

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





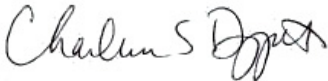
Approved By	Network	Name, Title	Signature	Date
	ACTG	Robert W. Coombs, MD, PhD, FRCPC ACTG Network Laboratory Principal Investigator		7/7/2009
	HPTN	Estelle Piwowar-Manning, MT(ASCP)SI HPTN Network Laboratory Deputy Director		6/30/2009
	HVTN	Constance Ducar, MT-ASCP HVTN International Laboratory Program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

Table des matières

1	Objectif	3
2	Portée	3
3	Contexte	3
4	Autorité et responsabilité	3
5	Spécimen	3
6	Équipement	5
7	Matériaux jetables	6
8	Équipement de protection du personnel	7
9	Réactifs	8
10	Préparation du réactif	10
11	Calibrage	13
12	Contrôle de la qualité	13
13	Présentation du traitement des PBMC et directives	15
14	Séparation cellulaire et dilution du sang avec remplacement facultatif du plasma par tube de séparation cellulaire comportant une barrière frittée (CSTFB) Le chapitre 14 peut être utilisé pour tous les réseaux ; vérifier les exigences du protocole et les matériels disponibles. Utiliser soit le chapitre 14, soit le chapitre 15, mais pas les deux.	16
15	Séparation cellulaire par application manuelle sur ou sous couche Ficoll® et dilution du sang avec remplacement facultatif du plasma par séparation cellulaire manuelle en gradient de densité Le chapitre 15 peut être utilisé pour tous les réseaux ; vérifier les exigences du protocole et les matériels disponibles. Utiliser soit le chapitre 14, soit le chapitre 15, mais pas les deux.	20
16	Lavage, numération, resuspension, concentration et congélation à vitesse contrôlée pendant la nuit Le chapitre 16 concerne tous les réseaux.....	24
17	Conservation sur site à une température de -70/-80 °C Le chapitre 17 concerne l'ACTG et le HVTN	30
18	Section 6B du traitement des PBMC : conservation sur place dans de l'azote liquide (LN2) Le chapitre 18 concerne l'IMPAACT, les HPTN et les MTN.....	31
19	Rapport des résultats	32
20	Calculs	32
21	Limitations de la procédure	33
22	Remarques procédurales	33
23	Glossaire	33
24	Références	35
25	Documents supplémentaires (maintenus par le laboratoire)	36
26	Annexes	36
	Annexe A : Formulaire de traitement des PBMC*	A1
	Annexe B : Exemple Journal des modifications isopropanol de Mr. Frosty NALGENE®	B1
	Annexe C : Dépannage : récupération des PBMC en l'absence de bande PBMC définie après centrifugation en gradient de densité	C1
	Annexe D : Rassemblement des couches leucocytaires pour isolation des PBMC par la méthode Ficoll®	D1
	Annexe E : Guide rapide de la SOP sur le traitement des PBMC inter-réseaux – tubes CSTFB	E1
	Annexe F : Guide rapide de la SOP sur le traitement des PBMC inter-réseaux – Méthode manuelle d'application sur couche	F1

*L'annexe A est également disponible en version téléchargeable et révisable sur le site Internet public HANC à l'adresse <http://www.hanc.info/labs/Pages/PBMC SOP.aspx>.

1 Objectif

- 1.1 Cette procédure opérationnelle standard (Standard Operating Procedure, SOP) décrit les procédures pour l'isolation et la cryoconservation de cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) à partir du sang entier.

2 Portée

- 2.1 Cette procédure doit être utilisée pour le traitement des échantillons sanguins pour l'isolation, la cryoconservation et le stockage des échantillons de PBMC.

3 Contexte

- 3.1 Les PBMC fraîchement prélevées ou cryoconservées sont utilisées pour l'évaluation de vaccins ou de réponses cellulaires immunitaires induites par thérapie antirétrovirale, des changements associés au VIH dans la réponse immunitaire et la récupération de virus aptes à la réplication. Ces tests nécessitent que les PBMC aient été isolées et cryoconservées dans des conditions strictement définies afin d'assurer une récupération, une viabilité et une fonctionnalité optimales. Certaines études de validation indiquent que les conditions optimales consistent à traiter et à congeler le sang dans les huit heures suivant le prélèvement sanguin afin de maintenir la fonction maximale des cellules dans les tests de surveillance immunitaire. Le HVTN exige que la durée totale entre le prélèvement et la congélation soit inférieure ou égale à huit heures. Pour les autres réseaux, le délai peut varier ; vérifier les documents du protocole approprié.

4 Autorité et responsabilité

- 4.1 Le directeur du laboratoire de réseau (ou son délégué) détient l'autorité nécessaire pour établir, examiner et mettre à jour cette procédure.
- 4.2 Le bureau du réseau de coordination du VIH SIDA (HANC) est responsable de la maintenance et du contrôle des documents de la SOP.
- 4.3 L'investigateur principal/le directeur du laboratoire est responsable de la mise en place de cette procédure ou d'une version de réseau équivalente et de veiller à ce que tout le personnel concerné soit formé.
- 4.4 Il est de la responsabilité de tous les techniciens de lire et de comprendre cette SOP avant d'effectuer les procédures décrites.

