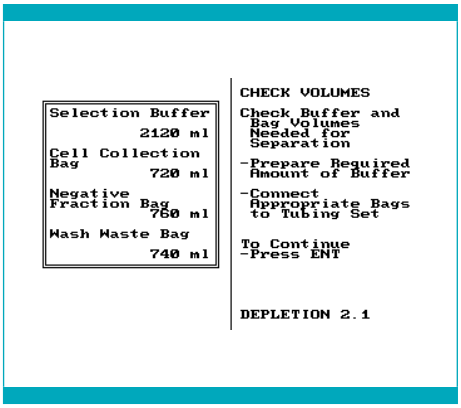
Informação do volume

A partir do número total de células marcadas (ver secção Cálculo"), o software calcula o número de fases de separação, a quantidade de solução tampão necessária para toda a separação e os volumes líquidos que irão ser reunidos na Negative Fraction Bag, na Buffer Waste Bag e na Cell Collection Bag.

Os valores padrão são os seguintes:

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

Se algum dos valores calculados exceder estes valores padrão, surge Ecrã 7.23 para informar da quantidade de líquido que irá ser necessária e acumulada durante o processo de separação. Se necessário, substituir as bolsas fornecidas com o conjunto de tubos (capacidade aproximada 500 mL) por outras alternativas de tamanho adequado. As bolsas fixadas originalmente no conjunto de tubos estão ligadas por conectores Luer. As bolsas que substituem as originais devem ter um conector Luer fêmea. As bolsas padrão podem ser ligadas por um Luer/Spike Interconnector.



Ecrã 7.23: Verificação de volumes

1. Confirmar se está disponível a quantidade de solução tampão necessária. Não carregar o suporte da bolsa com mais de três litros de solução tampão.

   ATENÇÃO

   Risco de danos no aparelho. Sobrecarregar os suportes das bolsas pode danificar o aparelho. A capacidade de carga de um único suporte da bolsa é de 3 kg. Não sobrecarregar os suportes das bolsas.

2. Abrir a bandeja do conjunto de tubos em condições estéreis e substituir as bolsas originais por outras maiores, se necessário. Garantir um fluxo ilimitado para estas bolsas.

3. Fixar uma Cell Collection Bag de tamanho suficiente ao conector Luer livre. Se não estiver especificado no Ecrã 7.23, o volume máximo de eluição da fração de células-alvo é de 150 mL. Garantir que é possível um fluxo ilimitado para a Cell Collection Bag.

IMPORTANTE

- Garantir que está disponível a quantidade de solução tampão necessária e que o volume das bolsas mencionado no Ecrã 7.23 é suficiente. Caso contrário, o desempenho da separação fica comprometido.
- Qualquer modificação nos conjuntos de tubos CliniMACS deve ser feita em condições estéreis, p. ex., na campânula de fluxo laminar.
- Para posterior análise ou processamento de células, atender ao facto de os volumes indicados no Ecrã 7.23 não serem exatos, mas sim volumes que se situam dentro dos requisitos de segurança.

4. Verificar as ligações Luer Lock nas colunas. Os Luer Locks têm de ser bem fechados.

Para continuar, pressionar **ENT**.

O programa continua automaticamente com as instruções de instalação do conjunto de tubos no aparelho.

▶ **Continuar com o PASSO 3.**

7.2.6 DEPLETION 3.1

IMPORTANTE

- O programa de separação DEPLETION 3.1só pode ser utilizado com o CliniMACS Depletion Tubing Set (REF 261-01).
- Na janela de visualização irão surgir instruções no ecrã e diagramas a servir de guias do procedimento. Executar e verificar cada um dos passos de acordo com as instruções do manual antes de ir para o passo seguinte. Para a correção de erros durante a introdução de dados, pressionar a tecla "Undo" desfazer) (ver secção "Descrição" no manual do utilizador CliniMACS Plus Instrument).

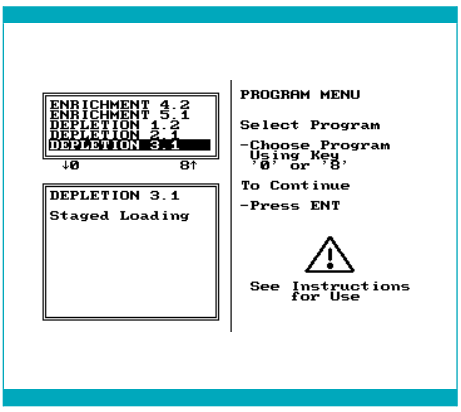
Escolha do programa de separação DEPLETION 3.1

A janela indica Ecrã 7.24.

Escolher DEPLETION 3.1.

Para escolher um programa de separação, destacar o nome do programa com a barra preta. Deslocar a barra para cima e para baixo com as teclas **0** e **8**.

Para ir para o programa destacado, pressionar **ENT**.



Ecrã 7.24: Escolha do programa de separação

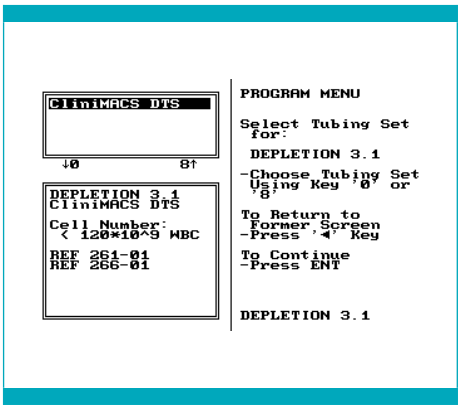
Seleção do conjunto de tubos

A janela indica Ecrã 7.25.

Confirmar que foi escolhido o programa correto. Caso contrário, pressionar ◄ para voltar ao passo anterior para corrigir a escolha.

Selecionar o conjunto de tubos destacando-o na caixa no canto superior esquerdo com a barra preta. Deslocar a barra para cima e para baixo com as teclas **0** e **8**.

A janela abaixo indica os dados relevantes, como a capacidade e o número de catálogo do conjunto de tubos selecionado.



Ecrã 7.25: Seleção do conjunto de tubos

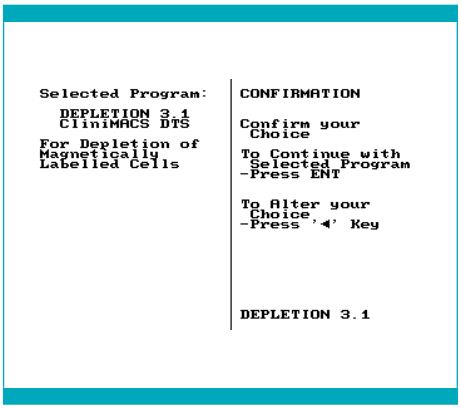
Para continuar com a combinação selecionada de programa de separação e conjunto de tubos, pressionar **ENT**.

Confirmação

A janela indica Ecrã 7.26.

Para confirmar a combinação de programa de separação e conjunto de tubos e continuar, pressionar **ENT**.

Caso contrário, pressionar ◄ para voltar ao passo anterior para corrigir a escolha.



Ecrã 7.26: Confirmação

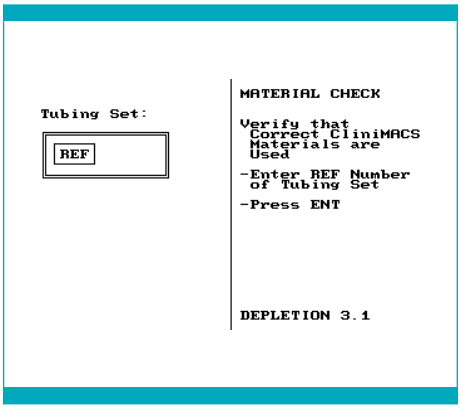
Verificação do material

A janela indica Ecrã 7.27.

A pergunta sobre o número de catálogo (REF) do conjunto de tubos serve de verificação de segurança para garantir que o conjunto de tubos selecionado pelo operador pode ser utilizado.

Introduzir o número de catálogo do conjunto de tubos selecionado e pressionar **ENT** para continuar.

Se tiver sido introduzido um número de catálogo não correspondente, surge uma mensagem.



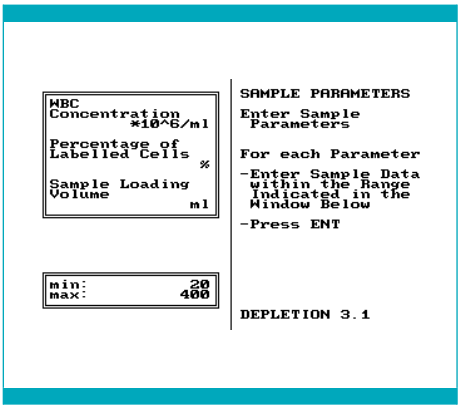
Ecrã 7.27: Verificação do material

Para confirmar, pressionar ENT e introduzir o número de catálogo correto. Se o número introduzido continuar errado, a mensagem volta a surgir. Ao pressionar ENT, o programa volta ao menu de programas (ver Ecrã 7.25).

Introdução dos parâmetros da amostra

Se a verificação do material tiver sido bem-sucedida, o programa continua automaticamente com a pergunta sobre alguns parâmetros da amostra necessários para ajustar a separação a cada amostra individual e para dar informações importantes ao operador relativas à solução tampão e aos volumes das bolsas necessários.

A janela indica Ecrã 7.28.



Ecrã 7.28: Introdução dos parâmetros da amostra

1. Começar por introduzir a concentração de WBC da amostra. O intervalo permitido é indicado na caixa no canto inferior esquerdo. Pressionar ◄ para corrigir uma introdução errada.

   Confirmar que o valor introduzido reflete o valor da amostra. Caso contrário, o processamento da amostra pode não ser o ideal.

   IMPORTANTE
   Todos os parâmetros da amostra necessários dizem respeito à amostra após marcação das células e procedimento de lavagem. O intervalo permitido indicado na caixa no canto inferior esquerdo tem sempre em conta a introdução anterior. Depois de cada introdução, o software calcula e ajusta o intervalo aceite da pergunta seguinte.

   ⚠ CUIDADO

   Especificar parâmetros errados pode resultar num processamento subótimo da amostra e aumentar o risco de perda de células-alvo. Introduzir valores da concentração de WBC e/ou percentagem de células marcadas inferiores aos valores efetivos da amostra pode resultar em perda de células devido a sobrecarga do sistema. Introduzir um volume de amostra inferior pode resultar em perda de células devido a sobrecarga ou mesmo no processamento incompleto da amostra. Se a especificação de algum dos três parâmetros for demasiado elevada, isso resultará num maior tempo de processamento e num maior volume de fração de células-alvo. Verificar sempre se são introduzidos os parâmetros corretos.

   Para continuar com a introdução seguinte, pressionar ENT.

2. Introduzir a percentagem de células marcadas. Confirmar que o valor introduzido reflete o valor da amostra. Caso contrário, o processamento da amostra pode não ser o ideal (ver "Importante").

   Para continuar com a introdução seguinte, pressionar ENT.

3. Introduzir o volume final da amostra de células. Confirmar que o valor introduzido reflete o valor da amostra. Caso contrário, o processamento da amostra pode não ser o ideal (ver "Importante").

Para continuar, pressionar **ENT**.

Cálculo

O software CliniMACS Plus calcula o número total de células marcadas para verificar se a capacidade de separação é suficiente.

O resultado é apresentado em um de dois ecrãs possíveis:

- O resultado do cálculo é apresentado num ecrã idêntico ao Ecrã 7.29. Verificar se o número calculado de células marcadas está correto.

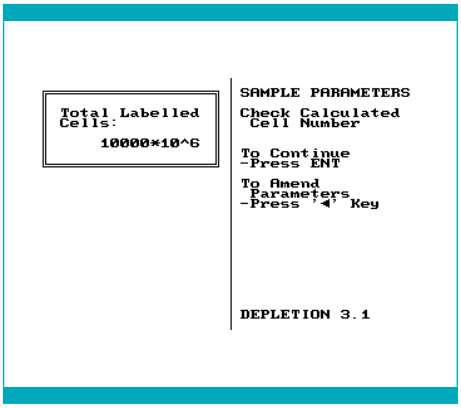
  Para continuar, pressionar **ENT**.

  Os dados podem ser corrigidos. Pressionar ◄ para voltar ao ecrã anterior para correção.

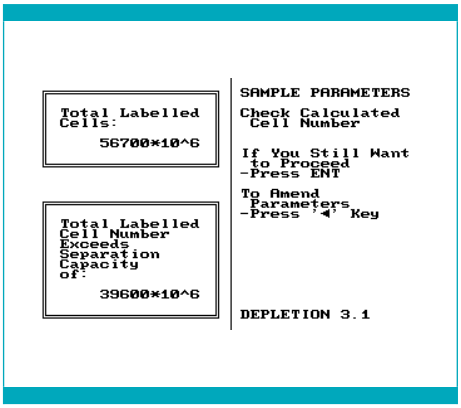
- Se o número calculado de células marcadas exceder a capacidade de separação do sistema CliniMACS Plus, surge um ecrã idêntico ao Ecrã 7.30. Verificar se foram introduzidos os parâmetros certos da amostra e se o número calculado de células está correto. Pressionar ◄ para voltar ao ecrã anterior e corrigir os parâmetros da amostra.

  Para evitar sobrecarregar o sistema, dividir a amostra e determinar o volume de cada porção. Pressionar ◄ para voltar ao ecrã Ecrã 7.28 anterior. Introduzir os parâmetros da amostra para a primeira alíquota da amostra e continuar com a separação desta porção. Uma vez concluída a separação, iniciar uma segunda separação com a segunda alíquota utilizando um novo conjunto de tubos.

  Para continuar, pressionar **ENT**.



Ecrã 7.29: Seleção do conjunto de tubos



Ecrã 7.30: Cálculo: O número de células excede a capacidade de separação

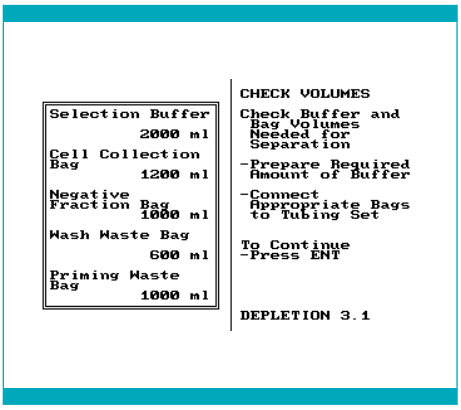
Informação do volume

A partir do número total de células marcadas (ver secção Cálculo"), o software calcula o número de fases de separação, a quantidade de solução tampão necessária para todo o empobrecimento e os volumes líquidos que irão ser reunidos na Cell Collection Bag, na Non-Target Cell Bag e na Reapplication Bag.

IMPORTANTE

- A Negative Fraction Bag corresponde à Non-Target Cell Bag.
- A Priming Waste Bag corresponde à Reapplication Bag.

Se algum dos valores calculados exceder estes valores padrão, surge um ecrã idêntico ao Ecrã 7.31 para informar da quantidade de líquido que irá ser necessária e acumulada durante o processo de separação. Se necessário, substituir as bolsas fornecidas com o conjunto de tubos por outras alternativas de tamanho adequado. As bolsas fixadas originalmente no conjunto de tubos estão ligadas por conectores Luer. As bolsas que substituem as originais devem ter um conector Luer fêmea. As bolsas padrão podem ser ligadas por um Luer/Spike Interconnector.



Ecrã 7.31: Verificação de volumes

1. Confirmar se está disponível a quantidade de solução tampão necessária. Não carregar o suporte da bolsa com mais de três litros de solução tampão.

   ATENÇÃO

   Risco de danos no aparelho. Sobrecarregar os suportes das bolsas pode danificar o aparelho. A capacidade de carga de um único suporte da bolsa é de 3 kg. Não sobrecarregar os suportes das bolsas.

2. Abrir a bandeja do conjunto de tubos em condições estéreis e substituir as bolsas originais por outras maiores, se necessário. Garantir um fluxo ilimitado para estas bolsas.

3. Se necessário, substituir a Cell Collection Bag do conjunto de tubos por uma bolsa de transferência de tamanho suficiente. Determinar o peso de uma Cell Collection Bag nova e vazia e registar. Garantir que é possível um fluxo ilimitado para a Cell Collection Bag. Em alternativa, fixar mais uma bolsa de transferência de 600 mL à primeira Cell Collection Bag, p. ex., com o conjunto de transferência de plasma.

IMPORTANTE

- Garantir que está disponível a quantidade de solução tampão necessária e que o volume das bolsas mencionado no Ecrã 7.31 é suficiente. Caso contrário, o desempenho da separação fica comprometido.
- Qualquer modificação no conjuntos de tubos CliniMACS deve ser feita em condições estéreis, p. ex., na campânula de fluxo laminar.
- Para posterior análise ou processamento de células, atender ao facto de os volumes indicados no Ecrã 7.31 não serem exatos, mas sim volumes que se situam dentro dos requisitos de segurança.

4. Verificar as ligações Luer Lock nas colunas. Os Luer Locks têm de ser bem fechados.

Para continuar, pressionar **ENT**.

O programa continua automaticamente com as instruções de instalação do conjunto de tubos no aparelho.

▶ **Continuar com o PASSO 3.**

7.3 PASSO 3: Instalação dos conjuntos de tubos CliniMACS

7.3.1 CliniMACS Tubing Set e CliniMACS Tubing Set LS

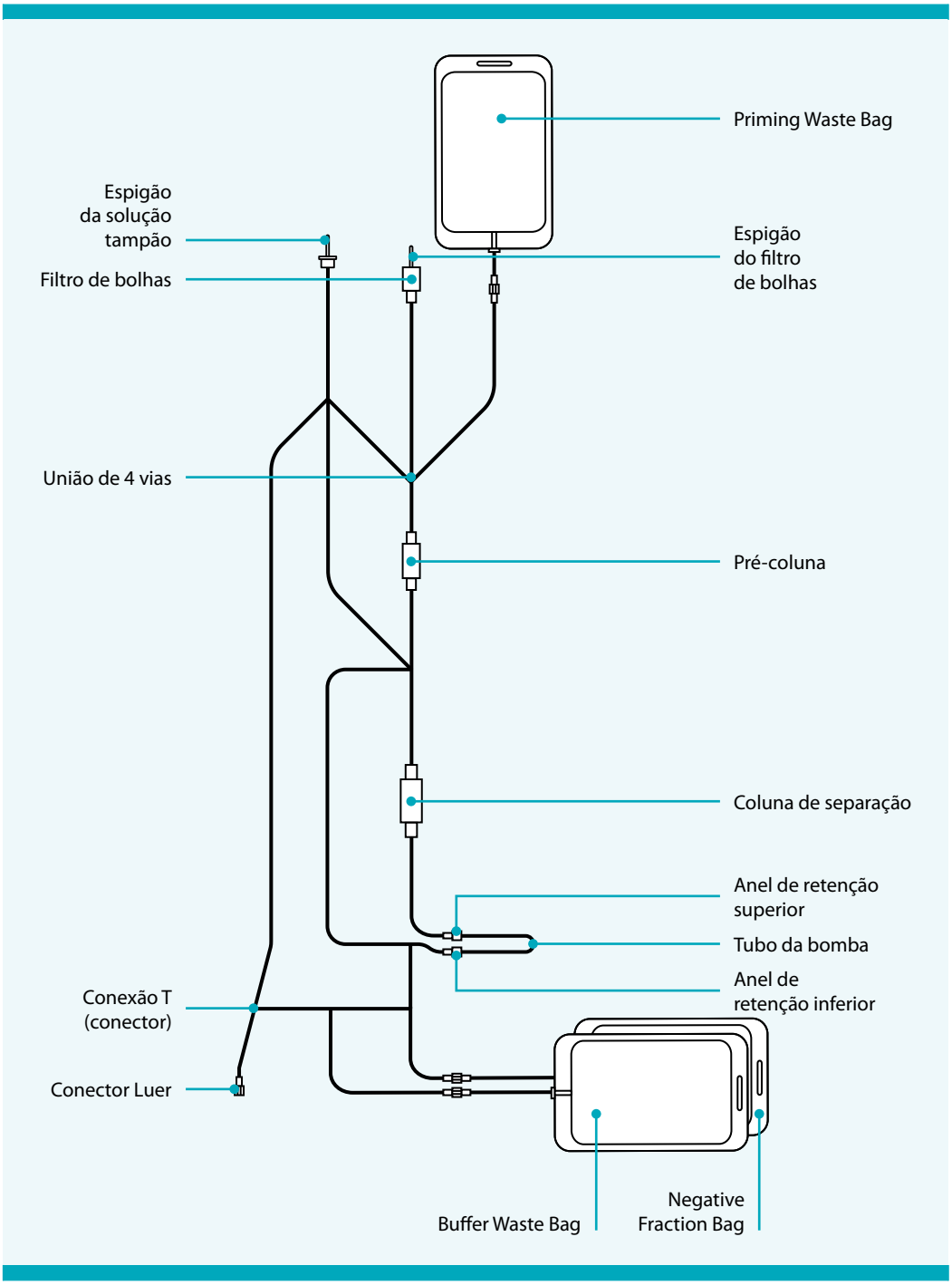
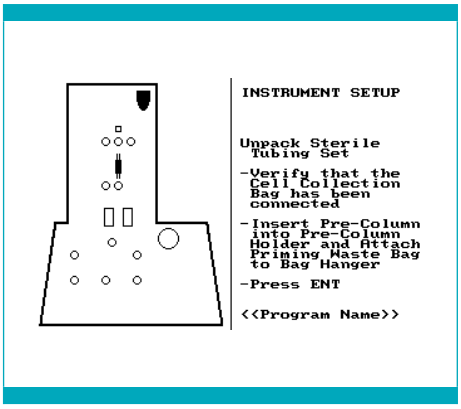


Figura 7.2: Estrutura geral de um CliniMACS Tubing Set (p. ex., CliniMACS Tubing Set)

Preparação para a instalação do conjunto de tubos

A janela indica Ecrã 7.32.

A instrução é apresentada à direita, num diagrama correspondente à instrução do lado esquerdo do ecrã. As intermitências no ecrã indicam as áreas às quais se deve dar atenção.



Ecrã 7.32: Desembalamento do conjunto de tubos

O CliniMACS Tubing Set e o CliniMACS Tubing Set LS são fornecidos em embalagens esterilizadas e seladas. Cada conjunto de tubos contém tubos pré-montados e colunas para uma separação de células (ver Figura 7.2). Se a embalagem estiver intacta, é fornecida uma via do fluido estéril.

⚠ ADVERTÊNCIA

Risco de contaminação. Uma embalagem danificada indica que o conjunto de tubos pode já não estar estéril, não podendo, por isso, ser utilizado. Inspecionar cuidadosamente a embalagem quanto a danos, furos ou ruturas. Utilizar o conjunto de tubos apenas se a embalagem estiver intacta e selada.

Nota: O CliniMACS Plus Instrument apresenta o nome do programa escolhido, p. ex., CD34 SELECTION 1, na linha do fundo do ecrã do aparelho. Durante a instalação do conjunto de tubos, a tecla "Undo" (desfazer) (ver secção "Descrição" no manual do utilizador CliniMACS Plus Instrument) pode ser pressionada em qualquer passo para voltar ao passo anterior.

1. Registar o número do lote e a data de validade do conjunto de tubos.

   Desembalar o conjunto de tubos estéril em condições estéreis (p. ex., campânula de fluxo laminar). Remover a pinça de aperto utilizada para embalar o CliniMACS Tubing Set LS antes da utilização do conjunto de tubos. A pinça está rotulada com "Remover antes da montagem no CliniMACS Plus Instrument".

2. Verificar as ligações Luer Lock às bolsas. Os Luer Locks têm de ser bem fechados.

Ligação da Cell Collection Bag

1. Anotar o peso da Cell Collection Bag vazia.
2. Em ambiente assético, remover as tampas e fixar a Cell Collection Bag estéril equipada com um Luer/Spike Interconnector no conjunto de tubos antes de o carregar no CliniMACS Plus Instrument. Verificar se os tubos originais da Cell Collection Bag estão fechados ou selados.

   Se for necessária mais de uma Cell Collection Bag para uma separação, ligar as bolsas com um conjunto de transferência de plasma. Verificar se todas as ligações estão bem fechadas.
3. Garantir que é possível um fluxo ilimitado para a Cell Collection Bag.
4. Continuar com a instalação do conjunto de tubos seguindo o procedimento abaixo descrito ou a "Instalação alternativa para conjuntos de tubos CliniMACS".

Fixar a Priming Waste Bag e inserir a pré-coluna

A janela indica Ecrã 7.32.

1. Fixar a Priming Waste Bag no suporte da bolsa direito no aparelho (ver Figura 7.3).
2. Ajustar a altura do suporte da bolsa. Levantar ou baixar o suporte da bolsa para ajustar a altura ao tamanho da Priming Waste Bag. Verificar se fica a uma altura suficiente para evitar que os tubos fiquem demasiado flexionados, o que poderia limitar o fluxo, e suficientemente baixo para evitar esticar tubos e ligações.
3. Colocar a pré-coluna no suporte (ver Figura 7.4).

Para continuar, pressionar **ENT**.

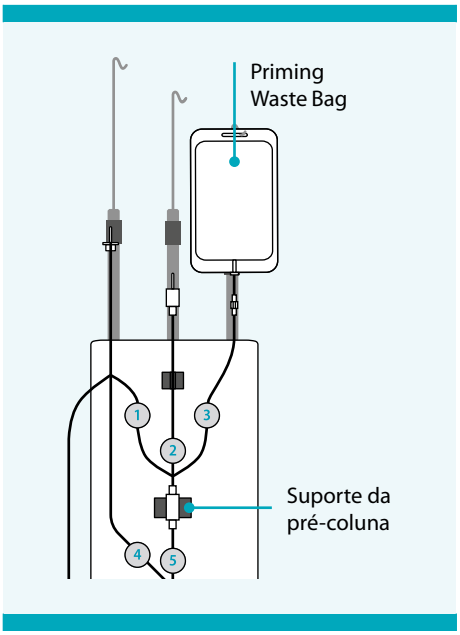


Figura 7.3: Fixação da Priming Waste Bag no suporte da bolsa

Inserir a coluna de separação e carregar a válvula n.º 5

A janela indica Ecrã 7.33.

As válvulas a preto no ecrã abrem-se automaticamente para facilitar a inserção dos tubos.

