






Owner	HIV/AIDS Network Coordination (HANC)
-------	--------------------------------------

Approved By	Network	Name, Title	Signature	Date
	ACTG	Robert W. Coombs, MD, PhD, FRCPC ACTG Network Laboratory Principal Investigator		7/7/2009
	HPTN	Estelle Piwowar-Manning, MT(ASCP)SI HPTN Network Laboratory Deputy Director		6/30/2009
	HVTN	Constance Ducar, MT-ASCP HVTN International Laboratory Program Manager		7/7/2009
	IMPAACT	Susan Fiscus, PhD IMPAACT Network Laboratory Principal Investigator		6/30/2009
	MTN	Charlene Dezzutti, PhD MTN Network Laboratory Principal Investigator		7/6/2009

**Índice**

<b>1</b>	<b>Propósito</b> .....	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>Alcance</b> .....	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>Aspectos generales</b> .....	<b>3</b>
<b>4</b>	<b>Facultades y responsabilidades</b> .....	<b>3</b>
<b>5</b>	<b>Muestra</b> .....	<b>4</b>
<b>6</b>	<b>Equipos</b> .....	<b>5</b>
<b>7</b>	<b>Elementos desechables</b> .....	<b>7</b>
<b>8</b>	<b>Equipos de protección personal</b> .....	<b>8</b>
<b>9</b>	<b>Reactivos</b> .....	<b>8</b>
<b>10</b>	<b>Preparación de reactivos</b> .....	<b>10</b>
<b>11</b>	<b>Calibración</b> .....	<b>13</b>
<b>12</b>	<b>Control de calidad</b> .....	<b>13</b>
<b>13</b>	<b>Introducción y pautas sobre el procesamiento de PBMC</b> .....	<b>15</b>
<b>14</b>	<b>Separación de células y dilución de sangre con reemplazo opcional de plasma por medio de tubo de separación de células con barrera de fritas (CSTFB)</b> El Capítulo 14 puede utilizarse para todas las redes; verifique los requisitos del protocolo y los materiales disponibles. Use el Capítulo 14 o el Capítulo 15, pero no ambos. ....	<b>16</b>
<b>15</b>	<b>Separación de células por método manual de colocación por encima o por debajo del Ficoll® y dilución de sangre con reemplazo opcional de plasma mediante separación manual de células con gradiente de densidad</b> El Capítulo 15 puede utilizarse para todas las redes; verifique los requisitos del protocolo y los materiales disponibles. Use el Capítulo 14 o el Capítulo 15, pero no ambos. ....	<b>20</b>
<b>16</b>	<b>Lavado, recuento, resuspensión, concentración y congelación a velocidad controlada durante la noche</b> El Capítulo 16 es para todas las redes. ....	<b>24</b>
<b>17</b>	<b>Almacenamiento en el centro a -70/-80 °C</b> El Capítulo 17 es para el ACTG y la HVTN .....	<b>30</b>
<b>18</b>	<b>Procesamiento de PBMC, Sección 6B: Almacenamiento en el centro en nitrógeno líquido (LN2)</b> El Capítulo 18 es para la IMPAACT, la HPTN y la MTN.....	<b>31</b>
<b>19</b>	<b>Información de resultados</b> .....	<b>32</b>
<b>20</b>	<b>Cálculos</b> .....	<b>32</b>
<b>21</b>	<b>Limitaciones del procedimiento</b> .....	<b>32</b>
<b>22</b>	<b>Notas del procedimiento</b> .....	<b>33</b>
<b>23</b>	<b>Glosario</b> .....	<b>33</b>
<b>24</b>	<b>Referencias</b> .....	<b>34</b>
<b>25</b>	<b>Documentos adicionales (que deben ser conservados por el laboratorio)</b> .....	<b>36</b>
<b>26</b>	<b>Apéndices</b> .....	<b>36</b>
	Apéndice A: Hoja de trabajo para procesamiento de PBMC*	A1
	Apéndice B: Modelo de diario de cambios del isopropanol del recipiente Mr. Frosty NALGENE®	B1
	Apéndice C: Resolución de problemas: Recuperación de PBMC ante la ausencia de una banda definida de PBMC después del centrifugado en gradiente de densidad	C1
	Apéndice D: Combinación de capas leucocíticas para el aislamiento de PBMC con Ficoll®	D1
	Apéndice E: Guía rápida del SOP de PBMC entre redes: Tubos CSTFB	E1
	Apéndice F: Guía rápida del SOP de PBMC entre redes: Método de colocación manual por encima del Ficoll®	F1

\*El Apéndice A también se proporciona en versión descargable y editable en el sitio web público de HANC en <http://www.hanc.info/labs/Pages/PBMC SOP.aspx>.

## **1 Propósito**

- 1.1 El presente Procedimiento operativo estándar (Standard Operating Procedure, SOP) describe los procedimientos para el aislamiento y la criopreservación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de sangre entera.

## **2 Alcance**

- 2.1 Este procedimiento se deberá utilizar para procesar muestras de sangre para el aislamiento, la criopreservación y el almacenamiento de muestras de PBMC.

## **3 Aspectos generales**

- 3.1 Se utilizan PBMC recientemente recolectadas o criopreservadas para la evaluación de respuestas inmunitarias celulares inducidas por vacunas o terapias antirretrovirales, cambios en la respuesta inmunitaria asociados con el VIH y recuperación de virus competente para la replicación. Estos ensayos requieren PBMC que se hayan aislado y criopreservado en circunstancias estrictamente definidas, que garanticen una recuperación, viabilidad y funcionalidad óptimas. Algunos estudios de validación indican que es ideal procesar y congelar la sangre dentro de las 8 horas de su extracción, para mantener la máxima función de las células en los ensayos de monitoreo del sistema inmunitario. La HVTN requiere que el tiempo total desde la recolección hasta la congelación sea inferior o igual a 8 horas. Para otras redes, puede variar el límite de tiempo; verifique los documentos del protocolo correspondientes.

## **4 Facultades y responsabilidades**

- 4.1 Los Directores de Laboratorios de la Red (o la persona que estos designen) tienen la facultad de establecer, revisar y actualizar este procedimiento.
- 4.2 La Oficina de Coordinación de Redes para el VIH/SIDA (HIV AIDS Network Coordination, HANC) está a cargo del mantenimiento y control de la documentación de SOP.
- 4.3 El Investigador Principal/Gerente del Laboratorio está a cargo de implementar este procedimiento o una versión equivalente para la red y de asegurar que todo el personal adecuado esté capacitado.
- 4.4 Todos los técnicos son responsables de leer y comprender este SOP antes de realizar los procedimientos descritos.

## **5 Muestra**

### **5.1 Preparación del paciente**

Ninguna

### **5.2 Tipo de muestra**

Sangre entera anticoagulada extraída en tubos para recolección de sangre

### **5.3 Volumen óptimo/mínimo de la muestra**

Volumen de sangre requerido según el protocolo

### **5.4 Condiciones de manipuleo**

5.4.1 Las muestras de sangre entera fresca anticoagulada deben almacenarse a temperatura ambiente (entre 15 y 30 °C) desde el momento de la recolección hasta la entrega a la unidad de procesamiento del laboratorio.

5.4.2 Las muestras de sangre entera fresca anticoagulada deben entregarse a la unidad de procesamiento del laboratorio, lo antes posible, después de la recolección, para permitir que el laboratorio de procesamiento tenga tiempo suficiente para completar los procedimientos de criopreservación.

5.4.3 Las muestras de sangre entera fresca anticoagulada deben ser procesadas por la unidad de procesamiento del laboratorio lo antes posible, una vez que las reciba. La HVTN requiere que el tiempo total desde la recolección hasta la congelación sea inferior o igual a 8 horas. Para otras redes, puede variar el límite de tiempo; verifique los documentos del protocolo correspondientes. Registre la hora de recolección en la Hoja de trabajo para procesamiento de PBMC (Apéndice A) y/o en el LDMS.

5.4.4 No refrigere ni congele la sangre entera.

5.4.5 Registre la hora en que comenzó el procesamiento en la Hoja de trabajo para procesamiento de PBMC o en el documento de registro equivalente.

**Nota:** Se *requiere* el uso de la **Hoja de trabajo para procesamiento de PBMC** para la HVTN con el fin de llevar un registro del horario del procesamiento y documentar los problemas que puedan surgir durante el procesamiento. La **Hoja de trabajo para procesamiento de PBMC** está disponible en los apéndices y en <http://www.hanc.info/labs/Pages/PBMC SOP.aspx>.

**Nota:** Se *recomienda* el uso de la **Hoja de trabajo para procesamiento de PBMC** para el ACTG, la HPTN, la IMPAACT y la MTN, pero estas redes también pueden usar un documento de registro equivalente, como el Sistema de Gestión de Datos del Laboratorio (LDMS), para este fin.

5.4.6 Si alguno de los tubos de sangre de muestra contiene coágulos pequeños, intente eliminar los coágulos antes de comenzar el procesamiento. Registre la cantidad total de tubos que contengan coágulos pequeños en la sección de comentarios de la Hoja de trabajo para procesamiento de PBMC o en el LDMS.

- 5.4.7 La hemólisis puede afectar la calidad de las PBMC. Anote cualquier caso de hemólisis que se produzca en la Hoja de trabajo para procesamiento de PBMC utilizando las definiciones de hemólisis incluidas en la sección Glosario. Si las muestras están marcadamente hemolizadas (3+ a 4+), intente el aislamiento y la criopreservación de las PBMC. Si el rendimiento celular está significativamente por debajo del rango previsto, almacene las PBMC con las anotaciones adecuadas y comuníquese con la clínica para un posible reemplazo de las muestras.

## 5.5 Muestras inaceptables

- 5.5.1 Las muestras no etiquetadas o mal etiquetadas serán rechazadas.
- 5.5.2 Si solo unos pocos tubos de sangre Vacutainer® de una partida de PTID contienen sangre marcadamente coagulada (vea el glosario), dichos tubos podrán desecharse si esto constituye una práctica aceptable para la red (vea las notas a continuación), y se procesarán los tubos que no contienen sangre coagulada.

**Nota para la HVTN:** Procese los tubos de sangre coagulada con los comentarios adecuados en la **Hoja de trabajo para procesamiento de PBMC**. Si el rendimiento celular es  $<0,4 \times 10^6$  células/ml), comuníquese con la clínica para un posible reemplazo de las muestras.

**Nota para el ACTG, la IMPAACT, la HPTN y la MTN:** Deberá procesarse toda la sangre y deben anotarse todas las complicaciones en la **Hoja de trabajo para procesamiento de PBMC** y/o en el LDMS, a menos que el cuadro de procesamiento del laboratorio (Lab Processing Chart, LPC), el protocolo específico del centro (Site-Specific Protocol, SSP) o el procedimiento operativo estándar (SOP) contengan instrucciones en contrario. Si todos los tubos de sangre Vacutainer® de una partida de PTID contienen sangre coagulada, elimine el coágulo y continúe con el procesamiento de la fracción restante.

**Nota:** En la sección “Comentarios y desviaciones del Protocolo” de la **Hoja de trabajo para procesamiento de PBMC**, anote la cantidad de tubos con sangre coagulada y la cantidad total de tubos de la partida de PTID. Si corresponde, registre los detalles del procesamiento de la sangre coagulada. Si se procesa la sangre coagulada, ingrese “a partir de sangre coagulada” en la sección de comentarios de la entrada del LDMS tanto para las muestras de PBMC como para las de plasma.

Registre la cantidad total de tubos que se desecharon debido a la presencia de coágulos marcados o de hemólisis marcada en la sección de comentarios de la **Hoja de trabajo para procesamiento de PBMC**.

- 5.5.3 Documente todos los estados inesperados de las muestras en la Hoja de trabajo para procesamiento de PBMC e ingrese la información en un sistema de gestión de datos de laboratorio, como en la sección de comentarios del Sistema de Gestión de Datos del Laboratorio (LDMS).

## 6 Equipos

Se mencionan los proveedores y equipos recomendados. A menos que se especifique lo contrario, pueden utilizarse equipos de la misma calidad o de mejor calidad que los recomendados.

### 6.1 Preparación y procesamiento

- 6.1.1 Gabinetes de seguridad biológica de flujo laminar, según lo establezca el laboratorio (P2, P2.5 o P3)

- 6.1.2 Centrífuga, baja velocidad (capaz de generar 300 a 1.000 x g), rotor con cubeta oscilante, preferentemente refrigerada, temperatura ambiente aceptable
  - 6.1.3 Micropipetas, rango 20, 200, 1.000 µl.
  - 6.1.4 Pipet-Aid (preferentemente inalámbrica) para pipetas serológicas desechables
  - 6.1.5 Refrigerador a una temperatura de entre 2 y 8 °C
  - 6.1.6 Congelador a una temperatura de -20 °C (o menos) *sin* descongelación automática (para almacenamiento de FBS)
  - 6.1.7 Congelador a una temperatura de -80 °C (entre -65 y -95 °C); para almacenamiento de PBMC a corto plazo
  - 6.1.8 Baño María a una temperatura de entre 37 y 56 °C
  - 6.1.9 Cubeta o vaso de precipitado para cloro u otros desinfectantes y para enjuague de pipetas, si lo requiere la práctica local de seguridad
- 6.2 Equipo de nitrógeno líquido (LN2) (si lo requiere la red)**
- 6.2.1 Tanque de almacenamiento de LN2 ( $\leq -140$  °C)
  - 6.2.2 Contenedor seco de LN2 aprobado por la Asociación Internacional de Transporte Aéreo (International Air Transport Association, IATA)
- 6.3 Recuento celular (seleccione una de las siguientes opciones)**
- 6.3.1 Contador automático de células capaz de enumerar células viables (Vi-Cell de Beckman-Coulter, PCA® de Guava o un contador equivalente)
  - 6.3.2 Cámara para recuento celular manual (hemocitómetro Neubauer) y microscopio de campo claro
  - 6.3.3 Contador automático de células incapaz de enumerar células viables (contador Coulter, Abbott CelDyne™, Sysmex® o uno equivalente), que se utiliza en paralelo con un hemocitómetro para enumerar células viables.
- Nota para la HVTN:** Se puede utilizar un contador automático de células incapaz de identificar células viables, para obtener un recuento total de células sin enumerar las células viables.
- Nota para los laboratorios que participan en el Programa de Análisis de Aptitud sobre Criopreservación de PBMC de Immunology Quality Assurance (IQA): Se requiere evaluar la viabilidad.
- 6.4 Criopreservación (seleccione una de las siguientes opciones)**
- 6.4.1 Módulo de criopreservación StrataCooler® (Stratagene). El módulo de criopreservación StrataCooler® debe estar a una temperatura de entre 2 y 8 °C antes de comenzar a enfriar los crioviales. No coloque crioviales en un módulo de criopreservación StrataCooler® que tenga una temperatura inicial por debajo de los 2 °C.