5 Spécimen

- 5.1 Préparation du patient

Aucune

5.2 Type de spécimen

Sang entier anticoagulé prélevé dans des tubes de prélèvement

5.3 Volume optimal/minimal de spécimen

Volume sanguin requis déterminé par le protocole

5.4 Conditions de manipulation

- 5.4.1 Les spécimens de sang entier anticoagulé frais doivent être conservés à température ambiante (de 15 à 30 °C) à partir du moment du prélèvement et jusqu'à son arrivée au laboratoire/unité de traitement.
- 5.4.2 Les spécimens de sang entier anticoagulé frais doivent être livrés à l'unité de traitement du laboratoire dès que possible après le prélèvement afin d'accorder au laboratoire suffisamment de temps pour réaliser la procédure de cryoconservation.
- 5.4.3 Les spécimens de sang entier anticoagulé frais doivent être traités par l'unité de traitement du laboratoire dès que possible après réception. Le HVTN exige que la durée totale entre le prélèvement et la congélation soit inférieure ou égale à 8 heures. Pour les autres réseaux, le délai peut varier ; vérifier les documents du protocole approprié. Enregistrer l'heure du prélèvement sur le **formulaire de traitement des PBMC** (Annexe A) et/ou dans le LDMS.
- 5.4.4 Ne pas réfrigérer ni congeler le sang complet.
- 5.4.5 Enregistrer l'heure à laquelle le traitement a commencé sur le **formulaire de traitement des PBMC** ou sur le document d'enregistrement équivalent.
- Remarque** : l'utilisation du **formulaire de traitement des PBMC** est *requis* par le HVTN pour suivre la durée de traitement et documenter les problèmes pouvant survenir en cours de traitement. Le **formulaire de traitement des PBMC** est disponible dans les annexes et à l'adresse <http://www.hanc.info/labs/Pages/PBMC SOP.aspx>.
- Remarque** : l'utilisation du **formulaire de traitement des PBMC** est *recommandée* par les ACTG, le HPTN, l'IMPACT et les MTN, mais ces réseaux peuvent également utiliser un document d'enregistrement équivalent, comme le système de gestion des données de laboratoire (Laboratory Data Management System, LDMS), pour ce but.
- 5.4.6 Si certains des tubes de spécimen sanguins contiennent de petits caillots, essayer de les retirer avant le traitement. Enregistrer le nombre total de tubes contenant des petits caillots dans la section des commentaires sur le **formulaire de traitement des PBMC** ou dans le LDMS.
- 5.4.7 L'hémolyse peut affecter la qualité des PBMC. Noter toutes les hémolyses dans le **formulaire de traitement des PBMC** en utilisant les définitions d'hémolyses figurant dans la section du glossaire. Si les spécimens sont grossièrement hémolysés (de 3+ à 4+), tenter l'isolation des PBMC et la cryoconservation. Si le rendement cellulaire est significativement en dessous de la gamme attendue, conserver les PBMC avec les notes appropriées et demander un éventuel remplacement du spécimen à l'hôpital.

5.5 Spécimens inacceptables

- 5.5.1 Les spécimens non étiquetés ou mal étiquetés seront rejetés.

- 5.5.2 Si seulement quelques tubes Vacutainer® de sang d'un lot de PTID contiennent de gros caillots (voir glossaire), ces tubes peuvent être jetés si cette pratique est acceptable pour le réseau (voir notes ci-dessous), et ceux ne comportant pas de caillots peuvent être traités.

Remarque pour le HVTN : traiter les tubes dont le sang contient des caillots avec les commentaires appropriés dans le **formulaire de traitement des PBMC**. Si le rendement cellulaire est inférieur à $0,4 \times 10^6$ cellules/ml), demander un éventuel remplacement de l'échantillon à l'hôpital.

Remarque pour l'ACTG, l'IMPACT, les HPTN et les MTN : tout le sang doit être traité et les complications doivent être notées dans le **formulaire de traitement des PBMC** et/ou dans le LDMS, sauf en cas d'instructions contraires du DTL (Diagramme de traitement laboratoire), du PSS (Protocole spécifique au centre) ou de la SOP (Procédure opérationnelle standard). Si tous les tubes Vacutainer® de sang d'un lot de PTID comportent des caillots, retirer les caillots et continuer à traiter la fraction de sang restante.

Remarque : dans la section « Commentaires et écarts au protocole » du **formulaire de traitement des PBMC**, noter le nombre de tubes comportant des caillots et le nombre total de tubes du lot du PTID. Le cas échéant, enregistrer les détails du traitement de sang comportant des caillots. Si le sang comportant des caillots est traité, saisir « à partir de sang comportant des caillots » dans la section des commentaires de la saisie dans le LDMS pour les spécimens de PBMC et les spécimens plasmatiques.

Enregistrer le nombre total de tubes ayant été jetés en raison du grand nombre de caillots ou grossièrement hémolysés dans la section des commentaires du **formulaire de traitement des PBMC**.

- 5.5.3 Documenter tous les états inattendus du spécimen dans le **formulaire de traitement des PBMC** et saisir les informations dans le système de gestion des données de laboratoire, comme dans la section des commentaires du système de gestion des données de laboratoire (LDMS).

6 Équipement

Les fournisseurs et l'équipement recommandés sont listés. Sauf en cas de spécification contraire, un équipement de qualité égale ou supérieure à celui recommandé peut être utilisé.

6.1 Préparation et traitement

- 6.1.1 Enceinte de sécurité biologique à flux laminaire, comme mise en place par le laboratoire (P2, P2.5 ou P3)
- 6.1.2 Centrifugeuse, capable d'atteindre de faibles accélérations (de 300 à 1 000 x g), munie d'un récipient de rotation à bascule, de préférence réfrigérée, à température ambiante acceptable
- 6.1.3 Micropipettes, gamme de 20, 200, 1 000 µL
- 6.1.4 Pipet-Aid (de préférence sans fil) pour pipettes sérologiques jetables
- 6.1.5 Réfrigérateur à une température comprise entre 2 et 8 °C
- 6.1.6 -20 °C (ou à une température inférieure) **sans** dégivrage automatique (pour conserver du SVF)
- 6.1.7 -80 °C (entre -65 et -95°C) ; pour la conservation à court terme des PBMC

- 6.1.8 Bain d'eau à une température comprise entre 37 et 56 °C
- 6.1.9 Récipient ou bécber pour l'eau de Javel ou autre désinfectant pour rincer les pipettes si requis par les pratiques de sécurité locales

6.2 Équipement à azote liquide (LN2) (si requis par le réseau)

- 6.2.1 Réservoir de stockage de LN2 (≤ -140 °C)
- 6.2.2 Conteneur de transport sec de LN2 approuvé par l'IATA

6.3 Numération cellulaire (sélectionner une des options suivantes)

- 6.3.1 Compteur cellulaire automatisé capable d'énumérer les cellules viables (Beckman-Coulter Vi-Cell, Guava PCA® ou équivalent)
- 6.3.2 Chambre de numération cellulaire manuelle (hémacytomètre Neubauer) et microscope à champ lumineux
- 6.3.3 Compteur cellulaire automatisé ne permettant pas d'énumérer les cellules viables (Coulter Counter, Abbott CelDyne™, Sysmex® ou équivalent) utilisé en parallèle avec un hémacytomètre pour énumérer les cellules viables.

Remarque pour le HVTN : un compteur cellulaire automatisé ne permettant pas d'identifier les cellules viables peut être utilisé pour obtenir une numération cellulaire totale sans énumération des cellules viables.

Remarque pour les laboratoires participants au programme de test de maîtrise de la cryoconservation IQA des PBMC : l'évaluation de la viabilité est requise.