1. Inserir a coluna de separação no respetivo suporte (ver Figura 7.4).

   ⚠ ADVERTÊNCIA

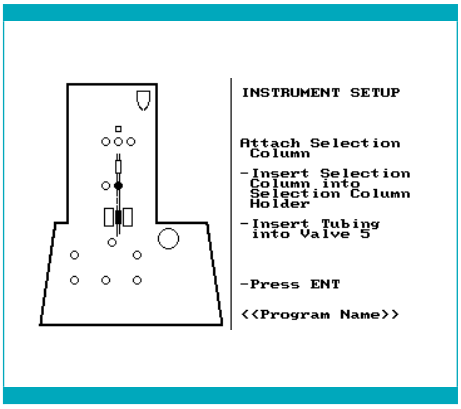
   Risco de lesões. Se a coluna de separação for inserida ou removida com a unidade magnética ligada, existe o risco de lesões pessoais graves. A coluna de separação só pode ser inserida ou removida com a unidade magnética desligada.

2. Carregar o tubo na válvula n.º 5.

IMPORTANTE

- À medida que cada passo vai sendo executado, verificar todos os tubos e fixações quanto a vincos ou dobras acentuadas que possam limitar o fluxo do líquido através dos tubos. Verificar todas as válvulas para garantir que os tubos estão bem encaixados.
- Inserir o conjunto de tubos apenas em válvulas abertas (quando o botão é pressionado para dentro). Os tubos não ficam bem instalados se forem inseridos numa válvula fechada.
- Se os tubos tiverem de ser ajustados depois de fechada uma válvula, não os puxar sem pressionar o botão da válvula para a abrir (ver Figura 7.5).

Para continuar, pressionar **ENT**.



Ecrã 7.33: Inserir a coluna de separação e carregar a válvula n.º 5

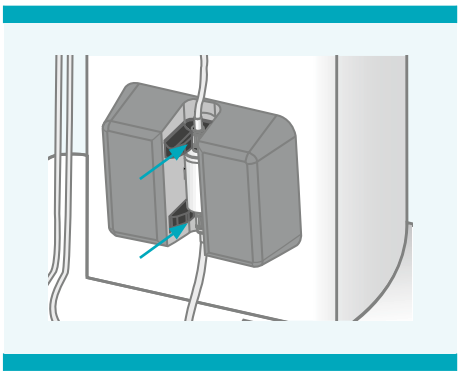


Figura 7.4: Coluna de separação no respetivo suporte

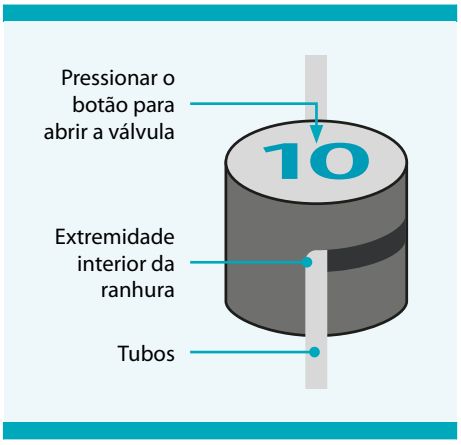


Figura 7.5: Tubo corretamente inserido

Carregar as válvulas n.º 1, 2, 3 e 4

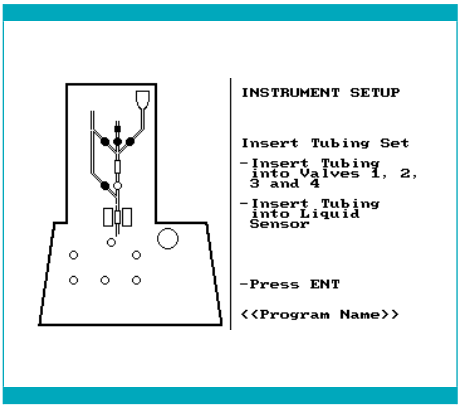
A janela indica Ecrã 7.34.

1. Carregar o tubo na válvula n.º 4. Verificar se o tubo está bem colocado na abertura da válvula (ver Figura 7.5). Prestar especial atenção à área entre as válvulas n.º 4 e 5 (ver Figura 7.6) e manter a união de quatro vias direita.
2. Inserir o tubo na válvula n.º 1.
3. Posicionar a união de 4 vias mesmo abaixo da válvula n.º 2. Prestar especial atenção à área abaixo da válvula n.º 2.
4. Inserir os tubos nas válvulas n.º 2 e 3.
5. Montar o tubo entre a válvula n.º 2 e o filtro de bolhas no sensor de líquido. Confirmar se o tubo está bem colocado na união do sensor.

IMPORTANTE

Para garantir um bom funcionamento, o sensor de líquido e o tubo a inserir têm de estar secos. Inspecionar ambos atentamente. Se houver líquido, limpar a área com um pano macio que não largue pelos.

Para continuar, pressionar **ENT**.



Ecrã 7.34: Carregar as válvulas n.º 1, 2, 3, 4 e o sensor de líquido

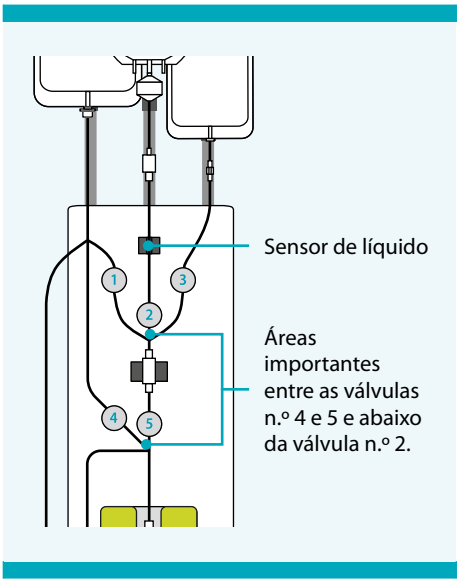
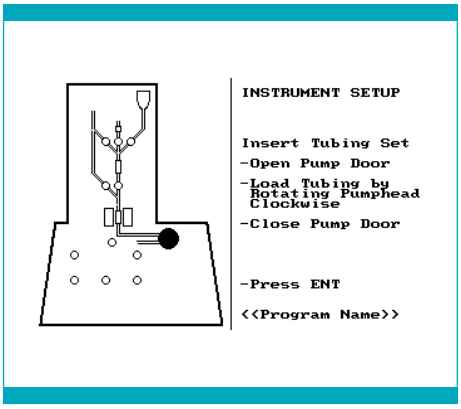


Figura 7.6: Tubos nas válvulas

Carregar o tubo da bomba

A janela indica Ecrã 7.35.

1. Abrir a porta da bomba levantando pela margem esquerda.
2. Inserir o anel de retenção superior do tubo da bomba no entalhe do anel de retenção do invólucro da bomba (ver Figura 7.7).
3. Rodar o rolo da bomba para a direita até o tubo ficar enroscado entre ambos os conjuntos de pinos guia do tubo e o tubo ficar bem encaixado à volta do rolo da bomba. Verificar se o tubo não está esmagado na extremidade dos pinos guia. Se for necessário ajustar o tubo dentro da bomba, este pode ser descarregado levantando a extremidade inferior e rodando o rolo da bomba para a esquerda.
4. Inserir o anel de retenção inferior do tubo da bomba no entalhe do anel de retenção existente no invólucro da bomba.
5. Rodar o rolo da bomba para a direita e para a esquerda para garantir que este se move livremente.
6. Fechar a porta da bomba.



Ecrã 7.35: Carregar o tubo da bomba

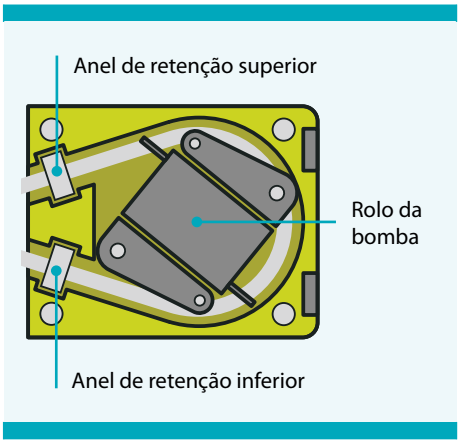


Figura 7.7: Carregar o tubo da bomba

IMPORTANTE

Durante o programa de separação de células, a bomba para imediatamente a corrida se o respetivo invólucro for aberto. Se for deixado aberto mais de 600 segundos, o aparelho cancela a corrida em curso.

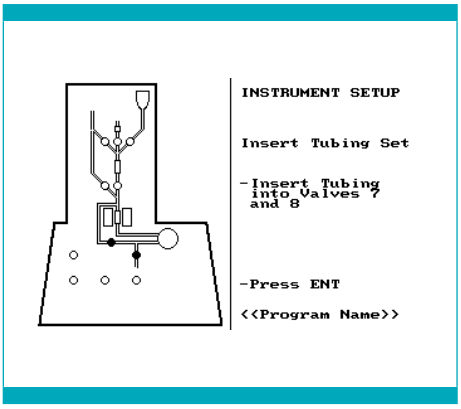
Para continuar, pressionar **ENT**.

Carregar as válvulas n.º 7 e 8

A janela indica Ecrã 7.36.

1. Carregar o tubo na válvula n.º 7.
2. Carregar o tubo na válvula n.º 8.

Para continuar, pressionar **ENT**.



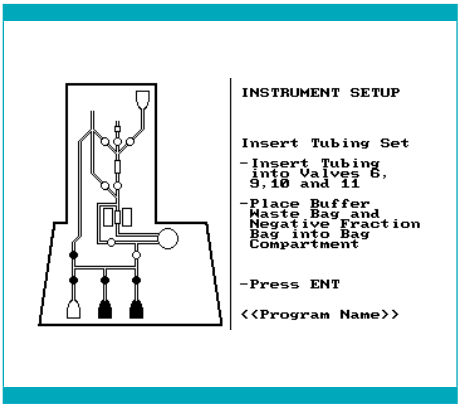
Ecrã 7.36: Carregar as válvulas n.º 7 e 8

Carregar as válvulas n.º 6, 9, 10 e 11

A janela indica Ecrã 7.37.

1. Carregar os tubos nas válvulas n.º 6, 9, 10 e 11.
2. Colocar a Negative Fraction Bag e a Buffer Waste Bag no compartimento da bolsa. Verificar se o tubo não está comprimido por baixo da cobertura do compartimento da bolsa.

Para continuar, pressionar **ENT**.



Ecrã 7.37: Carregar as válvulas n.º 6, 9, 10 e 11

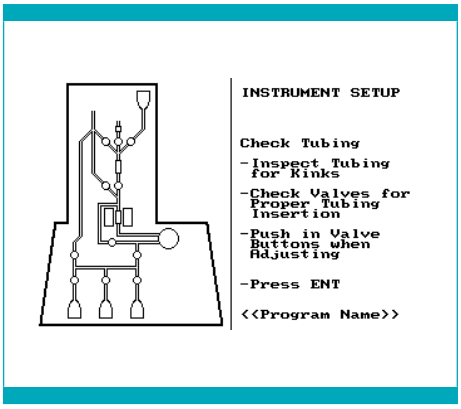
Voltar a verificar todos os tubos e fixações

A janela indica Ecrã 7.38.

Antes de iniciar a separação de células, voltar a verificar todos os tubos e fixações.

Nota: Verificar todas as válvula quanto à inserção correta dos tubos. Verificar se o tubo está espaçado uniformemente e se não há áreas vincadas ou esticadas à sua volta. Prestar especial atenção à área da pré-coluna, bem como à área entre a bomba e as válvulas n.º 7 e 8 (ver Figura 7.8) e entre as válvulas n.º 4 e 5 (ver Figura 7.6). Se os tubos tiverem de ser ajustados depois de fechada uma válvula, não os puxar sem pressionar o botão da válvula para a abrir. Se algum tubo tiver sido ajustado, é absolutamente necessário pressionar duas vezes as válvulas correspondentes com firmeza.

Para continuar, pressionar **ENT**.



Ecrã 7.38: Voltar a verificar todos os tubos e fixações

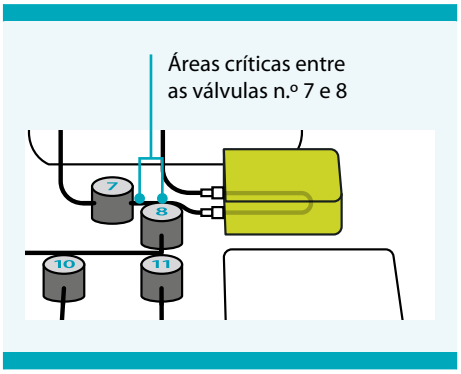


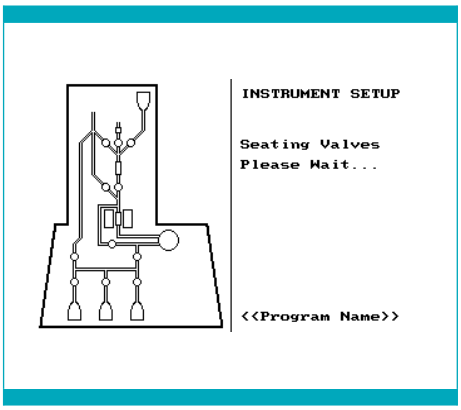
Figura 7.8: Tubos nas válvulas

Assentamento de válvulas

A janela indica Ecrã 7.39.

Para assegurar um bom encaixe dos tubos nas válvulas, o aparelho opera duas vezes todas as válvulas em sequência. Observar e ouvir para garantir que todas as válvulas estão a funcionar bem. Se alguma válvula não funcionar bem, ver capítulo 8 "Resolução de problemas" na página 211. Este passo pode ser repetido pressionando ◄ seguido de **ENT** (ver secção "Descrição" no manual do utilizador CliniMACS Plus Instrument).

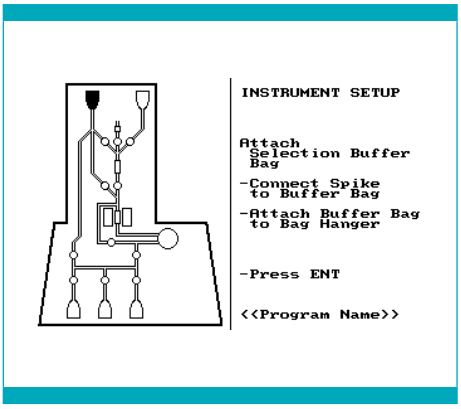
O acionamento do íman também irá ser testado durante esta sequência de verificação.



Ecrã 7.39: Assentamento de válvulas

Fixação do CliniMACS PBS/EDTA Buffer

A janela indica Ecrã 7.40.



Ecrã 7.40: Fixação da bolsa de solução tampão

A solução tampão prescrita para as separações CliniMACS Plus é o CliniMACS PBS/EDTA Buffer suplementado com HSA para uma concentração final de 0,5% (p/v).

1. Mediante técnicas asséticas, remover a tampa do espigão da solução tampão no conjunto de tubos (ver Figura 7.2 na página 156) e ligá-lo à bolsa de solução tampão. Verificar se o septo está perfurado, permitindo o fluxo livre de líquido. Apertar cuidadosamente a bolsa para confirmar se o espigão a penetrou .

   Se for necessário mais de um litro de solução tampão para uma separação, ligar duas bolsas de solução tampão com um conjunto de transferência de plasma.

2. Fixar a bolsa de solução tampão no respetivo gancho no suporte da bolsa (ver Figura 7.9).

3. Ajustar a altura do suporte da bolsa da solução tampão. Levantar ou baixar o suporte da bolsa para ajustar a altura ao tamanho da bolsa de solução tampão. Verificar se fica a uma altura suficiente para evitar que os tubos fiquem demasiado flexionados, o que poderia limitar o fluxo, e suficientemente baixo para evitar esticar tubos e ligações.

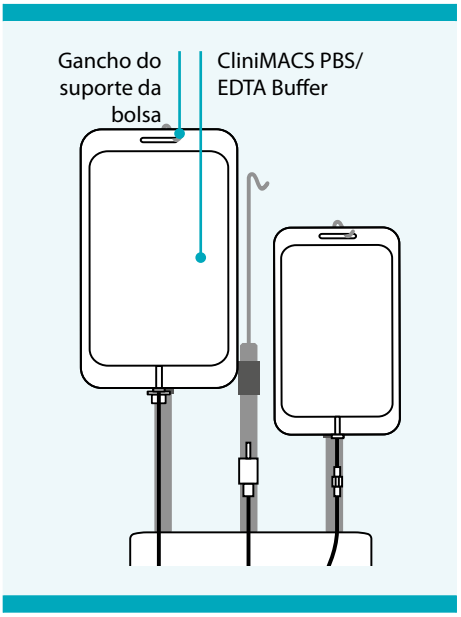


Figura 7.9: Fixar a bolsa de solução tampão

ATENÇÃO

Risco de danos no aparelho. Sobrecarregar os suportes das bolsas pode danificar o aparelho. A capacidade de carga de um único suporte da bolsa é de 3 kg. Não sobrecarregar os suportes das bolsas.

Para continuar, pressionar **ENT**.

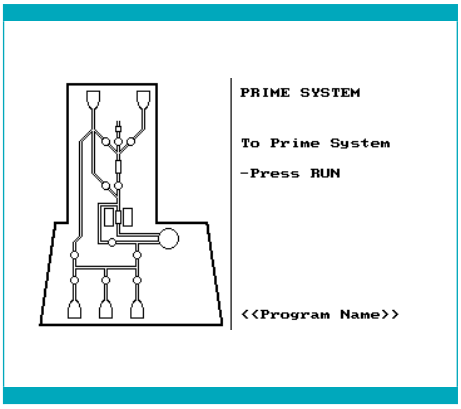
Início da escorva

A janela indica Ecrã 7.41.

Para iniciar a escorva, pressionar **RUN**.

A janela indica Ecrã 7.42.

Na fase de escorva, o conjunto de tubos é enchido com solução tampão. A solução tampão é posta a circular no conjunto de tubos, incluindo a pré-coluna e a coluna de separação. Os resíduos da escorva são reunidos na Priming Waste Bag e na Buffer Waste Bag (ver Figura 7.2 na página 156). Os ciclos de escorva continuam, repetindo uma série de passos. A fase de escorva demora cerca de 1 minuto. O estado da escorva é atualizado no visor.



Ecrã 7.41: Início da escorva

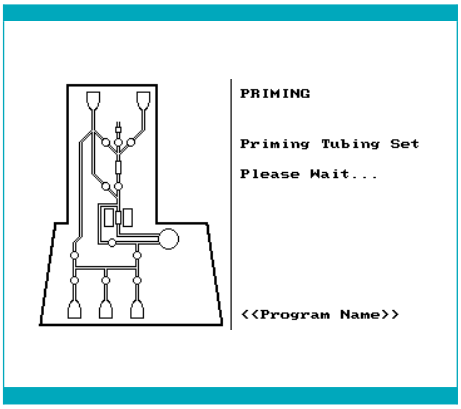
Verificação durante a escorva

Na fase de escorva, verificar todos os tubos, fixações, válvulas e colunas quanto a fugas ou dobras que possam bloquear o fluxo de fluido.

Se forem observadas fugas ou falhas de funcionamento, pressionar **STOP** para parar a corrida.

O operador tem 600 segundos para resolver o problema.

Retomar o processo pressionando **RUN**.



Ecrã 7.42: Escorva em curso

Passados 600 segundos, a separação é cancelada. Se o operador não conseguir resolver o problema ou se o conjunto de tubos tiver defeito, remover e substituir o conjunto de tubos por outro novo.

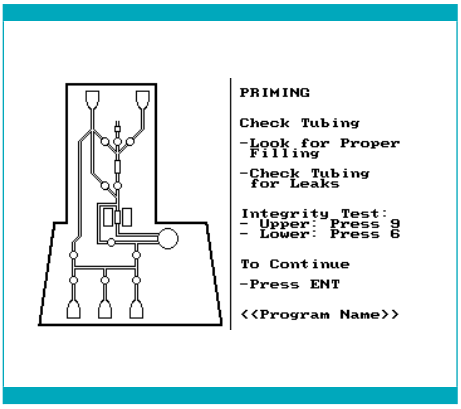
Nota: Uma vez iniciada a escorva, não é possível voltar ao procedimento de configuração do aparelho.

Verificação final de todos os tubos e fixações

A janela indica Ecrã 7.43.

Antes de continuar com o programa, verificar o seguinte:

- Fluido em todas as partes do conjunto de tubos (exceto no filtro pré-sistema)
- Sem excesso de ar no conjunto de tubos
- Fluido na Priming Waste Bag e na Buffer Waste Bag
- Sem fluido na Negative Fraction Bag ou na Cell Collection Bag



Ecrã 7.43: Verificação final do tubo

Ainda não pressionar ENT.

Teste de integridade

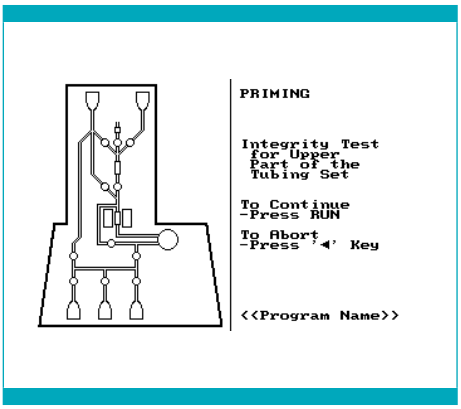
Para maior segurança, tem de ser realizado um teste de integridade do conjunto de tubos quanto a fugas. A sequência de teste consiste em duas subsequências automatizadas, que permitem que as partes superior e inferior do conjunto de tubos sejam pressurizadas e observadas em separado.

Teste de integridade para a parte superior do conjunto de tubos

1. Quanto o operador executa a "Verificação final de todos os tubos e fixações", a janela indica Ecrã 7.43.
2. Uma vez executada a "Verificação final de todos os tubos e fixações", prosseguir com o teste de integridade. **Não** pressionar ENT.
3. Para executar o teste de integridade para a parte superior, pressionar 9.

   A janela indica Ecrã 7.44.
4. Para iniciar a sequência de teste, pressionar RUN.

   Para voltar ao Ecrã 7.43, pressionar ◄.



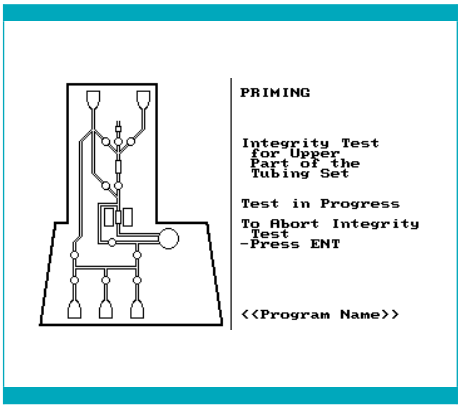
Ecrã 7.44: Iniciar teste de integridade para a parte superior

5. Uma vez pressionado **RUN**, o aparelho inicia a sequência de teste automatizada para a parte superior do conjunto de tubos.

   A janela indica Ecrã 7.45.

   É criada sobrepressão e mantida durante dois minutos. Durante este tempo, o operador deve observar todas as ligações acima da ligação superior de tubos da bomba.

   A sequência de teste pode ser finalizada em qualquer momento, pressionando **ENT**.



Ecrã 7.45: Teste de integridade para a parte superior em curso

6. Passados dois minutos, a pressão é automaticamente aliviada e a janela indica Ecrã 7.43.

   Verificar se ocorreu alguma fuga durante a sequência de teste. Se forem observadas fugas em alguma ligação do conjunto de tubos, este tem de ser removido e substituído por outro novo. Contactar o Miltenyi Biotec Technical Support para instruções relativas à devolução de conjuntos de tubos com defeito.

7. Se não forem observadas fugas, continuar com o teste de integridade da parte inferior do conjunto de tubos.

Teste de integridade para a parte inferior do conjunto de tubos

A janela indica Ecrã 7.46.

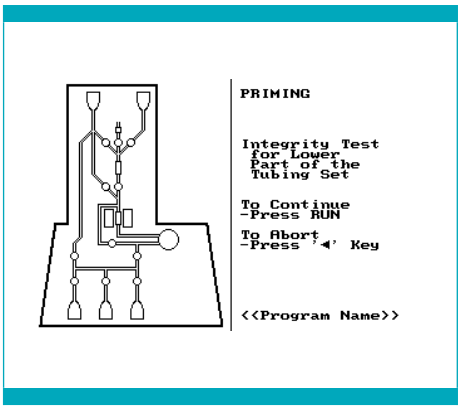
1. Para iniciar o teste de integridade para a parte inferior, pressionar **6**.
   Não pressionar ENT.

   A janela indica Ecrã 7.46.

2. Para iniciar a sequência de teste, pressionar **RUN**.

   Para voltar ao Ecrã 7.43, pressionar ◄.

3. Uma vez pressionado **RUN**, o aparelho inicia a sequência de teste automatizada para a parte inferior do conjunto de tubos.

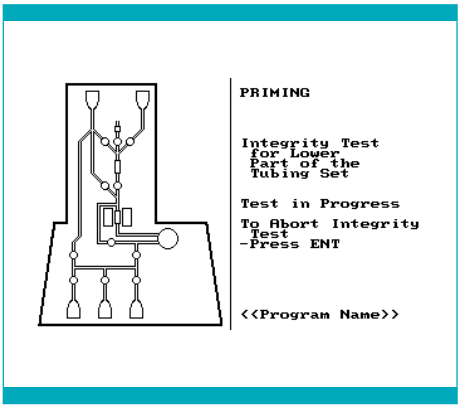


Ecrã 7.46: Iniciar teste de integridade para a parte inferior

A janela indica Ecrã 7.47.

É criada sobrepressão e mantida durante 30 segundos. Durante este tempo, o operador deve observar a ligação inferior dos tubos da bomba e as conexões T (conectores) entre as válvulas n.º 6, 8, 9, 10 e 11.

A sequência de teste pode ser finalizada em qualquer momento, pressionando **ENT**.



Ecrã 7.47: Teste de integridade para a parte inferior em curso

4. Passados 30 segundos, a pressão é automaticamente aliviada e a janela indica Ecrã 7.43.

   Verificar se ocorreu alguma fuga durante a sequência de teste. Se forem observadas fugas em alguma ligação do conjunto de tubos, este tem de ser removido e substituído por outro novo. Contactar o Miltenyi Biotec Technical Support para instruções relativas à devolução de conjuntos de tubos com defeito.