6.4.2 Recipiente Mr. Frosty NALGENE®, recipiente para criocongelación de 1 °C/minuto. El recipiente Mr. Frosty debe almacenarse a temperatura ambiente (15-30 °C).

**Nota:** Reemplace el isopropanol cada quinto ciclo de congelación/descongelación. Debe usarse un diario para llevar un registro de los ciclos de congelación/descongelación y los cambios en los reactivos. Vea el Apéndice B.

6.4.3 Congelador a velocidad controlada, como la cámara de congelación CryoMed® (Gordinier).

## **7 Elementos desechables**

### **7.1 Plásticos**

7.1.1 Pipetas serológicas, desechables de 1, 5, 10, 25, 50 ml, estériles.

7.1.2 Puntas de precisión para pipetas de 20, 100, 200, 1.000 µl, estériles.

7.1.3 Tubos de centrifuga desechables de 15 y 50 ml, estériles, con fondo cónico, graduados, de polipropileno.

7.1.4 Viales criogénicos (crioviales) de 1,8 a 2 ml, tapa a rosca con junta tórica, estériles, de polipropileno únicamente, que se mantienen en pie por sí solos, graduados, a prueba de filtraciones, formulados para preservación en LN2 en fase vapor (aproximadamente, -140 °C).

Productos NALGENE® NUNC®, catálogo n.º 377267; Wheaton, catálogo n.º 985742; Fisher Scientific, catálogo n.º 05-669-57; Corning, catálogo n.º 430659 (12,7 x 49 mm), SARSTEDT, n.º 72.694.006.

**Nota:** No todas las marcas de crioviales son adecuadas para el almacenamiento a largo plazo en LN2. Consulte a la(s) red(es) correspondiente(s) o al fabricante antes de sustituir este artículo.

7.1.5 Opcional: Frascos/matracas estériles, desechables, con cuello de 45 mm, 250 a 500 ml

7.1.6 Opcional: Pipetas de transferencia de 5 ml, estériles, de plástico, con envoltorio individual

7.1.7 Opcional: Si no se utilizan tubos de separación de células prellenados con barreras de frita (CSTFB), se requerirán tubos CSTFB vacíos (vea la sección 9.2 para obtener más detalles) o tubos de centrifuga desechables de 15 y 50 ml, según lo indicado en la sección 7.1.3.

### **7.2 Marcadores**

Los marcadores para escribir sobre los viales y tubos de procesamiento deben tener punta fina y contener tinta indeleble y de secado rápido. (Por ejemplo: Pluma marcador, de trazo fino, con punta de fieltro, Fisher Scientific).

Opcional: El uso de marcadores de distintos colores puede ser útil para clasificar diferentes PTID por color.

### **7.3 Etiquetas**

Etiquetas criogénicas adecuadas para temperaturas de -80 °C y para LN2.

Ejemplos: Cryo-Tags® y Cryo-Babies® de Diversified Biotech, Brady B461 o B490, etiquetas para congelador Shamrock.

## 8 Equipos de protección personal

Se requieren equipos de protección personal aptos para uso con patógenos transmitidos a través de la sangre. Cumpla las pautas y prácticas locales de laboratorio para manipular productos de la sangre.

### 8.1 Guardapolvo de laboratorio

### 8.2 Protección para los ojos

### 8.3 Guantes sin polvo, de nitrilo o equivalentes

### 8.4 Es necesario utilizar crioguantas y máscaras de protección (con mentonera opcional), si está usando LN2

## 9 Reactivos

### 9.1 Reactivos de dilución y lavado (Wash Diluent Reagents, WDR)

Solución de sal equilibrada de Hanks (HBSS\*) sin calcio ni magnesio, lista para usar.

\*Alternativa: 1X solución salina amortiguada con fosfato sin calcio ni magnesio, lista para usar.

\*\*Alternativa para el ACTG y la IMPAACT: Medio RPMI sin FBS ni antibióticos.

**Nota:** Almacene los frascos abiertos a la temperatura recomendada por el fabricante hasta que los utilice o hasta la fecha de vencimiento del fabricante. Deséchelos si observa signos visibles de contaminación, como un aspecto turbio.

### 9.2 Tubo de separación de células con barrera de fritada (CSTFB) prellenado

La capacidad del tubo requerida dependerá del volumen total de sangre.

Volumen total de sangre (ml)	Capacidad del tubo (ml)
≥15	50
<15	12 ó 14

CSTFB prellenado, tubos de 12 a 14 ml o 50 ml con medios de gradiente de densidad de 1,077 (Ejemplos: Sistema Accuspin™ Histopaque®-1,077 de Sigma o Ficoll-Paque™ PLUS de Greiner Bio-One):

Condiciones de almacenamiento:

- Almacénelos en el refrigerador (a una temperatura de entre 2 y 8 °C)
- Protéjalos de la luz
- Úselos antes de la fecha de vencimiento del fabricante
- El aspecto turbio indica deterioro del producto.
- Deje que los tubos CSTFB lleguen a temperatura ambiente (entre 15 y 30 °C) antes de usarlos

Alternativas al sistema de CSTFB prellenado:

Combine un CSTFB seco con medios de gradiente de densidad de 1,077

Capacidad del tubo (ml)	Volumen de medios de gradiente de densidad (ml)
50 ml	15 ml
12 a 14 ml	3 ml

A continuación se incluyen algunos ejemplos:

CSTFB secos (tubos)

- Tubos de separación de Accuspin™ secos (12 ml o 50 ml)
- Tubos de separación de Leucosep® secos (14 ml o 50 ml)

Medios de gradiente de densidad de 1,077

- Histopaque® de Sigma
- Ficoll-Hypaque™ de Amersham Biosciences
- Medios Lymphoprep™ de Axis-Shield (Greiner Bio-One)

**Nota:** Si usa CSTFB, consulte el [Capítulo 14](#). Si usa el método de colocación manual por encima o por debajo del Ficoll® (sin barreras de fritas), vea el [Capítulo 15](#).

### 9.3 Reactivos de congelación

9.3.1 Se prefiere suero bovino fetal (FBS), termoinactivado.

*Consulte los proveedores preferidos en la(s) red(es) aplicable(s).* No todas las marcas de FBS son equivalentes. Antes de cambiar de proveedor, deben abordarse los asuntos relacionados con control de calidad, toxicidad, aspectos generales y envío/importación.

Obtenga un certificado de análisis del proveedor para los registros de control de calidad del laboratorio local.

**Nota:** Es posible que se requiera una copia del certificado de análisis del FBS para exportar (o importar) alícuotas de PBMC de un país a otro.

El FBS almacenado en estado congelado ( $\leq -20$  °C) sirve hasta la fecha de vencimiento del fabricante.

El FBS descongelado y almacenado a una temperatura de entre 2 y 8 °C, es estable durante un mes.

9.3.2 Dimetilsulfóxido (DMSO), grado de cultivo celular

Asegúrese de usar un DMSO de grado de cultivo celular, por ejemplo: Hybrimax, Sigma-Aldrich cat. n.º D2650, probado para endotoxina y probado para hibridoma.

Almacene los frascos sin abrir a temperatura ambiente (entre 15 y 30 °C). Controle la fecha de vencimiento del frasco.

El DMSO debe ser fresco y mantenerse en condiciones de esterilidad. (El reactivo puede dividirse en alícuotas en cantidades pequeñas para ayudar a preservar la esterilidad). Etiquete con la fecha al abrirlo.

Después de abrir el frasco, el DMSO sin diluir es estable a temperatura ambiente (entre 15 y 30 °C) cuando se lo protege de la luz y la humedad, durante 6 meses.

Use una técnica aséptica al retirar el DMSO del frasco para evitar posibles contaminaciones.

Deseche el frasco abierto si se observan signos visibles de contaminación.

9.3.3 Desinfectante

9.3.3.1 Frasco rociador de desinfectante de etanol al 70% v/v

9.3.3.2 Cubeta o vaso de precipitado y frasco rociador con cloro al 10% v/v

9.3.3.3 Otro desinfectante, según lo especificado por la política del laboratorio local

#### **9.4 Reactivos para el recuento de células**

Para realizar recuentos manuales de células, se necesitan los siguientes reactivos:

9.4.1 Solución de azul de tripano al 0,4%

9.4.2 Opcional: Se puede utilizar solución de violeta cristal al 0,05% para teñir el núcleo de la célula, a fin de poder identificar las células mononucleares y contarlas con un hemocitómetro. Si se requiere viabilidad, podrá realizarse un segundo recuento manual utilizando azul de tripano.

La solución de violeta cristal al 0,05% contiene:

0,05 g de violeta cristal

2 ml de ácido acético glacial

98 ml de H<sub>2</sub>O destilada o desionizada

## **10 Preparación de reactivos**

### **10.1 FBS termoinactivado (HI-FBS)**

El HI-FBS puede solicitarse al fabricante. Si recibe HI-FBS, siga las siguientes instrucciones de descongelación, división en alícuotas y uso.

10.1.1 Retire el HI-FBS del congelador a una temperatura de -20 °C.

10.1.2 Descongélalo en el refrigerador (entre 2 y 8 °C), preferentemente, o durante varias horas a temperatura ambiente. No permita que el HI-FBS permanezca a temperatura ambiente más tiempo del necesario para completar el proceso de descongelación.

10.1.3 Agítelo suavemente dos o tres veces durante la descongelación.

10.1.4 Una vez descongelado, mezcle el HI-FBS suavemente, pero a fondo, utilizando una técnica aséptica. Divídalo en alícuotas en tubos cónicos, estériles y etiquetados, de 50 ml, o en alícuotas de otro tamaño, que sean adecuadas para la carga de trabajo prevista.

**Nota:** Las etiquetas deben identificar estos tubos como "HI-FBS" e incluir el número de lote, la fecha de la alícuota, la fecha de vencimiento y las iniciales del técnico. El FBS es estable durante 1 mes a una temperatura de entre 2 y 8 °C o hasta la fecha de vencimiento original del fabricante a -20 °C.

10.1.5 Refrigere (a una temperatura de entre 2 y 8 °C) la cantidad de tubos de alícuotas que sea necesaria para la carga de trabajo esperada. Mezcle bien antes de usar. Los tubos de alícuotas que no se necesiten de inmediato pueden colocarse en un congelador a una temperatura de -20 °C y son estables hasta la fecha de vencimiento original del fabricante.

**Nota:** La repetición de ciclos de congelación/descongelación tendrá un efecto adverso sobre la calidad del FBS. No vuelva a congelar las alícuotas que estuvieron almacenadas a temperaturas de refrigeración.

10.1.6 Para utilizar las alícuotas congeladas, descongélalas en el refrigerador durante la noche, preferentemente, o durante varias horas a temperatura ambiente. Cambie la fecha de vencimiento a un mes. Mezcle bien antes de usar.

## 10.2 Preparación con termoinactivación de FBS

Si el FBS no fue termoinactivado por el fabricante, realice la termoinactivación siguiendo las instrucciones que se proporcionan a continuación.

10.2.1 Retire el FBS del congelador a una temperatura de -20 °C.

10.2.2 Descongélalo en el refrigerador (a una temperatura de entre 2 y 8 °C), preferentemente, o durante varias horas a temperatura ambiente. No permita que el FBS permanezca a temperatura ambiente más tiempo del necesario para completar el proceso de descongelación.

10.2.3 Agítelo suavemente dos o tres veces durante la descongelación.

10.2.4 Coloque el FBS a baño María a 56 °C (entre 55 y 57 °C). Monitoree con atención la temperatura del baño María. Temperaturas mayores pueden degradar los componentes del FBS.

**Nota:** El nivel de agua del baño María debe cubrir el nivel del FBS del frasco y no tocar la tapa del frasco. Esto ayuda a garantizar que el FBS se caliente en forma pareja y evita la contaminación.

10.2.5 Una vez que el baño María haya vuelto a los 56 °C (entre 55 y 57 °C), caliente el FBS durante 30 minutos y mézclelo cada 5 a 10 minutos. Calentarlo por períodos más prolongados puede degradar los componentes del FBS.

**Nota:** Si la parte superior del frasco entra en contacto con el baño María, limpie la parte superior del frasco con etanol al 70% v/v antes de abrirlo.

10.2.6 Mezcle el FBS suavemente, pero a fondo, utilizando una técnica aséptica. Divídalo en alícuotas en tubos cónicos, estériles y etiquetados, de 50 ml.

**Nota:** Las etiquetas deben identificar estos tubos como "HI-FBS" (FBS termoinactivado) e incluir el número de lote, la fecha de la alícuota, la fecha de vencimiento y las iniciales del técnico. El FBS es estable durante 1 mes a una temperatura de entre 2 y 8 °C, o hasta la fecha de vencimiento original del fabricante si se almacena a -20 °C.

Refrigere (a una temperatura de entre 2 y 8 °C) la cantidad de tubos de alícuotas que sea necesaria para la carga de trabajo esperada. Mezcle bien antes de usar.

**Nota:** La repetición de ciclos de congelación/descongelación tendrá un efecto adverso sobre la calidad del FBS. No vuelva a congelar las alícuotas que estuvieron almacenadas a temperaturas de refrigeración.

10.2.7 Los tubos de alícuotas restantes pueden volver a colocarse en el congelador a -20 °C y se mantienen estables hasta la fecha de vencimiento original del fabricante.

10.2.8 Cuando esté listo para utilizar alícuotas congeladas, descongélalas en el refrigerador durante la noche, preferentemente, o durante varias horas a temperatura ambiente. Cambie la fecha de vencimiento a un mes. Mezcle bien antes de usar.

## 10.3 Solución de criopreservación (CPS) fresca

10.3.1

Componentes	Porcentaje (v/v)
DMSO	10%
FBS (termoinactivado)	90%

10.3.2 Preparación de la CPS

Utilice un recipiente estéril, desechable, de 15 ml o 50 ml, para preparar la CPS. La mezcla de DMSO y FBS es una reacción exotérmica. La CPS debe prepararse de antemano y enfriarse en un refrigerador (entre 2 y 8 °C) durante, al menos, 30 minutos o en un baño de hielo durante, al menos, 15 minutos antes de usarla.

**Nota para la HPTN, la HVTN, la MTN:** La CPS puede almacenarse a una temperatura de entre 2 y 8 °C por 1 día laborable (<18 horas).