6.4 Cryoconservation (utiliser l'une des options suivantes)

- 6.4.1 StrataCooler® Cryo (Stratagene). Le StrataCooler® Cryo doit être à une température comprise entre 2 et 8 °C avant de commencer le refroidissement des tubes cryogéniques. Ne pas placer les tubes cryogéniques dans un StrataCooler® Cryo dont la température initiale est inférieure à 2 °C.
- 6.4.2 NALGENE® Mr. Frosty, boîte de congélation progressive de 1 C par minute°. Mr. Frosty doit être conservé à température ambiante (entre 15 et 30 °C).

Remarque : remplacer l'isopropanol tous les cinq cycles de congélation/décongélation. Un journal doit être tenu pour suivre les cycles de congélation/décongélation et les modifications du réactif. Voir Annexe B.

- 6.4.3 Congélateur à vitesse contrôlée, comme la chambre de congélation CryoMed® (Gordinier)

7 Matériaux jetables

7.1 Plastiques

- 7.1.1 Pipettes sérologiques jetables de 1, 5, 10, 25, 50 ml, stériles
- 7.1.2 Pointes de précision pour pipettes, 20, 100, 200, 1 000 µL, stériles
- 7.1.3 Tubes à centrifuger jetables de 15 et de 50 ml, stériles, à fond conique, en polypropylène gradué.

7.1.4 Flacons cryogéniques (cryovials), de 1,8 à 2 ml, bouchon à visser avec joint torique, stériles, autoportants, gradués, antifuites, formulés pour la conservation de l'azote liquide (LN2) en phase vapeur (approximativement à -140 °C).

Produits de la marque NALGENE® NUNC®, référence catalogue n° 377267 ; Wheaton, référence catalogue n° 985742 ; Fisher Scientific, référence catalogue n° 05-669-57 ; Corning, référence catalogue n° 430659 (12,7 x 49 mm) ; SARSTEDT, référence catalogue n° 72.694.006.

Remarque : toutes les marques de tubes cryogéniques cryovials ne conviennent pas à la conservation à long terme de LN2. Vérifier avec le ou les réseaux concernés ou le fabricant avant la substitution de cet article.

7.1.5 Facultatif : bouteilles/flacons stériles, jetables, à col de 45 mm, de 250 à 500 ml

7.1.6 Facultatif : pipettes de transfert en plastique de 5 ml stériles, emballées individuellement

7.1.7 Facultatif : si des tubes préremplis de séparation cellulaire munis de barrières frittées (CSTFB) ne sont pas utilisés, des tubes CSTFB vides (voir paragraphe 9.2 pour plus de détails) ou des tubes à centrifuger jetables de 15 et de 50 ml, comme dans le paragraphe 7.1.3, seront requis.

7.2 Marqueurs

Les marqueurs pour écrire sur les tubes et les flacons de traitement doivent avoir une pointe fine et contenir une encre indélébile à séchage rapide. (Exemple : Fisher Scientific, marqueur à pointe-feutre fine).

Facultatif : des marqueurs de différentes couleurs peuvent être utiles pour le code couleur de différents PTID.

7.3 Étiquettes

Étiquettes cryogéniques convenant à une température de -80 °C et à l'azote liquide (LN2).

Exemples : Cryo-Tags® et Cryo-Babies® de chez Diversified Biotech, Brady B461 ou B490, étiquettes pour congélateur Shamrock.

8 Équipement de protection individuel

Un équipement de protection individuel convenant à la manipulation des agents pathogènes à diffusion hémotogène est requis. Suivre les directives et les pratiques du laboratoire local pour la manipulation de produits sanguins.

8.1 Blouse de laboratoire

8.2 Protection oculaire

8.3 Gants en nitrile non poudrés ou équivalents

8.4 Des cryogants et des écrans faciaux (avec protège-menton facultatif) sont nécessaires avec l'utilisation de l'azote liquide (LN2)

9 Réactifs

9.1 Réactifs diluants de lavage (WDR)

Solution saline équilibrée de Hank (HBSS*) sans calcium ni magnésium, prête à l'emploi.

*Alternative : 1X tampon phosphate salin sans calcium ni magnésium, prêt à l'emploi.

**Alternative pour ACTG et IMPAACT : milieu RPMI sans SVF ni antibiotiques.

Remarque : conserver les flacons ouverts à la température recommandée par le fabricant jusqu'à leur utilisation ou jusqu'à la date d'expiration du fabricant. Jeter les flacons en cas de signes visibles de contamination qui se développent, tels qu'un aspect trouble.

9.2 Tube de séparation cellulaire prérempli avec barrière frittée (CSTFB)

La capacité du tube requise dépendra du volume total de sang

Volume total de sang (ml)	Capacité du tube (ml)
≥ 15	50
<15	12 ou 14

Tubes CSTFB préremplis, de 12 à 14 ml ou tubes de 50 ml avec milieu à gradient de densité de 1,077 (exemples : Accuspin™ System Histopaque®-1077 de Sigma ou Ficoll-Paque™ PLUS de Greiner Bio-One) :

Conditions de conservation :

- Conserver au réfrigérateur (à une température comprise entre 2 et 8 °C)
- Conserver à l'abri de la lumière
- Utiliser avant la date d'expiration du fabricant
- Un aspect trouble indique la détérioration du produit.
- Laisser les tubes CSTFB atteindre la température ambiante (entre 15 et 30 °C) avant utilisation

Alternatives au système de tubes CSTFB préremplis :

Combiner un tube CSTFB sec avec un milieu à gradient de densité de 1,077.

Capacité du tube (ml).	Volume du milieu à gradient de densité (ml).
50 ml	15 ml
12 à 14 ml	3 ml

Des exemples sont donnés ci-dessous :

Dry CSTFB (tubes)

- Tubes de séparation Dry Accuspin™ (12 ml ou 50 ml)
- Tubes de séparation Dry Leucosep® (14 ml ou 50 ml)

Milieu à gradient de densité de 1,077

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

Remarque : en cas d'utilisation de tubes CSTFB, se conformer au [chapitre 14](#). En cas d'utilisation d'une méthode manuelle d'application sur couche (sans barrière frittée), se conformer au [chapitre 15](#).

9.3 Réactifs de congélation

9.3.1 Sérum foetal bovin (SVF), de préférence inactivé par la chaleur

Vérifier avec le ou les réseaux concernés quels sont les fournisseurs préférés. Toutes les marques de SVF ne sont pas équivalentes. Les problèmes concernant le contrôle de la qualité, la toxicité, le contexte et l'expédition/importation doivent être abordés avant de changer de fournisseurs.