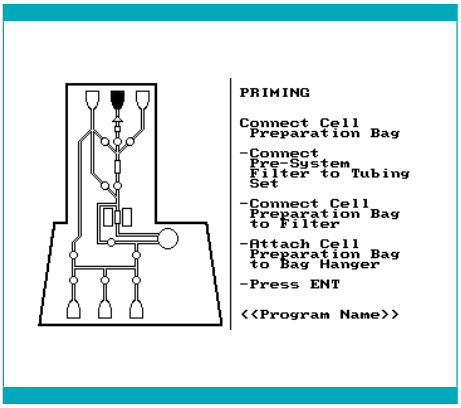
5. Se não forem observadas fugas, o operador pode agora continuar com o passo seguinte pressionando **ENT**.

Ligação da Cell Preparation Bag

A janela indica Ecrã 7.48.

Ligar a Cell Preparation Bag contendo o produto celular já marcado:

1. Remover a tampa do espigão do filtro do bolhas do conjunto de tubos (ver Figura 7.2).
2. Remover a tampa da extremidade romba do filtro pré-sistema (ver Figura 7.10). Inserir o espigão com firmeza no filtro pré-sistema.
3. Remover a tampa do espigão do filtro pré-sistema.



Ecrã 7.48: Ligação da Cell Preparation Bag

4. Inserir o espigão do filtro pré-sistema num orifício não utilizado da Cell Preparation Bag, verificando se o septo está perfurado, permitindo o fluxo livre de líquido. Apertar cuidadosamente a bolsa para confirmar se o espigão a penetrou .
5. Verificar atentamente a ligação entre o filtro pré-sistema e o conjunto de tubos para confirmar se a ligação está segura.
6. Suspender a Cell Preparation Bag no suporte da bolsa central.

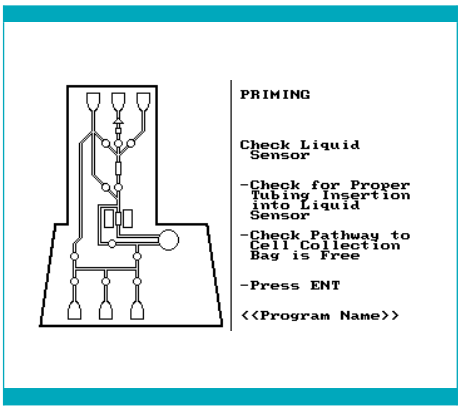
7. Ajustar o suporte da bolsa para a Cell Preparation Bag para manter a Cell Preparation Bag na posição vertical.

Para continuar, pressionar **ENT**.

Verificação final do sensor de líquido

A janela indica Ecrã 7.49.

1. Verificar o tubo do sensor de líquido. Verificar se o tubo está bem inserido, sem líquido no exterior e se deslocou durante o procedimento de carregamento.
2. Confirmar se é possível o fluxo ilimitado da Cell Collection Bag (p. ex., abrir a pinça por baixo da válvula 9).



Ecrã 7.49: Verificação final do sensor de líquido

Para continuar, pressionar **ENT**.

▶ **Continuar com o PASSO 4.**

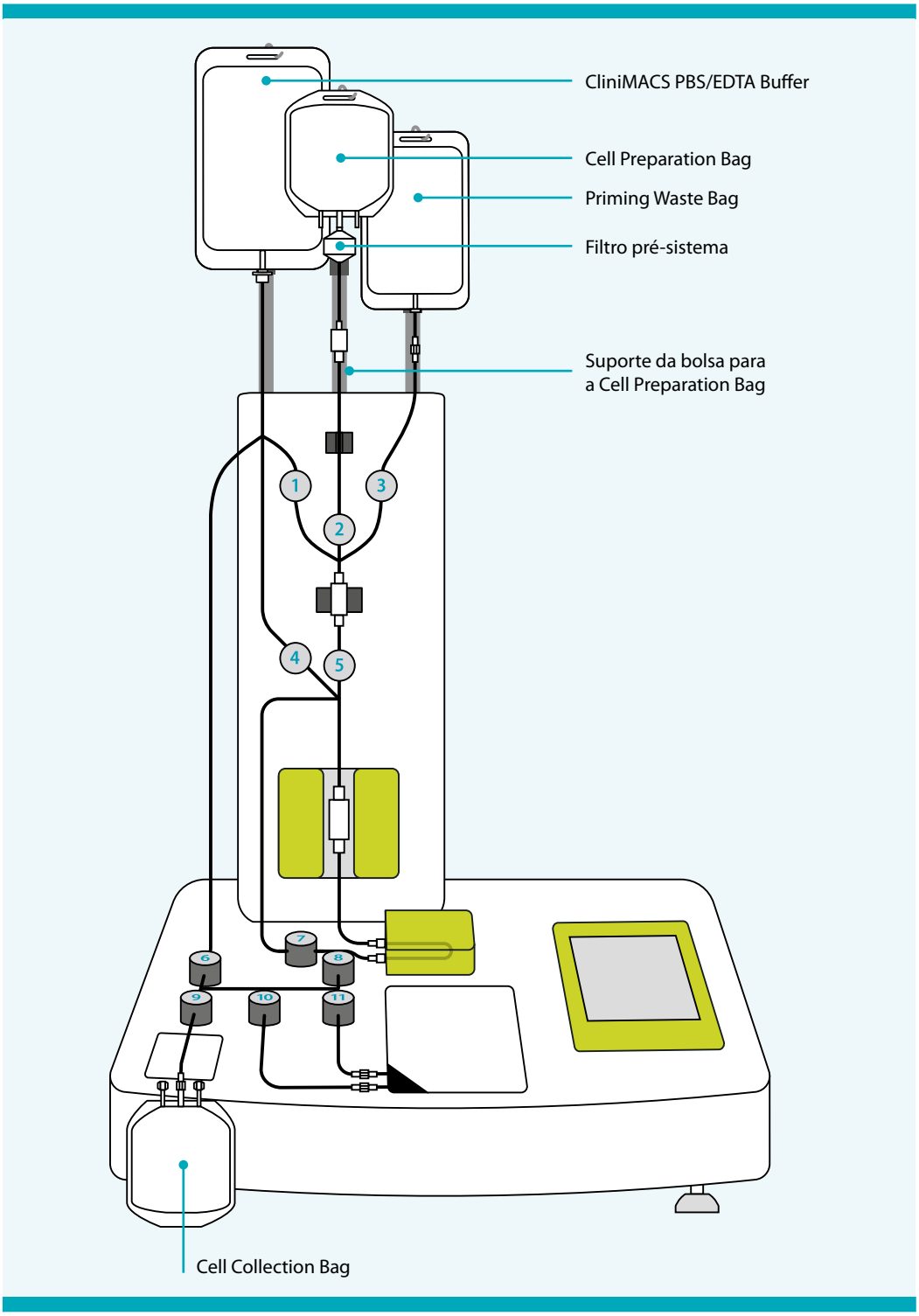


Figura 7.10: CliniMACS Plus Instrument com CliniMACS Tubing Set, CliniMACS PBS/EDTA Buffer, Cell Preparation Bag e Cell Collection Bag

7.3.2 Instalação alternativa dos conjuntos de tubos CliniMACS

As instruções no PASSO 3 e os ecrãs indicados pelo CliniMACS Plus Instrument descrevem a instalação dos conjuntos de tubos CliniMACS Tubing em condições estéreis (sala limpa).

O sistema CliniMACS Plus propriamente dito é um sistema fechado, que não tem necessariamente de ser operado numa sala limpa. Contudo, se for operado fora de uma sala limpa, o procedimento de instalação do conjunto de tubos tem de ser adaptado para garantir a esterilidade do processo de separação de células.

A esterilidade do processo de separação de células pode ficar comprometida durante a fixação da Cell Collection Bag, do CliniMACS PBS/EDTA Buffer, do filtro pré-sistema e da Cell Preparation Bag. Para garantir que o sistema continua estéril, estes componentes têm de ser fixados no conjunto de tubos em condições estéreis (p. ex., campânula de fluxo laminar). Quando os componentes são fixados no conjunto de tubos antes da instalação no CliniMACS Plus Instrument, a ordem das instruções fornecidas pelo aparelho e no PASSO 3 tem de ser alterada, devendo ser tomadas mais medidas.

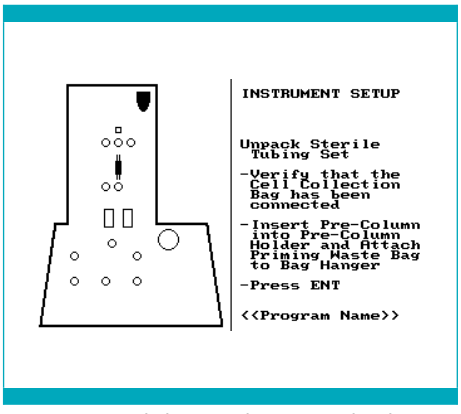
Ao operar o CliniMACS Plus Instrument fora de uma sala limpa, observar as instruções adicionais que se seguem alterando as instruções no PASSO 3.

Preparação para a instalação do conjunto de tubos

A janela indica Ecrã 7.50.

Tal como descrito, a Cell Collection Bag, o CliniMACS PBS/EDTA Buffer, o filtro pré-sistema e a Cell Preparation Bag têm de ser fixados no conjunto de tubos antes da instalação do conjunto de tubos no aparelho em condições estéreis.

Desembalar o conjunto de tubos em condições estéreis e fixar os seguintes componentes em condições estéreis:



Ecrã 7.50: Desembalamento do conjunto de tubos

- **Ligação da Cell Collection Bag**

  Ver página 158.

Fixação do CliniMACS PBS/EDTA Buffer

IMPORTANTE

Antes de ligar o CliniMACS PBS/EDTA Buffer ao conjunto de tubos, fixar o tubo abaixo do espigão de solução tampão com uma pinça de bloqueio para evitar que a solução tampão entre no conjunto de tubos antes da instalação (ver pinça 1, Figura 7.11 na página 175).

Mediante técnicas asséticas, remover a tampa do espigão da solução tampão no conjunto de tubos e ligá-lo à bolsa de solução tampão. Verificar se o septo está perfurado, permitindo o fluxo livre de líquido. Apertar cuidadosamente a bolsa para confirmar se o espigão a penetrou.

Fixação do filtro pré-sistema

Remover a tampa do espigão do filtro de bolhas. Remover a tampa da abertura inferior do filtro pré-sistema.

Inserir o espigão com firmeza no filtro pré-sistema. NÃO remover a tampa superior do filtro pré-sistema. Fechar o tubo mesmo abaixo do filtro de bolhas com uma pinça de bloqueio (ver pinça 2, Figura 7.11 na página 175). Isto impede que a suspensão de células preparada na Cell Preparation Bag entre no filtro pré-sistema e no conjunto de tubos.

Fixação da Cell Preparation Bag

Ligar a Cell Preparation Bag contendo as células marcadas magneticamente e lavadas ao conjunto de tubos. Inserir o espigão na Cell Preparation Bag com o filtro pré-sistema, verificando se o septo está perfurado, permitindo o fluxo livre de líquido. Apertar cuidadosamente a bolsa para confirmar se o espigão a penetrou.

Instalação no CliniMACS Plus Instrument

Suspender a bolsa de solução tampão no suporte da bolsa esquerdo, a Cell Preparation Bag no suporte da bolsa do meio, e a Priming Waste Bag no suporte da bolsa direito no aparelho.

Para continuar, pressionar **ENT**.

- **Fixar a Priming Waste Bag e inserir a pré-coluna**

  Ver página 158.

- **Inserir a coluna de separação e carregar a válvula n.º 5**

  Ver página 159.

- **Carregar as válvulas n.º 1, 2, 3 e 4**

  Ver página 160.

▶ Carregar o tubo da bomba

Ver página 161.

▶ Carregar as válvulas n.º 7 e 8

Ver página 162.

▶ Carregar as válvulas n.º 6, 9, 10 e 11

Ver página 162.

▶ Voltar a verificar todos os tubos e fixações

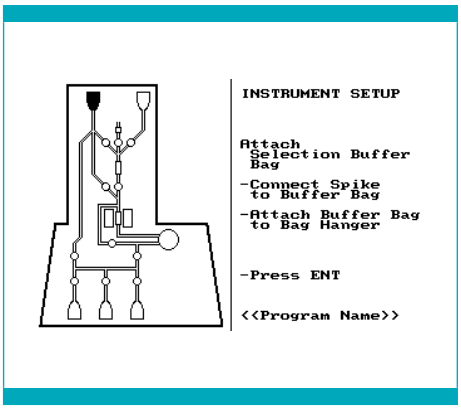
Ver página 163.

▶ Assentamento de válvulas

Ver página 163.

Fixação do CliniMACS PBS/EDTA Buffer

A janela indica Ecrã 7.51.



Ecrã 7.51: Fixação da bolsa de solução tampão

1. A bolsa de solução tampão foi fixada durante a "Preparação para a instalação do conjunto de tubos". Por isso, apenas a altura do suporte da bolsa da solução tampão poderá ter de ser ajustada. Levantar ou baixar o suporte para acomodar o tamanho da bolsa de solução tampão, garantindo que a altura estipulada é suficiente para evitar que os tubos fiquem demasiado flexionados, o que poderia limitar o fluxo de líquido, e suficientemente baixo para evitar esticar os tubos ou as ligações.
2. Remover a pinça de bloqueio do tubo mesmo abaixo do espigão da solução tampão.

Para continuar, pressionar **ENT**.

▶ Início da escorva

Ver página 165.

▶ Verificação durante a escorva

Ver página 165.

▶ Verificação final de todos os tubos e fixações

Ver página 166.

▶ Teste de integridade

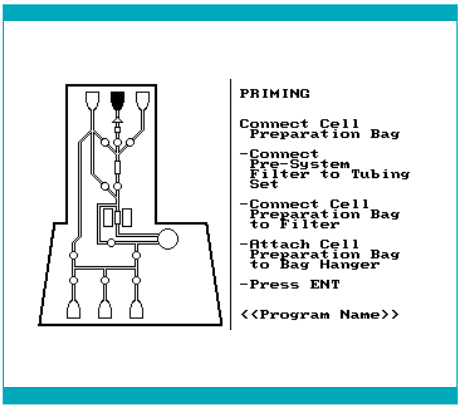
Ver página 166.

Ligação da Cell Preparation Bag (e filtro pré-sistema)

A janela indica Ecrã 7.52.

1. A Cell Preparation Bag e o filtro pré-sistema foram fixados durante a "Preparação para a instalação do conjunto de tubos".
2. Remover a pinça de bloqueio abaixo do filtro de bolhas.

Para continuar, pressionar **ENT**.



Ecrã 7.52: Ligação da Cell Preparation Bag

▶ Verificação final do sensor de líquido

Ver página 169.

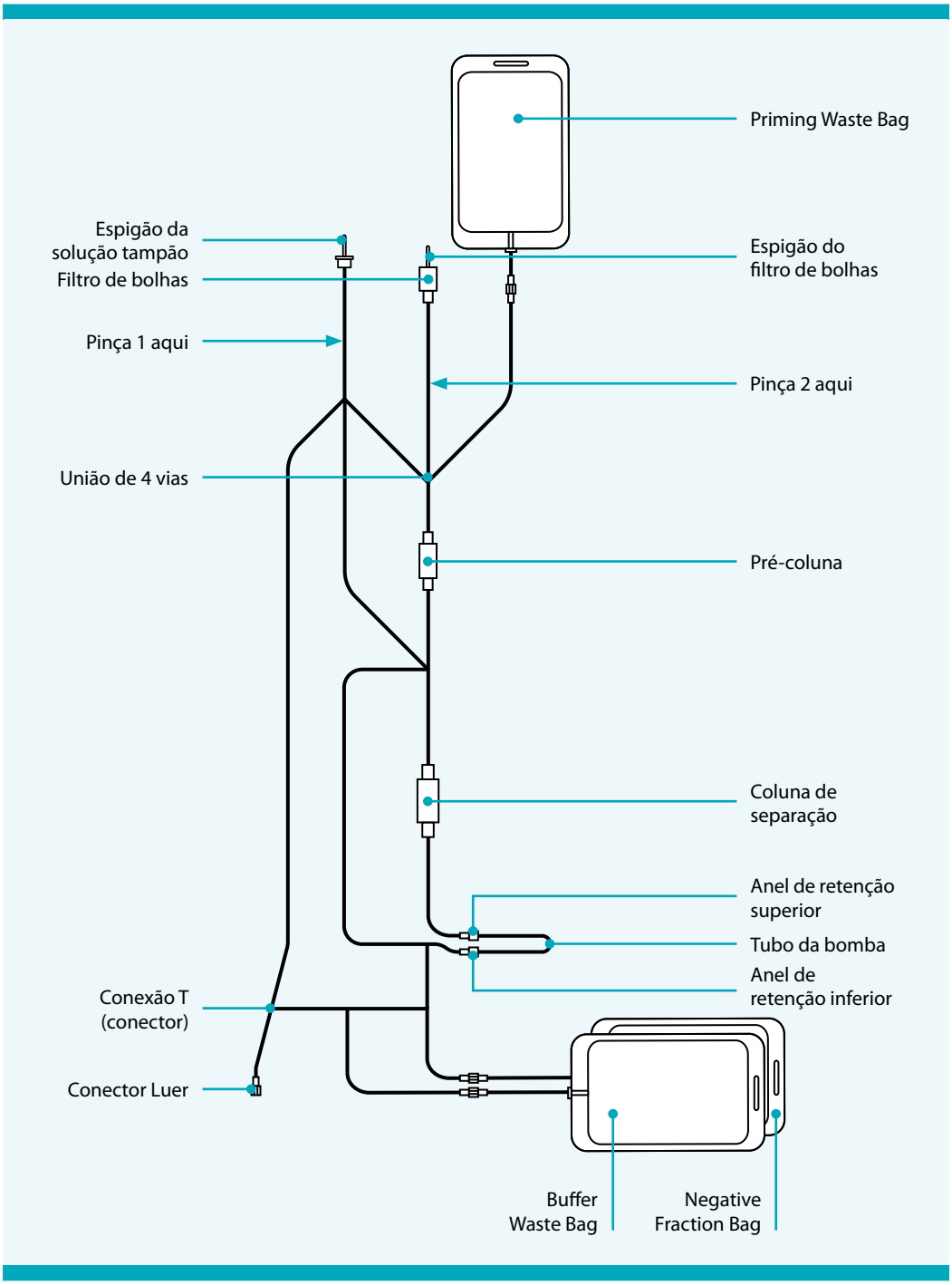


Figura 7.11: Estrutura geral de um CliniMACS Tubing Set (p. ex., CliniMACS Tubing Set) com posições de fixação 1 e 2

7.3.3 CliniMACS Depletion Tubing Set

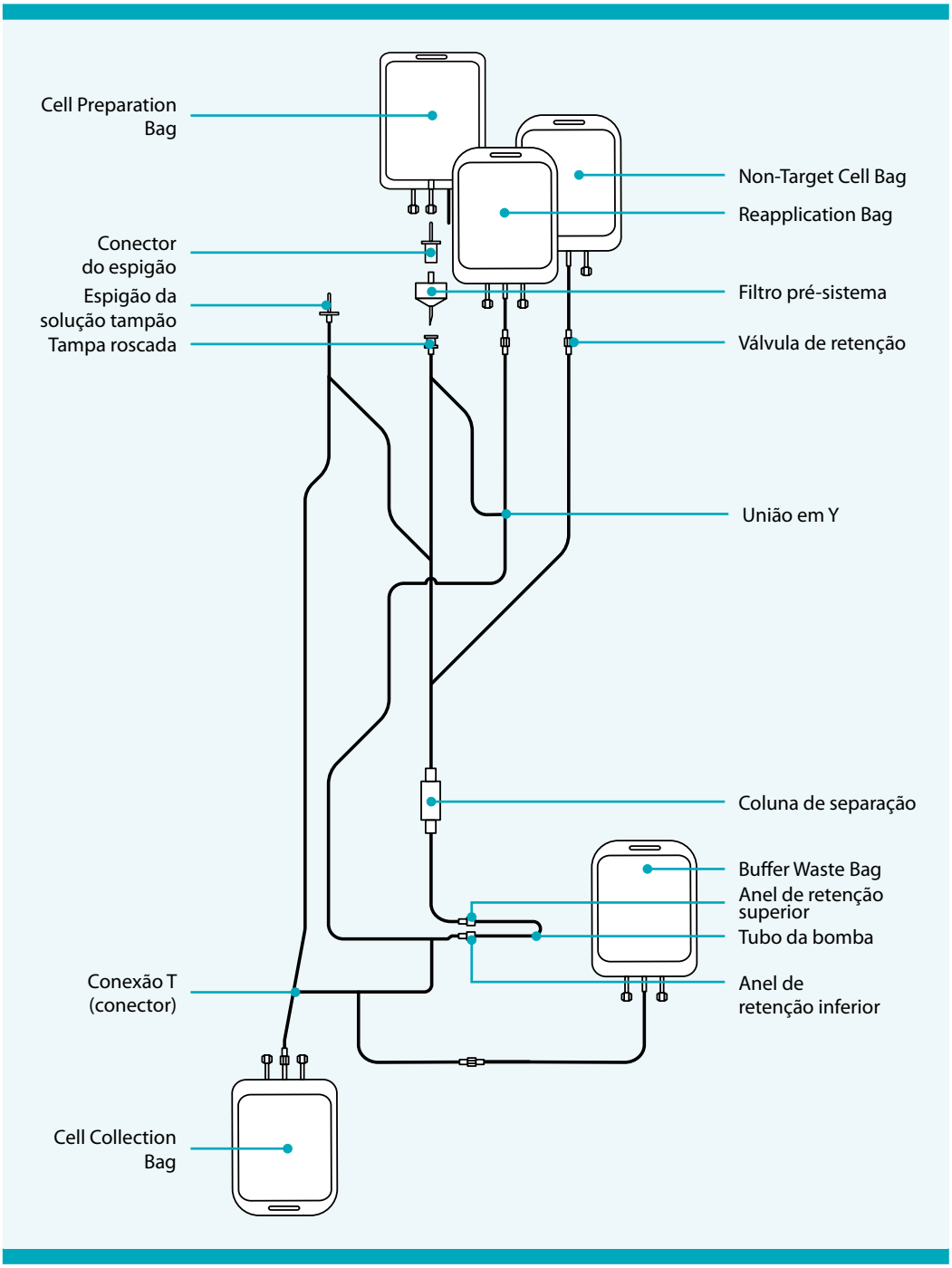
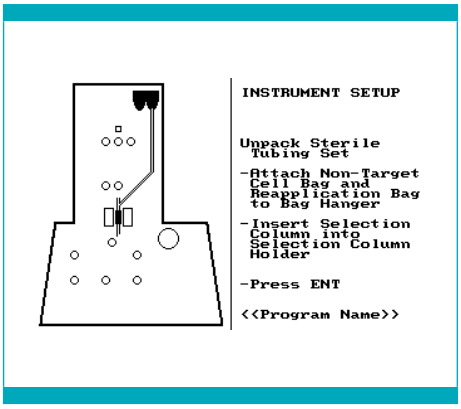


Figura 7.12: Estrutura geral de um CliniMACS Depletion Tubing Set

Preparação para a instalação do conjunto de tubos

A janela indica Ecrã 7.53.

A instrução encontra-se à direita e um diagrama correspondente à instrução é indicado à esquerda. As intermitências no ecrã indicam as áreas às quais se deve dar atenção.



Ecrã 7.53: Desembalamento do conjunto de tubos

O CliniMACS Depletion Tubing Set é fornecido numa embalagem esterilizada e selada. Cada conjunto de tubos contém tubos pré-montados, coluna e bolsas para uma separação de células (ver Figura 7.12). Se a embalagem estiver intacta, é fornecida uma via do fluido estéril.

Nota: O CliniMACS Plus Instrument apresenta o nome do programa escolhido, p. ex., DEPLETION 3.1, na linha do fundo. Durante a instalação do conjunto de tubos, a tecla "Undo" (desfazer) (ver secção "Descrição" no manual do utilizador CliniMACS Plus Instrument) pode ser pressionada em qualquer passo para voltar ao passo anterior.

1. Registar o número do lote e a data de validade do conjunto de tubos.

   Desembalar o conjunto de tubos estéril em condições estéreis (p. ex., campânula de fluxo laminar). Remover a pinça de aperto utilizada para embalar antes da utilização do conjunto de tubos. A pinça está rotulada com "Remover antes da montagem no CliniMACS Plus Instrument".

2. Verificar as ligações Luer Lock às bolsas. Os Luer Locks têm de ser bem fechados.

Cell Collection Bag

O CliniMACS Depletion Tubing Set é fornecido com uma Cell Collection Bag fixada. Anotar o peso da Cell Collection Bag vazia. Se for necessária mais de uma Cell Collection Bag para uma separação, ligar as bolsas com um conjunto de transferência de plasma. Verificar se todas as ligações estão bem fechadas. Anotar o peso da(s) Cell Collection Bag(s) vazia(s).

Fixar a Non-Target Cell Bag, a Reapplication Bag e inserir a coluna de separação

1. Fixar a Non-Target Cell Bag e a Reapplication Bag no suporte da bolsa direito no aparelho (ver Figura 7.13).
2. Ajustar a altura dos suportes das bolsas. Levantar ou baixar os suportes de bolsas para ajustar a altura ao tamanho da Non-Target Cell Bag e da Reapplication Bag. Verificar se ficam a uma altura suficiente para evitar que os tubos fiquem demasiado flexionados, o que poderia limitar o fluxo, e suficientemente baixo para evitar esticar os tubos e as ligações.

   ATENÇÃO

   Risco de danos no aparelho. Sobrecarregar os suportes das bolsas pode danificar o aparelho. A capacidade de carga de um único suporte da bolsa é de 3 kg. Não sobrecarregar os suportes das bolsas.
3. Inserir a coluna de separação no respetivo suporte (ver Figura 7.14).

   ⚠ ADVERTÊNCIA

   Risco de lesões. Se a coluna de separação for inserida ou removida com a unidade magnética ligada, existe o risco de lesões pessoais graves. A coluna de separação só pode ser inserida ou removida com a unidade magnética desligada.

Para continuar, pressionar **ENT**.