**Nota para el ACTG, la IMPAACT:** La CPS puede prepararse en partidas más grandes y almacenarse a -20 °C durante no más de una semana laborable, y descongelarse a una temperatura de entre 2 y 8 °C antes de usarse.

10.3.3 Utilice la fórmula que aparece a continuación para estimar el volumen de CPS que se debe preparar. También se proporcionan ejemplos.

$$\text{Sangre entera utilizable (ml)} \times \text{rendimiento celular (células/ml)} \times \text{concentración congelada (ml/células)} = \text{CPS estimada (ml)}$$

*Redondee hacia arriba al mililitro entero más cercano.*

**Ejemplos:** Sangre adulta. Recolección de gran volumen de sangre

Sangre entera utilizable x	Rendimiento celular x	Concentración congelada =	CPS estimada que se debe preparar
(10 ml) x	(1,5 x 10 <sup>6</sup> células/1 ml) x	(1 ml/15 x 10 <sup>6</sup> células) =	1 ml
(85 ml) x	(1,0 x 10 <sup>6</sup> células/1 ml) x	(1 ml/15 x 10 <sup>6</sup> células) =	6 ml
(140 ml) x	(1,5 x 10 <sup>6</sup> células/1 ml) x	(1 ml/15 x 10 <sup>6</sup> células) =	14 ml

**Ejemplos:** Sangre adolescente/pediátrica. Recolección de poco volumen de sangre

Sangre entera utilizable x	Rendimiento celular x	Concentración congelada =	CPS estimada que se debe preparar
(10 ml) x	(1,5 x 10 <sup>6</sup> células/1 ml) x	(0,5 ml/5 x 10 <sup>6</sup> células) =	2 ml
(2 ml) x	(1,0 x 10 <sup>6</sup> células/1 ml) x	(0,5 ml/2,5 x 10 <sup>6</sup> células) =	1 ml

10.3.4 Utilice las siguientes fórmulas para calcular la cantidad de DMSO y FBS necesarios.

Volumen estimado de CPS	Volumen de DMSO = (0,1)(volumen de CPS)	Volumen de HI-FBS = Volumen de CPS – volumen de DMSO	Volumen total de CPS = volumen de DMSO + volumen de FBS
1 ml	0,1 ml	0,9 ml	1 ml
9 ml	0,9 ml	8,1 ml	9 ml
50 ml	5 ml	45 ml	50 ml

10.3.5 Registre los volúmenes de CPS, DMSO y FBS en la Hoja de trabajo para procesamiento de PBMC.

**10.4 Reactivos para recuento**

Los requerimientos de reactivos para recuento variarán según el método utilizado. Vea las instrucciones para el método que se utilice.

10.4.1 Solución de azul de tripano al 0,4%

10.4.2 Opcional: Solución de violeta cristal al 0,05%

## 11 Calibración

- 11.1 No se necesita calibración para los pasos de procesamiento.
- 11.2 Siga los procedimientos correspondientes de calibración del laboratorio si utiliza un contador automático de células.

## 12 Control de calidad

### 12.1 Rendimientos celulares

Los rendimientos celulares son bastante uniformes dentro de las poblaciones. Por lo general, en las poblaciones de niños los rendimientos de linfocitos son más altos que en las poblaciones de adultos. De manera similar, **los pacientes con SIDA o con enfermedad por VIH avanzada pueden tener linfopenia. Es importante tener en cuenta cuál es la recuperación prevista que deberá obtenerse** para la población de participantes para quienes se realiza el procesamiento. En función de esta uniformidad, los rendimientos celulares pueden servir como marcadores de control de calidad interno para cada pasada. Los rendimientos que se encuentren fuera de los rangos previstos pueden indicar error procedimental, deterioro en los reactivos, error en el recuento de células o error de cálculo. El propósito de las recomendaciones que se proporcionan a continuación es brindar pautas para ayudar a identificar errores técnicos flagrantes antes de la criopreservación. Estos valores pueden variar según el anticoagulante que se utilice.

#### 12.1.1 Rendimientos celulares previstos

Población	Rango del rendimiento de células mononucleares (células/ml)
Adulta	$0,7 \times 10^6$ a $3 \times 10^6$
Pediátrica: Menos de 6 meses	$3 \times 10^6$ a $10 \times 10^6$
Pediátrica: 6 meses a 2 años	$2 \times 10^6$ a $9 \times 10^6$
Pediátrica: 2 a 5 años	$1 \times 10^6$ a $6 \times 10^6$
Pediátrica: Más de 5 años	$0,8 \times 10^6$ a $4 \times 10^6$
Pediátrica: Edad desconocida	$1 \times 10^6$ a $10 \times 10^6$

#### 12.1.2 Rendimientos celulares no previstos

Si los rendimientos celulares se encuentran fuera del rango esperado, revise los esquemas de dilución, los cálculos y la técnica de procesamiento (especialmente, la mezcla adecuada de suspensiones para el recuento de células), así como los antecedentes de PTID, si se encuentran disponibles, para ver las posibles causas. Los rendimientos celulares de los pacientes con infección por VIH pueden ser menores que los indicados en la tabla anterior. Si se sospecha que hay errores de dilución o recuento de células, haga una nueva dilución y un nuevo recuento.

Registre todos los resultados y cualquier problema que ocurra durante el procesamiento en la **Hoja de trabajo para procesamiento de PBMC**.

**Nota para la HVTN:** Registre todos los problemas y las medidas en la sección de comentarios sobre rendimiento celular de los registros de Control de calidad interno.

## **12.2 Viabilidad celular**

La viabilidad celular de las PBMC frescas es bastante uniforme. El tiempo de procesamiento prolongado, una técnica deficiente y, en ocasiones, la muestra de un participante específico pueden afectar de manera adversa la viabilidad. Para las redes que requieren viabilidad celular (vea la sección 6.3), calcule y registre el porcentaje de células viables en la hoja de trabajo.

12.2.1 La viabilidad de las PBMC recientemente aisladas debe ser >95%.

12.2.2 Si la viabilidad de las PBMC recientemente aisladas es <95%, revise los resultados con el supervisor y documéntelos en la Hoja de trabajo para procesamiento de PBMC.

## **12.3 Tiempos de manipuleo**

Los tiempos de manipuleo pueden afectar de manera adversa la recuperación y viabilidad celulares. Los tiempos de recolección, manipuleo y procesamiento se registran en la **Hoja de trabajo para procesamiento de PBMC** y/o en el LDMS.

12.3.1 Tiempos previstos

- La HVTN requiere que el tiempo total desde la recolección hasta la congelación sea inferior o igual a 8 horas. Para otras redes, el límite de tiempo puede variar.
- La HVTN requiere que el tiempo de procesamiento real desde la introducción de sangre fresca en los tubos de gradiente de densidad hasta el comienzo de la congelación a velocidad controlada sea de 2 a 3 horas, para maximizar la integridad celular. Para otras redes, el límite de tiempo puede variar.

12.3.2 Tiempos de procesamiento imprevistos (prolongados)

Revise todos los tiempos de procesamiento prolongados con el supervisor y documéntelos en la **Hoja de trabajo para procesamiento de PBMC** y/o en el LDMS.

## **12.4 Hoja de trabajo para procesamiento de PBMC**

**Para la HVTN:** Se *requiere* utilizar la **Hoja de trabajo para procesamiento de PBMC** para llevar un registro del tiempo de procesamiento, los cálculos y la documentación de problemas que surjan durante el procesamiento. La **Hoja de trabajo para procesamiento de PBMC** se proporciona en el Apéndice A. Esta hoja de trabajo también se proporciona en versión descargable y editable en <http://www.hanc.info/labs/Pages/PBMCSOP.aspx>.

**Para otras redes:** Se recomienda el uso de la **Hoja de trabajo para procesamiento de PBMC**.

### 13 Introducción y pautas sobre el procesamiento de PBMC

Existen principios y medidas estándar comunes a todos los procedimientos de procesamiento de PBMC. Las variaciones se dan según la elección de las técnicas de separación (CSTFB prellenados en comparación con el método manual por encima del Ficoll®), el tratamiento de la sangre (dilución con o sin reemplazo de plasma en comparación con cosecha directa de plasma), concentración final de células, y congelación/almacenamiento. Seleccione las secciones de procedimientos correspondientes para la separación de células y el tratamiento de la sangre, y la congelación y el almacenamiento, de conformidad con los requisitos de la red y el protocolo.

Capítulo sobre procesamiento de PBMC	Utilización para estas redes
<p><b><i>Separación de células y tratamiento de la sangre</i></b></p> <p>Capítulo 14: Separación de células y dilución de sangre con reemplazo opcional de plasma por medio de tubo de separación de células con barrera de frita (CSTFB)</p> <p style="text-align: center;"><b>O</b></p> <p>Capítulo 15: Separación de células por método manual de colocación por encima o por debajo del Ficoll® y dilución de sangre con reemplazo opcional de plasma mediante separación manual de células con gradiente de densidad</p>	<p>Puede utilizarse para todas las redes; verifique los requisitos del protocolo y los materiales disponibles</p> <p>Puede utilizarse para todas las redes; verifique los requisitos del protocolo y los materiales disponibles</p>
<p><b><i>Lavado, recuento, resuspensión, concentración, y congelación a velocidad controlada durante la noche</i></b></p> <p>Capítulo 16</p>	<p>Todas las redes</p>
<p><b><i>Almacenamiento en el centro</i></b></p> <p>Capítulo 17: Almacenamiento en el centro a una temperatura de -70/-80 °C</p> <p style="text-align: center;"><b>O</b></p> <p>Capítulo 18: Almacenamiento en el centro en nitrógeno líquido (LN2)</p>	<p>ACTG y HVTN</p> <p>IMPAACT, HPTN y MTN</p>

## **14 Separación de células y dilución de sangre con reemplazo opcional de plasma por medio de tubo de separación de células con barrera de frita (CSTFB)**

**El Capítulo 14 puede utilizarse para todas las redes; verifique los requisitos del protocolo y los materiales disponibles. Para una muestra en particular, use el Capítulo 14 o el Capítulo 15, pero no ambos.**

### **14.1 Separación de linfocitos de sangre periférica utilizando tubos de separación CSTFB prellenados**

- 14.1.1 Todo el trabajo con pipetas y las mezclas se realizan en un gabinete de seguridad biológica (biological safety cabinet, BSC) de nivel 2 o superior.
- 14.1.2 Rocíe todas las superficies, las gradillas y los frascos de reactivos con etanol al 70% v/v o un desinfectante equivalente, antes de ingresar en el BSC y utilizarlo.
- 14.1.3 A menos que se indique lo contrario, el procedimiento se realiza a temperatura ambiente (entre 15 y 30 °C).
- 14.1.4 Utilice una nueva pipeta para cada número de identificación del participante (PTID) y para cada aditivo.

### **14.2 Prepare muestras de sangre entera, reactivos y suministros.**

- 14.2.1 Antes del procesamiento o con la suficiente anticipación antes de la mezcla con PBMC, prepare y enfríe la CPS (vea el Capítulo 10, Preparación de reactivos).
- 14.2.2 Si los tubos de muestras están fríos al tacto (debido al frío del ambiente, como cuando se transportan en los meses más fríos), deje que los tubos lleguen a temperatura ambiente antes del procesamiento.
- 14.2.3 Registre en la Hoja de trabajo para procesamiento de PBMC (y/o un documento equivalente): PTID, número de visita, protocolo, fecha/hora de recolección, fecha/hora de comienzo del procesamiento, números del lote y fechas de vencimiento de todos los reactivos, y volúmenes de CPS, DMSO y FBS.
- 14.2.4 Antes de agregar la sangre, inspeccione visualmente los tubos CSTFB para comprobar si hay líquido por encima de la frita. Si hay líquido por encima de la frita, centrifugue los tubos CSTFB a 1.000 x g durante 30 segundos. Si queda algo de solución de gradiente de densidad por encima de la frita después de centrifugar, deberá aspirarla.
- 14.2.5 Verifique con atención el PTID en todos los tubos de sangre recibidos. Organice los tubos primarios para que no haya posibilidad de mezclar tubos con diferentes PTID ni los anticoagulantes dentro de la recolección de un mismo PTID.

**Sugerencia:** Coloque todos los tubos para cada PTID/anticoagulante en una gradilla. Pueden utilizarse diferentes gradillas para separar PTID o tipos de tubos, y puede utilizarse un color diferente de marcador para cada PTID, con el fin de evitar confusiones.

### 14.3 Reemplazo opcional de plasma

Realice este reemplazo de plasma **solo** si se requieren alícuotas de plasma, según las instrucciones del protocolo. Si no se requieren alícuotas de plasma, omita este paso y diríjase al paso 14.4.

**Nota para la IMPAACT:** Se requiere reemplazo de plasma.

- 14.3.1 Los tubos para recolección de sangre del mismo PTID y el mismo anticoagulante pueden procesarse en forma individual o combinarse en tubos cónicos de 50 ml.
- 14.3.2 Marque el volumen de sangre entera en el menisco.
- 14.3.3 Centrifugue la sangre entera a entre 200 y 400 x g durante 10 minutos.
- 14.3.4 Transfiera el plasma a un tubo de centrifuga de 15 ó 50 ml para realizar un segundo centrifugado que elimine todo resto de células.
- 14.3.5 Agregue una cantidad suficiente de WDR (vea la sección 9.1) para llevar la sangre nuevamente a su volumen original de sangre entera, mezcle suavemente y continúe el procesamiento de PBMC en el paso 14.4.
- 14.3.6 Complete el procesamiento de plasma centrifugando el plasma recolectado a entre 800 y 1.200 x g durante 10 minutos. Esto se puede realizar con posterioridad, cuando no se esté utilizando la centrifuga para el procesamiento de PBMC.
- 14.3.7 Divida el plasma en alícuotas y colóquelas en tubos de alícuotas etiquetados, según lo indique el protocolo, y elimine todo resto de células que se encuentre en el tubo de plasma centrifugado.

### 14.4 Dilución de sangre para separación de CSTFB

**Nota:** Debe determinarse una medición exacta del volumen de sangre utilizable y registrarse en la **Hoja de trabajo para procesamiento de PBMC** y en el LDMS, según corresponda. Esto puede lograrse utilizando una pipeta estéril para transferir la sangre entera a los tubos CSTFB y llevando un registro del volumen de sangre a medida que se transfiere con la pipeta, o combinando la sangre en un recipiente graduado estéril antes de transferirla a los tubos CSTFB y tomando la medición del recipiente.