Obtenir un certificat d'analyse de la part du fournisseur pour les dossiers de contrôle de la qualité du laboratoire local.

Remarque : une copie du certificat d'analyse du SVF peut être exigée pour l'exportation (ou l'importation) d'aliquotes de PBMC entre pays.

Le SVF conservé congelé (≤ -20 °C) est bon jusqu'à la date d'expiration du fabricant.

Le SVF décongelé et conservé à une température comprise entre 2 et 8° C, reste stable pendant un mois.

9.3.2 Diméthylsulfoxyde (DMSO) de grade culture cellulaire

Veiller à utiliser un DMSO de grade culture cellulaire, par exemple, Hybrimax, Sigma-Aldrich référence catalogue n° D2650, testé pour les endotoxines et les hybridomes.

Conserver les flacons non ouverts à température ambiante (entre 15 et 30 °C). Vérifier la date d'expiration sur le flacon.

Le DMSO doit être frais et maintenu stérile. (Le réactif peut être aliquoté en petites quantités afin d'aider à conserver sa stérilité). Indiquer la date d'ouverture sur l'étiquette.

Après ouverture du flacon, le DMSO non dilué reste stable à température ambiante (entre 15 et 30 °C), quand il est conservé à l'abri de la lumière et de l'humidité, pendant 6 mois.

Utiliser une technique aseptique pour retirer le DMSO du flacon afin d'éviter une éventuelle contamination.

Jeter le flacon en cas de signes visibles de contamination.

9.3.3 Désinfectant

9.3.3.1 Désinfectant éthanol à 70 % v/v, en pulvérisateur

9.3.3.2 Eau de javel à 10 % v/v, récipient ou béccher et pulvérisateur

9.3.3.3 Autre désinfectant, tel que spécifié par la politique du laboratoire local

9.4 Réactifs de numération cellulaire

En cas de numération cellulaire manuelle, les réactifs suivants sont nécessaires :

9.4.1 Solution de bleu trypan à 0,4 %

9.4.2 Facultatif : une solution au cristal violet à 0,05 % peut être utilisée pour colorer le noyau cellulaire afin que les cellules mononucléées puissent être identifiées et comptées à l'aide d'un hémacytomètre. Si la viabilité est requise, une deuxième numération manuelle à l'aide d'une solution de bleu trypan peut être effectuée.

La solution au cristal violet à 0,05 % contient :

0,05 g de cristal violet

2 ml d'acide acétique glacial

98 ml H₂O distillée ou désionisée

10 Préparation du réactif

10.1 SVF inactivé par la chaleur

Le SVF inactivé par la chaleur peut être commandé auprès du fabricant. Si l'on reçoit du SVF inactivé par la chaleur, suivre ces instructions pour la décongélation, l'aliquotage et l'utilisation.

10.1.1 Retirer le SVF inactivé par la chaleur du congélateur à -20 °C.

10.1.2 Le décongeler dans le réfrigérateur (température comprise entre 2 et 8 °C), de préférence, ou pendant plusieurs heures à température ambiante. Ne pas laisser le SVF inactivé par la chaleur à température ambiante plus longtemps qu'il n'est nécessaire pour terminer le processus de décongélation.

10.1.3 Le faire tourner délicatement deux ou trois fois durant la décongélation.

10.1.4 Une fois décongelé, mélanger délicatement, mais complètement le SVF inactivé par la chaleur en utilisant une technique aseptique. L'aliquoter dans des tubes coniques de 50 ml, stériles et étiquetés, ou dans une autre taille d'aliquotes appropriée pour le travail anticipé.

Remarque : les étiquettes doivent identifier ces tubes comme étant du « SVF inactivé par la chaleur » et comprendre le numéro de lot, la date de l'aliquote, la date d'expiration et les initiales du technicien. Le SVF reste stable pendant un mois à une température comprise entre 2 et 8 °C ou jusqu'à la date d'expiration originale du fabricant à -20 °C.

10.1.5 Réfrigérer (à une température comprise entre 2 et 8 °C) le nombre de tubes d'aliquotes nécessaires pour le travail anticipé. Bien mélanger avant utilisation. Les tubes d'aliquotes qui ne sont pas immédiatement nécessaires peuvent être placés dans un congélateur à -20 °C et restent stables jusqu'à la date d'expiration originale du fabricant.

Remarque : des cycles répétés de congélation/décongélation auront un effet indésirable sur la qualité du SVF. Ne pas congeler des aliquotes qui ont été conservées à des températures réfrigérées.

10.1.6 Pour utiliser les aliquotes congelées, les décongeler pendant une nuit dans le réfrigérateur, de préférence, ou pendant plusieurs heures à température ambiante. Modifier la date d'expiration à un mois. Bien mélanger avant utilisation.

10.2 Préparation de l'inactivation du SVF par la chaleur

Si le SVF n'est pas inactivé par la chaleur par le fabricant, l'inactiver par la chaleur en suivant les instructions ci-dessous.

10.2.1 Retirer le SVF du congélateur à -20 °C.

10.2.2 Le décongeler dans le réfrigérateur (à une température comprise entre 2 et 8 °C), de préférence, ou pendant plusieurs heures à température ambiante. Ne pas laisser le SVF à température ambiante plus longtemps qu'il n'est nécessaire pour terminer le processus de décongélation.

10.2.3 Le faire tourner délicatement deux ou trois fois durant le cours de la décongélation.

- 10.2.4 Placer le SVF dans un bain d'eau à 56 °C (entre 55 et 57 °C). Surveiller attentivement la température de l'eau. **Des températures plus élevées peuvent dégrader les composants du SVF.**

Remarque : le niveau d'eau dans le bain d'eau doit couvrir le niveau du SVF dans le flacon, mais ne doit pas toucher le bouchon du flacon. Cela permettra de chauffer le SVF tout en évitant la contamination.

- 10.2.5 Une fois que l'eau du bain aura atteint la température de 56 °C (entre 55 et 57 °C), chauffer le SVF pendant 30 minutes en mélangeant toutes les 5 à 10 minutes. **Chauffer pour plus longtemps peut dégrader les composants du SVF.**

Remarque : si le haut du flacon entre en contact avec l'eau du bain, le tamponner avec de l'éthanol à 70 % v/v avant l'ouverture du flacon.