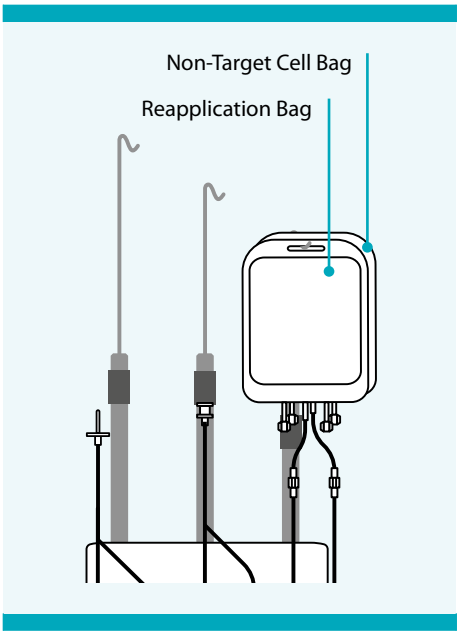


Figura 7.13: Fixação da Non-Target Cell Bag e da Reapplication Bag

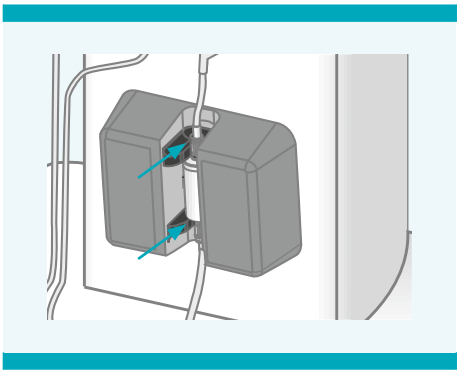


Figura 7.14: Coluna de separação no respetivo suporte

Carregar as válvulas n.º 1, 2, 3, 4 e 5

A janela indica Ecrã 7.54.

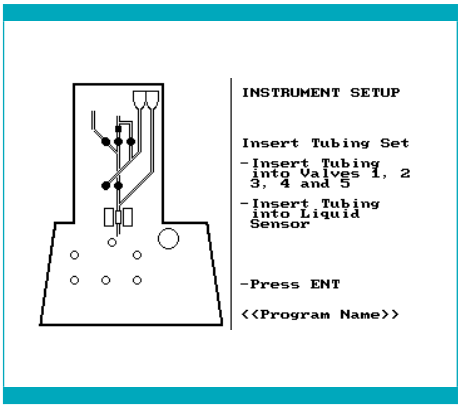
As válvulas apresentadas no ecrã abrem-se automaticamente.

1. Carregar os tubos nas válvulas n.º 1, 2, 3, 4 e 5.
2. Inserir o tubo acima da válvula n.º 2 no sensor de líquido (ver Figura 7.15).

IMPORTANTE

- Para garantir um bom funcionamento, o sensor de líquido e o tubo a inserir têm de estar secos. Inspecionar ambos atentamente. Se houver líquido, limpar a área com um pano macio que não largue pelos.
- À medida que cada passo vai sendo executado, verificar todos os tubos e fixações quanto a vincos ou dobras acentuadas que possam limitar o fluxo do líquido através dos tubos. Verificar todas as válvulas para garantir que os tubos estão bem encaixados.
- Inserir o conjunto de tubos apenas em válvulas abertas (quando o botão é pressionado para dentro). Os tubos não ficam bem instalados se forem inseridos numa válvula fechada.
- Se os tubos tiverem de ser ajustados depois de fechada uma válvula, não os puxar sem pressionar o botão da válvula para a abrir (ver Figura 7.16

Para continuar, pressionar **ENT**.



Ecrã 7.54: Carregar as válvulas n.º 1, 2, 3, 4 e 5

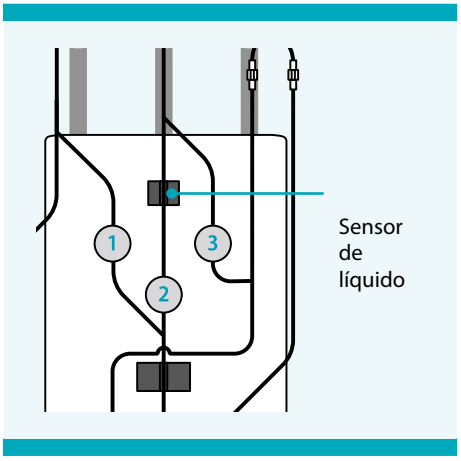


Figura 7.15: Tubos nas válvulas

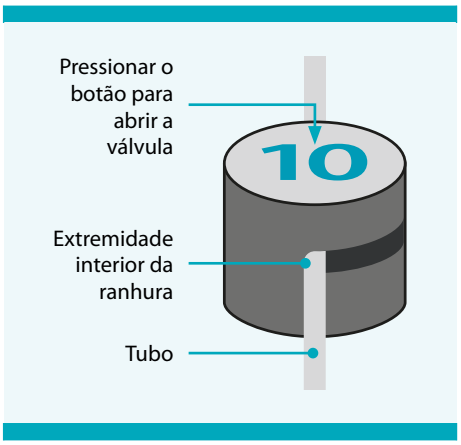
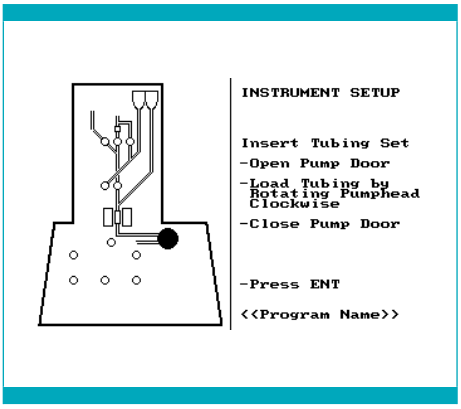


Figura 7.16: Tubo corretamente inserido

Carregar o tubo da bomba

A janela indica Ecrã 7.55.

1. Abrir a porta da bomba levantando pela margem esquerda.
2. Inserir o anel de retenção superior do tubo da bomba no entalhe do anel de retenção do invólucro da bomba (ver Figura 7.17).
3. Rodar o rolo da bomba para a direita até o tubo ficar enroscado entre ambos os conjuntos de pinos guia do tubo e o tubo ficar bem encaixado à volta do rolo da bomba. Verificar se o tubo não está esmagado na extremidade dos pinos guia. (Se for necessário ajustar o tubo dentro da bomba, este pode ser descarregado levantando a extremidade inferior e rodando o rolo da bomba para a esquerda.)
4. Inserir o anel de retenção inferior do tubo da bomba no entalhe do anel de retenção existente no invólucro da bomba.
5. Repetir a rotação para a direita do rolo da bomba para garantir que este se move livremente.
6. Fechar a porta da bomba.



Ecrã 7.55: Carregar o tubo da bomba

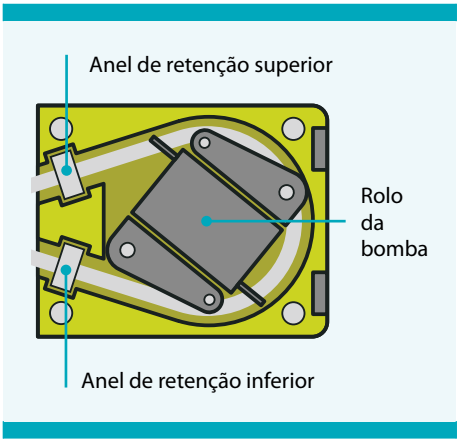


Figura 7.17: Carregar o tubo da bomba

IMPORTANTE

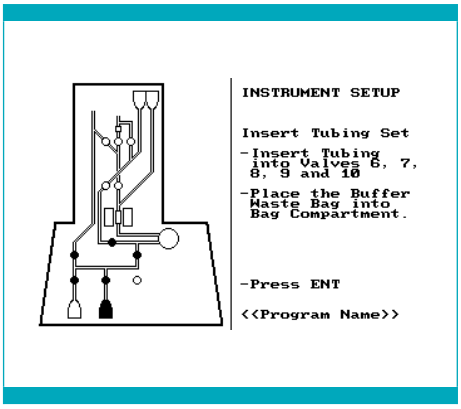
Durante a separação de células, a bomba para imediatamente a corrida se o respetivo invólucro for aberto. Se for deixado aberto mais de 600 segundos, o aparelho cancela a corrida em curso.

Para continuar, pressionar **ENT**.

Carregar as válvulas n.º 6, 7, 8, 9 e 10

A janela indica Ecrã 7.56.

1. Carregar os tubos nas válvulas n.º 6, 7, 8, 9 e 10. Verificar se o tubo está bem colocado na abertura da válvula.
2. Colocar a Buffer Waste Bag no compartimento da bolsa. Verificar se o tubo não está comprimido por baixo da cobertura do compartimento da bolsa.
3. Garantir que é possível um fluxo ilimitado para a Cell Collection Bag.



Ecrã 7.56: Carregar as válvulas n.º 6, 7, 8, 9 e 10

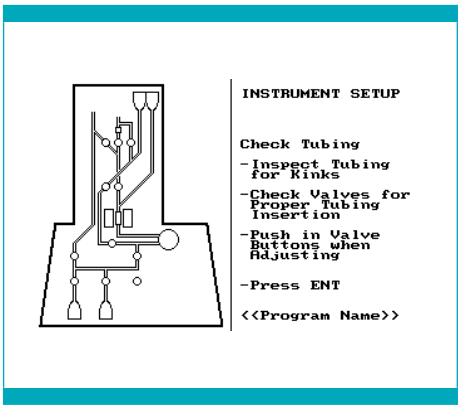
Para continuar, pressionar **ENT**.

Voltar a verificar todos os tubos e fixações

A janela indica Ecrã 7.57.

1. Começando pela válvula n.º 1, verificar se o tubo fica bem encaixado e corretamente posicionado em cada válvula.

   Voltar a inspecionar o tubo em cada válvula. Verificar se o tubo entra e sai de cada válvula através do espaço alargado na extremidade interior da ranhura (ver Figura 7.16).
2. Verificar se o tubo não está vincado ou torcido.



Ecrã 7.57: Voltar a verificar todos os tubos e fixações

Nota: Se os tubos tiverem de ser ajustados depois de fechada uma válvula, não os puxar sem pressionar o botão da válvula para a abrir.

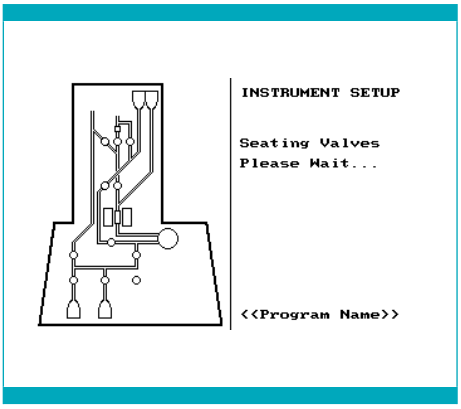
Para continuar, pressionar **ENT**.

Assentamento de válvulas

A janela indica Ecrã 7.58.

Para assegurar um bom encaixe dos tubos nas válvulas, o aparelho opera duas vezes todas as válvulas em sequência. Observar e ouvir para garantir que todas as válvulas estão a funcionar bem. Se alguma válvula não funcionar bem, ver capítulo 8 "Resolução de problemas" na página 211. Este passo pode ser repetido pressionando ◄ seguido de **ENT** (ver secção "Descrição" no manual do utilizador CliniMACS Plus Instrument).

O acionamento do íman também irá ser testado durante esta sequência de verificação.



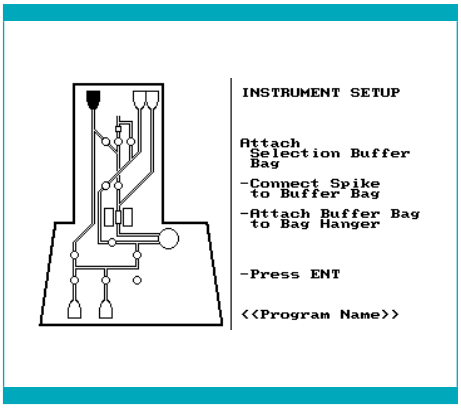
Ecrã 7.58: Assentamento de válvulas

Fixação do CliniMACS PBS/EDTA Buffer

A janela indica Ecrã 7.59.

A solução tampão prescrita para as separações CliniMACS Plus é o CliniMACS PBS/EDTA Buffer suplementado com HSA para uma concentração final de 0,5% (p/v).

1. Mediante técnicas asséticas, remover a tampa do espigão da solução tampão (ver Figura 7.12 na página 176) no conjunto de tubos e ligá-lo à bolsa de solução tampão. Verificar se o septo está perfurado, permitindo o fluxo livre de líquido. Apertar cuidadosamente a bolsa para confirmar se o espigão a penetrou sem fugas externas.
2. Fixar a bolsa de solução tampão no respetivo gancho no suporte da bolsa (ver Figura 7.18).
3. Ajustar a altura do suporte da bolsa da solução tampão. Levantar ou baixar o suporte da bolsa para ajustar a altura ao tamanho da bolsa de solução tampão. Verificar se fica a uma altura suficiente para evitar que os tubos fiquem demasiado flexionados, o que poderia limitar o fluxo, e suficientemente baixo para evitar esticar tubos e ligações.



Ecrã 7.59: Fixação da bolsa de solução tampão

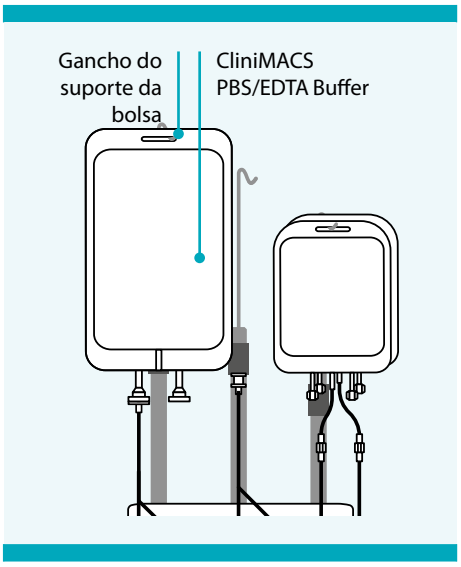


Figura 7.18: Fixar a bolsa de solução tampão

IMPORTANTE

Devido às várias escorvas gravimétricas e passos de enxaguamento, é essencial que a bolsa de solução tampão fique posicionada o mais alto possível, acima da Reapplication Bag e da Non-Target Cell Bag (ver Figura 7.20 na página 188).

Para continuar, pressionar **ENT**.

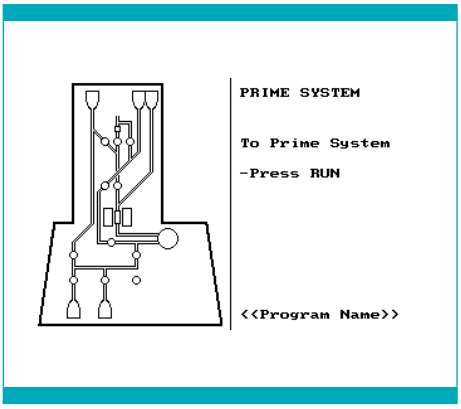
Início da escorva

A janela indica Ecrã 7.60.

Para iniciar a escorva, pressionar **RUN**.

A janela indica Ecrã 7.61.

Na fase de escorva, o conjunto de tubos é enchido com CliniMACS PBS/EDTA Buffer. A solução tampão é posta a circular no conjunto de tubos incluindo a coluna de separação. O fluido da escorva é reunido na Buffer Waste Bag, na Reapplication Bag e na Non-Target Cell Bag, ao passo que a Cell Collection Bag permanece vazia (ver Figura 7.12 na página 176). Os ciclos de escorva continuam, repetindo uma série de passos.



Ecrã 7.60: Início da escorva

A fase de escorva demora cerca de 2,5 minutos. O estado da escorva é atualizado no visor.

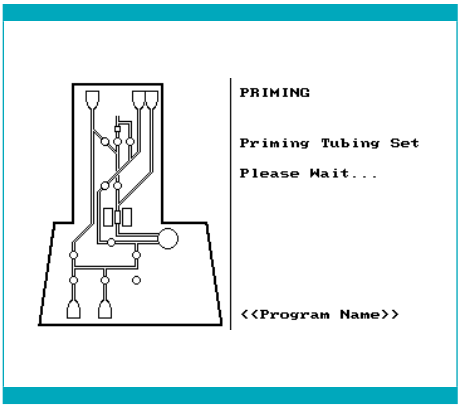
Verificação durante a escorva

Na fase de escorva, verificar todos os tubos, fixações, válvulas e a coluna de separação quanto a fugas ou dobras que possam bloquear o fluxo de fluido.

Se forem observadas fugas ou falhas de funcionamento, pressionar **STOP** para parar a corrida.

O operador tem 600 segundos para resolver o problema.

Retomar o processo pressionando **RUN**.



Ecrã 7.61: Escorva em curso

Passados 600 segundos, a separação é cancelada. Se o operador não conseguir resolver o problema ou se o conjunto de tubos tiver defeito, remover e substituir o conjunto de tubos por outro novo.

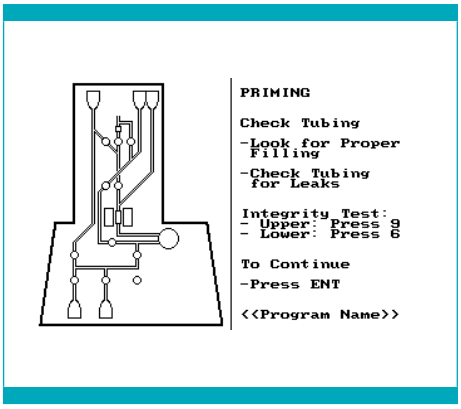
Nota: Uma vez iniciada a escorva, não é possível voltar ao procedimento de configuração do aparelho.

Verificação final de todos os tubos e fixações

A janela indica Ecrã 7.62.

Antes do início de cada corrida, verificar o seguinte:

- Fluido em todas as partes do conjunto de tubos exceto o tubo acima das válvulas n.º 2 e 3
- Sem excesso de ar no conjunto de tubos
- Fluido na Reapplication Bag, na Buffer Waste Bag e na Non-Target Cell Bag
- Sem fluido na Cell Collection Bag



Ecrã 7.62: Verificação final dos tubos e fixações

Ainda não pressionar **ENT**.

Teste de integridade

Para maior segurança, tem de ser realizado um teste de integridade do conjunto de tubos quanto a fugas. A sequência de teste consiste em duas sequências automatizadas, que permitem que as partes superior e inferior do conjunto de tubos sejam sobrepressurizadas e testadas em separado.

⚠ CUIDADO

Risco de atraso no processo. Se a pinça abaixo da Non-Target Cell Bag não tiver sido removida uma vez concluído o teste de integridade, as células não-alvo (marcadas) não podem ser removidas da coluna de separação durante a eluição. Assim não será possível continuar a reter as células não-alvo. O procedimento de separação tem de ser repetido. Remover a pinça uma vez concluído o teste de integridade.

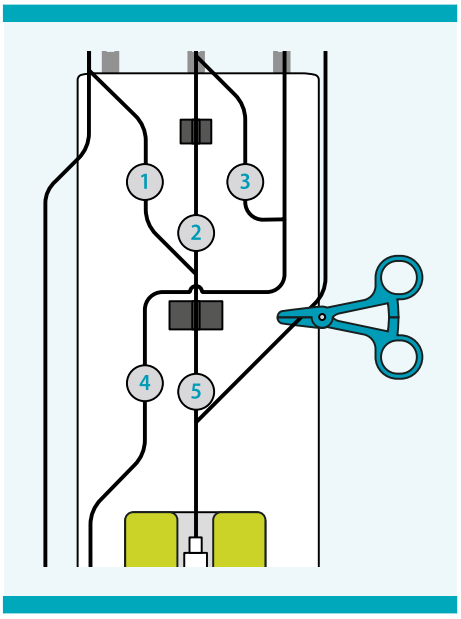


Figura 7.19: Preparação para o teste de integridade

IMPORTANTE

O teste de integridade só funcionará bem se o tubo for fixado abaixo da Non-Target Cell Bag. Fixar o tubo abaixo da Non-Target Cell Bag antes de iniciar o teste de integridade. Remover a pinça uma vez concluído o teste de integridade.

Teste de integridade para a parte superior do conjunto de tubos

1. Quanto o operador executa a "Verificação final de todos os tubos e fixações", a janela indica Ecrã 7.63.
2. Uma vez executada a "Verificação final de todos os tubos e fixações", **não** pressionar ENT.
3. Para iniciar o teste de integridade para a parte superior, pressionar 9.

   A janela indica Ecrã 7.64.

   IMPORTANTE
   Fixar o tubo por baixo da válvula de retenção da Non-Target Cell Bag.
4. Para iniciar a sequência de teste, pressionar RUN.

   Para voltar ao Ecrã 7.63, pressionar ◄.
5. Uma vez pressionado RUN, o aparelho inicia a sequência de teste automatizada para a parte superior do conjunto de tubos.

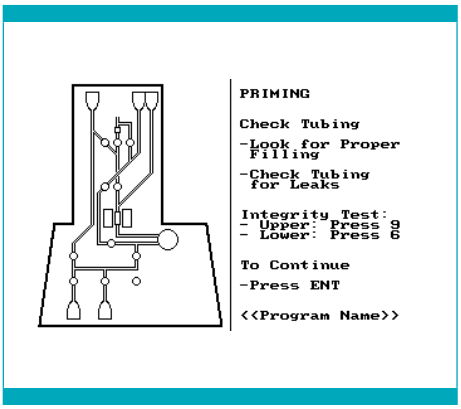
   A janela indica Ecrã 7.65.

   É criada sobrepressão e mantida durante dois minutos. Durante este tempo, o operador deve observar todas as ligações acima da ligação de tubos da bomba superior.

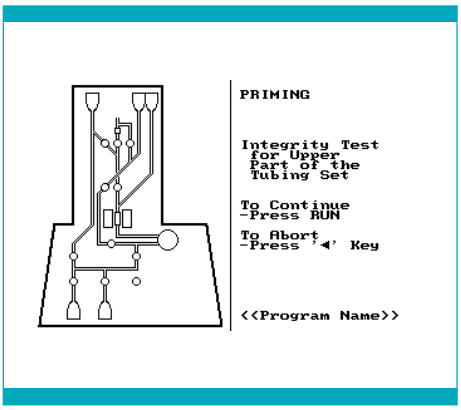
   A sequência de teste pode ser finalizada em qualquer momento, pressionando ENT.
6. Passados dois minutos, a pressão é automaticamente aliviada e a janela indica Ecrã 7.63.

   Verificar se ocorreu alguma fuga durante a sequência de teste. Se forem observadas fugas em alguma ligação do conjunto de tubos, este tem de ser removido e substituído por outro novo.

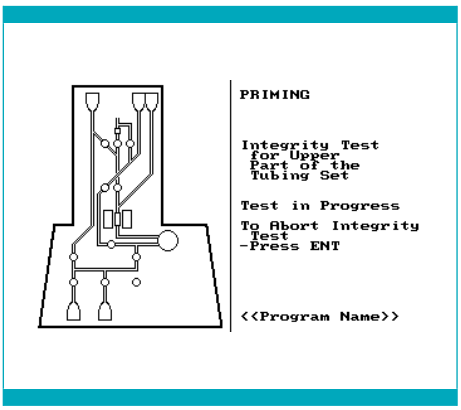
   Contactar o Miltenyi Biotec Technical Support para instruções relativas à devolução de conjuntos de tubos com defeito.
7. Se não forem observadas fugas, continuar com o teste de integridade da parte inferior do conjunto de tubos.



Ecrã 7.63: Iniciar teste de integridade para a parte superior



Ecrã 7.64: Iniciar teste de integridade para a parte superior



Ecrã 7.65: Iniciar teste de integridade para a parte superior

Teste de integridade para a parte inferior do conjunto de tubos

A janela indica Ecrã 7.63.

1. Para iniciar o teste de integridade, pressionar **6**.
   Não pressionar **ENT**.

   A janela indica Ecrã 7.66.

2. Para iniciar a sequência de teste, pressionar **RUN**.

   Para voltar ao Ecrã 7.63, pressionar ◄.

3. Uma vez pressionado **RUN**, o aparelho inicia a sequência de teste automatizada para a parte inferior do conjunto de tubos.

   A janela indica Ecrã 7.67.

   É criada sobrepressão e mantida durante 30 segundos.

   Durante este tempo, o operador deve observar a ligação inferior dos tubos da bomba e as conexões T (conectores) entre as válvulas n.º 6, 8, 9 e 10.

   A sequência de teste pode ser finalizada em qualquer momento, pressionando **ENT**.

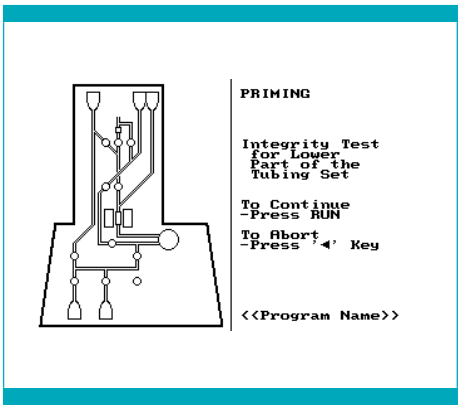
4. Passados 30 segundos, a pressão é automaticamente aliviada e a janela indica Ecrã 7.63.

   O operador tem de verificar se ocorreu alguma fuga durante a sequência de teste. Se forem observadas fugas em alguma ligação do conjunto de tubos, este tem de ser removido e substituído por outro novo.

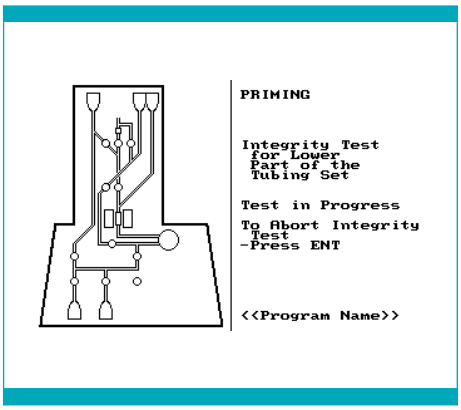
   Contactar o Miltenyi Biotec Technical Support para instruções relativas à devolução de conjuntos de tubos com defeito.

5. **Abrir a via da Non-Target Cell Bag removendo a pinça por baixo da válvula de retenção.**

6. Se não forem observadas fugas, o operador pode agora continuar com o passo seguinte pressionando **ENT**.



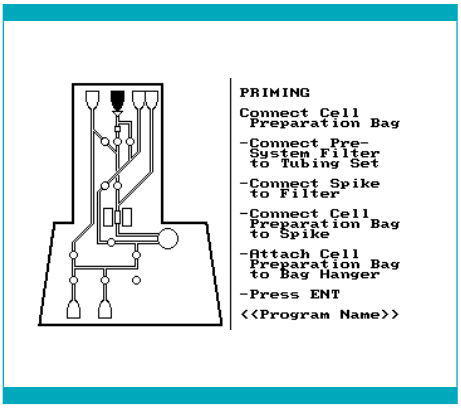
Ecrã 7.66: Iniciar teste de integridade para a parte inferior



Ecrã 7.67: Teste de integridade para a parte inferior em curso

Ligação da Cell Preparation Bag

A janela indica Ecrã 7.68.