**Nota:** La proporción máxima entre la sangre y el WDR debe ser, aproximadamente, 2:1. Utilice un tubo de 50 ml por cada 10 a 20 ml de sangre entera adulta (o un tubo de 12 a 14 ml por cada 4 a 5 ml de sangre entera pediátrica). Utilice tantos tubos CSTFB como sean necesarios para distribuir toda la sangre para cada PTID.

**Nota:** El Ficoll® es tóxico para las células; trabaje con rapidez y eficiencia mientras sigue los pasos de la separación.

- 14.4.1 Etiquete cada CSTFB con el PTID.
- 14.4.2 Si un tubo contiene sangre marcadamente coagulada (vea el glosario), deséchelo.
- 14.4.3 Documente el tipo de muestra recibida, la cantidad total de tubos desechados y el estado de la sangre en la Hoja de trabajo para procesamiento de PBMC.
- 14.4.4 Con una pipeta estéril, agregue 5 ml (para sangre adulta) o 2 ml (para sangre pediátrica) de WDR a cada CSTFB.

14.4.5 Mezcle la sangre entera suavemente; luego, utilice una pipeta estéril para transferir 10 a 20 ml (para sangre adulta) o 4 a 5 ml (para sangre pediátrica) de sangre a los CSTFB etiquetados.

14.4.6 Con una pipeta estéril, enjuague cada tubo con sangre anticoagulada original con WDR, agregue volúmenes de enjuague a los tubos CSTFB y asegúrese de no superar el volumen total del tubo (WDR + sangre entera) de 30 ml (para sangre adulta) o 7,5 ml (para sangre pediátrica).

14.4.7 Registre el volumen de sangre utilizable en la Hoja de trabajo para procesamiento de PBMC.

**Nota:** No estime el volumen de sangre utilizable en función del tamaño del tubo.

**Nota:** No incluya el volumen del WDR utilizado para diluir la muestra de sangre.

14.4.8 Tape los tubos CSTFB con cuidado.

#### 14.5 Centrifugado en gradiente de densidad y recolección de CSTFB

14.5.1 Sostenga los tubos en posición vertical y transfíralos con cuidado a la centrífuga.

14.5.2 Centrifugue a entre 800 y 1.000 x g durante 15 minutos, a una temperatura de entre 15 y 30 °C, con el freno en posición OFF (apagado).

**Nota:** La separación de PBMC puede mejorarse para algunas muestras realizando un centrifugado a 1.000 x g.

**Nota:** Si el freno está activado, afectará las capas. Consulte el Capítulo 20, Cálculos, para convertir g en rpm según la longitud de su rotor.

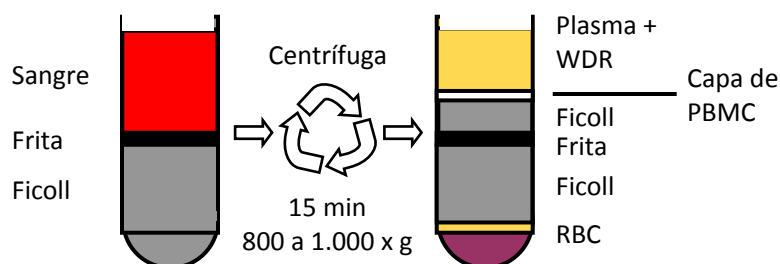
14.5.3 Prepare la misma cantidad de tubos cónicos nuevos, estériles, de 50 ml (para sangre adulta) o 15 ml (para sangre pediátrica), ya que los tubos CSTFB se utilizan en el paso de centrifugado para separación.

14.5.4 Etiquete cada tubo con el PTID. Utilice estos nuevos tubos para el siguiente lavado.

14.5.5 Quite con cuidado los tubos CSTFB de la centrífuga para no afectar las capas.

14.5.6 El centrifugado hace que los contenidos del tubo se dividan en seis capas diferentes, incluida la frita. Desde la parte superior del tubo, estas capas son las siguientes:

- Plasma + WDR
- Capa de PBMC
- Ficoll®
- Frita
- Ficoll®
- Concentrado de glóbulos rojos (red blood cells, RBC) y granulocitos



14.5.7 Inspeccione los tubos para detectar los siguientes problemas posibles:

Hemólisis en la capa de plasma + WDR. Ante la presencia de hemólisis, clasifíquela de +1 a +4 según la descripción incluida en la sección 29, Glosario.

Coágulos visibles en la frita después del centrifugado.

Capa deficiente de PBMC debido a un error en el centrifugado, como velocidad, tiempo o frenado. La capa de PBMC parecerá pequeña y poco definida, mientras que la capa de plasma + WDR puede estar levemente turbia. Consulte el Apéndice C para la resolución de problemas.

La capa de PBMC se formó sobre la frita debido al recuento de RBC o al volumen de hematocrito bajos.

Registre las observaciones en la sección de comentarios de la **Hoja de trabajo para procesamiento de PBMC** y/o en el LDMS. Documente cualquier medida de seguimiento tomada.

14.5.8 Con una nueva pipeta estéril (pipeta serológica o de transferencia) para cada PTID, retire la fracción amarillenta de plasma-WDR que se encuentra en la parte superior hasta llegar a, aproximadamente, 1 a 2 cm de la banda blanca turbia de PBMC ubicada en la interfaz entre la fracción de plasma-WDR (amarillenta) y la solución de medio de separación transparente. Deseche la fracción de plasma-WDR según la política del laboratorio.

**Nota:** Como alternativa, la fracción de plasma-WDR que se encuentra en la parte superior puede dejarse en su lugar, y la banda blanca turbia de PBMC puede quitarse insertando con cuidado la pipeta a través de la capa superior hasta la banda de PBMC.

14.5.9 Con una pipeta serológica o de transferencia estéril, recolecte todas las células en la interfaz blanca turbia que se encuentra por encima de la frita. Tenga cuidado de no aspirar más solución de medio de separación de lo necesario.

14.5.10 Transfiera las células recolectadas de un tubo CSTFB a un único tubo cónico correspondiente, previamente etiquetado, estéril, de 50 ml (para sangre adulta) o de 15 ml (para sangre pediátrica). Los tubos pueden prellenarse con WDR hasta 25 ml (para sangre adulta) o 5 ml (para sangre pediátrica), para ahorrar tiempo.

14.5.11 Vuelva a tapar el tubo CSTFB que contiene los glóbulos rojos restantes y los medios de separación. Elimine el tubo CSTFB como desecho biopeligroso, siguiendo la política del laboratorio.

**Omita el Capítulo 15 y diríjase al Capítulo 16.**

## **15 Separación de células por método manual de colocación por encima o por debajo del Ficoll® y dilución de sangre con reemplazo opcional de plasma mediante separación manual de células con gradiente de densidad**

**El Capítulo 15 puede utilizarse para todas las redes; verifique los requisitos del protocolo y los materiales disponibles. Para una muestra en particular, use el Capítulo 14 o el Capítulo 15, pero no ambos.**

### **15.1 Separación de linfocitos de sangre periférica con el método manual de colocación por encima del Ficoll®**

- 15.1.1 Todo el trabajo con pipetas y las mezclas se realizan en un gabinete de seguridad biológica de nivel 2 o superior.
- 15.1.2 Rocíe todas las superficies, las gradillas y los frascos de reactivos con etanol al 70% v/v antes de ingresar en la campana del BSC y utilizarla.
- 15.1.3 A menos que se indique lo contrario, el procedimiento se realiza a temperatura ambiente (entre 15 y 30 °C).
- 15.1.4 Utilice una nueva pipeta para cada número de identificación del participante (PTID) y para cada aditivo.

### **15.2 Prepare muestras de sangre entera, reactivos y suministros (utilice la Hoja de trabajo para procesamiento de PBMC u otra herramienta de seguimiento, según lo defina el protocolo o la red para documentar y llevar un registro del procesamiento de las muestras).**

- 15.2.1 Antes del procesamiento o con la suficiente anticipación antes de la mezcla con PBMC, prepare y enfríe la CPS (vea el Capítulo 10, Preparación de reactivos).
- 15.2.2 Si los tubos de muestras están fríos al tacto (debido al frío del ambiente, como cuando se transportan en los meses más fríos), deje que los tubos lleguen a temperatura ambiente (entre 15 y 30 °C) antes del procesamiento.
- 15.2.3 Deje que Ficoll-Hypaque™ (o los medios de gradiente de densidad equivalentes) llegue a temperatura ambiente (entre 15 y 30 °C). Para obtener más información, vea la sección Reactivos de este documento.
- 15.2.4 Complete las secciones sobre muestras y reactivos de la Hoja de trabajo para procesamiento de PBMC.
- 15.2.5 Verifique con atención el PTID en todos los tubos de sangre recibidos. Organice los tubos primarios para que no haya posibilidad de mezclar tubos con diferentes PTID ni los anticoagulantes dentro de la recolección de un mismo PTID.

**Sugerencia:** Coloque todos los tubos para cada PTID/anticoagulante en una gradilla. Pueden utilizarse diferentes gradillas para separar PTID o tipos de tubos, y puede utilizarse un color diferente de marcador para cada PTID, con el fin de evitar confusiones.

### **15.3 Reemplazo opcional de plasma**

Realice este reemplazo de plasma solo si se requieren alícuotas de plasma, según las instrucciones del protocolo. Si no se requieren alícuotas de plasma, omita este paso y diríjase al paso 15.4.

**Nota para la IMPAACT:** Se requiere reemplazo de plasma.

- 15.3.1 Los tubos para recolección de sangre pueden procesarse en forma individual o combinarse en tubos cónicos de 50 ml.
- 15.3.2 Marque el volumen de sangre entera en el menisco de cada tubo.
- 15.3.3 Centrifugue la sangre entera a entre 200 y 400 x g durante 10 minutos.
- 15.3.4 Transfiera el plasma a un tubo de centrifuga de 15 ó 50 ml para realizar un segundo centrifugado que elimine todo resto de células.
- 15.3.5 Agregue una cantidad suficiente de WDR (vea la sección 9.1) para llevar la sangre nuevamente a su volumen original de sangre entera, mezcle suavemente y continúe el procesamiento de PBMC en el paso 15.4.
- 15.3.6 Complete el procesamiento del plasma centrifugando el plasma recolectado a entre 800 y 1.200 x g durante 10 minutos. Esto se puede realizar con posterioridad, cuando no se esté utilizando la centrifuga para el procesamiento de PBMC.
- 15.3.7 Divida en alícuotas el plasma centrifugado y colóquelas en tubos de alícuotas etiquetados, según lo indique el protocolo, y elimine todo resto de células que haya en el tubo de plasma centrifugado.

### **15.4 Dilución de sangre y separación manual de células con gradiente de densidad**

**Nota para el ACTG, la IMPAACT y la HPTN:** Para las recolecciones de sangre de mayor volumen, se permite combinar capas leucocíticas (vea el Apéndice D: Combinación de capas leucocíticas para el aislamiento de PBMC con Ficoll).

**Nota para la HVTN:** Se debe determinar y registrar una medición exacta del volumen de sangre utilizable.

**Nota:** La dilución de la sangre con WDR puede ayudar a mejorar la separación (vea el Apéndice D).

- 15.4.1 Etiquete cada tubo de centrifuga de 15 ó 50 ml con el PTID. Utilice un tubo de 50 ml por cada 15 a 20 ml de sangre entera adulta (o un tubo de 15 ml por cada 4 a 5 ml de sangre entera pediátrica).
- 15.4.2 Destape los tubos de sangre anticoagulada.
- 15.4.3 Si un tubo contiene sangre marcadamente coagulada (vea el glosario), deséchelo.
- 15.4.4 Documente el tipo de sangre recibida en la Hoja de trabajo de PBMC.
- 15.4.5 Registre la cantidad total de tubos desechados o cualquier otro problema que se observe en la sangre.
- 15.4.6 Registre el estado de la sangre.
- 15.4.7 Registre el volumen total de sangre entera no diluida.

**Nota:** No estime el volumen de sangre utilizable en función del tamaño del tubo.

**Nota:** No incluya el volumen del WDR utilizado para diluir la muestra de sangre.

- 15.4.8 Transfiera la sangre a un tubo de centrifuga estéril, etiquetado, de 15 ó 50 ml y agregue un volumen suficiente de WDR para diluir la sangre de acuerdo con el prospecto del medio de separación de linfocitos (la proporción máxima entre la sangre y el diluyente debe ser 2:1).

**Opcional:** Se permite agregar el WDR y realizar la mezcla en el tubo de sangre inicial, si hay volumen suficiente disponible.

- 15.4.9 Para la separación de células con gradiente de densidad:

Para cualquier muestra en particular, use el método de colocación por encima del Ficoll® (15.4.9.1) o por debajo del Ficoll® (15.4.9.2), pero no ambos.

- 15.4.9.1 Método de **colocación por encima** del Ficoll®-Hypaque: En función del volumen de sangre diluida con WDR, determine la cantidad y el tamaño de los tubos de centrifuga estériles requeridos para la separación en gradiente de densidad.

Con una técnica aséptica, agregue Ficoll® o medio de separación de linfocitos (lymphocyte separation medium, LSM), según se requiera, a los tubos de centrifuga estériles.

**Nota:** La proporción entre el Ficoll® y la sangre entera puede variar según la recomendación del fabricante y la experiencia del laboratorio. Por ejemplo, algunos fabricantes recomiendan 4 partes de sangre diluida a 3 partes del reactivo Ficoll®; sin embargo, la práctica ha demostrado buenos resultados al utilizar 3 partes de sangre a 1 parte de medio de gradiente).

Con una pipeta, coloque con cuidado y lentamente la sangre diluida sobre el medio de gradiente.

**Sugerencia:** Suavemente, deje que la mezcla de sangre diluida con WDR baje por el costado del tubo y se acumule por encima de la superficie del Ficoll® sin romper el plano de la superficie.

- 15.4.9.2 Método de **colocación por debajo** del Ficoll®-Hypaque:

Si se quitó el plasma para almacenarlo, agregue un volumen de WDR igual al volumen de plasma que se quitó.

Mezcle suavemente y a fondo para reducir la aglutinación de células durante la separación.

**Opcional:** A la sangre entera o a la sangre-WDR, agréguele otro volumen de WDR igual al volumen total de sangre.

En función del volumen de sangre diluida con WDR, determine el volumen de medio de gradiente de densidad que se requiere para cada tubo. Con una pipeta, coloque la solución Ficoll®-Hypaque con cuidado y lentamente por DEBAJO de la sangre-WDR en tubos de centrifuga estériles de 15 ml ó 50 ml.