- 10.2.6 Mélanger délicatement, mais complètement le SVF en utilisant une technique aseptique. Aliquoter dans des tubes coniques de 50 ml, stériles et étiquetés.

Remarque : les étiquettes doivent identifier ces tubes comme étant du « SVF inactivé par la chaleur » et comprendre le numéro de lot, la date de l'aliquote, la date d'expiration et les initiales du technicien. Le SVF reste stable pendant un mois à une température comprise entre 2 et 8 °C, ou jusqu'à la date d'expiration originale du fabricant s'il est conservé à -20°C.

Réfrigérer (à une température comprise entre 2 et 8 °C) le nombre de tubes d'aliquotes nécessaires pour le travail anticipé. Bien mélanger avant utilisation.

Remarque : des cycles répétés de congélation/décongélation auront un effet indésirable sur la qualité du SVF. Ne pas congeler des aliquotes qui ont été conservées à des températures réfrigérées.

- 10.2.7 Les tubes d'aliquotes restants peuvent retourner dans le congélateur à -20 °C et restent stables jusqu'à la date d'expiration originale du fabricant.

- 10.2.8 Lorsqu'on est prêt à utiliser les aliquotes congelées, les décongeler dans le réfrigérateur pendant la nuit, de préférence, ou pendant plusieurs heures à température ambiante. Modifier la date d'expiration à un mois. Bien mélanger avant utilisation.

10.3 Solution de cryoconservation fraîche (Fresh Cryopreservation Solution, CPS)

10.3.1

Composants	Pourcentage (v/v)
DMSO	10 %
SVF (inactivé par la chaleur)	90 %

10.3.2 Préparation de la CPS

Utiliser un récipient jetable stérile de 15 ml ou de 50 ml pour préparer la CPS. Le mélange du DMSO et du SVF est une réaction exothermique. La CPS doit être préparée à l'avance et refroidie dans le réfrigérateur (à une température comprise entre 2 à 8 °C) pendant au moins 30 minutes ou dans un bain de glace pendant au moins 15 minutes avant utilisation.

Remarque pour les HPTN, le HVTN, les MTN : la CPS peut être conservée à une température comprise entre 2 et 8 °C pendant un jour ouvrable (<18 heures).

Remarque pour l'ACTG, l'IMPAACT : la CPS peut être préparée en lots plus larges et conservée à -20 °C pendant pas plus d'un jour ouvrable et décongelée à une température comprise entre 2 et 8 °C avant utilisation.

10.3.3 Utiliser la formule ci-dessous pour **estimer** le volume de CPS à préparer. Des exemples sont également fournis.

$$\text{Sang entier utilisable (ml)} \times \text{rendement cellulaire (cellules/ml)} \times \text{concentration congelée (ml/cellules)} = \text{CPS estimée (ml)}$$

Arrondir au ml entier le plus proche.

Exemples : sang d'adulte — prélèvement d'un grand volume de sang

Sang entier utilisable x	Rendement cellulaire x	Concentration de congélation =	CPS estimée à préparer
(10 ml) x	(1,5 x 10 ⁶ cellules/1 ml) x	(1 ml/15 x 10 ⁶ cellules) =	1 ml
(85 ml) x	(1,0 x 10 ⁶ cellules/1 ml) x	(1 ml/15 x 10 ⁶ cellules) =	6 ml
(140 ml) x	(1,5 x 10 ⁶ cellules/1 ml) x	(1 ml/15 x 10 ⁶ cellules) =	14 ml

Exemples : sang pédiatrique/adolescent — prélèvement d'une petite quantité de volume de sang

Sang entier utilisable x	Rendement cellulaire x	Concentration de congélation =	CPS estimée à préparer
(10 ml) x	(1,5 x 10 ⁶ cellules/1 ml) x	(0,5 ml/5 x 10 ⁶ cellules) =	2 ml
(2 ml) x	(1,0 x 10 ⁶ cellules/1 ml) x	(0,5 ml/2,5 x 10 ⁶ cellules) =	1 ml

10.3.4 Utiliser les formules suivantes pour calculer les quantités de DMSO et de SVF nécessaires.

Volume estimé de CPS	Volume du DMSO = (0,1)(volume de la CPS)	Volume du SVF inactivé par la chaleur = volume de la CPS – volume du DMSO	Volume total de la CPS = Volume du DMSO + volume du SVF
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 Enregistrer les volumes de CPS, de DMSO et de SVF sur le **formulaire de traitement des PBMC**.

10.4 Réactifs de numération

Les exigences pour les réactifs de numération varieront selon la méthode utilisée. Voir les instructions pour la méthode utilisée.

10.4.1 Solution de bleu de trypan à 0,4 %

10.4.2 Facultatif : solution de cristal violet à 0,05 %

11 Calibrage

11.1 Aucun calibrage n'est requis pour les étapes du traitement.

11.2 Suivre les procédures de calibrage de laboratoire appropriées si l'on utilise un compteur cellulaire automatisé.

12 Contrôle de la qualité

12.1 Rendements cellulaires

Les rendements cellulaires sont assez constants dans les populations. Les populations de nourrissons génèrent généralement des rendements lymphocytaires plus élevés que les populations adultes. De même, **les patients atteints du sida ou d'une maladie VIH à un stade avancé peuvent être lymphopéniques. Il est important de connaître la récupération attendue qui doit être obtenue** pour la population de participants pour lesquels le traitement est effectué. En fonction de cette cohérence, les rendements cellulaires peuvent servir de marqueurs de contrôle internes de la qualité pour chaque tour. Les rendements en dehors des fourchettes attendues peuvent indiquer une erreur de procédure, une détérioration du réactif, une erreur de la numération cellulaire ou de calcul. Les recommandations fournies ci-dessous sont destinées à fournir des directives pour permettre d'identifier des erreurs techniques flagrantes avant la cryoconservation. Ces valeurs peuvent varier en fonction de l'anticoagulant utilisé.