Ecrã 7.68: Ligação da Cell Preparation Bag

Ligar a Cell Preparation Bag (contendo as células marcadas magneticamente) ao conjunto de tubos:

1. Remover a tampa roscada (ver Figura 7.12 na página 176) do conjunto de tubos.
2. Remover a tampa do espigão do filtro pré-sistema. Inserir com firmeza o espigão do filtro pré-sistema no conjunto de tubos, verificando se o septo está perfurado.
3. Remover as tampas do filtro pré-sistema e a extremidade romba do conector do espigão e ligar as peças uma à outra.
4. Remover a outra tampa do conector do espigão e ligar o espigão à Cell Preparation Bag, verificando se o septo está perfurado, permitindo o fluxo livre de líquido. Apertar cuidadosamente a bolsa para confirmar se o espigão a penetrou.
5. Verificar a ligação entre a Cell Preparation Bag, o conector do espigão, o filtro pré-sistema e o conjunto de tubos para confirmar se a ligação está segura.
6. Suspender a Cell Preparation Bag no suporte da bolsa (ver Figura 7.21).
7. Verificar se as bolsas e os tubos fixados no suporte da bolsa não estão esticados nem dobrados.

   Devido à escorva gravimétrica e aos passos de enxaguamento executados durante a separação automatizada, é muito importante que as bolsas sejam niveladas corretamente. Para assegurar o processamento completo da amostra, também é fundamental colocar a Reapplication Bag e a Non-Target Cell Bag mais alto do que a Cell Preparation Bag (ver Figura 7.20):

   - **Posição mais alta:** bolsa de solução tampão
   - **Posição intermédia:** Reapplication Bag e Non-Target Cell Bag
   - **Posição mais baixa:** Cell Preparation Bag

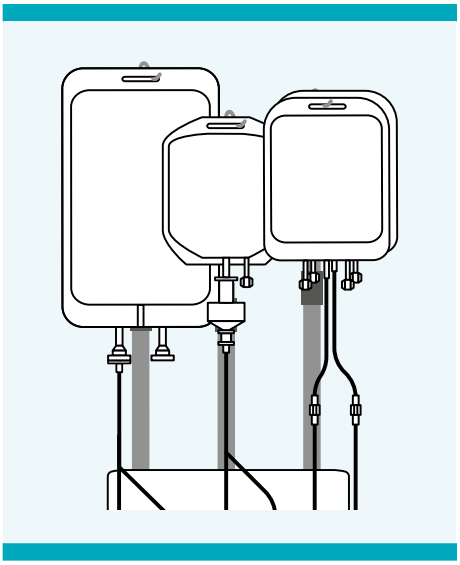


Figura 7.20: Bolsas corretamente niveladas

Para continuar, pressionar **ENT**.

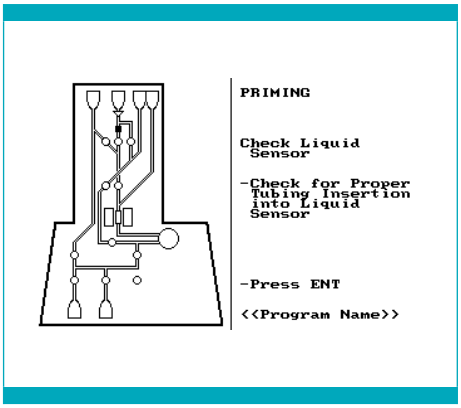
Verificação final do sensor de líquido

A janela indica Ecrã 7.69.

1. Verificar o tubo do sensor de líquido. Verificar se o tubo ficou bem inserido, sem líquido no exterior e se não se deslocou durante o procedimento de carregamento.
2. Confirmar se é possível o fluxo ilimitado para cada bolsa.

Para continuar, pressionar **ENT**.

▶ **Continuar com o PASSO 4.**



Ecrã 7.69: Verificação final do sensor de líquido

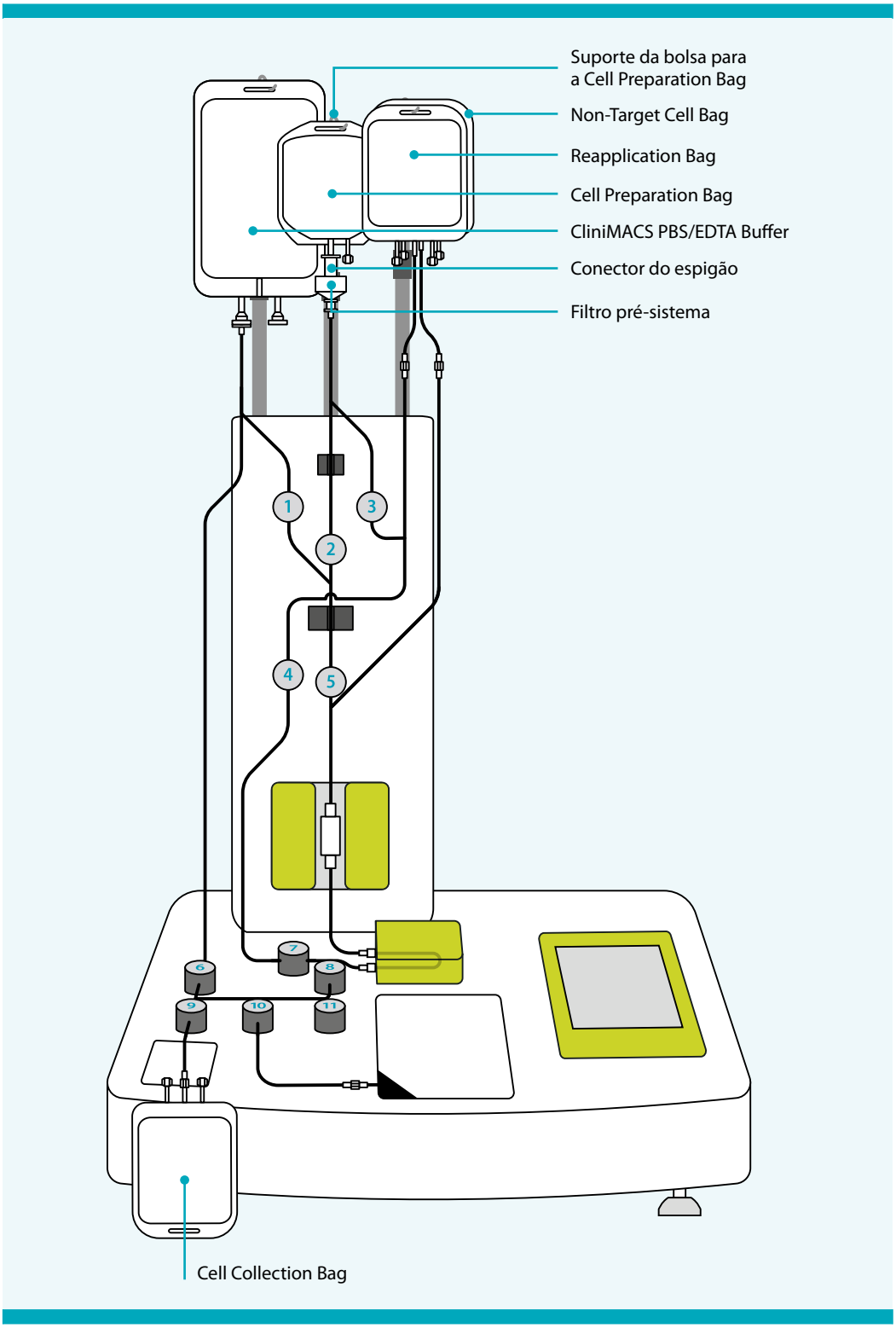


Figura 7.21: CliniMACS Plus Instrument com CliniMACS Depletion Tubing Set, CliniMACS PBS/EDTA Buffer, Cell Preparation Bag e Cell Collection Bag

7.4 PASSO 4: Separação CliniMACS Plus

7.4.1 CD34 SELECTION 1/2

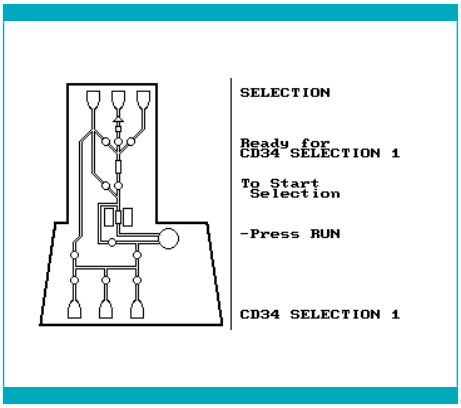
Uma vez concluída a verificação final, o CliniMACS Plus Instrument está pronto a iniciar a separação. A janela indica Ecrã 7.70.

Para continuar, pressionar **RUN**.

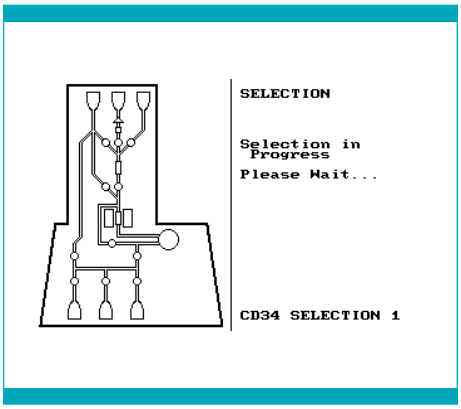
Uma vez pressionado **RUN**, o aparelho executa automaticamente o procedimento de separação escolhido.

Em cada fase da operação, surge um ecrã idêntico ao Ecrã 7.71 para indicar o estado do procedimento de separação.

O indicador de posição do íman é apresentado como duas caixas pretas junto à coluna de separação quando o íman está "ON", ou seja, foi deslocado para a frente para magnetizar a coluna de separação. Se o indicador de posição do íman estiver transparente (p. ex., Ecrã 7.70), o íman está "OFF", ou seja, foi deslocado para a traseira do aparelho. Com o íman retirado, a coluna de separação está fora do campo magnético e deixa de estar magnetizada.



Ecrã 7.70: Iniciar separação



Ecrã 7.71: Separação em curso

Nota: O ecrã pode apresentar um programa com um nome diferente, dependendo do programa de separação escolhido (CD34 SELECTION 1 ou 2).

Procedimento de separação

Carregamento de células

O procedimento de separação começa com o enchimento do filtro pré-sistema para remover o ar residual do filtro pré-sistema.

Começa então a separação das células marcadas. A bomba extrai o conteúdo da Cell Preparation Bag para o conjunto de tubos e carrega o produto celular através da pré-coluna na coluna de separação. As células marcadas magneticamente (células-alvo) são retidas na coluna de separação, colocadas no campo magnético, ao passo que as células não marcadas (células não-alvo) atravessam e são reunidas na Negative Fraction Bag. Quando a Cell Preparation Bag está vazia (o que é detetado automaticamente pelo sensor de líquido) o filtro pré-sistema é enxaguado duas vezes com solução tampão.

Lavagem da coluna I

A pré-coluna e a coluna de separação são lavadas extensivamente para remover todas as células não marcadas. A solução tampão de lavagem é reunida na Buffer Waste Bag. Quando "Lavagem da coluna I" se inicia, é apresentado o tempo restante total até ao final do procedimento de separação.

IMPORTANTE
No início da separação, a solução tampão é bombeada em sentido ascendente para a Cell Preparation Bag, a fim de encher o filtro pré-sistema. Bater com cuidado no flanco do filtro várias vezes para eliminar eventuais bolhas que possam estar nele aprisionadas.

Libertação de células I

O íman é deslocado para a traseira do aparelho (posição "OFF"). As células retidas são libertadas num fluxo a alta velocidade, mas permanecem num ciclo interno do tubo.

Recarregamento de células I

O íman é deslocado novamente para a posição "ON" para magnetizar a coluna de separação e as células são reaplicadas na coluna de separação.

Lavagem da coluna II

O recarregamento das células é seguido de um segundo passo de lavagem para remover as restantes células não marcadas. Também todos os tubos são enxaguados várias vezes.

Libertação de células II, recarregamento de células II, lavagem da coluna III

As células são libertadas e reaplicadas na coluna de separação uma segunda vez para remover eventuais células não marcadas que se fixam inespecificamente na matriz da coluna. A seguir, a coluna de separação é novamente lavada.

Libertação de células III, recarregamento de células III, lavagem da coluna IV

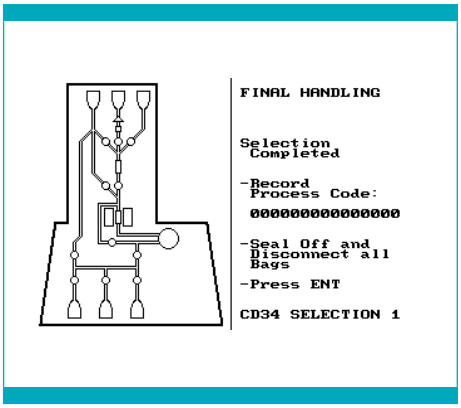
Além disso, o programa de separação CD34 SELECTION 2 inclui um terceiro passo de libertação e reaplicação.

Eluição final das células

O íman é deslocado para a posição "OFF" e as células marcadas magneticamente são libertadas da coluna de separação e reunidas na Cell Collection Bag fixada.

Desprender as bolsas e registar o código do processo

Uma vez concluída a corrida, a janela indica Ecrã 7.72.



Ecrã 7.72: Desprender as bolsas e registar o código do processo

1. Registar o código do processo.
2. Fixar ou selar o tubo acima do Luer Lock que liga a Cell Collection Bag ao conjunto de tubos (ver Figura 7.22).

   Fazer três selagens herméticas no tubo mesmo abaixo da válvula n.º 9. Separar a selagem central com cuidado para desprender a Cell Collection Bag do conjunto de tubos.
3. Pesar a Cell Collection Bag cheia. Registar o peso.

   Determinar o peso da fração de células-alvo subtraindo o peso da Cell Collection Bag vazia do peso da Cell Collection Bag contendo as células-alvo. Registar o peso.
4. Misturar bem a suspensão de células-alvo rodando a bolsa. Retirar uma quantidade adequada, p. ex., 0,5 mL e manter para análise.
5. Com o selador térmico, selar o tubo acima do Luer Lock da Negative Fraction Bag. Fazer três selagens herméticas no tubo. Separar a selagem central para desprender a Negative Fraction Bag.
6. Desprender a Buffer Waste Bag da mesma forma.
7. Remover a Negative Fraction Bag e a Buffer Waste Bag. Manter todas as bolsas até à conclusão da análise final de todas as células.

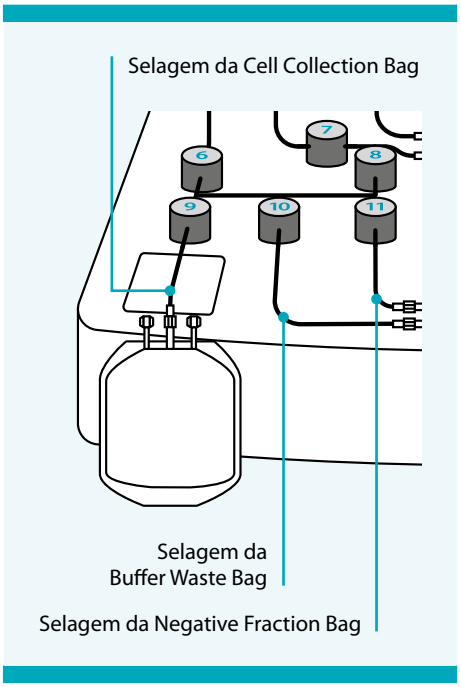


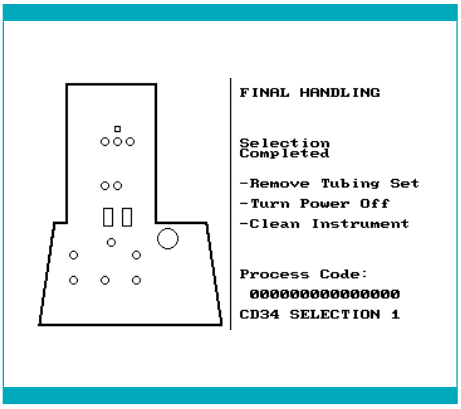
Figura 7.22: Desprender bolsas

As células-alvo podem agora ser processadas de acordo com os protocolos clínicos.

Para continuar, pressionar **RUN**.

Descarregar o conjunto de tubos e encerrar

A janela indica Ecrã 7.73.



Ecrã 7.73: Descarregar o conjunto de tubos e encerrar

1. Remover o conjunto de tubos: A começar pelas válvulas n.º 6, 9, 10 e 11, e trabalhando em sentido ascendente, libertar o tubo do sensor de líquido e das válvulas pressionando-as. Soltar as colunas dos suportes das colunas. Eliminar o conjunto de tubos como risco biológico, de acordo com os procedimentos hospitalares padrão.
2. Desligar o CliniMACS Plus Instrument.
3. Limpar o aparelho de acordo com as instruções de limpeza, ver secção "Limpeza e desinfeção" no manual do utilizador CliniMACS Plus Instrument. Observar os procedimentos padrão para o tratamento de material infecioso.

Análise das células

IMPORTANTE

- O CliniMACS PBS/EDTA Buffer não tem de ser removido antes da administração das células-alvo separadas se o volume não exceder os 100 mL por transplante com débitos de perfusão adequados. O estado renal do paciente e os efeitos nos eletrólitos sanguíneos têm de ser considerados. Especialmente em crianças, os débitos de perfusão têm de ser ajustados em conformidade.
- Se o volume da fração de células-alvo exceder os 100 mL, tem de ser reduzido por meios adequados, p. ex., através de centrifugação ou troca de solução tampão, para uma solução de perfusão aprovada no país do utilizador.

⚠ CUIDADO

Risco de qualidade reduzida das células-alvo. As células-alvo devem ser analisadas e verificadas quanto aos requisitos do utilizador, caso contrário, a adequação para a aplicação clínica pode ficar comprometida. Examinar as células-alvo em termos de qualidade e quantidade de acordo com a sua utilização prevista.

Isto tem de incluir os seguintes parâmetros:

- Número total de leucócitos
- Viabilidade e número total de células-alvo
- Pureza e recuperação das células-alvo

Também se recomenda determinar o número total de leucócitos e a viabilidade da fração celular não-alvo. A lista é um exemplo e devem ser incluídos outros testes com base na utilização prevista e nos protocolos clínicos. Registar os dados da análise.

7.4.2 ENRICHMENT 1.1

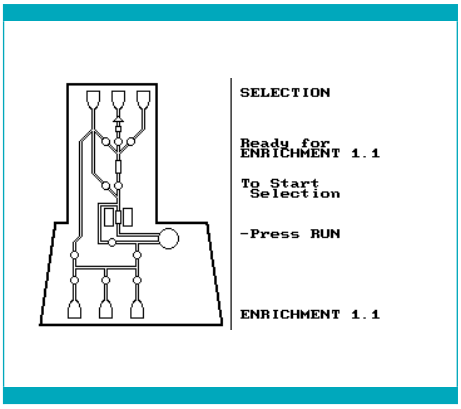
Uma vez concluída a verificação final, o CliniMACS Plus Instrument está pronto a iniciar a separação. A janela indica Ecrã 7.74.

Para continuar, pressionar **RUN**.

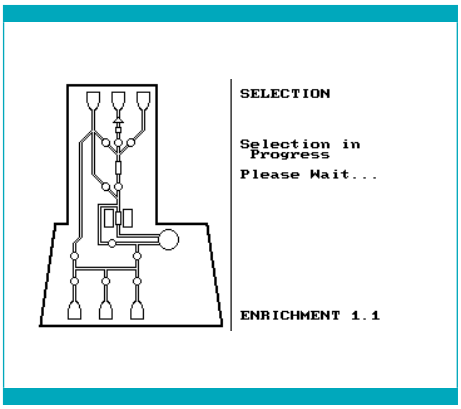
Uma vez pressionado **RUN**, o aparelho executa automaticamente o procedimento de separação escolhido.

Em cada fase da operação, surge um ecrã idêntico ao Ecrã 7.75 para indicar o estado do procedimento de separação.

O indicador de posição do íman é indicado como duas caixas pretas junto à coluna de separação quando o íman está "ON", ou seja, foi deslocado para a frente para magnetizar a coluna de separação. Se o indicador de posição do íman estiver transparente (p. ex., Ecrã 7.74), o íman está "OFF", ou seja, foi deslocado para a traseira do aparelho. Com o íman retirado, a coluna de separação está fora do campo magnético e não é magnetizada.



Ecrã 7.74: Iniciar separação



Ecrã 7.75: Separação em curso

Procedimento de separação

Carregamento de células

O procedimento de separação começa com o enchimento do filtro pré-sistema para remover o ar residual do filtro pré-sistema. Começa então a separação das células marcadas. A bomba extrai o conteúdo da Cell Preparation Bag para o conjunto de tubos e carrega o produto celular através da pré-coluna na coluna de separação. As células marcadas magneticamente (células-alvo) são retidas na coluna de separação, colocadas no campo magnético, ao passo que as células não marcadas (células não-alvo) atravessam e são reunidas na Negative Fraction Bag.

IMPORTANTE

No início da separação, a solução tampão é bombeada em sentido ascendente para a Cell Preparation Bag, a fim de encher o filtro pré-sistema. Bater com cuidado no flanco do filtro várias vezes para eliminar eventuais bolhas que possam estar nele aprisionadas.

Nota:

- Se o número de células marcadas magneticamente (calculado pelo software CliniMACS Plus) exceder a capacidade de ligação da coluna de separação, o programa de separação carrega e separa automaticamente a amostra de células em porções adequadas ("carregamento por fases").
- O carregamento para quando a capacidade da coluna de separação é alcançada, e o programa de separação continua com o passo seguinte da separação. Depois de concluído o último passo (eluição final das células), a porção seguinte da amostra é carregada para a coluna e processada em conformidade.

Lavagem da coluna I

A pré-coluna e a coluna de separação são lavadas extensivamente para remover todas as células não marcadas. A solução tampão de lavagem é reunida na Buffer Waste Bag.

Libertação de células

O íman é deslocado para a traseira do aparelho (posição "OFF"). As células retidas são libertadas num fluxo a alta velocidade, mas permanecem num ciclo interno do tubo.

Recarregamento de células

O íman é deslocado novamente para a posição "ON" para magnetizar a coluna de separação e as células são reaplicadas na coluna de separação.

Lavagem da coluna II

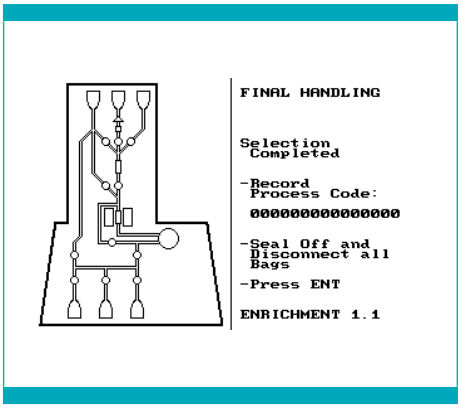
O recarregamento das células é seguido de uma segunda sequência de lavagem da coluna para remover as restantes células não marcadas. Também todos os tubos são enxaguados várias vezes.

Eluição final das células

O íman é deslocado para a posição "OFF" e as células marcadas magneticamente (células-alvo) são libertadas da coluna de separação e reunidas na Cell Collection Bag.

Desprender as bolsas e registar o código do processo

Uma vez concluída a corrida, a janela indica Ecrã 7.76.



Ecrã 7.76: Desprender as bolsas e registar o código do processo

1. Registar o código do processo.
2. Fixar ou selar o tubo acima do Luer Lock que liga a Cell Collection Bag ao conjunto de tubos (ver Figura 7.23).

   Fazer três selagens herméticas no tubo mesmo abaixo da válvula n.º 9. Separar a selagem central com cuidado para desprender a Cell Collection Bag do conjunto de tubos.
3. Pesar a Cell Collection Bag cheia. Registar o peso.

   Determinar o peso da fração de células-alvo subtraindo o peso da Cell Collection Bag vazia do peso da Cell Collection Bag contendo as células-alvo. Registar o peso.
4. Misturar bem a suspensão de células-alvo rodando a bolsa. Retirar uma quantidade adequada, p. ex., 0,5 mL e manter para análise.
5. Com o selador térmico, selar o tubo acima do Luer Lock da Negative Fraction Bag. Fazer três selagens herméticas no tubo. Separar a selagem central para desprender a Negative Fraction Bag.
6. Desprender a Buffer Waste Bag da mesma forma.
7. Remover a Negative Fraction Bag e a Buffer Waste Bag. Manter todas as bolsas até à conclusão da análise final de todas as células.

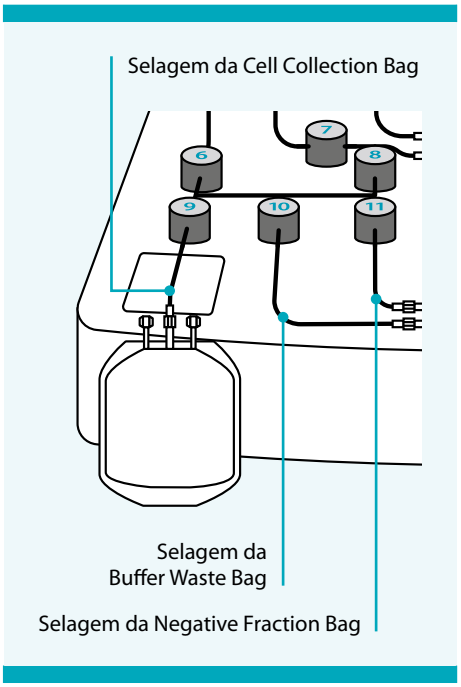


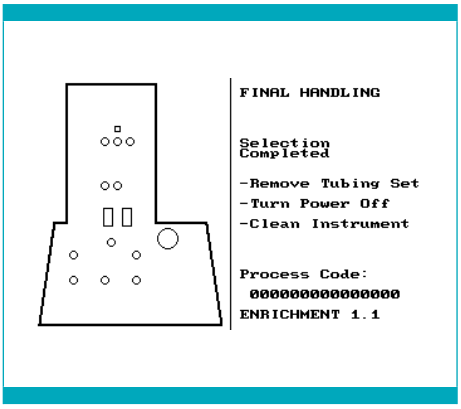
Figura 7.23: Desprender bolsas

As células-alvo podem agora ser processadas de acordo com os protocolos clínicos.