**Nota:** La proporción entre el Ficoll® y la sangre entera puede variar según las recomendaciones del fabricante y la experiencia del laboratorio. Por ejemplo, algunos fabricantes recomiendan 4 partes de sangre diluida a 3 partes del reactivo Ficoll®; sin embargo, la práctica en algunos laboratorios ha demostrado buenos resultados al utilizar 3 partes de sangre a 1 parte de Ficoll®.

- 15.4.10 Tape los tubos con cuidado.

**15.5 Centrifugado en gradiente de densidad y recolección de linfocitos**

- 15.5.1 Sostenga los tubos en posición vertical y transfíralos con cuidado a la centrífuga.
- 15.5.2 Centrifugue a 400 x g durante 30 minutos a una temperatura de entre 15 y 30 °C con el freno en posición OFF (apagado), según se describe en el prospecto que acompaña el medio de gradiente.
- Nota:** Si el freno está activado, afectará las capas. El freno de la centrífuga debe estar APAGADO para que la separación sea limpia y para maximizar la recuperación de PBMC. Consulte la sección 20, Cálculos, para convertir g en rpm según la longitud de su rotor.
- 15.5.3 Prepare la misma cantidad de tubos cónicos nuevos, estériles, de 15 ó 50 ml que los tubos de centrífuga utilizados para el paso de centrifugado para separación.
- 15.5.4 Etiquete cada tubo con el PTID. Utilice estos nuevos tubos para el siguiente lavado.
- 15.5.5 Retire los tubos de la centrífuga.
- 15.5.6 Si no se ve la capa de células, confirme si la centrífuga está funcionando correctamente. Corrija cualquier problema que encuentre. Vuelva a centrifugar el tubo. Documente el problema y las medidas tomadas.
- Nota:** Si aún no se ve la capa de células después de volver a centrifugar, documente, retire y deseche el sobrenadante de WDR y continúe.
- 15.5.7 Inspeccione si los tubos tienen hemólisis o coágulos pequeños visibles en la interfaz celular, que no se hayan observado con anterioridad, y documéntelos.
- Nota:** Vea si hay hemólisis o coágulos después del centrifugado. Clasifique la hemólisis de +1 a +4 según la descripción incluida en el glosario. Registre sus observaciones.
- 15.5.8 Con una nueva pipeta estéril (pipeta serológica o de transferencia) para cada PTID, retire la fracción amarillenta de plasma-WDR que se encuentra más arriba hasta llegar a, aproximadamente, 1 a 2 cm de la banda blanca turbia de PBMC ubicada en la interfaz entre la fracción de plasma-WDR (amarillenta) y la solución de medio de separación transparente. Deseche la fracción de plasma-WDR según la política del laboratorio.
- Nota:** Como alternativa, la fracción de plasma-WDR que se encuentra en la parte superior puede dejarse en su lugar, y la banda blanca turbia de PBMC puede quitarse insertando con cuidado la pipeta a través de la capa superior hasta la banda de PBMC.
- 15.5.9 Con una pipeta serológica o de transferencia estéril, recolecte todas las células en la interfaz blanca turbia. Tenga cuidado de no aspirar más solución de medio de separación de lo necesario.
- 15.5.10 Transfiera las células recolectadas de un tubo de centrífuga a un único tubo cónico correspondiente, previamente etiquetado, estéril, de 15 ó 50 ml. Los tubos pueden prellenarse con WDR hasta 5 ml (para el tubo de 15 ml) o 25 ml (para el tubo de 50 ml), para ahorrar tiempo.
- 15.5.11 Vuelva a tapar el tubo de centrífuga que contiene los glóbulos rojos restantes/el medio de separación restante y elimine el tubo como desecho biopeligroso, siguiendo la política del laboratorio.

**Pase al Capítulo 16.**

## **16 Lavado, recuento, resuspensión, concentración, y congelación a velocidad controlada durante la noche**

**Use el Capítulo 16 para todas las redes.**

### **16.1 Lavado 1:**

- 16.1.1 Agregue WDR en QS a la fracción de PBMC hasta obtener aproximadamente 10 ml (para tubos cónicos de 15 ml) o 45 ml (para tubos cónicos de 50 ml). Mezcle suavemente.
- 16.1.2 Vuelva a tapar todos los tubos de células cosechadas.
- 16.1.3 Centrifugue las células diluidas a entre 200 y 400 x g durante 10 minutos, a una temperatura de entre 15 y 30 °C (freno opcional).
- 16.1.4 Retire los tubos de la centrífuga y verifique la presencia del sedimento celular.  
  
Si no se ve el sedimento celular, confirme que la centrífuga esté funcionando correctamente. Corrija cualquier problema que encuentre. Vuelva a centrifugar el tubo. Documente el problema y las medidas tomadas en la sección de comentarios de la **Hoja de trabajo para procesamiento de PBMC**. Si aún no se ve el sedimento celular después de volver a centrifugar el tubo, documéntelo.
- 16.1.5 Retire y deseche el sobrenadante sin alterar el sedimento celular.

### **16.2 Lavado 2:**

- 16.2.1 Para tubos cónicos de 15 ml y 50 ml, resuspenda cada sedimento en un volumen pequeño (que no supere los 10 ml totales) de WDR y mezcle suavemente, pero a fondo, hasta obtener una suspensión celular homogénea.
- 16.2.2 Para tubos cónicos de 50 ml, combine hasta cuatro suspensiones de sedimentos (<20 ml en total) del mismo donante. Para tubos cónicos de 15 ml, combine hasta dos suspensiones de sedimentos (<10 ml en total) del mismo donante. Este es el tubo de células cosechadas. Agregue WDR en QS a la fracción de PBMC hasta obtener aproximadamente 10 ml (para tubos cónicos de 15 ml) o aproximadamente 45 ml (para tubos cónicos de 50 ml). Mezcle suavemente.
- 16.2.3 Use un volumen reducido de WDR para enjuagar los tubos de donde se transfirieron los sedimentos.  
  
**Nota:** La combinación del enjuague y del volumen cosechado no debe exceder los 45 ml (para tubos de 50 ml) o 10 ml (para tubos de 15 ml).
- 16.2.4 Recolecte el enjuague de WDR en el tubo de células cosechadas.
- 16.2.5 Vuelva a tapar los tubos y colóquelos en la centrífuga.

- 16.2.6 Centrifugue las células diluidas a entre 200 y 400 x g durante 10 minutos, a una temperatura de entre 15 y 30 °C (freno opcional).

Retire los tubos de la centrífuga y verifique la presencia del sedimento celular.

Si no se ve el sedimento celular, confirme que la centrífuga esté funcionando correctamente. Corrija cualquier problema. Vuelva a centrifugar el tubo. Documente el problema y las medidas tomadas en la sección de comentarios de la **Hoja de trabajo para procesamiento de PBMC**. Si aún no se ve el sedimento celular después de volver a centrifugar el tubo, documéntelo.

- 16.2.7 Retire y deseche el sobrenadante sin alterar el sedimento celular.

### 16.3 Recuento de PBMC

- 16.3.1 Registre el método de recuento utilizado en la Hoja de trabajo para procesamiento de PBMC.

- 16.3.2 Calcule y registre en la hoja de trabajo para procesamiento el volumen (V) de resuspensión para recuento de WDR. Este es el volumen sobre el que se basa el recuento celular.

**Nota:** El volumen de resuspensión debe ser de aproximadamente el 20% del volumen de sangre entera utilizable, redondeado al mililitro entero más cercano. Según el tamaño del sedimento celular, el volumen de resuspensión generalmente varía entre el 10% y el 50% del volumen de sangre entera utilizable.

- 16.3.3 Si hay más de un sedimento, use una pequeña cantidad de WDR para resuspender y combinar suavemente los sedimentos celulares en un tubo. Usando el volumen restante, enjuague los tubos de donde se transfirieron las células. Agregue el enjuague al tubo de células cosechadas.

- 16.3.4 Complete el recuento celular usando el SOP correspondiente al método de recuento celular aprobado en el laboratorio.

- 16.3.5 Mezcle las células suavemente, pero a fondo, antes de extraer las muestras para el recuento celular.

- 16.3.6 Transfiera un pequeño volumen de la resuspensión a un tubo pequeño para el recuento.

**Nota:** Si es necesario realizar varios recuentos, minimice el volumen de muestreo necesario.

- 16.3.7 Siga el SOP correspondiente al método de recuento celular aprobado en el laboratorio de procesamiento y la Hoja de trabajo para procesamiento de PBMC, para determinar la concentración de células x 10<sup>6</sup> por ml.

**Nota:** Células a 10<sup>3</sup>/μl = células a 10<sup>6</sup>/ml.

- 16.3.8 Use la sección Recuentos celulares correspondiente en la Hoja de trabajo para procesamiento de PBMC, para registrar las concentraciones de recuento celular para cada PTID (células x 10<sup>6</sup> por ml).

**Nota:** Los recuentos automáticos pueden realizarse una vez. Los recuentos manuales deben contar, al menos, los cuatro cuadrados grandes de las esquinas (1 mm<sup>2</sup>).

- 16.3.9 En la Hoja de trabajo para procesamiento de PBMC, registre el recuento celular automático o manual.

16.3.10 Calcule la cantidad total de células usando la siguiente fórmula:

$$T = C \times V$$

T = Cantidad total de células

C = Concentración ( $10^6$ /ml) determinada en el método de recuento

V = Volumen de resuspensión para recuento de WDR en ml

16.3.11 Registre la cantidad total de células (T) en la Hoja de trabajo para procesamiento de PBMC.

16.3.12 Calcule el rendimiento celular en células/ml de sangre entera utilizable usando la fórmula que aparece a continuación.

$$\text{Rendimiento celular (10}^6 \text{ células/ml)} = T / \text{Volumen de sangre entera utilizable}$$

16.3.13 Registre el rendimiento celular en la Hoja de trabajo para procesamiento de PBMC.

**Nota:** Los rendimientos celulares se calculan con fines de calidad únicamente. Consulte la sección 12, Control de calidad, para conocer el rango de rendimientos celulares previsto. Si el rendimiento celular se encuentra fuera del rango previsto, siga las pautas de resolución de problemas que se describen en la sección Control de calidad. Vuelva a realizar la dilución y el recuento, si es necesario.

16.3.14 Registre cualquier anomalía en el procesamiento, en la sección de comentarios de la Hoja de trabajo para procesamiento de PBMC.

#### 16.4 Cálculo del volumen final de resuspensión

16.4.1 Calcule el volumen de resuspensión congelado en CPS requerido completando los pasos que figuran a continuación, a fin de obtener la concentración final de células objetivo.

La concentración final de células objetivo varía en función de la red y del protocolo. Use la siguiente tabla para determinar la concentración objetivo adecuada habitual y el rango aceptable.

Red	Concentración objetivo (células/ml)	Rango aceptable (células/ml)
HVTN	$15 \times 10^6$	10 a $20 \times 10^6$
ACTG, HPTN y MTN	$10 \times 10^6$	5 a $10 \times 10^6$
IMPAACT	$10 \times 10^6$	$10 \times 10^5$

Calcule el volumen de resuspensión congelado en CPS (V1) estimado requerido usando la concentración final de células objetivo de la tabla que se encuentra arriba.

$$V1 = (T/N1) \times V2$$

T = Cantidad total de células

N1 = Concentración final de células deseada

V2 = Volumen final de la alícuota en ml

Registre el volumen estimado (V1) en la **Hoja de trabajo para procesamiento de PBMC**.

Redondee el V1 hacia abajo al 0,1 ml más cercano para determinar el volumen de resuspensión en CPS (V<sub>f</sub>) real.

**Nota para la HVTN:** Redondee el V1 hacia abajo al mililitro entero (1,0 ml) más cercano para determinar el V<sub>f</sub>.

**Nota:** Para algunas redes, el V2 será de 1 ml/criovial, de modo que la cantidad de viales requeridos será igual a los mililitros de CPS. Para el ACTG y la IMPAACT, ajuste el volumen por criovial de acuerdo con la LPC o con el protocolo.

Registre el volumen de resuspensión en CPS ( $V_f$ ) real en la **Hoja de trabajo para procesamiento de PBMC**.

- 16.4.2 Calcule la cantidad real de células por vial ( $N_2$ ) usando el volumen congelado en CPS ( $V_f$ ) real determinado en el cálculo anterior.

$$N_2 = (T / V_f) \times V_2$$

$N_2$  = Cantidad real de células por vial

T = Cantidad total de células

$V_2$  = Volumen final de la alícuota en ml

- 16.4.3 Registre la cantidad final de células por vial ( $N_2$ ) en la Hoja de trabajo para procesamiento de PBMC.
- 16.4.4 Confirme que la Hoja de trabajo para procesamiento de PBMC esté completa y que los cálculos sean correctos.

## 16.5 Etiquetado

- 16.5.1 Complete la impresión y el etiquetado de los crioviales ANTES del centrifugado final.

**Nota:** Esto es importante para asegurar que las células no permanezcan en el sedimento durante un período prolongado.

- 16.5.2 Las etiquetas de los crioviales deben generarse usando el Sistema de Gestión de Datos del Laboratorio (LDMS).

Siga la práctica de laboratorio de la red para realizar el ingreso de datos.

Controle cada tipo derivado de etiqueta de criovial para verificar que no tenga errores de ingreso de datos, en comparación con la petición del laboratorio y con la Hoja de trabajo para procesamiento ANTES de etiquetar el criovial.

Inspeccione visualmente el código de barras de la etiqueta y el área de impresión para verificar la alineación y la calidad de impresión.

Corrija los errores de ingreso de datos en el LDMS y reimprima las etiquetas, según sea necesario (asegurándose de que estén seleccionadas las identificaciones globales correspondientes).

- 16.5.3 Aplique las etiquetas en los crioviales de modo que la información sea fácil de leer y que el contenido del tubo pueda verse claramente.

**Nota para la HVTN:** Escanee los crioviales vacíos etiquetados siguiendo las pautas vigentes de la HVTN.

## 16.6 Centrifugado final

- 16.6.1 Coloque el tubo de células cosechadas en la centrífuga.

**Opcional para la HVTN:** Agregue WDR en QS a la suspensión celular hasta obtener 45 ml antes del centrifugado.

16.6.2 Centrifugue las células diluidas a entre 200 y 400 x g durante 10 minutos, a una temperatura de entre 15 y 30 °C (freno opcional).

16.6.3 Verifique que todos los crioviales estén etiquetados y que estén en un lugar de fácil acceso.

### **16.7 División en alícuotas para la criopreservación**

**Nota:** Los pasos siguientes deben realizarse rápidamente para preservar la integridad de las células. Se recomienda conservar los viales fríos en hielo común. No deje que los viales se sumerjan en el hielo común. No deje que se acumule humedad cerca de las tapas de los viales.