12.1.1 Rendements cellulaires attendus

Population	Fourchette de rendements de cellules mononuclées (cellules/ml)
Adulte	$0,7 \times 10^6$ à 3×10^6
Enfant – patient âgé de moins de 6 mois	3×10^6 à 10×10^6
Enfant – patient âgé de 6 mois à 2 ans	2×10^6 à 9×10^6
Enfant – patient âgé de 2 à 5 ans	1×10^6 à 6×10^6
Enfant – patient âgé de plus de 5 ans	$0,8 \times 10^6$ à 4×10^6
Enfant – âge du patient inconnu	1×10^6 à 10×10^6

12.1.2 Rendements cellulaires inattendus

Si les rendements cellulaires sont en dehors des fourchettes attendues, examiner les schémas de dilution, les calculs, la technique de traitement (en particulier le mélange adéquat des suspensions de numération cellulaire) ainsi que les antécédents du PTID s'ils sont disponibles pour identifier les raisons possibles. Les rendements cellulaires de patients infectés par le VIH peuvent être inférieurs à ceux indiqués dans le tableau ci-dessus. Si la dilution cellulaire ou des erreurs de numération sont suspectées, préparer une dilution fraîche et effectuer de nouveau la numération.

Enregistrer tous les résultats et tous les problèmes survenant durant le traitement sur le **formulaire de traitement des PBMC**.

Remarque pour le HVTN : enregistrer les problèmes et les actions dans la section des commentaires sur le rendement cellulaire des dossiers de contrôle de la qualité interne.

12.2 Viabilité des cellules

La viabilité des PBMC fraîches est assez constante. Un temps de traitement long, une mauvaise technique et occasionnellement, un spécimen de participant spécifique peuvent affecter la viabilité de manière indésirable. Pour les réseaux nécessitant la viabilité des cellules (voir section 6.3), calculer et enregistrer le pourcentage de cellules viables sur le formulaire.

12.2.1 La viabilité de PBMC fraîchement isolées doit être supérieure à 95 %.

12.2.2 Si la viabilité de PBMC fraîches est inférieure à 95 %, examiner les résultats avec le superviseur et documenter sur le formulaire de traitement des PBMC.

12.3 Temps de manipulation

Les temps de manipulation peuvent affecter de manière indésirable la récupération et la viabilité des cellules. Les temps de prélèvement, de manipulation et de traitement sont enregistrés sur le **formulaire de traitement des PBMC** et/ou dans le LDMS.

12.3.1 Temps attendus

- Le HVTN exige que la durée totale entre le prélèvement et la congélation soit inférieure ou égale à 8 heures. Pour les autres réseaux, la limite de temps peut varier.
- Le HVTN exige que le temps de traitement réel entre l'introduction de sang frais dans les tubes à gradient de densité et l'initiation de la congélation à vitesse contrôlée soit compris entre deux et trois heures pour la préservation maximale de l'intégrité cellulaire. Pour les autres réseaux, la limite de temps peut varier.

12.3.2 Temps de traitement inattendus (long)

Examiner tous les temps de traitement longs avec le superviseur et documenter sur le **formulaire de traitement des PBMC** et/ou dans le LDMS.

12.4 Formulaire de traitement des PBMC

Pour le HVTN : l'utilisation du **formulaire de traitement des PBMC** est **requise pour suivre le temps de traitement, les calculs et la documentation de problèmes survenant durant le traitement**. Le **formulaire de traitement des PBMC** est fourni à l'annexe A. Ce formulaire est également disponible en version téléchargeable et révisable à l'adresse <http://www.hanc.info/labs/Pages/PBMC SOP.aspx>.

Pour les autres réseaux : l'utilisation du **formulaire de traitement des PBMC** est recommandée.

13 Traitement des PBMC Présentation et directives

Il existe des principes et des étapes standard communs à toutes les procédures de traitement des PBMC. Des variantes ont lieu avec le choix des techniques de séparation (CSTFB prérempli par rapport à la technique manuelle application sur couche), le traitement du sang (dilution avec ou sans remplacement de plasma par rapport à la récolte de plasma), la concentration cellulaire finale et la congélation/conservation. Sélectionner les sections appropriées de la procédure pour la séparation cellulaire et le traitement du sang ainsi que pour la congélation et la conservation en fonction du réseau et des exigences du protocole.

Chapitre du traitement des PBMC	Utiliser pour ces réseaux
<p><i>Séparation cellulaire et traitement du sang</i></p> <p>Chapitre 14 : séparation cellulaire et dilution du sang avec remplacement du plasma facultatif par tube de séparation avec barrière frittée (CSTFB)</p> <p style="text-align: center;">OU</p> <p>Chapitre 15 : séparation cellulaire par la méthode manuelle d'application sur et sous couche Ficoll® et dilution de sang avec remplacement facultatif du plasma par séparation cellulaire manuelle à gradient de densité</p>	<p>Peut être utilisé pour tous les réseaux ; vérifier les exigences du protocole et les matériels disponibles</p> <p>Peut être utilisé pour tous les réseaux ; vérifier les exigences du protocole et les matériels disponibles</p>
<p><i>Lavage, numération, resuspension, concentration et congélation pendant la nuit à vitesse contrôlée</i></p> <p>Chapitre 16</p>	<p>Tous les réseaux</p>
<p><i>Conservation sur place</i></p> <p>Chapitre 17 : conservation sur place à une température de -70/-80 °C</p> <p style="text-align: center;">OU</p> <p>Chapitre 18 : conservation sur place dans de l'azote liquide (LN2)</p>	<p>ACTG et HVTN</p> <p>IMPAACT, HPTN et MTN</p>

14 Séparation cellulaire et dilution du sang avec remplacement facultatif du plasma avec un tube de séparation cellulaire avec barrière frittée (CSTFB)

Le chapitre 14 peut être consulté pour tous les réseaux ; vérifier les exigences du protocole et les matériels disponibles. Pour tout échantillon donné, se conformer soit au chapitre 14, soit au chapitre 15, mais pas aux deux.

14.1 Séparation des lymphocytes du sang périphérique à l'aide de tubes de séparation CSTFB préremplis

- 14.1.1 Tout le pipetage et le mélange ont lieu dans une enceinte de sécurité microbiologique (ESM) de niveau 2 ou supérieur.
- 14.1.2 Pulvériser sur toutes les surfaces, tous les plateaux et tous les flacons de réactifs de l'éthanol à 70 % v/v ou un désinfectant équivalent avant d'entrer et d'utiliser l'ESM.
- 14.1.3 Sauf si noté autrement, la procédure est effectuée à température ambiante (entre 15 et 30 °C).
- 14.1.4 Utiliser une nouvelle pipette pour chaque numéro d'identification de participant (PTID) et additif.