Para continuar, pressionar **ENT**.

Descarregar o conjunto de tubos e encerrar

A janela indica Ecrã 7.77.



Ecrã 7.77: Descarregar o conjunto de tubos e encerrar

1. Remover o conjunto de tubos: A começar pelas válvulas n.º 6, 9, 10 e 11, e trabalhando em sentido ascendente, libertar o tubo do sensor de líquido e das válvulas pressionando-as. Soltar as colunas dos suportes das colunas. Eliminar o conjunto de tubos como risco biológico de acordo com os procedimentos hospitalares padrão.
2. Desligar o CliniMACS Plus Instrument.
3. Limpar o aparelho de acordo com as instruções de limpeza, ver secção "Limpeza e desinfeção" no manual do utilizador CliniMACS Plus Instrument. Observar os procedimentos padrão para o tratamento de material infecioso.

Análise das células

IMPORTANTE

- O CliniMACS PBS/EDTA Buffer não tem de ser removido antes da administração das células-alvo separadas se o volume não exceder os 100 mL por transplante com débitos de perfusão adequados. O estado renal do paciente e os efeitos nos eletrólitos sanguíneos têm de ser considerados. Especialmente em crianças, os débitos de perfusão têm de ser ajustados em conformidade.
- Se o volume da fração de células-alvo exceder os 100 mL, tem de ser reduzido por meios adequados, p. ex., através de centrifugação ou troca de solução tampão, para uma solução de perfusão aprovada no país do utilizador.

⚠ CUIDADO

Risco de qualidade reduzida das células-alvo. As células-alvo devem ser analisadas e verificadas quanto aos requisitos do utilizador, caso contrário, a adequação para a aplicação clínica pode ficar comprometida. Examinar as células-alvo em termos de qualidade e quantidade de acordo com a sua utilização prevista.

Isto tem de incluir os seguintes parâmetros:

- Número total de leucócitos
- Viabilidade e número total de células-alvo
- Pureza (eficiência do empobrecimento) e recuperação das células-alvo

Também se recomenda determinar o número total de leucócitos e a viabilidade da fração celular não-alvo. A lista é um exemplo e devem ser incluídos outros testes com base na utilização prevista e nos protocolos clínicos. Registar os dados da análise.

7.4.3 ENRICHMENT 3.2

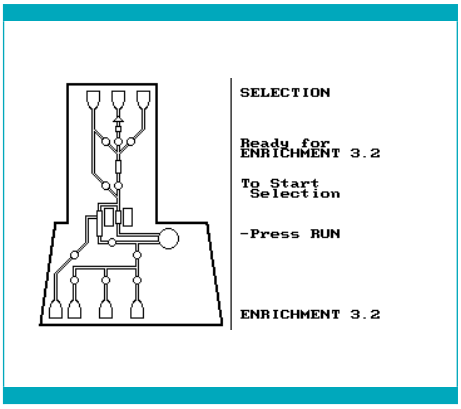
Uma vez concluída a verificação final, o CliniMACS Plus Instrument está pronto a iniciar a separação. A janela indica Ecrã 7.78.

Para continuar, pressionar **RUN**.

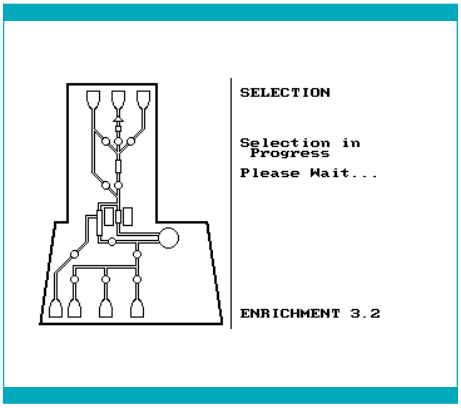
Uma vez pressionado **RUN**, o aparelho executa automaticamente o procedimento de separação escolhido.

Em cada fase da operação, surge um ecrã idêntico ao Ecrã 7.79 para indicar o estado do procedimento de separação.

O indicador de posição do íman é indicado como duas caixas pretas junto à coluna de separação quando o íman está "ON", ou seja, foi deslocado para a frente para magnetizar a coluna de separação. Se o indicador de posição do íman estiver transparente (p. ex., Ecrã 7.78), o íman está "OFF", ou seja, foi deslocado para a traseira do aparelho. Com o íman retirado, a coluna de separação está fora do campo magnético e não é magnetizada.



Ecrã 7.78: Iniciar separação



Ecrã 7.79: Separação em curso

Procedimento de separação

Carregamento de células

O procedimento de separação começa com o enchimento do filtro pré-sistema para remover o ar residual do filtro pré-sistema. Começa então a separação das células marcadas. A bomba extrai o conteúdo da Cell Preparation Bag para o conjunto de tubos e carrega o produto celular através da pré-coluna na coluna de separação. As células marcadas magneticamente (células-alvo) são retidas na coluna de separação, colocadas no campo magnético, ao passo que as células não marcadas (células não-alvo) atravessam e são reunidas na Negative Fraction Bag. Quando a Cell Preparation Bag está vazia (o que é detetado automaticamente pelo sensor de líquido) o filtro pré-sistema é enxaguado duas vezes com solução tampão.

IMPORTANTE

No início da separação, a solução tampão é bombeada em sentido ascendente para a Cell Preparation Bag, a fim de encher o filtro pré-sistema. Bater com cuidado no flanco do filtro várias vezes para eliminar eventuais bolhas que possam estar nele aprisionadas.

Lavagem da coluna I

A pré-coluna e a coluna de separação são lavadas extensivamente para remover todas as células não marcadas. A solução tampão de lavagem é reunida na Buffer Waste Bag.

Libertação de células I

O íman é deslocado para a traseira do aparelho (posição "OFF"). As células retidas são libertadas num fluxo a alta velocidade, mas permanecem num ciclo interno do tubo.

Recarregamento de células I

O íman é deslocado novamente para a posição "ON" para magnetizar a coluna de separação e as células são reaplicadas na coluna de separação.

Lavagem da coluna II

O recarregamento das células é seguido de um segundo passo de lavagem para remover as restantes células não marcadas. Também todos os tubos são enxaguados várias vezes.

Libertação de células II, recarregamento de células II, lavagem da coluna III

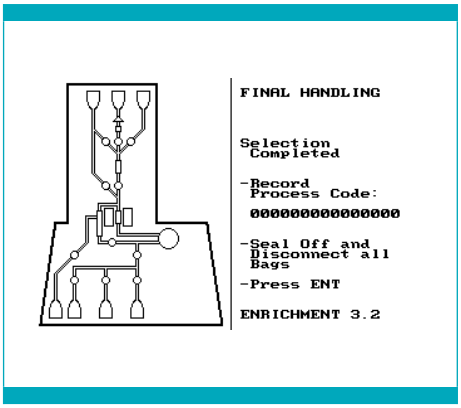
As células são libertadas e reaplicadas na coluna de separação uma segunda vez para remover eventuais células não marcadas que se fixam inespecificamente a matriz da coluna. A seguir, a coluna de separação é novamente lavada.

Eluição final das células

O íman é deslocado para a posição "OFF" e as células marcadas magneticamente marcadas (células-alvo) são libertadas e reunidas na Cell Collection Bag.

Desprender as bolsas e registar o código do processo

Uma vez concluída a corrida, a janela indica Ecrã 7.80.



Ecrã 7.80: Desprender as bolsas e registar o código do processo

1. Registar o código do processo.
2. Fixar ou selar o tubo acima do Luer Lock que liga a Cell Collection Bag ao conjunto de tubos (ver Figura 7.24).

   Fazer três selagens herméticas no tubo mesmo abaixo da válvula n.º 9. Separar a selagem central com cuidado para desprender a Cell Collection Bag do conjunto de tubos.
3. Pesar a Cell Collection Bag cheia. Registar o peso.

   Determinar o peso da fração de células-alvo subtraindo o peso da Cell Collection Bag vazia do peso da Cell Collection Bag contendo as células-alvo. Registar o peso.
4. Misturar bem a suspensão de células-alvo rodando a bolsa. Retirar uma quantidade adequada, p. ex., 0,5 mL e manter para análise.
5. Com o selador térmico, selar o tubo acima do Luer Lock da Negative Fraction Bag. Fazer três selagens herméticas no tubo. Separar a selagem central para desprender a Negative Fraction Bag.
6. Desprender a Buffer Waste Bag da mesma forma.
7. Remover a Negative Fraction Bag e a Buffer Waste Bag. Manter todas as bolsas até à conclusão da análise final de todas as células.

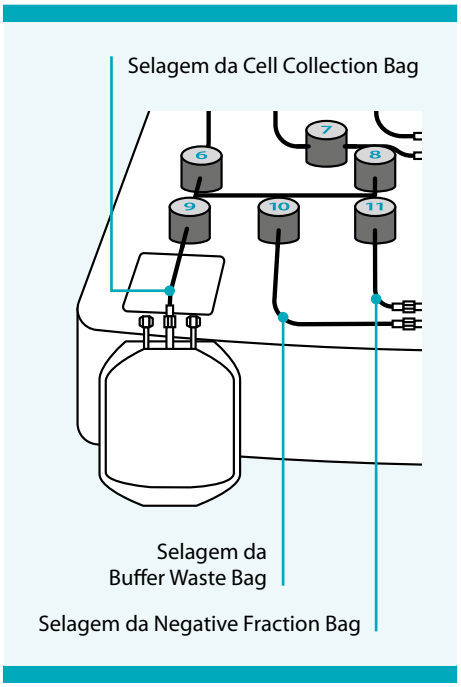


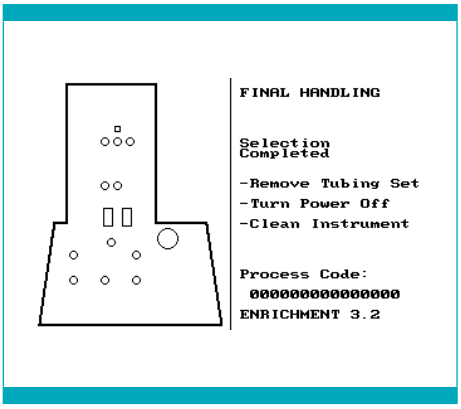
Figura 7.24: Desprender bolsas

As células-alvo podem agora ser processadas de acordo com os protocolos clínicos.

Para continuar, pressionar **ENT**.

Descarregar o conjunto de tubos e encerrar

A janela indica Ecrã 7.81.



Ecrã 7.81: Descarregar o conjunto de tubos e encerrar

1. Remover o conjunto de tubos: A começar pelas válvulas n.º 6, 9, 10 e 11, e trabalhando em sentido ascendente, libertar o tubo do sensor de líquido e das válvulas pressionando-as. Soltar as colunas dos suportes das colunas. Eliminar o conjunto de tubos como risco biológico de acordo com os procedimentos hospitalares padrão.
2. Desligar o CliniMACS Plus Instrument.
3. Limpar o aparelho de acordo com as instruções de limpeza, ver secção "Limpeza e desinfeção" no manual do utilizador CliniMACS Plus Instrument. Observar os procedimentos padrão para o tratamento de material infecioso.

Análise das células

IMPORTANTE

- O CliniMACS PBS/EDTA Buffer não tem de ser removido antes da administração das células-alvo separadas se o volume não exceder os 100 mL por transplante com débitos de perfusão adequados. O estado renal do paciente e os efeitos nos eletrólitos sanguíneos têm de ser considerados. Especialmente em crianças, os débitos de perfusão têm de ser ajustados em conformidade.
- Se o volume da fração de células-alvo exceder os 100 mL, tem de ser reduzido por meios adequados, p. ex., através de centrifugação ou troca de solução tampão, para uma solução de perfusão aprovada no país do utilizador.

⚠ CUIDADO

Risco de qualidade reduzida das células-alvo. As células-alvo devem ser analisadas e verificadas quanto aos requisitos do utilizador, caso contrário, a adequação para a aplicação clínica pode ficar comprometida. Examinar as células-alvo em termos de qualidade e quantidade de acordo com a sua utilização prevista.

Isto tem de incluir os seguintes parâmetros:

- Número total de leucócitos
- Viabilidade e número total de células-alvo
- Pureza e recuperação das células-alvo

Também se recomenda determinar o número total de leucócitos e a viabilidade da fração celular não-alvo. A lista é um exemplo e devem ser incluídos outros testes com base na utilização prevista e nos protocolos clínicos. Registar os dados da análise.

7.4.4 DEPLETION 2.1

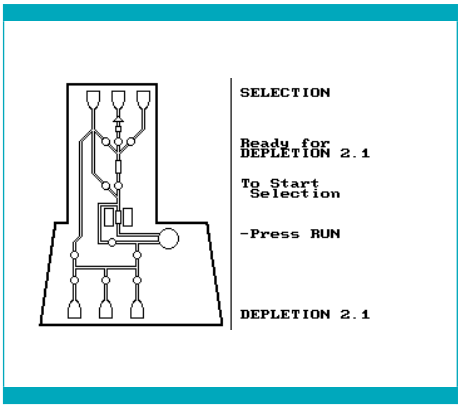
Uma vez concluída a verificação final, o CliniMACS Plus Instrument está pronto a iniciar a separação. A janela indica Ecrã 7.82.

Para continuar, pressionar **RUN**.

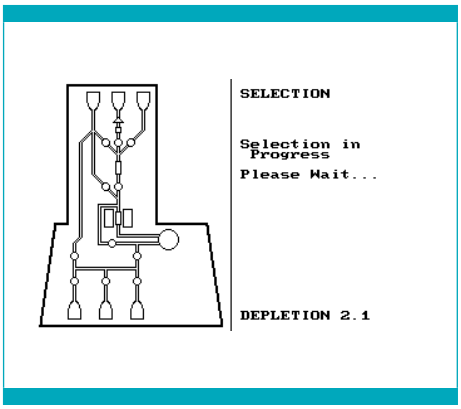
Uma vez pressionado **RUN**, o aparelho executa automaticamente o procedimento de separação escolhido.

Em cada fase da operação, surge um ecrã idêntico ao Ecrã 7.83 para indicar o estado do procedimento de separação.

O indicador de posição do íman é indicado como duas caixas pretas junto à coluna de separação quando o íman está "ON", ou seja, foi deslocado para a frente para magnetizar a coluna de separação. Se o indicador de posição do íman estiver transparente (p. ex., Ecrã 7.82), o íman está "OFF", ou seja, foi deslocado para a traseira do aparelho. Com o íman retirado, a coluna de separação está fora do campo magnético e não é magnetizada.



Ecrã 7.82: Iniciar separação



Ecrã 7.83: Separação em curso

Procedimento de separação

Carregamento de células

O procedimento de separação começa com o enchimento do filtro pré-sistema para concluir a escorva do sistema. Começa então a separação das células marcadas. A bomba extrai o conteúdo da Cell Preparation Bag para dentro do conjunto de tubos. As células marcadas magneticamente (células não-alvo) são retidas na coluna de separação, colocadas no campo magnético, ao passo que as células não marcadas (células-alvo) atravessam e são reunidas na Cell Collection Bag.

IMPORTANTE

No início da separação, a solução tampão é bombeada em sentido ascendente para a Cell Preparation Bag, a fim de encher o filtro pré-sistema. Bater com cuidado no flanco do filtro várias vezes para eliminar eventuais bolhas que possam estar nele aprisionadas.

Enxaguamento do filtro pré-sistema

Depois de a amostra de células ser totalmente carregada no conjunto de tubos, o filtro pré-sistema é enxaguado duas vezes com solução tampão para reduzir a perda de células no filtro.

Nota:

- Se o número de células marcadas magneticamente (calculado pelo software CliniMACS Plus) exceder a capacidade de ligação da coluna de separação, o programa de separação carrega e separa automaticamente a amostra de células em porções mais pequenas ("carregamento por fases").
- O carregamento para quando a capacidade da coluna de separação é alcançada e o programa de separação continua com o passo seguinte da separação. Depois do concluído o último passo (eluição final das células), a porção seguinte da amostra é carregada na coluna.

Lavagem da coluna

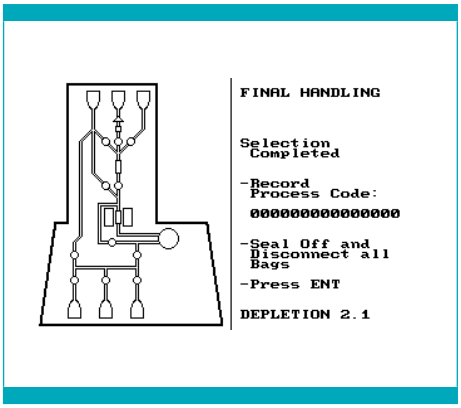
A pré-coluna e a coluna de separação são lavadas extensivamente para remover todas as células não marcadas. A solução tampão de lavagem é reunida na Buffer Waste Bag.

Eluição final das células

O íman é deslocado para a posição "OFF". Primeiro, as células marcadas magneticamente são eluídas para a Priming Waste Bag. Só depois de concluída a última fase de carregamento é que todas as células marcadas magneticamente (células não-alvo) são libertadas da coluna de separação e reunidas na Negative Fraction Bag para reduzir a transferência de células marcadas para o tubo da bomba.

Desprender as bolsas e registar o código do processo

Uma vez concluída a corrida, a janela indica Ecrã 7.84.



Ecrã 7.84: Desprender as bolsas e registar o código do processo

1. Registar o código do processo.
2. Fixar ou selar o tubo acima do Luer Lock que liga a Cell Collection Bag ao conjunto de tubos (ver Figura 7.25).

   Fazer três selagens herméticas no tubo mesmo abaixo da válvula n.º 9. Separar a selagem central com cuidado para desprender a Cell Collection Bag do conjunto de tubos.
3. Pesar a Cell Collection Bag cheia. Registar o peso.

   Determinar o peso da fração de células-alvo subtraindo o peso da Cell Collection Bag vazia do peso da Cell Collection Bag contendo as células-alvo. Registar o peso.
4. Misturar bem a suspensão de células-alvo rodando a bolsa. Retirar uma quantidade adequada, p. ex., 0,5 mL e manter para análise.
5. Com o selador térmico, selar o tubo acima do Luer Lock da Negative Fraction Bag. Fazer três selagens herméticas no tubo. Separar a selagem central para desprender a Negative Fraction Bag.
6. Desprender a Buffer Waste Bag da mesma forma.
7. Remover a Negative Fraction Bag e a Buffer Waste Bag. Manter todas as bolsas até à conclusão da análise final de todas as células.

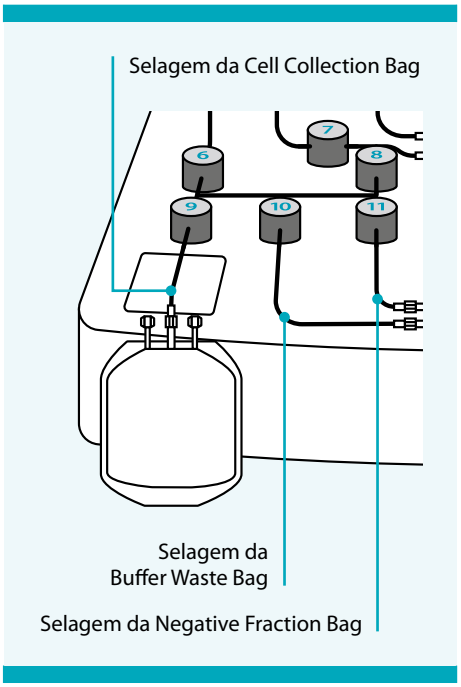


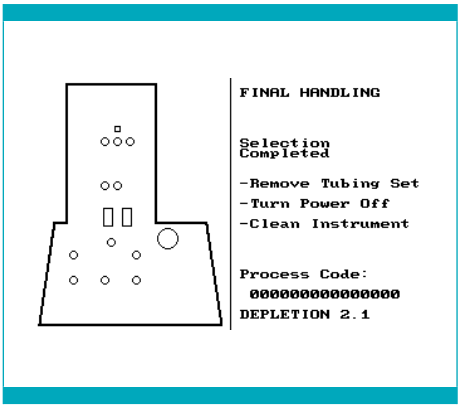
Figura 7.25: Desprender bolsas

As células-alvo podem agora ser processadas de acordo com os protocolos clínicos.

Para continuar, pressionar **ENT**.

Descarregar o conjunto de tubos e encerrar

A janela indica Ecrã 7.85.



Ecrã 7.85: Descarregar o conjunto de tubos e encerrar

1. Remover o conjunto de tubos: A começar pelas válvulas n.º 6, 9, e 10 e trabalhando no sentido ascendente, libertar o tubo do sensor de líquido e das válvulas pressionando-as. Soltar a coluna do suporte da coluna. Eliminar o conjunto de tubos como risco biológico de acordo com os procedimentos hospitalares padrão.
2. Desligar o CliniMACS Plus Instrument.
3. Limpar o aparelho de acordo com as instruções de limpeza, ver secção "Limpeza e desinfeção" no manual do utilizador CliniMACS Plus Instrument. Observar os procedimentos padrão para o tratamento de material infecioso.

Análise das células

IMPORTANTE

- O CliniMACS PBS/EDTA Buffer não tem de ser removido antes da administração das células-alvo separadas se o volume não exceder os 100 mL por transplante com débitos de perfusão adequados. O estado renal do paciente e os efeitos nos eletrólitos sanguíneos têm de ser considerados. Especialmente em crianças, os débitos de perfusão têm de ser ajustados em conformidade.
- Se o volume da fração de células-alvo exceder os 100 mL, tem de ser reduzido por meios adequados, p. ex., através de centrifugação ou troca de solução tampão, para uma solução de perfusão aprovada no país do utilizador.

⚠ CUIDADO

Risco de qualidade reduzida das células-alvo. As células-alvo devem ser analisadas e verificadas quanto aos requisitos do utilizador, caso contrário, a adequação para a aplicação clínica pode ficar comprometida. Examinar as células-alvo em termos de qualidade e quantidade de acordo com a sua utilização prevista.

Isto tem de incluir os seguintes parâmetros:

- Número total de leucócitos
- Viabilidade e número total de células-alvo
- Eficiência do empobrecimento

Também se recomenda determinar o número total de leucócitos e a viabilidade da fração celular não-alvo. A lista é um exemplo e devem ser incluídos outros testes com base na utilização prevista e nos protocolos clínicos. Registar os dados da análise.

7.4.5 DEPLETION 3.1

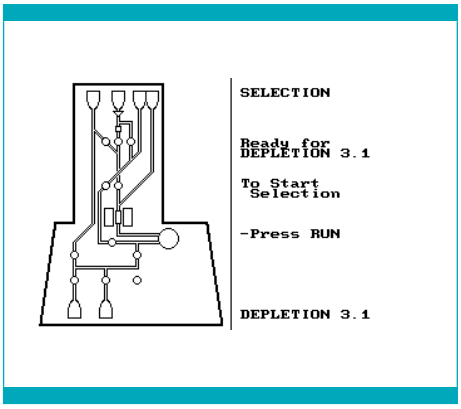
Uma vez concluída a verificação final, o CliniMACS Plus Instrument está pronto a iniciar a separação. A janela indica Ecrã 7.86.

Para continuar, pressionar **RUN**.

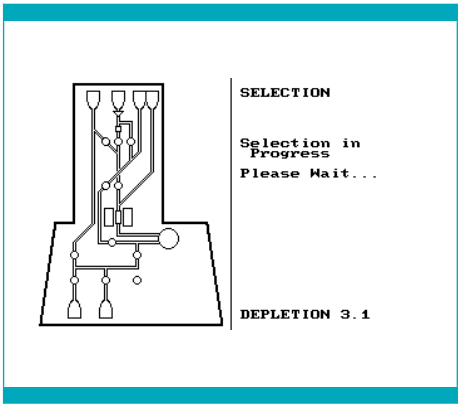
Uma vez pressionado **RUN**, o aparelho executa automaticamente o procedimento de separação escolhido.

Em cada fase da operação, surge um ecrã idêntico ao Ecrã 7.87 para indicar o estado do procedimento de separação.

O indicador de posição do íman é indicado como duas caixas pretas junto à coluna de separação quando o íman está "ON", ou seja, foi deslocado para a frente para magnetizar a coluna de separação. Se o indicador de posição do íman estiver transparente (p. ex., Ecrã 7.86), o íman está "OFF", ou seja, foi deslocado para a traseira do aparelho. Com o íman retirado, a coluna de separação está fora do campo magnético e não é magnetizada



Ecrã 7.86: Iniciar separação



Ecrã 7.87: Separação em curso

Procedimento de separação

Depletion 3.1 é um programa de empobrecimento em dois passos, ou seja, as células são aplicadas duas vezes na coluna de separação.

Na primeira parte do processo, o volume de células marcadas é empobrecido (Staged Cell Loading [Bulk Loading Stage]). Na segunda parte do processo, as poucas células marcadas que ainda restam são empobrecidas (Sensitive Sample Loading [Sensitive Loading Stage]).

IMPORTANTE
No início da separação, a solução tampão é bombeada em sentido ascendente para a Cell Preparation Bag, a fim de encher o filtro pré-sistema. Bater com cuidado no flanco do filtro várias vezes para eliminar eventuais bolhas que possam estar nele aprisionadas.

Nota: Se o número de células marcadas magneticamente (calculado pelo software CliniMACS Plus) exceder a capacidade de ligação da coluna de separação, o programa de separação carrega e separa automaticamente a amostra de células em porções mais pequenas ("carregamento por fases"). Entre cada fase de

carregamento, a coluna de separação é lavada para remover todas as células marcadas. As células marcadas são eluídas e mantidas na Non-Target Cell Bag. A solução tampão de lavagem é reunida na Reapplication Bag.

Staged cell loading (Bulk Loading Stage)

O procedimento de separação começa com o enchimento do filtro pré-sistema para concluir a escorva do sistema. Começa, então, a separação das células marcadas. A bomba extrai o conteúdo da Cell Preparation Bag para dentro do conjunto de tubos. As células marcadas magneticamente (células não-alvo) são retidas na coluna de separação, colocadas no campo magnético, ao passo que as células não marcadas (células-alvo) atravessam e são reunidas na Reapplication Bag.

Sensitive sample loading (Sensitive Loading Stage)

Para um maior empobrecimento, as células na Reapplication Bag são recarregadas na coluna de separação a uma velocidade mais baixa. Enquanto as poucas células marcadas que restam são agora retidas na coluna, as células não marcadas (células-alvo) atravessam o campo magnético e são reunidas na Cell Collection Bag.