16.7.1 Retire y deseche el sobrenadante de WDR. Conserve el sedimento.

**Nota para el ACTG y la IMPAACT:** Si las células deben ser congeladas como sedimentos de PBMC (SED.) inviábiles, no se recomienda la resuspensión de células en un medio de congelación (CPS) debido a que el DMSO es un potente inhibidor de la reacción en cadena de la polimerasa (polymerase chain reaction, PCR). Si las PBMC han estado en contacto con el DMSO (p. ej., medio de congelación), lave el SED. dos veces con WDR antes del almacenamiento.

16.7.2 Resuspenda el sedimento usando el volumen de CPS ( $V_f$ ) frío que determinó en la sección 16.4.

**Con cuidado,** resuspenda el sedimento celular antes de agregar la CPS dando tincazos al tubo, agitándolo en la gradilla o usando una pipeta.

**Con cuidado,** agregue la CPS a las células resuspendidas agitando en forma constante.

Se pueden preenfriar los viales y/o trabajar sobre hielo común.

16.7.3 Trabaje *rápidamente* una vez que se haya agregado la CPS. No deje que las células permanezcan en la solución de congelación durante más de 10 minutos antes de colocarlas en el congelador.

16.7.4 Divida en alícuotas de 0,5 a 1 ml por tubo, según los requisitos de la red y del protocolo. Prepare una alícuota parcial final con cualquier exceso de volumen que pueda haber debido al tamaño del sedimento celular.

**Nota para la HVTN:** En lugar de crear una alícuota parcial final, distribuya de manera uniforme cualquier exceso de volumen entre todos los tubos para ese PTID.

### **16.8 Congelación a velocidad controlada durante la noche**

16.8.1 Después del procesamiento y del recuento, las células deben ser congeladas inmediatamente.

- 16.8.2 Seleccione el método de congelación que se utilizará: El modo de criopreservación StrataCooler®, el recipiente Mr. Frosty NALGENE® o CryoMed®.

**Nota:** El módulo de criopreservación StrataCooler® debe almacenarse a una temperatura de entre 2 y 8 °C antes de cada uso.

**Nota:** Idealmente, deje que el recipiente Mr. Frosty NALGENE® se equilibre a una temperatura de entre 2 y 8 °C antes de cada uso, en un refrigerador a prueba de explosiones. Si no se cuenta con un refrigerador a prueba de explosiones, deje que el recipiente Mr. Frosty NALGENE® se equilibre a temperatura ambiente antes de cada uso. El nivel de isopropanol debe ser el correcto, y el isopropanol debe reemplazarse completamente después del quinto ciclo de congelación/descongelación.

Siga el SOP correspondiente del centro para un congelador a velocidad controlada, como el CryoMed®.

- 16.8.3 Transfiera en forma inmediata todos los crioviales al recipiente de congelación a velocidad controlada.

Para el recipiente Mr. Frosty NALGENE® y para el módulo de criopreservación StrataCooler®, cierre el recipiente y colóquelo en un congelador a -80 °C (entre -65 y -95 °C), en un lugar que no se vea afectado por los reiterados accesos al congelador (es decir, alejado de la parte delantera o superior del congelador cerca de la puerta o tapa de apertura) durante un mínimo de 4 horas para el recipiente Mr. Frosty y durante toda la noche para el módulo de criopreservación StrataCooler®.

Para CryoMed®, inicie el programa de enfriamiento.

- 16.8.4 Registre la fecha y la hora a la que los crioviales se traspasaron al congelador a -80 °C (entre -65 y -95 °C) en la Hoja de trabajo para procesamiento de PBMC.

**Nota:** Esta es la hora de finalización del procesamiento.

- 16.8.5 Registre la cantidad real de crioviales congelados en la Hoja de trabajo para procesamiento de PBMC.

**Continúe con el Capítulo 17 (para el ACTG y la HVTN) o el Capítulo 18 (para la HPTN, la IMPAACT y la MTN).**

## **17 Almacenamiento en el centro a -70/-80 °C**

**Use el Capítulo 17 únicamente si las PBMC se están procesando para el ACTG o la HVTN.**

### **17.1 Transferencia de los crioviales de PBMC a un congelador a -70/-80 °C.**

17.1.1 Transfiera los crioviales desde el sistema de enfriamiento a velocidad controlada hasta el lugar de almacenamiento designado a -70/-80 °C.

**Nota:** No almacene en nitrógeno líquido (LN2).

Transfiera los crioviales después de un mínimo de 4 horas para el recipiente Mr. Frosty NALGENE® y durante toda la noche para el módulo de criopreservación StrataCooler®. Si se va a utilizar CryoMed®, transfiera los crioviales una vez finalizado el programa al congelador a -70/-80 °C.

17.1.2 Registre las iniciales de la persona que realiza la transferencia y la fecha/hora de la transferencia en la Hoja de trabajo para procesamiento de PBMC.

17.1.3 Registre la información de almacenamiento correspondiente en la Hoja de trabajo para procesamiento de PBMC según el programa de almacenamiento definido por su laboratorio.

17.1.4 Almacene a una temperatura de entre -65 y -95 °C hasta el momento del envío.

**Nota para la HVTN:** Envíe en hielo seco al depósito de muestras central dentro de las 2 semanas posteriores a la recolección.

**Nota para el ACTG:** Envíe en hielo seco dentro de las 3 a 5 semanas de la fecha de la congelación.

17.1.5 NO almacene muestras temporalmente en LN2, a menos que esto sea indicado por la red o el protocolo. NO vuelva a transferir muestras que se encuentren en LN2 a congeladores a -70/-80 °C, a menos que esto sea indicado por el equipo de la red o del protocolo.

17.1.6 Comuníquese con el personal de operaciones de laboratorio de la red si las muestras no pueden llegar a su destino final dentro del tiempo de almacenamiento temporal asignado por la red. Es necesario obtener un permiso para pasar las muestras a almacenamiento en LN2 y para realizar el envío en contenedores de LN2 si no pueden cumplirse las condiciones de almacenamiento temporal y de envío.

### **17.2 Revisión final de la hoja de trabajo**

17.2.1 El técnico debe confirmar que la Hoja de trabajo para procesamiento de PBMC esté completa y que los cálculos sean correctos.

17.2.2 Un segundo revisor verifica que la hoja de trabajo esté completa y que contenga datos exactos y, luego, coloca las iniciales y la fecha en la Hoja de trabajo para procesamiento de PBMC.

**Nota:** La HVTN requiere que todas las revisiones se completen dentro de los dos días posteriores al procesamiento.

17.2.3 Almacene la Hoja de trabajo para procesamiento de PBMC según la política del laboratorio.

**Esto indica el fin del procesamiento y del almacenamiento. Siga los procedimientos de laboratorio correspondientes para la preparación y el procesamiento de los envíos.**

## **18 Procesamiento de PBMC, Sección 6B: Almacenamiento en el centro en nitrógeno líquido (LN2)**

**Use el Capítulo 18 únicamente si las PBMC se están procesando para la HPTN, la IMPAACT o la MTN.**

### **18.1 Transferencia de los crioviales de PBMC a LN2**

- 18.1.1 El día laborable siguiente, transfiera los crioviales desde el sistema de enfriamiento a velocidad controlada hasta el lugar de almacenamiento designado en el sistema de almacenamiento en LN2.
- 18.1.2 Registre las iniciales de la persona que realiza la transferencia junto con la fecha/hora de la transferencia en la Hoja de trabajo para procesamiento de PBMC.
- 18.1.3 Registre la información de almacenamiento correspondiente en la Hoja de trabajo para procesamiento de PBMC según el programa de almacenamiento definido por su laboratorio.
- 18.1.4 Las muestras de PBMC congeladas pueden almacenarse en forma segura en LN2, indefinidamente (preferentemente, en fase de vapor).
- 18.1.5 Una vez que las muestras han sido almacenadas en LN2, todas las transferencias o envíos deben mantenerse en LN2 ( $\leq -140$  °C), y las muestras no pueden enviarse en hielo seco.  
***Nota para la IMPAACT:*** Las muestras pueden enviarse en hielo seco después del almacenamiento en LN2.
- 18.1.6 No almacene muestras temporalmente en LN2.
- 18.1.7 NO vuelva a transferir muestras que se encuentren en LN2 a congeladores a -70 °C o -80 °C, a menos que esto sea indicado por el equipo de la red o del protocolo.

### **18.2 Revisión final de la hoja de trabajo**

- 18.2.1 El técnico debe confirmar que la Hoja de trabajo para procesamiento de PBMC esté completa y que los cálculos sean correctos.
- 18.2.2 Un segundo revisor verifica que la hoja de trabajo esté completa y que contenga datos exactos y, luego, coloca las iniciales y la fecha en la Hoja de trabajo para procesamiento de PBMC.  
***Nota:*** Las revisiones deben completarse dentro de los 2 días laborables posteriores al procesamiento.
- 18.2.3 Guarde la Hoja de trabajo para procesamiento de PBMC según la política del laboratorio.

**Esto indica el fin del procesamiento y del almacenamiento.**

**Siga los procedimientos de laboratorio correspondientes para la preparación y el procesamiento de los envíos.**

## 19 Información de resultados

19.1 Se requiere una Hoja de trabajo para procesamiento de PBMC completa solo para la HVTN.

19.2 Requisitos para todas las redes:

19.2.1 Los datos se ingresan en el Sistema de Gestión de Datos del Laboratorio para generar las etiquetas de los crioviales, la documentación del lugar de almacenamiento y los requisitos de las guías de envío.

19.2.2 Las desviaciones se informan de acuerdo con el protocolo del laboratorio.

## 20 Cálculos

20.1 Las revoluciones por minuto (RPM), por lo general, se leen de un nomograma. Los nomogramas a menudo están incluidos en el manual de mantenimiento de la centrífuga. Asegúrese de usar los cuadros específicos para la centrífuga y el rotor.

20.2 Se recomienda colocar la conversión de g en RPM correspondiente en su centrífuga para que pueda usarse fácilmente como referencia.

20.3 Si no se cuenta con un nomograma, las fuerzas g pueden convertirse en RPM usando la siguiente fórmula.

$$RPM = \sqrt{\frac{g}{1.18r \times 10^{-5}}}$$

$r$  = radio del rotor en centímetros

$g$  = fuerza centrífuga relativa expresada en unidades de gravedad

$RPM$  = revoluciones por minuto

## 21 Limitaciones del procedimiento

21.1 El tiempo óptimo de procesamiento desde la recolección hasta la congelación de sangre fresca para PBMC es <8 horas desde el momento de la recolección. La función celular puede reducirse en las muestras más viejas.

21.2 El tiempo óptimo de procesamiento para PBMC es <3 horas desde el momento en que se agrega sangre a los tubos de separación de células (Accuspin™ o equivalente) hasta el inicio del ciclo de congelación a velocidad controlada.

21.3 Los estudios indican que las muestras recolectadas en anticoagulante ácido etilendiamino tetraacético (ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA) producen menores rendimientos a lo largo del tiempo.

- 21.4 Evite eliminar las cantidades excedentes de los medios de separación con la banda de PBMC, dado que esto puede incrementar la contaminación de granulocitos.
- 21.5 Evite eliminar el sobrenadante excedente con la banda de PBMC para limitar la contaminación con proteínas del plasma.

## 22 Notas del procedimiento

- 22.1 Si el plasma es muy turbio, es posible que resulte difícil ver la interfaz de gradiente de Ficoll®. Se puede mejorar la recolección de linfocitos eliminando la mayor parte del plasma que se encuentre por encima de la interfaz, con una pipeta de 10 ml, hasta que queden solo 0,5 cm restantes. Esto permite lograr un mejor posicionamiento de la punta de la pipeta para la recolección de células.
- 22.2 El almacenamiento en nitrógeno líquido (LN2) en fase de vapor es el espacio en el tanque de almacenamiento que está por encima del LN2 líquido en el fondo del tanque.

## 23 Glosario

Término	Definición
<i>ACTG</i>	Grupo de ensayos clínicos sobre el SIDA (AIDS Clinical Trials Group)
<i>Coágulos pequeños</i>	Por lo general, no suelen verse coágulos pequeños en el tubo de sangre entera, pero pueden verse en la frita del tubo de separación después del centrifugado.
<i>CPS</i>	Solución de criopreservación (Cryopreservation Solution)
<i>CSR</i>	Depósito de muestras central (Central Specimen Repository)
<i>CSTFB</i>	Tubo de separación de células con barrera de frita (Cell Separation Tube with Frit Barrier)
<i>FBS</i>	Suero bovino fetal (Fetal Bovine Serum)
<i>HBSS</i>	Solución de sal equilibrada de Hanks (Hanks' Balanced Salt Solution)
<i>Hemólisis</i>	<p>Una coloración de rosado a rojo del suero o plasma debido a la lisis de los glóbulos rojos. La hemólisis se clasifica y se informa según la siguiente escala:</p> <p>1+ Color rojo tirando a rosa pálido del suero o plasma, que permite leer claramente un periódico colocado detrás del tubo de sangre</p> <p>2+ Color rojo tirando a rosa del suero o plasma; el periódico puede leerse, pero no tan nítidamente</p> <p>3+ Color rojo tirando a rosa oscuro del suero o plasma; el periódico se ve poco claro</p> <p>4+ Color rojo caoba oscuro del suero o plasma, que no permite leer el periódico</p> <p><b>Nota:</b> Los glóbulos rojos lisados confieren al suero o plasma un</p>

Término	Definición
	aspecto coloreado pero transparente, mientras que la contaminación con glóbulos rojos confiere al suero o plasma un aspecto turbio.
<i>HI-FBS</i>	Suero bovino fetal termoinactivado (Heat Inactivated Fetal Bovine Serum)
<i>HPTN</i>	Red de ensayos de prevención del VIH (HIV Prevention Trials Network)
<i>HVTN</i>	Red de ensayos sobre vacunas contra el VIH (HIV Vaccine Trials Network)
<i>Ictérico</i>	Plasma de color verde o naranja, que sugiere la presencia de mayores niveles de bilirrubina.
<i>IMPAACT</i>	Red de ensayos clínicos internacionales sobre el SIDA en adolescentes, niños y madres (International Maternal Pediatric Adolescent AIDS Clinical Trials Network)
<i>LDMS</i>	Sistema de Gestión de Datos del Laboratorio (Laboratory Data Management System)
<i>Marcadamente coagulada</i>	Más de las $\frac{3}{4}$ partes de la masa de sangre entera está coagulada y queda muy poca sangre entera libre.
<i>Medios de DG</i>	Medios de gradiente de densidad (Density Gradient Media)
<i>MTN</i>	Red de ensayos sobre microbicidas (Microbicides Trials Network)
<i>PBMC</i>	Células mononucleares de sangre periférica (Peripheral Blood Mononuclear Cells)
<i>PBS</i>	Solución salina amortiguada con fosfato (Phosphate-buffered saline)
<i>PTID/PID</i>	Número de identificación del participante (Participant Identification Number)
<i>QS</i>	Cantidad suficiente (Quantity Sufficient): Agregar cantidad suficiente de líquido para alcanzar el volumen especificado
<i>Temperatura ambiente (Room Temperature, RT)</i>	Entre 15 y 30 °C
<i>Temperatura de la centrifuga</i>	Entre 15 y 30 °C
<i>WDR</i>	Reactivo de dilución y lavado (Wash Diluent Reagent) (HBSS, PBS o RPMI; el RPMI puede usarse únicamente para el ACTG/la IMPAACT)