14.2 Préparer les échantillons de sang entier, les réactifs et les fournitures.

- 14.2.1 Avant le traitement ou suffisamment de temps avant le mélange avec les PBMC, préparer et refroidir la CPS (voir chapitre 10 Préparation du réactif).
- 14.2.2 Si les tubes de spécimens sont froids au toucher (en raison de conditions ambiantes froides telles que le transport pendant les mois les moins chauds), laisser les tubes atteindre la température ambiante avant le traitement.
- 14.2.3 Enregistrer sur le **formulaire de traitement des PBMC** (et/ou équivalent) : le PTID, le numéro de visite, la date/l'heure du prélèvement, la date/l'heure du début du traitement, les numéros de lots ainsi que les dates d'expiration des volumes de tous les réactifs, CPS, DMSO et SVF.
- 14.2.4 Avant d'ajouter le sang, vérifier visuellement les tubes CSTFB pour voir s'il y a du liquide au-dessus de la barrière frittée. S'il y a du liquide au-dessus de la barrière frittée, centrifuger les tubes CSTFB à une vitesse de 1 000 x g pendant 30 secondes. Si de la solution à gradient de densité reste au-dessus de la barrière frittée après la centrifugation, il doit être aspiré.
- 14.2.5 Vérifier soigneusement le PTID sur tous les tubes de sang reçus. Organiser les tubes principaux de telle manière qu'il ne puisse y avoir aucune possibilité de les mélanger entre les PTID ou les anticoagulants dans un lot PTID.

Suggestion : placer tous les tubes pour chaque PTID/anticoagulant sur un seul plateau. Différents plateaux peuvent être utilisés pour séparer les PTID ou les types de tubes, et une couleur de marqueur différente peut être utilisée pour chaque PTID afin d'éviter toute confusion.

14.3 Remplacement facultatif du plasma

N'effectuer cette étape de remplacement du plasma que *si* des aliquotes de plasma sont requises conformément aux instructions du protocole. Si des aliquotes de plasma ne sont pas requises, sauter cette étape et passer à l'étape 14.4.

Remarque pour l'IMPAACT : le remplacement du plasma est requis.

- 14.3.1 Les tubes de prélèvements sanguins provenant du même PTID et du même anticoagulant peuvent être traités individuellement ou rassemblés dans des tubes coniques de 50 ml.
- 14.3.2 Inscrire le volume de sang entier au niveau du ménisque.
- 14.3.3 Centrifuger le sang entier à une vitesse comprise entre 200 et 400 x g pendant 10 minutes.
- 14.3.4 Transférer le plasma dans un tube à centrifuger de 15 ou de 50 ml pour une deuxième centrifugation afin d'éliminer tout débris cellulaire.
- 14.3.5 Ajouter une quantité suffisante de WDR (voir section 9.1) pour ramener le sang entier à son volume d'origine, mélanger délicatement et continuer le traitement des PBMC à l'étape 14.4.
- 14.3.6 Terminer le traitement du plasma en centrifugeant le prélèvement de plasma à une vitesse comprise entre 800 et 1 200 x g pendant 10 minutes. Cela peut s'effectuer plus tard, lorsque la centrifugeuse n'est pas utilisée pour le traitement des PBMC.
- 14.3.7 Aliquoter le plasma centrifugé dans des tubes d'aliquotes étiquetés, comme spécifié dans le protocole et éliminer tout débris cellulaire dans le tube de plasma centrifugé.

14.4 Dilution du sang pour la séparation CSTFB

Remarque : une mesure précise du volume de sang utilisable doit être déterminée et enregistrée sur le **formulaire de traitement des PBMC** et dans le LDMS, le cas échéant. Cela peut se faire à l'aide d'une pipette stérile pour transférer le sang entier dans les tubes CSTFB et suivre le volume de sang à mesure qu'il est pipeté, ou en rassemblant le sang dans un récipient gradué avant de le transférer dans les tubes CSTFB et en prenant la mesure à partir du récipient.

Remarque : le rapport maximal entre le sang et le WDR doit être approximativement de 2 : 1. Utiliser un tube de 50 ml pour chaque 10 à 20 ml de sang entier d'adulte (ou un tube de 12 à 14 ml pour chaque 4 à 5 ml de sang entier d'enfant). Utiliser autant de tubes CSTFB que nécessaire pour répartir tout le sang de chaque PTID.

Remarque : le Ficoll® est toxique pour les cellules ; travailler rapidement et efficacement durant les étapes de la séparation.

- 14.4.1 14.4.1 Étiqueter chaque tube CSTFB avec le PTID.
- 14.4.2 Si un tube comporte de gros caillots (voir glossaire), éliminer le.
- 14.4.3 Documenter le type de spécimen reçu, le nombre total de tubes éliminés et l'état du sang sur le **formulaire de traitement des PBMC**.
- 14.4.4 À l'aide d'une pipette stérile, ajouter 5 ml (pour les adultes) ou 2 ml (pour les enfants) de WDR à chaque tube CSTFB.
- 14.4.5 Mélanger délicatement le sang entier puis utiliser une pipette stérile pour transférer de 10 à 20 ml (pour les adultes) ou de 4 à 5 ml (pour les enfants) de sang dans les tubes CSTFB étiquetés.

14.4.6 À l'aide d'une pipette stérile, rincer le tube original de sang anticoagulé avec du WDR, ajouter les volumes de rinçage aux tubes CSTFB en veillant à ne pas dépasser 30 ml (pour les adultes) ou 7,5 ml (pour les enfants) du volume total du tube (WDR + sang entier).

14.4.7 Enregistrer le volume de sang utilisable sur le **formulaire de traitement des PBMC**.

Remarque : ne pas estimer le volume de sang utilisable en fonction de la taille du tube.

Remarque : ne pas inclure le volume de WDR utilisé pour diluer l'échantillon de sang.

14.4.8 Boucher soigneusement les tubes CSTFB.

14.5 Centrifugation de la densité CSTFB et prélèvement

14.5.1 Tenir les tubes en position verticale et les transférer délicatement dans la centrifugeuse.

14.5.2 Centrifuger à une vitesse comprise entre 800 et 1 000 x g pendant 15 minutes à une température comprise entre 15 et 30 °C avec le frein sur ARRÊT.

Remarque : la séparation des PBMC peut être améliorée pour certains spécimens en centrifugeant à une vitesse de 1 000 x g.

Remarque : si le frein est en marche, cela perturbera les couches. Se conformer au chapitre 20 Calculs pour convertir les g en tr/min pour la longueur de rotation.