Enxaguamento do filtro pré-sistema e da Reapplication Bag

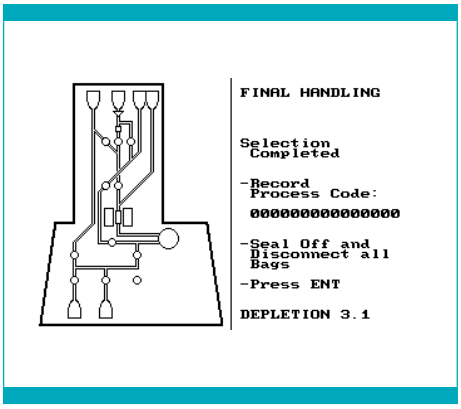
Depois de a amostra de células ter concluído tanto o empobrecimento em massa como o empobrecimento sensível, o filtro pré-sistema e a Reapplication Bag são enxaguados duas vezes com solução tampão para reduzir a perda de células no sistema.

Remoção de células não-alvo

O íman é deslocado para a posição "OFF". As células marcadas magneticamente (células não-alvo) são libertadas da coluna de separação e reunidas na Non-Target Cell Bag depois de cada fase de carregamento.

Desprender as bolsas e registar o código do processo

Uma vez concluída a corrida, a janela indica Ecrã 7.88.



Ecrã 7.88: Desprender as bolsas e registar o código do processo

1. Registar o código do processo.
2. Fixar ou selar o tubo acima do Luer Lock que liga a Cell Collection Bag ao conjunto de tubos (ver Figura 7.26).

   Fazer três selagens herméticas no tubo mesmo abaixo da válvula n.º 9. Separar a selagem central com cuidado para desprender a Cell Collection Bag do conjunto de tubos.
3. Pesar a Cell Collection Bag cheia. Registar o peso.

   Determinar o peso da fração de células-alvo subtraindo o peso da Cell Collection Bag vazia do peso da Cell Collection Bag contendo as células-alvo. Registar o peso.
4. Misturar bem a suspensão de células-alvo rodando a bolsa. Retirar uma quantidade adequada, p. ex., 0,5 mL e manter para análise.
5. Com o selador térmico, selar o tubo acima do Luer Lock da Buffer Waste Bag. Fazer três selagens herméticas no tubo. Separar a selagem central para desprender a Buffer Waste Bag.
6. Desprender a Non-Target Cell Bag da mesma forma.
7. Remover a Non-Target Cell Bag e a Buffer Waste Bag. Manter todas as bolsas até à conclusão da análise final de todas as células.

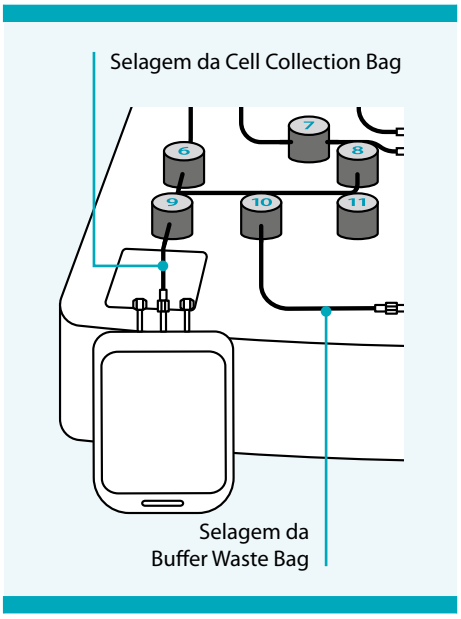


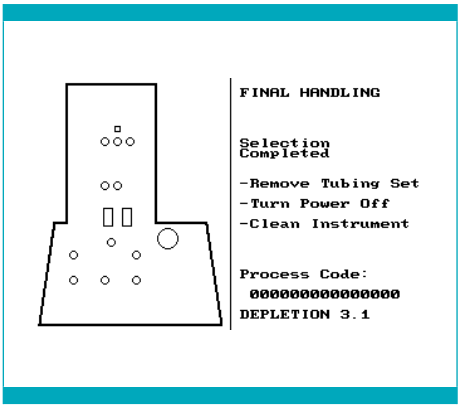
Figura 7.26: Desprender bolsas

As células-alvo podem agora ser processadas de acordo com os protocolos clínicos.

Para continuar, pressionar **ENT**.

Descarregar o conjunto de tubos e encerrar

A janela indica Ecrã 7.89.



Ecrã 7.89: Descarregar o conjunto de tubos e encerrar

1. Remover o conjunto de tubos: A começar pelas válvulas n.º 6, 9, e 10 e trabalhando no sentido ascendente, libertar o tubo do sensor de líquido e das válvulas pressionando-as. Soltar a coluna do suporte da coluna. Eliminar o conjunto de tubos como risco biológico de acordo com os procedimentos hospitalares padrão.
2 Desligar o CliniMACS Plus Instrument.
3. Limpar o aparelho de acordo com as instruções de limpeza, ver secção "Limpeza e desinfeção" no manual do utilizador CliniMACS Plus Instrument. Observar os procedimentos padrão para o tratamento de material infecioso.

Análise das células

IMPORTANTE

- O CliniMACS PBS/EDTA Buffer não tem de ser removido antes da administração das células-alvo separadas se o volume não exceder os 100 mL por transplante com débitos de perfusão adequados. O estado renal do paciente e os efeitos nos eletrólitos sanguíneos têm de ser considerados. Especialmente em crianças, os débitos de perfusão têm de ser ajustados em conformidade.
- Se o volume da fração de células-alvo exceder os 100 mL, tem de ser reduzido por meios adequados, p. ex., através de centrifugação ou troca de solução tampão, para uma solução de perfusão aprovada no país do utilizador.

⚠ CUIDADO

Risco de qualidade reduzida das células-alvo. As células-alvo devem ser analisadas e verificadas quanto aos requisitos do utilizador, caso contrário, a adequação para a aplicação clínica pode ficar comprometida. Examinar as células-alvo em termos de qualidade e quantidade de acordo com a sua utilização prevista.

Isto tem de incluir os seguintes parâmetros:

- Número total de leucócitos
- Viabilidade e número total de células-alvo
- Eficiência do empobrecimento

Também se recomenda determinar o número total de leucócitos e a viabilidade da fração celular não-alvo. A lista é um exemplo e devem ser incluídos outros testes com base na utilização prevista e nos protocolos clínicos. Registar os dados da análise.

8 Resolução de problemas

Este capítulo destina-se a servir de referência para fornecer informações sobre eventuais eventos inesperados que possam ocorrer e sugerir a ação corretiva adequada. Para informações não abrangidas no capítulo seguinte, contactar a Miltenyi Biotec Technical Support quanto antes.

Nota: A ordem deste capítulo obedece à sequência efetiva da separação.

8.1 Miltenyi Biotec Technical Support

Em caso de anomalia do aparelho ou falha do processo, que o operador não consiga corrigir (mensagens de erro), contactar a equipa do Miltenyi Biotec Technical Support:

+49 2204 8306-3803
technicalsupport@miltenyi.com

Visitar www.miltenyibiotec.com para informações de contacto locais do Miltenyi Biotec Technical Support.

8.2 Preparação do produto de leucaférese

A amostra recebida está diluída

Idealmente, a marcação magnética é feita em produto de leucaférese diluído. Ajustar o produto de leucaférese a uma diluição final de cerca de 1:3. Se a amostra recebida estiver mais diluída que 1:3, ou se o operador não souber a concentração exata de plasma na amostra, adicionar imunoglobulina à amostra antes da adição do reagente (concentração recomendada de imunoglobulina no volume da marcação: 1,5 mg/mL). É importante ter uma determinada quantidade de imunoglobulina na amostra durante a marcação para minimizar a ligação não-específica do reagente.

O número de células-alvo é baixo no produto de leucaférese

A mobilização de células estaminais foi insuficiente. Verificar a análise do produto de leucaférese.

■ Pouca viabilidade das células no produto de leucaférese

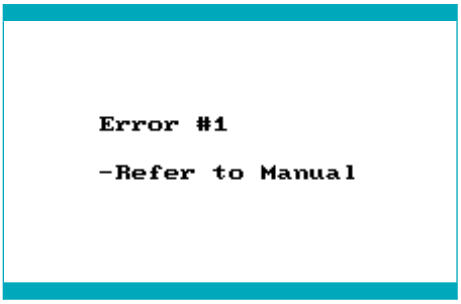
O produto de leucaférese pode ter sido colhido, armazenado ou transportado inadequadamente. Para assegurar uma melhor qualidade da amostra, a preparação e a separação do produto de leucaférese devem ser feitas imediatamente a seguir à leucaférese. Manter o produto de leucaférese com uma concentração de leucócitos inferior a $0{,}2\times10^9$ por mL. Se necessário, diluir o produto de leucaférese com plasma autólogo. O produto de leucaférese não deve ter mais de 24 horas ao iniciar o processo de marcação e separação. Se o produto de leucaférese tiver de ser armazenado, p. ex., durante a noite, deve ser mantido a uma temperatura ambiente controlada (+19 a +25 °C [+66 a +77 °F]).

8.3 CliniMACS Plus Instrument e conjuntos de tubos CliniMACS

8.3.1 Mensagens de erro

O aparelho ou o software podem ter uma série de falhas. Estas surgem assinaladas como tal e são indicadas no ecrã. Dizem respeito a erros internos que não podem ser corrigidos pelo operador. Registar o número de erro e contactar o Miltenyi Biotec Technical Support.

Uma mensagem de erro possível é apresentada no Ecrã 8.1.



Ecrã 8.1: Mensagem de erro n.º 1

Além das mensagens de erro, as falhas de funcionamento que podem ser corrigidas pelo operador estão marcadas como "Mensagens de advertência" (ver secção 8.4.1).

8.3.2 Carregamento e escorva do conjunto de tubos

■ A válvula não se abre quando o operador é instruído a inserir o tubo numa determinada válvula

As válvulas foram concebidas para funcionar devidamente uma vez inserido o tubo. Pressionar manualmente a válvula para a abrir. Observar atentamente a válvula durante a sequência de teste das válvulas. Se a válvula não se comprimir durante a sequência de teste das válvulas, ver secção "A válvula não se comprime durante a sequência de teste das válvulas".

■ A válvula não se comprime durante a sequência de teste das válvulas

Confirmar se o tubo está bem inserido. Verificar se as válvulas foram bem limpas. As válvulas contaminadas com fluido têm de ser substituídas. Contactar o Miltenyi Biotec Technical Support.

- Existem fugas de solução tampão do conjunto de tubos durante a escorva

  O conjunto de tubos tem defeito. Desligar o CliniMACS Plus Instrument e reiniciar a escorva com um novo conjunto de tubos instalado e uma quantidade suficiente de solução tampão nova.

- Excesso de ar no conjunto de tubos depois da escorva

  A bolsa de solução tampão não está devidamente perfurada. Utilizar um novo conjunto de tubos e uma quantidade suficiente de solução tampão nova e reiniciar a separação CliniMACS Plus. Confirmar se o septo da bolsa de solução tampão está devidamente perfurado.

- Volume inesperado de solução tampão nas bolsas depois da escorva. Depois da escorva, só deve haver líquido na Priming Waste Bag e na Buffer Waste Bag

  O conjunto de tubos não está corretamente montado. Podem existir fugas de líquido por detrás das válvulas se o conjunto de tubos não estiver corretamente instalado ou se as válvulas não estiverem a funcionar devidamente. Remover o conjunto de tubos e substituí-lo por outro novo. Reiniciar o processo de escorva com uma quantidade suficiente de solução tampão nova. A separação CliniMACS Plus pode ter um desempenho fraco se o conjunto de tubos não estiver bem inserido.

- O motor da bomba para durante a escorva

  O tubo da bomba não ficou corretamente inserido. Pressionar **STOP** para interromper a escorva, desligar e voltar a ligar com "OFF" e "ON", respetivamente. Fixar a linha de solução tampão com uma pinça de bloqueio durante o procedimento de instalação, corrigir a posição do tubo da bomba e remover a pinça de bloqueio antes de reiniciar a sequência de escorva.

8.4 Separação de células automatizada

8.4.1 Mensagens de advertência

Ao contrário das mensagens de erro (ver secção 8.3.1), as mensagens de advertência são indicadas no ecrã quando o sistema de controlo interno do CliniMACS Plus Instrument reconhece uma falha de funcionamento que possa ser corrigida pelo operador. Normalmente, uma mensagem de advertência surge em combinação com um som ("bip"). Se surgir uma mensagem de advertência durante a separação CliniMACS Plus, observar as instruções no ecrã para continuar com a separação de células. Regra geral, as mensagens de advertência surgem ao pressionar **STOP**, quando a porta da bomba é aberta, quando a bomba para ou quando o sensor de líquido deteta um erro.

Dado que podem ocorrer os mais diversos tipos de eventos inesperados durante os vários programas de separação, a secção seguinte está subdividida em conformidade.

8.4.2 Eventos inesperados: Todos os programas de separação

Erro detetado pelo sensor de líquido

A mensagem de advertência n.º 1 surge durante a fase inicial do processo de carregamento das células se o sensor de líquido não conseguir detetar líquido no tubo. Uma vez que o filtro pré-sistema é enxaguado com solução tampão antes do carregamento das células, tem de haver líquido no tubo nesta fase.

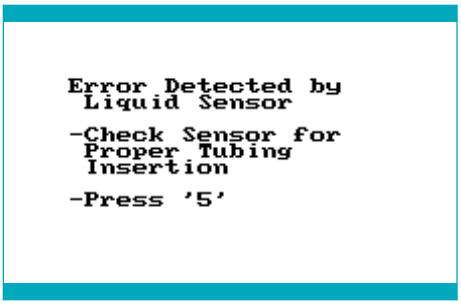


Figura 8.1: Mensagem de advertência n.º 1

Verificar os seguintes pontos:

1. O tubo ficou corretamente inserido? No sensor de líquido? Se não tiver ficado, inseri-lo devidamente.
2. O tubo está cheio de solução tampão? Se não estiver, ver o ponto 3.
3. Se o tubo não estiver cheio de solução tampão, inspecionar o tubo quanto a vincos que bloqueiem a subida da solução tampão para o filtro pré-sistema e para a Cell Preparation Bag. Ajustar a posição do conjunto de tubos. Se necessário, elevar ou baixar os suportes das bolsas com as respetivas pinças. Ajustar a posição dos tubos nas válvulas. Para alterar a posição do tubo, abrir a válvula pressionando manualmente o botão. Verificar se o tubo não está vincado, torcido ou esticado.
4. A Cell Preparation Bag está devidamente perfurada? Confirmar se o espigão do filtro pré-sistema entrou no septo do orifício da Cell Preparation Bag.
5. Se o conjunto de tubos não tiver sido completamente enchido com solução tampão: O espigão da solução tampão do conjunto de tubos penetrou a bolsa de solução tampão? Para corrigir, ver "Excesso de ar no conjunto de tubos depois da escorva" na secção 8.3.2.

Depois da ação corretiva, continuar com a separação em curso e pressionar **5**. Se a mensagem de advertência n.º 1 voltar a surgir depois de todas as possíveis causas acima indicadas terem sido excluídas, o sensor de líquido pode ter defeito. Contactar o Miltenyi Biotec Technical Support.

As células deslocam-se para a parte errada do conjunto de tubos. Fuga de líquido pela(s) válvula(s)

- O conjunto de tubos não ficou bem inserido. Se a corrida estiver em curso no aparelho, pressionar **STOP** e fixar a linha com uma pinça de bloqueio. Ajustar o tubo começando por comprimir a válvula em questão. Remover a pinça de bloqueio e pressionar **RUN** para retomar a separação. A separação de células é cancelada se **RUN** não for pressionado num prazo de 600 segundos.

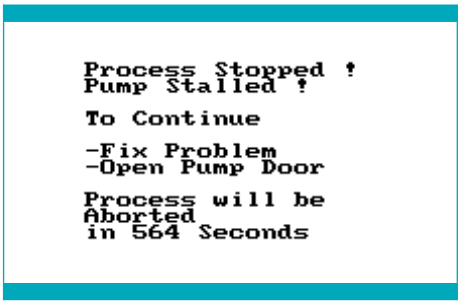
- A válvula não está a funcionar bem. Pressionar **STOP**. Fixar a linha com uma pinça de bloqueio. Comprimir a válvula manualmente várias vezes para a desencravar. Remover a pinça de bloqueio e pressionar **RUN** para continuar. A separação de células é cancelada se **RUN** não for pressionado num prazo de 600 segundos. Se o utilizador não conseguir desencravar a válvula, contactar o Miltenyi Biotec Technical Support.
- Foi utilizado o programa de software errado. Ver no visor o nome do programa que está a ser utilizado. Cancelar a corrida pressionando **STOP** e contactar imediatamente o Miltenyi Biotec Technical Support.

O íman não se mexe

O acionamento do íman não funciona. Ocorreu uma falha no acionamento do íman. Surgirá uma mensagem de erro (ver secção 8.3.1). Registar o número da mensagem de erro e contactar o Miltenyi Biotec Technical Support.

O motor da bomba para durante a separação de células

O tubo da bomba não ficou corretamente inserido, por isso a bomba pode não conseguir rodar. Neste caso, surgirá a mensagem de advertência n.º 2 na janela do ecrã. O operador tem então 600 segundos para corrigir a posição do tubo da bomba.



Ecrã 8.2: Mensagem de advertência n.º 2

1. Remover cuidadosamente o tubo da bomba.
2. Confirmar se o tubo da bomba não ficou danificado pela inserção incorreta. Se houver fugas do tubo da bomba, fixar o tubo acima e abaixo da coluna de separação para guardar as células retidas na coluna e contactar o Miltenyi Biotec Technical Support.
3. Se o tubo da bomba não tiver ficado danificado, pode ser reinserido no invólucro da bomba.
4. Pressionar **RUN** para reiniciar a separação num prazo de 600 segundos ou a separação será cancelada.

Se o tubo da bomba estiver plano e tiver colapsado, isso indicia que existe uma coluna obstruída. Nesse caso, contactar o Miltenyi Biotec Technical Support.

O carregamento de amostra não para apesar de a Cell Preparation Bag e o filtro pré-sistema estarem vazios

O sensor de líquido não está a funcionar bem, p. ex., por a superfície do tubo no sensor de líquido estar molhada. Pressionar **STOP** para interromper a separação. Remover o tubo do sensor de líquido. Secar o tubo e a área de contacto com um toalhete de papel ou material absorvente. Substituir o tubo no sensor de líquido e pressionar **RUN**. Não interromper a sequência durante mais de 600 segundos, caso contrário, a separação de células será terminada.

Se não for possível ativar o sensor de líquido desta forma, pressionar **STOP**, depois **2** , e confirmar com **ENT** para ignorar o carregamento de amostra e prosseguir com a separação.

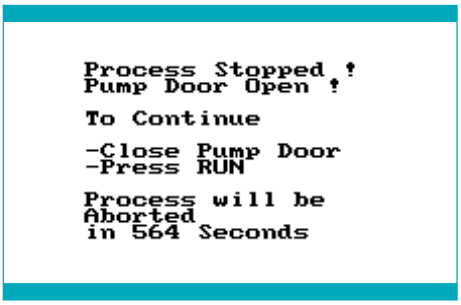
8.4.3 Eventos inesperados: Apenas programas de enriquecimento

■ A corrida é cancelada antes da conclusão do programa de separação de células

- Porta da bomba aberta: Por motivos de segurança, a separação em curso para automaticamente durante o funcionamento do aparelho se a porta da bomba for aberta. Surgirá a mensagem n.º 5 na janela do ecrã.

  Fechar a porta da bomba e pressionar **RUN**.

  Se, como neste caso, **RUN** não for pressionado num prazo de 600 segundos, a separação será cancelada e a separação de células não ficará concluída. Recuperar a quantidade máxima da amostra do conjunto de tubos executando o PROGRAMA DE EMERGÊNCIA.



Ecrã 8.3: Mensagem de advertência n.º 5

- Falha de energia elétrica: A falha de energia elétrica faz parar a separação CliniMACS Plus. A separação de células não ficará concluída depois de restabelecida a energia elétrica. Recuperar a quantidade máxima da amostra do conjunto de tubos executando o PROGRAMA DE EMERGÊNCIA.

8.4.4 Eventos inesperados: CD34 SELECTION 1/2

■ O carregamento parou antes de toda a amostra ter sido carregada nas colunas

O filtro pré-sistema está obstruído devido a grande quantidade de resíduos celulares ou enchimento incompleto do filtro. Devido ao bombeamento contínuo, criou-se um vácuo que levou à formação de bolhas de ar que ativam o sensor de líquido. Por isso, o processo de separação foi continuado com as lavagens da coluna antes de se poder carregar toda a amostra. Não é possível reiniciar o carregamento de amostra uma vez parada a sequência de carregamento.

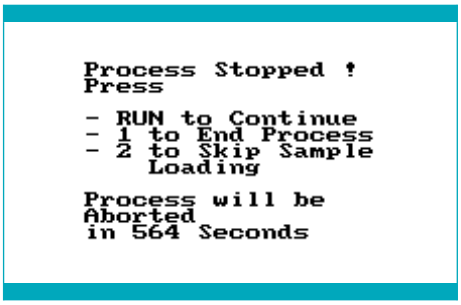
Deixar o CliniMACS Plus Instrument concluir o programa de separação. Não cancelar a corrida em curso, isso pode resultar em perda desnecessária de células. Uma vez concluído o procedimento de separação, filtrar o que resta da amostra com um filtro de sangue de 200 µm em linha e transferir para uma nova bolsa de transferência. Proceder de imediato a uma segunda separação com um novo conjunto de tubos e uma quantidade suficiente de solução tampão nova.

O tubo da bomba colapsou, e/ou surgiu excesso de ar no conjunto de tubos abaixo da pré-coluna durante o carregamento das células

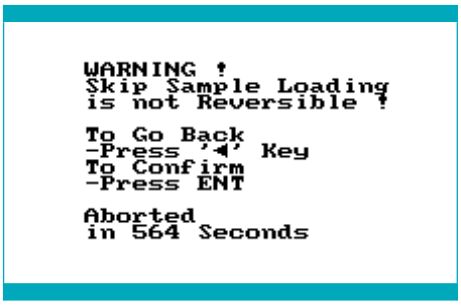
A pré-coluna está obstruída devido a grande quantidade de resíduos celulares na Cell Preparation Bag. É necessário ignorar manualmente o carregamento do que resta da amostra e continuar a separação com as células já carregadas no sistema.

1. Pressionar **STOP** para interromper o carregamento de células. Surge a mensagem de advertência n.º 3.
2. Pressionar **2** para ignorar o processo de carregamento das células.

   Surge a mensagem de advertência n.º 4, dando oportunidade ao operador para confirmar ou alterar a decisão, dado que ignorar o carregamento de amostra não é reversível.
3. Pressionar **ENT** e o programa de separação para o carregamento de amostra e continua com as lavagens da coluna.



Ecrã 8.4: Mensagem de advertência n.º 3



Ecrã 8.5: Mensagem de advertência n.º 4

Fixar o tubo abaixo do filtro pré-sistema para prevenir fugas de células da Cell Preparation Bag para o conjunto de tubos. Uma vez concluído o procedimento de separação, filtrar o que resta da amostra com um filtro de sangue de 200 µm em linha e transferir para uma nova bolsa de transferência.

Proceder de imediato a uma segunda separação com um novo conjunto de tubos e uma quantidade suficiente de solução tampão nova.

8.4.5 Eventos inesperados: ENRICHMENT 1.1

- O carregamento parou antes de toda a amostra ter sido carregada nas colunas

  O filtro pré-sistema está obstruído devido a grande quantidade de resíduos celulares ou enchimento incompleto do filtro. Devido ao bombeamento contínuo, criou-se um vácuo que levou à formação de bolhas de ar. Estas ativaram o sensor de líquido e o processo de separação continuou diretamente com a fase final do carregamento de amostra. Uma parte da amostra poderá ficar na Cell Preparation Bag uma vez concluída a separação.

  Deixar o CliniMACS Plus Instrument concluir o programa de separação. Não cancelar a corrida em curso, isso pode resultar em perda desnecessária de células.

  Determinar o número total de células, a percentagem de células-alvo, o volume da amostra carregada do que resta da amostra na Cell Preparation Bag e introduzir os parâmetros efetivos da amostra durante a configuração do aparelho (PASSO 2). Uma vez concluído o procedimento de separação, filtrar o que resta da amostra com um filtro de sangue de 200 µm em linha e transferir para uma nova bolsa de transferência. Proceder de imediato a uma segunda separação com um novo conjunto de tubos e uma quantidade suficiente de solução tampão nova.

- Foram introduzidos valores incorretos de parâmetros da amostra

  O volume da amostra carregada introduzido foi inferior ao volume efetivo na Cell Preparation Bag fixada. Uma vez parado, não é possível reiniciar o carregamento de amostra.

  Deixar o CliniMACS Plus Instrument concluir o programa de separação. Não cancelar a corrida em curso, isso pode resultar em perda desnecessária de células.

  Determinar o número total de células, a percentagem de células-alvo, o volume da amostra carregada do que resta da amostra na Cell Preparation Bag e introduzir os parâmetros efetivos da amostra durante a configuração do aparelho (PASSO 2). Processar o que resta da amostra com um novo conjunto de tubos, um novo filtro pré-sistema e uma quantidade suficiente de solução tampão nova.

- O motor da bomba para durante a eluição das células-alvo para dentro da Cell Collection Bag

  A pinça de bloqueio junto à Cell Collection Bag não está aberta durante a sequência de eluição. Por isso, a via para a Cell Collection Bag está bloqueada.

  Pressionar **STOP** e abrir a pinça de bloqueio junto à Cell Collection Bag. Abrir a porta da bomba e verificar se o tubo da bomba está corretamente inserido. Fechar a porta da bomba e pressionar **RUN** para reiniciar a sequência de eluição num prazo de 600 segundos.

8.4.6 Eventos inesperados: ENRICHMENT 3.2

- O carregamento parou antes de toda a amostra ter sido carregada nas colunas

  O filtro pré-sistema está obstruído devido a grande quantidade de resíduos celulares ou enchimento incompleto do filtro. Devido ao bombeamento contínuo, criou-se um vácuo que levou à formação de bolhas de ar. Estas ativaram o sensor de líquido e o processo de separação continuou com as lavagens da coluna antes de toda a amostra ter sido carregada. Não é possível reiniciar o carregamento de amostra uma vez parada a sequência de carregamento.