## 24 Referencias

- 24.1 Bull M., Lee B., Stucky J., Chiu Y.L., Rubin A., Horton H. y McElrath M.J. Defining blood processing parameters for optimal detection of cryopreserved antigen-specific responses for HIV vaccine trials. (Definición de los parámetros de procesamiento de sangre para lograr una detección óptima de las respuestas específicas al antígeno criopreservado para ensayos sobre vacunas contra el VIH). J. Immunol. Methods 322:57-69 (2007).**

- 24.2 CHAVI SOP for PBMC Isolation and Cryopreservation (SOP del Centro de Inmunología para Vacunas contra el VIH-SIDA [Center for HIV-AIDS Vaccine Immunology, CHAVI] para el aislamiento y la criopreservación de PBMC), CHAVI-A0001, v5, 3 de nov. de 2008.
- 24.3 Cox J.H., DeSouza M., Ratto-Kim S., Ferrari G., Weinhold K.J. y Birx B.L. Cellular Immune assays for evaluation of Vaccine efficacy in developing countries. (Ensayos sobre inmunidad celular para evaluar la eficacia de la vacuna en los países en desarrollo). Manual of Clinical laboratory Immunology (Manual de inmunología para laboratorios clínicos). Rose N.R., Hamilton R.G., Detrick B. Ed. (6.ª ed.) p. 301-315 (2002).
- 24.4 Islam B., Lindbert A. y Christensen B. Peripheral blood cells preparation influences the level of expression of leukocyte cell surface markers as assessed with quantitative multicolor flow cytometry. (La preparación de células de sangre periférica influye en el nivel de expresión de los marcadores de superficie celular de los leucocitos según la evaluación con citometría de flujo multicolor cuantitativa). Cytometry 22:128-134 (1995).
- 24.5 Immunovirology Research Network (IVRN) Laboratory Manual: Separation and storage of serum, plasma and PBMCs. (Manual de laboratorio de la Red de Investigación en Inmunovirología [IVRN]: Separación y almacenamiento de suero, plasma y PBMC). IVRN. 12 de dic. de 2007.
- 24.6 Kierstead L.S., Dubey S., Meyer B., Tobery T.W., Mogg R., Fernandez V.R., Long R., Guan L., Gaunt C., Collins K., Sykes K.J., Mehrotra B.V., Chirmule N., Shiver J.W. y Casimiro B.R. Enhanced rates and magnitude of immune responses detected against an HIV vaccine: effect of using an optimized process for isolating PBMC. (Mejores tasas y magnitud de las respuestas inmunitarias detectadas contra una vacuna contra el VIH: Efecto de la utilización de un proceso optimizado de aislamiento de PBMC). AIDS Res Hum Retroviruses 23:86-92 (2007).
- 24.7 Shearer W.T., Rosenblatt H.M., Gelman R.S., Oyomopito R., Plaeger S., Stiehm E.R., Wara D.W., Douglas S.D., Luzuriaga K., McFarland E.J., Yogev R., Rathore M.H., Levy W., Graham B.L., Spector S.A.; Pediatric AIDS Clinical Trials Group. Lymphocyte subsets in healthy children from birth through 18 years of age: the Pediatric AIDS Clinical Trials Group P1009 study. (Subconjuntos de linfocitos en niños sanos desde el nacimiento hasta los 18 años: Estudio P1009 del Grupo de ensayos clínicos sobre el SIDA pediátrico). J Allergy Clin Immunol. 112(5):973-80 (2003).
- 24.8 Sigma-Aldrich Accuspin™ System-Histopaque®-1,077, número de procedimiento A6929/A7054/A0561, con fecha 2003-09.
- 24.9 Weinberg A., Betensky R., Zhang L. y Ray G. Effect of shipment, storage, anticoagulant, and cell separation on lymphocyte proliferation assays for human immunodeficiency virus-infected patients. (Efectos del envío, el almacenamiento, los anticoagulantes y la separación celular en los ensayos sobre proliferación de linfocitos para pacientes infectados con el virus de inmunodeficiencia humana). Clin. Diagn. Lab. Immunol. 5:804-807 (1998).

## **25 Documentos adicionales (que deben ser conservados por el laboratorio)**

- 25.1 Prospecto de FBS (y Certificado de Análisis)
- 25.2 Prospecto de WDR (HBSS, PBS o RPMI)
- 25.3 Prospecto del medio de gradiente de densidad
- 25.4 Prospecto del tubo de separación de células con barrera de fritada

## **26 Apéndices**

### **26.1 Apéndice A: Hoja de trabajo para procesamiento de PBMC**

El Apéndice A también se proporciona en versión descargable y editable en el sitio web público de HANC en <http://www.hanc.info/labs/Pages/PBMCSOP.aspx>.

### **26.2 Apéndice B: Modelo de diario de cambios del isopropanol del recipiente Mr. Frosty NALGENE®**

### **26.3 Apéndice C: Resolución de problemas: Recuperación de PBMC ante la ausencia de una banda definida de PBMC después del centrifugado en gradiente de densidad**

### **26.4 Apéndice D: Combinación de capas leucocíticas para el aislamiento de PBMC con Ficoll**

### **26.5 Apéndice E: Guía rápida del SOP de PBMC entre redes: Tubos CSTFB**

### **26.6 Apéndice F: Guía rápida del SOP de PBMC entre redes: Método de colocación manual por encima del Ficoll®**

**Apéndice A: Hoja de trabajo para procesamiento de PBMC (Requerida para la HVTN)**

Laboratorio de procesamiento de muestras:

ID del participante (PTID):	Visita:	Protocolo:
Fecha de la recolección:	Hora:	
Fecha de comienzo del procesamiento:	Hora:	Procesado por:

Reactivos/fabricante	Número de lote			Fecha de vencimiento
DMSO (Fabr.: _____)				
FBS (Fabr.: _____)				
HBSS u otro WDR (Fabr.: _____)				
Tubo de separación de células (Fabr.: _____)				
Medio de gradiente de densidad (Fabr.: _____)				
	Volumen en ml			
CPS	CPS	DMSO	FBS	1 día laborable
Datos que deben registrarse durante el procesamiento				Muestra
Tipo de tubo para muestras (marque una opción con un círculo)				NaHep/ACD/EDTA
Estado de la sangre (marque una o más opciones con un círculo)				NORMAL/HEMÓL./COAGULADA
Volumen de sangre entera utilizable				ml
Método de recuento (nombre del instrumento o recuento manual)				
Volumen de resuspensión para recuento en HBSS (u otro WDR) ( <b>V</b> )				ml
Concentración promedio del recuento celular ( <b>C</b> )				$\times 10^6$ células/ml
Cantidad total de células ( <b>T</b> ) = <b>C x V</b>				$\times 10^6$ células
Cálculo de rendimiento celular/ml de sangre entera (verificación de QC) = $(T/volumen\ de\ sangre\ entera\ utilizable)$				$\times 10^6$ células/ml
Cálculo del vol. estimado de resuspensión en CPS ( <b>V1</b> )				ml
Cálculo del vol. final de resuspensión en CPS ( <b>Vj</b> ), redondeado hacia ABAJO al mililitro entero más cercano				ml
Cálculo de la cantidad real de células por vial <b>N2</b> = $(Volumen\ de\ alícuota * T)/(Vj)$ ; el volumen de alícuota de la HVTN es igual a 1 ml.				$\times 10^6$ células/vial
Fecha y hora de finalización del procesamiento (Incluir una nota en comentarios si no se realizó en el término de 8 horas desde el comienzo del procesamiento)				h:min
Impresión y QC del contenido/los códigos de barras de las etiquetas del LDMS (iniciales de la persona que realiza el QC)				
Cantidad de crioviales efectivamente congelados <b>Nota:</b> Debe ser igual al volumen de resuspensión congelado para alícuotas de 1 ml.				
Para la HVTN, completar las entradas en el LDMS, incluido el tiempo de congelación.				

**Apéndice A: Hoja de trabajo para procesamiento de PBMC (Requerida para la HVTN)**

Laboratorio de procesamiento de muestras:

PTID:

Transferencia de crioviales al almacenamiento en congelador	
Persona que transfirió los crioviales a las ubicaciones en las cajas de almacenamiento asignadas por el LDMS	
Fecha (ddmmaaaa)/hora en que los crioviales se transfirieron desde el dispositivo de enfriamiento lento a la caja de almacenamiento. (La muestra debe mantenerse a -70/-80 °C durante la transferencia)	
Revisión final	
Revisor/fecha	

Recuentos con hemocitómetro	Recuento total	Células viables	Células no viables	
Cuadrado n.º 1 (células/mm <sup>2</sup> )				
Cuadrado n.º 2 (células/mm <sup>2</sup> )				
Cuadrado n.º 3 (células/mm <sup>2</sup> )				
Cuadrado n.º 4 (células/mm <sup>2</sup> )				
Recuento celular promedio por cuadrado (células/mm <sup>2</sup> )				
Factor de dilución de PBMC (1:DF*)				
Factor del hemocitómetro para células/ml	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	
Concentración del recuento celular (C) = (promedio de células/mm <sup>2</sup> )(DF)(10 <sup>4</sup> ); convertir a 10 <sup>6</sup> células/ml	x 10 <sup>6</sup> células/ml	x 10 <sup>6</sup> células/ml	x 10 <sup>6</sup> células/ml	
% de viabilidad = (células viables/células totales)(100)	No aplicable		No aplicable	No aplicable
Recuentos celulares automáticos (10 <sup>3</sup> /μl=10 <sup>6</sup> /ml)	Recuento n.º 1			
Recuento celular (C) como células x 10 <sup>6</sup> /ml				
Factor de dilución de PBMC (1:DF*)				
Concentración de células = (C)(DF)	x 10 <sup>6</sup> células/ml			

\*Nota: Factor de dilución (DF) = (partes de células + partes de líquido de dilución)/ partes de células

Recuentos celulares con el contador Guava (10 <sup>3</sup> /μl=10 <sup>6</sup> /ml)	Recuento n.º 1			
Recuento celular (C) como células x 10 <sup>6</sup> /ml				
Células totales (T) como células x 10 <sup>6</sup>				
% de viabilidad				

Comentarios y desviaciones del Protocolo:



**Esta página se deja en blanco intencionalmente.**

***Apéndice C: Resolución de problemas: Recuperación de PBMC ante la ausencia de una banda definida de PBMC después del centrifugado en gradiente de densidad***

**C.1 Aspectos generales:**

- C.1.1 Si se produce alguna falla durante el centrifugado en gradiente de densidad de la sangre, las capas de Ficoll® y de plasma se mezclan y, como consecuencia, no puede verse la capa de PBMC. No se asuste. Las PBMC pueden recuperarse siguiendo algunos pasos adicionales.

**C.2 Identifique el problema:**

- C.2.1 Retire los tubos de la centrífuga y transfíeralos a una gradilla.
- C.2.2 Trate de determinar por qué se mezcló la muestra. A continuación, se enumeran las posibles causas:
- C.2.2.1 El tubo se cayó.
  - C.2.2.2 Se dejó activado el freno.
  - C.2.2.3 La velocidad de centrifugado fue demasiado rápida. Verifique que la configuración de rpm haya sido la correcta para el procedimiento utilizado (CSTFB o separación manual de células en gradiente de densidad) revisando el cuadro de RCF/rpm para el rotor. Algunas centrifugas requieren que las configuraciones de la centrífuga coincidan con el tipo de cubeta utilizada. Si las configuraciones no son correctas, la centrífuga puede calcular erróneamente su velocidad.
  - C.2.2.4 La centrífuga se detuvo debido a una interrupción del suministro eléctrico.
  - C.2.2.5 La frita se salió de lugar. (Con frecuencia, esto se debe a una velocidad de centrifugado demasiado alta, pero, ocasionalmente, puede haber un tubo defectuoso en la partida).
  - C.2.2.6 La centrífuga estaba desequilibrada.

**C.3 De las causas mencionadas, las primeras cinco se pueden resolver fácilmente. Si la causa se debe a una centrífuga desequilibrada, determine por qué la centrífuga estaba desequilibrada. Verifique lo siguiente:**

- C.3.1 Verifique que los tubos hayan sido equilibrados.
- C.3.2 Verifique que las cubetas de la centrífuga hayan sido equilibradas.
- C.3.3 Verifique que los brazos y las cubetas de la centrífuga hayan sido engrasados y aceitados en forma adecuada.

**Nota:** En caso de tener alguna duda con respecto a la centrífuga, use otra.

**C.4 Suponiendo que el problema está resuelto, vuelva a centrifugar las muestras de la siguiente manera:**

- C.4.1 Reactivos:
  - C.4.1.1 Ficoll®
  - C.4.1.2 Tubos de 50 ml

C.4.1.3 Pipetas

C.4.2 Método:

**Nota:** El Ficoll® es tóxico para las células, de modo que debe trabajar con eficiencia

C.4.2.1 Agregue 15 ml de Ficoll® a los tubos estériles de 50 ml (no a los tubos CSTFB).

C.4.2.2 Deje que el Ficoll® alcance la temperatura ambiente mientras trabaja con la muestra.

C.4.2.3 Por cada tubo mezclado, etiquete los tubos de 50 ml con el PTID del sujeto. Use una pipeta para eliminar lentamente el contenido de la muestra mezclada del tubo de separación o de CSTFB. (Por lo general, la frita del CSTFB se habrá salido de lugar).

C.4.2.4 Transfiera hasta un máximo de 30 ml de la muestra mezclada al tubo que contiene Ficoll®.

C.4.2.5 Repita este procedimiento para todas las muestras mezcladas.

C.4.2.6 Coloque los tubos en la centrífuga y verifique que los tubos estén equilibrados.

C.4.2.7 Centrifugue durante 30 a 40 minutos a 400 x g con el freno en posición OFF (apagado) a una temperatura de entre 15 y 30 °C.

C.4.2.8 Ahora debe poder verse una capa de PBMC. (Con frecuencia, se pierden algunas células, de modo que la capa puede ser delgada).

C.4.2.9 En esta etapa, puede recolectarse la capa superior, que es plasma posiblemente contaminado con Ficoll®, y procesarse según se describe en las Secciones 'Aislamiento de PBMC y de plasma' y 'Almacenamiento de plasma' del protocolo principal. Sin embargo, la información acerca de que esta muestra de plasma puede estar contaminada con Ficoll® debe ingresarse en la sección de comentarios de esta muestra en el LDMS.

C.4.2.10 Con cuidado, transfiera la capa de PBMC a un tubo de centrífuga de 50 ml etiquetado con el identificador PTID. Utilice un tubo nuevo para cada tubo que contiene Ficoll®.

C.4.2.11 Vuelva a tapar el tubo que contiene Ficoll®.

C.4.2.12 Regrese al Capítulo 16 del protocolo principal.

**Nota:** En la sección "Comentarios y desviaciones del Protocolo" de la **Hoja de trabajo para procesamiento de PBMC**, registre los detalles de la desviación del SOP (es decir, que se siguieron los pasos del "Apéndice B" para recuperar las PBMC debido a la ausencia de una banda definida de PBMC después del centrifugado en gradiente de densidad). Además, señale cuánto tiempo demoró el recentrifugado, a fin de proporcionar una estimación de cuánto tiempo estuvieron las células en Ficoll®. También indique que la muestra de plasma recuperada estaba posiblemente contaminada con Ficoll® en la **Hoja de trabajo para procesamiento de PBMC** y en la sección de comentarios de la entrada en el LDMS para las muestras de plasma.

***Apéndice D: Combinación de capas leucocíticas para el aislamiento de PBMC con Ficoll***

El procedimiento puede usarse al aislar PBMC de múltiples tubos de sangre. Este procedimiento permite consolidar las capas leucocíticas para reducir el consumo de Ficoll. Si se realiza correctamente, la combinación de capas leucocíticas da como resultado grandes cantidades de células que, por lo general, están muy limpias.

Generalmente, pueden colocarse las capas leucocíticas de dos tubos de 10 ml en 6 ml de Ficoll® o en una solución de separación en gradiente de densidad equivalente, en un tubo cónico de 15 ml. Al combinar capas leucocíticas, puede usarse un solo tubo cónico de 50 ml con Ficoll® para procesar hasta seis tubos de 10 ml con EDTA.

Procedimiento:

- D1. Centrifugue la sangre con EDTA (o heparina o ACD) a 400 x g durante 10 minutos.
- D2. Coseche plasma de cada tubo hasta aproximadamente 5 mm de la capa leucocítica blanca.
- D3. Agregue 2 ml de WDR a un tubo estéril de polipropileno de 10 ml y déjelo en la campana de flujo laminar.
- D4. Sostenga el tubo al que se le redujo el plasma (que ahora contiene únicamente concentrado de glóbulos rojos) a un ángulo de alrededor de 30°. Use una pipeta desechable de polipropileno, estéril, de diámetro grande, para cosechar la capa leucocítica. Aspire la capa leucocítica avanzando a lo largo del extremo inferior del tubo. La capa leucocítica se “desliza” por la capa de concentrado de glóbulos rojos y la mayor parte de los glóbulos blancos sale en el primer mililitro del aspirado. Transfiera la capa leucocítica al tubo que contiene WDR y enjuague la pipeta de 2 a 3 veces con WDR/suspensión celular. Coseche y combine las capas leucocíticas de los tubos restantes. Según la cantidad original de tubos para recolección de sangre, la suspensión de la capa leucocítica será de alrededor de 5 ml.
- D5. Para capturar las células adheridas a la pipeta desechable, agregue 3 ml de WDR en un tubo desechable estéril de 5 ml y enjuague el contenido de la pipeta en los 3 ml de WDR fresco. Combine las células enjuagadas con las capas leucocíticas primarias agrupadas.
- D6. Mezcle suavemente la combinación de capas leucocíticas de 3 a 4 veces con una pipeta estándar de 10 ml y coloque la suspensión de capa leucocítica en estrato sobre el Ficoll.
- D7. Continúe con el SOP sobre el aislamiento estándar con Ficoll.

Materiales adicionales necesarios:

- Un tubo estéril de polipropileno de 10 ml para la cosecha de 15 ml con Ficoll  
○  
Un tubo de 50 ml para una cosecha de 50 ml con Ficoll (con experiencia, el estrato de Ficoll puede colocarse por debajo de la combinación en tubo de 50 ml).
- Un tubo estéril de 5 ml para enjuagar la pipeta.
- Una pipeta estéril de polipropileno de 2,5 ml, de diámetro grande.

**Nota:** Intente estratificar las combinaciones de capas leucocíticas de modo que el material combinado quede diluido en una proporción aproximada de 1:2 (capa leucocítica: diluyente), de la misma forma que para la sangre entera.

**Esta página se deja en blanco intencionalmente.**

**Apéndice E: Guía rápida del SOP de PBMC: Tubos CSTFB**

Se **requiere** el uso de la **Hoja de trabajo para procesamiento de PBMC** (Apéndice A) **para la HVTN**. Antes de usar esta guía rápida por primera vez, asegúrese de revisar el SOP de PBMC completo para ver las notas y detalles importantes, y las pautas específicas de la red.

<b>Pasos</b> (Las cantidades para los volúmenes de muestra más pequeños están en <i>bastardilla</i> ).	<b>Referencia al SOP</b>
1. Prepare y enfríe la CPS.	10.3
2. Prepare las muestras de sangre entera, los reactivos y los suministros.	14.2
3. Si <b>se requieren</b> alícuotas de plasma, según las instrucciones del protocolo: a. Centrifugue la sangre entera a entre 200 y 400 x g durante 10 minutos. b. Marque el volumen de sangre total en el menisco y, luego, transfiera el plasma a un tubo de centrifuga de 15 ó 50 ml para continuar el procesamiento (entre 800 y 1.200 x g durante 10 minutos, freno opcional). c. Agregue una cantidad suficiente de WDR para llevar la sangre nuevamente a su volumen original de sangre entera, mezcle suavemente y continúe el procesamiento de PBMC.	14.3
4. Agregue 5 ml (2 ml) de WDR en cada CSTFB. 5. Transfiera de 10 a 20 ml (4 a 5 ml) de sangre en los CSTFB etiquetados. 6. Agregue el enjuague de tubos con WDR y el WDR final a los tubos CSTFB hasta alcanzar los 30 ml (7,5 ml) (WDR + sangre entera).	14.4
7. Centrifugue a entre 800 y 1.000 x g durante 15 minutos, a una temperatura de entre 15 y 30 °C, con el <u>freno en posición OFF</u> (apagado). 8. Inspeccione los tubos para detectar posibles problemas. 9. Coseche cada capa leucocítica de CSTFB en un único tubo cónico de 50 ml (15 ml) correspondiente.	14.5
10. Agregue WDR en QS hasta obtener un volumen total de 45 ml (10 ml) y mezcle suavemente. 11. Lavado n.º 1: Centrifugue a entre 200 y 400 x g durante 10 minutos, a una temperatura de entre 15 y 30 °C (freno opcional). 12. ¡Verifique la presencia de los sedimentos celulares! 13. Con cuidado, retire el sobrenadante, sin alterar el sedimento celular.	16.1
14. Resuspenda el sedimento celular en una pequeña cantidad de WDR hasta lograr una suspensión celular homogénea. 15. Combine hasta 4 suspensiones de sedimento en un tubo cónico de 50 ml (2 en un tubo de 15 ml). 16. Agregue el enjuague de tubos con WDR y el WDR final de 45 ml (10 ml) al tubo de células. 17. Lavado n.º 2: Centrifugue a entre 200 y 400 x g durante 10 minutos, a una temperatura de entre 15 y 30 °C (freno opcional). 18. ¡Verifique la presencia de los sedimentos celulares! 19. Con cuidado, retire el sobrenadante, sin alterar el sedimento celular.	16.2
20. Calcule el volumen (V) de resuspensión para recuento de WDR. 21. Combine los sedimentos celulares en un tubo usando el WDR del volumen de resuspensión. Este es el volumen sobre el que se basa el recuento celular. 22. Realice el recuento y calcule la cantidad total de células. 23. Calcule el rendimiento celular en células/ml de sangre entera utilizable.	16.3
24. Calcule el volumen final de resuspensión en CPS. Revise los cálculos.	16.4
25. Complete la impresión, el etiquetado y el control de calidad de los crioviales ANTES del centrifugado final.	16.5

<b>Pasos</b> (Las cantidades para los volúmenes de muestra más pequeños están en <i>bastardilla</i> ).	<b>Referencia al SOP</b>
26. Centrifugue a entre 200 y 400 x g durante 10 minutos, a una temperatura de entre 15 y 30 °C (freno opcional).	16.6
27. Con cuidado, retire el sobrenadante, sin alterar el sedimento celular. 28. Resuspenda suavemente el sedimento en CPS <b>fría</b> ( $V_f$ ) mientras agita el tubo para lograr una distribución uniforme. Se recomienda trabajar sobre hielo común. 29. Con cuidado, realice alícuotas de CPS-células.	16.7
30. Inmediatamente ( $\leq 10$ minutos) transfiera todos los crioviales al equipo de congelación a velocidad controlada e inicie la congelación.	16.8
31. Después del período correspondiente, transfiera los crioviales al equipo de almacenamiento en el centro y envíelos dentro del período designado por la red.	17 ó 18
32. Para la HVTN, revise que la <b>Hoja de trabajo para procesamiento de PBMC</b> esté completa y que contenga datos exactos.	17.2

**Apéndice F: Guía rápida del SOP de PBMC: Método de colocación manual por encima del Ficoll®**

Se **requiere** el uso de la **Hoja de trabajo para procesamiento de PBMC** (Apéndice A) **para la HVTN**. Antes de usar esta guía rápida por primera vez, asegúrese de revisar el SOP de PBMC completo para ver las notas y detalles importantes, y las pautas específicas de la red.

<b>Pasos</b> (Las cantidades para los volúmenes de muestra más pequeños están en <i>bastardilla</i> ).	<b>Referencia al SOP</b>
1. Prepare y enfríe la CPS.	10.3
2. Prepare las muestras de sangre entera, los reactivos y los suministros.	14.2
3. Si <b>se requieren</b> alícuotas de plasma, según las instrucciones del protocolo: a. Centrifugue la sangre entera a entre 200 y 400 x g durante 10 minutos. b. Marque el volumen de sangre total en el menisco y, luego, transfiera el plasma a un tubo de centrifuga de 15 ó 50 ml para continuar el procesamiento (entre 800 y 1.200 x g durante 10 minutos, freno opcional). c. Agregue una cantidad suficiente de WDR para llevar la sangre nuevamente a su volumen original de sangre entera, mezcle suavemente y continúe el procesamiento de PBMC.	15.3
4. Transfiera la sangre entera a un tubo de centrifuga estéril de 50 ml ( <i>15 ml</i> ) y dilúyala con WDR, según sea necesario. 5. Cuidadosa y lentamente, coloque la capa de sangre por encima de la parte superior del medio de gradiente de densidad. (El método de colocación por debajo del Ficoll® es una alternativa aprobada).	15.4
6. Centrifugue a 400 x g durante 30 minutos con el <u>freno en posición OFF</u> (apagado). 7. Revise cada tubo de la centrifuga para detectar posibles problemas. 8. Coseche cada capa leucocítica en un único tubo de centrifuga cónico de 50 ml ( <i>15 ml</i> ) correspondiente.	15.5
9. Agregue WDR en QS hasta obtener un volumen total de 45 ml ( <i>10 ml</i> ) y mezcle suavemente. 10. Lavado n.º 1: Centrifugue a entre 200 y 400 x g durante 10 minutos, a una temperatura de entre 15 y 30 °C (freno opcional). 11. ¡Verifique la presencia de los sedimentos celulares! 12. Con cuidado, retire el sobrenadante, sin alterar el sedimento celular.	16.1
13. Resuspenda el sedimento celular en una pequeña cantidad de WDR hasta lograr una suspensión celular homogénea. 14. Combine hasta 4 suspensiones de sedimento en un tubo cónico de 50 ml ( <i>2 en un tubo de 15 ml</i> ). 15. Agregue el enjuague de tubos con WDR y el WDR final de 45 ml ( <i>10 ml</i> ) al tubo de células. 16. Lavado n.º 2: Centrifugue a entre 200 y 400 x g durante 10 minutos, a una temperatura de entre 15 y 30 °C (freno opcional). 17. ¡Verifique la presencia de los sedimentos celulares! 18. Con cuidado, retire el sobrenadante, sin alterar el sedimento celular.	16.2
19. Calcule el volumen (V) de resuspensión para recuento de WDR. 20. Combine los sedimentos celulares en un tubo usando el WDR del volumen de resuspensión. Este es el volumen sobre el que se basa el recuento celular. 21. Realice el recuento y calcule la cantidad total de células. 22. Calcule el rendimiento celular en células/ml de sangre entera utilizable.	16.3
23. Calcule el volumen final de resuspensión en CPS. Revise los cálculos.	16.4
24. Complete la impresión, el etiquetado y el control de calidad de los crioviales ANTES del	16.5

<b>Pasos</b> (Las cantidades para los volúmenes de muestra más pequeños están en <i>bastardilla</i> ).	<b>Referencia al SOP</b>
centrifugado final.	
25. Centrifugue a entre 200 y 400 x g durante 10 minutos, a una temperatura de entre 15 y 30 °C (freno opcional).	16.6
26. Con cuidado, retire el sobrenadante, sin alterar el sedimento celular. 27. Resuspenda suavemente el sedimento en CPS <b>fría</b> ( $V_f$ ) mientras agita el tubo para lograr una distribución uniforme. Se recomienda trabajar sobre hielo común. 28. Con cuidado, realice alícuotas de CPS-células.	16.7
29. Inmediatamente ( $\leq 10$ minutos) transfiera todos los crioviales al equipo de congelación a velocidad controlada e inicie la congelación.	16.8
30. Después del período correspondiente, transfiera los crioviales al equipo de almacenamiento en el centro y envíelos dentro del período designado por la red.	17 ó 18
31. Para la HVTN, revise que la <b>Hoja de trabajo para procesamiento de PBMC</b> esté completa y que contenga datos exactos.	17.2