  Deixar o CliniMACS Plus Instrument concluir o programa de separação. Não cancelar a corrida em curso, isso pode resultar em perda desnecessária de células.

  Uma vez concluído o procedimento de separação, filtrar o que resta da amostra com um filtro de sangue de 200 µm em linha e transferir para uma nova bolsa de transferência. Proceder de imediato a uma segunda separação com um novo conjunto de tubos e uma quantidade suficiente de solução tampão nova.

- O motor da bomba para durante a eluição das células-alvo para dentro da Cell Collection Bag

  A pinça de bloqueio junto à Cell Collection Bag não está aberta durante a sequência de eluição. Por isso, a via para a Cell Collection Bag está bloqueada.

  Pressionar **STOP** e abrir a pinça de bloqueio junto à Cell Collection Bag. Abrir a porta da bomba e verificar se o tubo da bomba está bem inserido. Fechar a porta da bomba e pressionar **RUN** para reiniciar a sequência de eluição num prazo de 600 segundos.

8.4.7 Programa de emergência (a utilizar apenas com programas de enriquecimento)

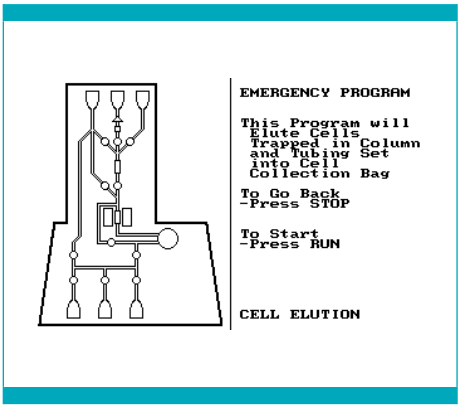
Se, por algum motivo, uma corrida tiver terminado irreversivelmente antes de as células-alvo terem sido eluídas da coluna de separação, o programa de emergência pode ser corrido para eluir as células da coluna de separação. Este programa foi concebido apenas para a utilização com todos os programas de enriquecimento juntamente com um CliniMACS Tubing Set (REF 161-01) ou um CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01).

O programa de emergência não pode ser utilizado com programas de empobrecimento.

Nota: O programa de emergência eluirá cerca de 75 mL de fluido. Confirmar se está fixada uma Cell Collection Bag adequada no conjunto de tubos.

1. Para confirmar que a coluna de separação não está magnetizada, desligar o aparelho, esperar 5 segundos e voltar a ligá-lo. O íman será retirado da unidade de separação magnética (ver secção "Descrição" no manual do utilizador CliniMACS Plus Instrument). Isto deve ser verificado mantendo um pequeno objeto magnetizável contra a unidade de separação magnética. Se o íman não tiver sido retirado, ou em caso de falha de energia elétrica, contactar o Miltenyi Biotec Technical Support.
2. Esperar que surja o ecrã principal na janela (ver secção "Instalação" no manual do utilizador CliniMACS Plus Instrument).

   Para aceder ao programa de emergência, pressionar **4**. A janela indica Ecrã 8.6.



Ecrã 8.6: Programa de emergência

3. Para continuar com a eluição das células presas, pressionar **RUN**.

   Nota: Para sair do programa de emergência sem iniciar a eluição das células presas, pressionar **STOP**.
4. Transferir as células eluídas reunidas na Cell Collection Bag para uma nova bolsa de transferência de 600 mL. Se necessário, agrupar as células restantes na Cell Preparation Bag com as células eluídas pelo programa de emergência. Iniciar um novo procedimento de separação com um novo conjunto de tubos e uma quantidade suficiente de solução tampão nova.

8.4.8 Eventos inesperados: DEPLETION 2.1

- As células-alvo não chegam à Cell Collection Bag

  A bomba não consegue carregar o produto da Cell Preparation Bag porque a pinça junto à Cell Collection Bag não está aberta durante a sequência de carregamento de células. Pressionar **STOP** e abrir a pinça junto à Cell Collection Bag. Continuar com o processo de empobrecimento pressionando **RUN**.

  Deixar o CliniMACS Plus Instrument concluir o programa de separação. Não cancelar a corrida em curso, isso pode resultar em perda desnecessária de células. Se uma parte do produto continuar na Cell Preparation Bag uma vez concluído o procedimento de empobrecimento, processar as células restantes com um novo conjunto de tubos, um novo filtro pré-sistema e uma quantidade suficiente de solução tampão nova.

  Determinar o número total de células, a percentagem de células marcadas, o volume da amostra carregada, introduzir os parâmetros efetivos da amostra durante a configuração do aparelho (PASSO 2) e iniciar o novo empobrecimento.

- O carregamento parou antes de toda a amostra ter sido carregada nas colunas

  Bolhas de ar da amostra e/ou do filtro pré-sistema ativaram o sensor de líquido antes do carregamento de toda a amostra. Cancelar a corrida em curso e verificar o número total de células e a eficiência do empobrecimento das células na Cell Collection Bag. Se necessário, processar o que resta da amostra com um novo conjunto de tubos, um novo filtro pré-sistema e uma quantidade suficiente de solução tampão nova.

  Determinar o número total de células, a percentagem de células marcadas, o volume da amostra carregada, introduzir os parâmetros efetivos da amostra durante a configuração do aparelho (PASSO 2) e iniciar o novo empobrecimento.

8.4.9 Eventos inesperados: DEPLETION 3.1

O carregamento parou durante o Staged Cell Loading antes de toda a amostra ter sido carregada nas colunas

- Filtro pré-sistema inserido ao contrário. Por isso, a função de câmara de gotejamento não está disponível e as bolhas de ar podem passar diretamente no sensor de líquido, fazendo terminar o carregamento de amostra antes da aplicação de toda a amostra. O aparelho continua com o processo de empobrecimento iniciando logo o passo seguinte. Uma vez parado, não é possível reiniciar o carregamento de amostra.
- O filtro pré-sistema está obstruído devido a grande quantidade de resíduos celulares ou enchimento incompleto do filtro. Devido ao bombeamento contínuo, criou-se um vácuo que levou à formação de bolhas de ar. Estas ativaram o sensor de líquido e o processo de separação continuou diretamente com a fase final do carregamento de amostra. Uma parte da amostra pode ficar na Cell Preparation Bag uma vez concluída a separação.

Cancelar a corrida em curso e reunir o conteúdo da Reapplication Bag e da Cell Preparation Bag. Processar as células restantes com um novo conjunto de tubos, um novo filtro pré-sistema e uma quantidade suficiente de solução tampão nova.

O carregamento parou durante o Sensitive Sample Loading (Sensitive Loading Stage)

A Reapplication Bag está suspensa a um nível inferior ao da Cell Preparation Bag. Durante o passo de carregamento sensível, a Cell Preparation Bag fica vazia antes de o volume da Reapplication Bag ser completamente carregado. Por isso, é possível que uma bolha de ar ative o sensor de líquido antes do carregamento completo da amostra da Reapplication Bag depois de concluído o procedimento de empobrecimento. Uma vez parado, não é possível reiniciar o carregamento de amostra .

Deixar o CliniMACS Plus Instrument concluir o programa de separação. Não cancelar a corrida em curso, isso pode resultar em perda desnecessária de células. Processar o que resta da amostra com um novo conjunto de tubos, um filtro pré-sistema e uma quantidade suficiente de solução tampão nova.

Determinar o número total de células, a percentagem de células marcadas, o volume da amostra carregada e introduzir os parâmetros efetivos da amostra durante a configuração do aparelho (PASSO 2). Considerar a necessidade absoluta de três suportes das bolsas grandes para o programa DEPLETION 3.1 e consultar as instruções de utilização relativas às alturas adequadas das bolsa (ver secção 7.3.3).

As células-alvo (células não marcadas) não chegam à Reapplication Bag durante o Staged Cell Loading Bulk (Loading Stage)

Tubo errado inserido na válvula n.º 3 (ramal direito do tubo da Reapplication Bag em vez de ramal esquerdo (união em Y) do tubo). Pressionar **STOP** e remover o tubo errado da válvula n.º 3. Inserir manualmente o tubo correto (ramal esquerdo do tubo da Reapplication Bag) na válvula n.º 3 tal como descrito nas instruções de utilização. Pressionar **RUN** para continuar com o procedimento de empobrecimento num prazo de 600 segundos.

Deixar o CliniMACS Plus Instrument concluir o programa de separação. Não cancelar a corrida em curso, isso pode resultar em perda desnecessária de células. Verificar a eficiência do empobrecimento da fração-alvo na Cell Collection Bag. Se a eficiência do empobrecimento não for suficiente, repetir o procedimento de empobrecimento com um novo conjunto de tubos, um novo filtro pré-sistema e uma quantidade suficiente de solução tampão nova.

Determinar o número total de células, a percentagem de células marcadas e o volume da amostra carregada e introduzir os valores efetivos dos parâmetros da amostra durante a configuração do aparelho (PASSO 2) e iniciar o novo empobrecimento.

Entram células na bolsa de solução tampão durante os passos de enxaguamento gravimétrico

A bolsa de solução tampão está suspensa a um nível demasiado baixo (inferior ao da Cell Preparation Bag). Pressionar **STOP** e ajustar o suporte da bolsa de solução tampão para a posição correta. Confirmar se estão instalados três suportes das bolsas grandes para o programa DEPLETION 3.1 e consultar as instruções de utilização relativas às alturas adequadas das bolsas (ver secção 7.3.3).

- Se as células não tiverem chegado à bolsa de solução tampão, basta abrir manualmente as válvulas n.º 1 e 2 para permitir um breve refluxo das células para dentro da Cell Preparation Bag. Depois de o tubo da bolsa de solução tampão estar novamente desimpedido, fechar as válvulas n.º 1 e 2 e pressionar **RUN** para continuar com o procedimento de empobrecimento num prazo de 600 segundos.
- Se as células já tiverem chegado à bolsa de solução tampão, substituí-la e abrir manualmente as válvulas n.º 1 e 2, para um breve enxaguamento do tubo da bolsa de solução tampão, e pressionar **RUN** para continuar com o procedimento de empobrecimento num prazo de 600 segundos. Processar o que resta da amostra na bolsa de solução tampão, se necessário (se o volume exceder os 300 mL, transferir primeiro a amostra para uma bolsa que possa ser centrifugada para redução do volume) com um novo conjunto de tubos, um novo filtro pré-sistema e uma quantidade suficiente de solução tampão nova.

- O motor da bomba para durante a primeira eluição das células marcadas para dentro da Non-Target Cell Bag

  - A pinça de bloqueio não foi removida depois do teste de integridade. Pressionar **STOP** e remover a pinça de bloqueio. Abrir a porta da bomba e verificar se o tubo da bomba está corretamente inserido. Fechar a porta da bomba e pressionar **RUN** para reiniciar a sequência de eluição num prazo de 600 segundos.
  - Tubo errado inserido na válvula n.º 3 (tubo da Non-Target Cell Bag em vez do ramal esquerdo (união em Y) do tubo da Reapplication Bag). Pressionar **STOP** e remover o tubo da Non-Target Cell Bag da válvula n.º 3. Inserir manualmente o tubo correto (ramal esquerdo do tubo Reapplication Bag) na válvula n.º 3 tal como descrito nas instruções de utilização. Pressionar **RUN** para reiniciar a sequência de eluição num prazo de 600 segundos.

8.5 Desempenho da separação de células

8.5.1 Eventos inesperados: Apenas programas de enriquecimento

■ O rendimento das células-alvo é baixo

- As células-alvo foram pouco marcadas com o reagente:
  - O reagente expirou. Verificar a data de validade. Não utilizar os reagentes após a data de validade.
  - O reagente não foi devidamente armazenado. Verificar a temperatura de armazenamento Não utilizar um reagente que tenha sido indevidamente armazenado (ver instruções de utilização do reagente).
  - O procedimento de marcação recomendado não foi observado. Consultar as secções sobre a preparação da amostra e o procedimento de separação no manual do utilizador.
- Perderam-se células durante os passos de preparação.
  - Foram removidas células com o sobrenadante para a Plasma Waste Bag e as Wash Waste Bags devido a sedimentação incompleta ou ressuspensão prematura das células, p. ex., ao remover a bolsa da centrífuga. Comparar o conteúdo de leucócitos do produto celular não marcado e do produto celular marcado. Verificar as definições de centrifugação para uma centrifugação adequada. Determinar as contagens de células de todas as bolsas de lixo.
  - Solução tampão sem HSA. Suplementar a solução tampão com HSA para uma concentração final de 0,5% (p/v), (ver secção "Materiais CliniMACS necessários" da respetiva aplicação).
  - As definições da centrífuga não eram as ideais. Verificar as definições da centrífuga.
  - Desequilíbrio da centrífuga ou utilização do travão ou carregamento assimétrico da centrífuga.
- Análise incorreta.
  - Erro de amostragem. Verificar a suspensão das células quanto a grumos ou sedimentação. Confirmar se foram colhidas amostras representativas e repetir a análise.
  - Erro de coloração. Verificar os reagentes de citometria de fluxo. Repetir a coloração.
  - Definições erradas da citometria de fluxo. Verificar as definições do aparelho.

■ Baixa pureza das células-alvo.

- O produto celular foi armazenado inadequadamente. A preparação e a separação do produto celular devem ser feitas imediatamente a seguir à leucaférese. Manter o produto celular com uma concentração de leucócitos inferior a $0{,}2\times10^9$ por mL. Se necessário, diluir o produto celular com plasma autólogo. O produto celular não deve ter mais de 24 horas ao iniciar o processo de marcação e separação. Se o produto celular tiver de ser armazenado, p. ex., durante a noite, deve ser mantido a uma temperatura ambiente controlada (+19 °C a +25 °C [+66 °F a +77 °F]).
- O protocolo de marcação magnética não foi observado (p. ex., volumes incorretos durante a marcação magnética). Observar as instruções para a marcação magnética (ver PASSO 1 na secção da respetiva aplicação). Para efeitos de resolução de problemas, determinar os subconjuntos de leucócitos (células B, células T, monócitos, granulócitos, bem como plaquetas) que contaminam a fração de células-alvo e contactar o Miltenyi Biotec Technical Support para aconselhamento.
- Um número elevado de granulócitos contaminou o produto inicial (definição subótima da aférese). Granulócitos apoptóticos irão ligar-se não-especificamente ao reagente CliniMACS, o que pode levar a uma menor pureza das células-alvo.
- Falha de funcionamento da válvula. A fração de células-alvo eluída foi contaminada por parte da fração não-alvo ou da fração de resíduos de solução tampão. Inspecionar a colocação do tubo dentro das válvulas para assegurar um bom funcionamento. Avaliar o conteúdo das células-alvo da fração celular não-alvo e os resíduos de solução tampão. Se necessário, agrupar a fração de células-alvo e não-alvo, reduzir para um volume adequado e repetir a separação com um novo conjunto de tubos e uma quantidade suficiente de solução tampão nova.

■ Retenção não-específica de células mortas do produto celular ou elevadas perdas de células não-específicas ao longo do procedimento

- Solução tampão sem HSA. Suplementar a solução tampão com HSA para uma concentração final de 0,5% (p/v), (ver secção "Materiais CliniMACS necessários" da respetiva aplicação).
- O produto celular pode ter sido armazenado inadequadamente. A preparação e a separação do produto celular devem ser feitas imediatamente a seguir à leucaférese. Manter o produto celular com uma concentração de leucócitos inferior a $0{,}2\times10^9$ por mL. Se necessário, diluir a leucaférese com plasma autólogo. O produto celular não deve ter mais de 24 horas ao iniciar o processo de marcação e separação. Se o produto celular tiver de ser armazenado, p. ex., durante a noite, deve ser mantido a uma temperatura ambiente controlada (+19 °C a +25 °C [+66 °F a +77 °F]).
- Carregamento de amostra incompleto devido a obstrução da coluna de separação, do filtro pré-sistema ou da pré-coluna. Verificar o número total de células e a eficiência do empobrecimento das células restantes.

8.5.2 Eventos inesperados: CD34 SELECTION 1/2 e ENRICHMENT 1.1

■ Baixa pureza das células-alvo

Eluição incompleta da coluna de separação.

- Programa de separação cancelado. Verificar no ecrã a mensagem de erro. Continuar com a secção "A corrida é cancelada antes da conclusão do programa de separação de células" (ver secção 8.4.3 na página 216).
- Falha da bomba ou da válvula. Recuperar as células do conjunto de tubos depois do programa de emergência descrito na secção 8.4.7. Verificar os volumes de todas as frações. Avaliar o conteúdo de células-alvo na Buffer Waste Bag e na Negative Fraction Bag.
- O tubo para a Cell Collection Bag está bloqueado. Verificar o conjunto de tubos quanto a pinças fechadas, oclusões ou vincos.
- A capacidade de reagente/e ou do conjunto de tubos foi excedida. Consultar o limite de capacidade da aplicação relevante.
- O tubo não ficou bem inserido. Verificar todas as válvula quanto a inserção correta dos tubos.

8.5.3 Eventos inesperados: CD34 SELECTION 1/2

■ Baixa pureza das células-alvo

Células não-alvo retidas.

- Baixa mobilização das células-alvo. Ocorreu um número muito baixo de células-alvo. Por isso, um número baixo de células não-alvo contaminantes (p. ex., granulócitos, monócitos, plaquetas) pode resultar em menor pureza.
- Presença de plasma ou imunoglobulinas insuficientes durante a marcação magnética. Observar as instruções para a marcação magnética (ver PASSO 1 da respetiva aplicação).

  Se não puder ser garantida uma concentração final de cerca de 30% de plasma autólogo na amostra durante a marcação magnética, adicionar imunoglobulina à amostra. Recomenda-se uma concentração final de 1,5 mg/mL para o bloqueio eficiente da ligação não-específica de reagente durante a marcação magnética.

8.5.4 Eventos inesperados: ENRICHMENT 1.1

■ Baixo rendimento das células-alvo

Introdução incorreta dos parâmetros da amostra. Comparar os parâmetros introduzidos com os resultados da análise.

8.5.5 Eventos inesperados: DEPLETION 2.1 e DEPLETION 3.1

■ Baixa eficiência do empobrecimento

Se a eficiência do empobrecimento for insuficiente, processar o que resta da amostra com um novo conjunto de tubos e uma quantidade suficiente de solução tampão nova. Deve ser considerada uma nova marcação das células a empobrecer. Determinar a contagem e a percentagem de células a empobrecer e introduzir os parâmetros efetivos da amostra durante a configuração do aparelho (PASSO 2). Se ocorrerem grumos visíveis, poderá ser útil filtrar as células antes de uma nova corrida. Considerar que se podem perder células devido a grumos e filtração adicional.

- A capacidade do reagente e/ou conjunto de tubos foi excedida. Consultar o limite de capacidade da aplicação relevante.
- Determinação incorreta de células a rotular pelo reagente.
- Introdução de parâmetros da amostra incorretos. Comparar os parâmetros introduzidos com os resultados da análise.
- Reduzida viabilidade das células. As células mortas podem ligar-se não-especificamente à coluna de separação, reduzindo, assim, a capacidade de marcação da coluna, o que pode resultar em menor eficiência do empobrecimento. Garantir uma melhor qualidade do produto celular e processar o produto tão fresco quanto possível. Não devem ser utilizados produtos armazenados com mais de 24 horas. Se o armazenamento for necessário, o produto celular tem de ser mantido à temperatura ambiente controlada (+19 °C a +25 °C [+66 °F a +77 °F]). A concentração de células não deve exceder $0{,}2\times10^9$/mL. Se necessário, diluir o produto celular com plasma autólogo para obter a concentração ideal de células.

9 Notas legais

9.5.1 Garantia limitada

Exceto conforme indicado numa declaração de garantia específica, que pode acompanhar o seu produto, ou salvo acordo escrito em contrário por um mandatário da Miltenyi Biotec, a garantia da Miltenyi Biotec para produtos adquiridos diretamente à Miltenyi Biotec estará sujeita aos termos e condições de venda ao abrigo dos quais lhe foram fornecidos pela respetiva organização de vendas da Miltenyi Biotec. Os termos e condições de venda aplicáveis podem variar em função do país e da região. Estes termos e condições estão disponíveis a pedido ou em www.miltenyibiotec.com. Nada aqui contido deve ser interpretado como constituindo uma garantia adicional.

Para produtos adquiridos a retalhistas ou revendedores terceiros (p. ex., adquiridos a um prestador de serviços local autorizado da Miltenyi Biotec), podem aplicar-se termos e condições diferentes.

Para determinar que garantia acompanha o produto, consultar a guia de remessa, a fatura, o recibo ou outra documentação de venda. Alguns componentes de uma combinação de produtos que tenha sido adquirida podem ter uma garantia mais curta do que a indicada na sua guia de remessa, fatura, recibo ou outra documentação de venda (p. ex., mercadoria sujeita a prazo de validade e obsolescência).

A garantia da Miltenyi Biotec para este produto cobre apenas problemas causados por defeitos de material ou de mão-de-obra durante a sua utilização normal. Não cobre problemas causados por qualquer outro motivo, incluindo, entre outros, problemas devido à utilização do produto de uma forma diferente da especificamente descrita neste manual, por exemplo: utilização inadequada ou imprópria; montagem ou instalação incorreta por um operador ou terceiros; desgaste razoável; operação, manuseamento, armazenamento, assistência ou manutenção negligente ou incorreta; incumprimento das instruções de funcionamento; modificação não-autorizada de ou a qualquer parte deste produto; ou utilização de consumíveis, acessórios ou materiais de trabalho inadequados.

A garantia da Miltenyi Biotec não cobre os produtos vendidos COMO ESTÃO ou COM TODAS AS FALHAS ou consumíveis. Nada aqui contido deve ser interpretado como constituindo uma garantia adicional.

A Miltenyi Biotec deve ser informada imediatamente se for feita uma reclamação ao abrigo dessa garantia. Se ocorrer um defeito de material ou de fabrico dentro do período de garantia, a Miltenyi Biotec tomará as medidas apropriadas para restaurar a plena usabilidade do aparelho.

Limitação de danos A Miltenyi Biotec não será responsável por danos incidentais ou consequenciais pela violação de qualquer garantia ou condição expressa ou implícita neste produto.

Alguns países/estados ou jurisdições não permitem a exclusão ou limitação de danos incidentais ou consequenciais, pelo que as limitações ou exclusões acima mencionadas podem não se aplicar a si. Esta declaração de garantia dá-lhe direitos legais específicos, podendo ter outros direitos que podem variar de estado para estado ou jurisdição para jurisdição.

9.5.2 Marcas comerciais

CliniMACS, MACS, MACSmix, o logótipo da Miltenyi Biotec e MiniMACS são marcas comerciais registadas da Miltenyi Biotec e/ou das suas filiais em vários países em todo o mundo. Todas as outras marcas comerciais mencionadas neste documento são propriedade dos respetivos proprietários e são utilizadas exclusivamente para fins de identificação.

Miltenyi Biotec

Alemanha/Áustria
Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG
Friedrich-Ebert-Straße 68
51429 Bergisch Gladbach
Alemanha
+49 2204 8306-0
+49 2204 85197
macsde@miltenyi.com

EUA/Canadá
Miltenyi Biotec Inc.
2303 Lindbergh Street
Auburn, CA 95602
EUA
800 FOR MACS
+1 866 811 4466
+1 877 591 1060
macsus@miltenyi.com

Austrália
Miltenyi Biotec
Australia Pty. Ltd.
Unit 11, 2 Eden Park Drive
Macquarie Park NSW 2113
Austrália
+61 2 8877 7400
+61 2 9889 5044
macsau@miltenyi.com

Benelux
Miltenyi Biotec B.V.
Dellaertweg 9C
2316 WZ Leiden
Países Baixos
macsnl@miltenyi.com
Apoio ao cliente Países Baixos
0800 4020120
0800 4020100
Apoio ao cliente Bélgica
0800 94016
0800 99626
Apoio ao 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
R.P. China
+86 21 6235 1005
+86 21 6235 0953
macscn@miltenyi.com.cn

Coreia do Sul
Miltenyi Biotec Korea Co., Ltd.
Donggeuk 7F
562 Nonhyeon-ro
Gangnam-gu
Seoul 06136
Coreia do Sul
+82 2 555 1988
+82 2 555 8890
macskr@miltenyi.com

Espanha
Miltenyi Biotec S.L.
C/Luis Buñuel 2
Ciudad de la Imagen
28223 Pozuelo de Alarcón (Madrid)
Espanha
+34 91 512 12 90
+34 91 512 12 91
macses@miltenyi.com

França
Miltenyi Biotec SAS
10 rue Mercoeur
75011 Paris
França
+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

Itália
Miltenyi Biotec S.r.l.
Via Paolo Nanni Costa, 30
40133 Bologna
Itália
+39 051 6 460 411
+39 051 6 460 499
macsit@miltenyi.com

Japão
Miltenyi Biotec K.K.
NEX-Eitai Building 5F
16-10 Fuyuki, Koto-ku,
Tokyo 135-0041
Japão
+81 3 5646 8910
+81 3 5646 8911
macsjp@miltenyi.com

Países nórdicos e bálticos
Miltenyi Biotec Norden AB
Medicon Village
Scheeletorget 1
223 81 Lund
Suécia
macsse@miltenyi.com
Apoio ao cliente Suécia
0200 111 800
+46 280 72 99
Apoio ao cliente Dinamarca
80 20 30 10
+46 46 280 72 99

Apoio ao cliente
Noruega, Finlândia, Islândia,
e 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

Singapura
Miltenyi Biotec Asia Pacific Pte Ltd
438B Alexandra Road, Block B
Alexandra Technopark
#06-01
Singapura 119968
+65 6238 8183
+65 6238 0302
macssg@miltenyi.com

Suíça
Miltenyi Biotec Swiss AG
Gibelinstrasse 27
4500 Solothurn
Suíça
+41 32 623 08 47
+49 2204 85197
macsch@miltenyi.com

www.miltenyibiotec.com

A Miltenyi Biotec oferece produtos e serviços em todo o mundo. Visite **www.miltenyibiotec.com/local** para encontrar o seu contacto mais próximo da Miltenyi Biotec.

CliniMACS, MACS, MACSmix, o logótipo Miltenyi Biotec e MiniMACS e o logótipo da Miltenyi Biotec são marcas comerciais registadas ou marcas comerciais da Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG e/ou das respetivas filiais em vários países do mundo. Copyright © 2023 Miltenyi Biotec e/ou respetivas filiais. Todos os direitos reservados.

210-003-250/01 | Emitido: 2023-10