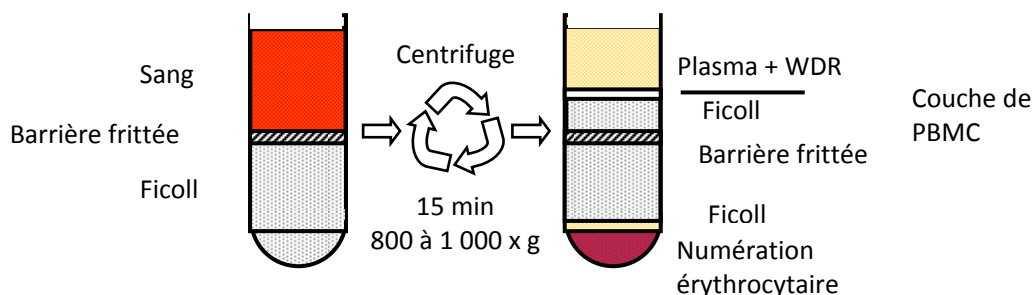
14.5.3 Préparer le même nombre de nouveaux tubes coniques stériles de 50 ml (pour les adultes) ou de 15 ml (pour les enfants) que pour les tubes CSTFB utilisés pour l'étape de séparation de centrifugation.

14.5.4 Étiqueter chaque tube avec le PTID. Utiliser ces nouveaux tubes pour le lavage suivant.

14.5.5 Retirer délicatement les tubes CSTFB de la centrifugeuse afin de ne pas perturber les couches.

14.5.6 La centrifugation entraîne la division du contenu du tube en six couches distinctes, y compris la barrière frittée. En partant de la partie supérieure du tube, celles-ci sont les suivantes :

- Plasma + WDR
- couche de PBMC
- Ficoll®
- barrière frittée
- Ficoll®
- Agrégats érythrocytaires et de granulocytes.



14.5.7 Inspecter les tubes pour déceler les problèmes éventuels suivants :

Hémolyse dans la couche plasmatique + WDR. Si c'est le cas, donner une note de +1 à +4 à l'hémolyse en fonction de la description fournie dans l'entrée 29 du glossaire.

Caillots visibles sur la barrière frittée après centrifugation.

Faible couche de PBMC en raison d'une erreur de centrifugation, telle que la vitesse, la durée ou le freinage. La couche de PBMC apparaîtra petite et indistincte alors que la couche plasmatique + WDR pourra être légèrement trouble. Consulter l'annexe C pour le dépannage.

Couche de PBMC formée sur la barrière frittée en raison d'une faible numération d'érythrocytes ou du volume d'hématocrites.

Enregistrer les observations dans la section des commentaires sur le **formulaire de traitement des PBMC** et/ou dans le LDMS. Documenter toutes les actions de suivi prises.

14.5.8 À l'aide d'une nouvelle pipette stérile (pipette sérologique ou de transfert), pour chaque PTID, retirer la fraction supérieure jaunâtre de plasma-WDR jusqu'à approximativement 1 à 2 cm de la bande de PBMC blanc trouble située à l'interface entre la fraction plasma-WDR (jaunâtre) et la séparation claire de solution de milieu. Éliminer la fraction de plasma-WDR selon la politique du laboratoire.

Remarque : Alternativement, la fraction supérieure de plasma-WDR peut être laissée en place et la bande de PBMC blanc trouble peut être retirée en insérant avec précaution une pipette à travers la couche supérieure de la bande de PBMC.

14.5.9 À l'aide d'une pipette sérologique ou de transfert stérile, recueillir toutes les cellules de l'interface blanc trouble située au-dessus de la barrière frittée. Prendre soin de ne pas aspirer plus de la solution de milieu de séparation que nécessaire.

14.5.10 Transférer les cellules prélevées du tube CSTFB dans un seul tube conique correspondant, préétiqueté et stérile, de 50 ml (pour les adultes) ou de 15 ml (pour les enfants). Les tubes peuvent être préremplis avec 25 ml (pour les adultes) ou 5 ml (pour les enfants) de WDR afin de gagner du temps.

14.5.11 Reboucher le tube CSTFB contenant les cellules érythrocytaires restantes et le milieu de séparation. Éliminer les tubes CSTFB comme les déchets biologiques selon la politique du laboratoire.

Sauter le chapitre 15 et continuer au chapitre 16.

15 Séparation cellulaire par application manuelle Ficoll® et dilution du sang avec remplacement facultatif du plasma par séparation cellulaire manuelle en gradient de densité

Tous les réseaux peuvent se conformer au chapitre 15 ; vérifier les exigences du protocole et le matériel disponible. Pour tout échantillon donné, se conformer soit au chapitre 14, soit au chapitre 15, mais pas aux deux.

15.1 Séparation des lymphocytes du sang périphérique en utilisant la méthode d'application Ficoll®

- 15.1.1 Tout le pipetage et le mélange ont lieu dans une enceinte de sécurité microbiologique (ESM) de niveau 2 ou supérieur.
- 15.1.2 Pulvériser de l'éthanol à 70 % v/v ou un désinfectant équivalent sur toutes les surfaces, tous les plateaux ainsi que sur tous les flacons de réactif avant d'entrer et d'utiliser la hotte de l'ESM.
- 15.1.3 Sauf si noté autrement, la procédure est effectuée à température ambiante (entre 15 et 30 °C).
- 15.1.4 Utiliser une nouvelle pipette pour chaque numéro d'identification de participant (PTID) et additif.

15.2 Préparer les échantillons de sang entier, les réactifs et les fournitures (utiliser le Formulaire de traitement des PBMC ou un autre outil de suivi comme défini par le protocole ou le réseau pour documenter et suivre le traitement du spécimen).

- 15.2.1 Avant le traitement ou suffisamment de temps avant le mélange avec les PBMC, préparer et refroidir la CPS (voir chapitre 10 Préparation du réactif).
- 15.2.2 Si les tubes de spécimen sont froids au toucher (en raison de conditions ambiantes froides telles que le transport dans des glacières), laisser les tubes atteindre la température ambiante (entre 15 et 30 °C) avant le traitement.
- 15.2.3 Laisser le Ficoll-Hypaque™ (ou un milieu à gradient de densité équivalent) atteindre la température ambiante (entre 15 et 30 °C). Voir la section Réactif de ce document pour plus d'informations.
- 15.2.4 Remplir les sections relatives à l'échantillon et au réactif sur le **formulaire de traitement des PBMC**.
- 15.2.5 Vérifier soigneusement le PTID sur tous les tubes de sang reçus. Organiser les tubes principaux de telle manière qu'il ne puisse y avoir aucune possibilité de mélanger les tubes entre les PTID ou les anticoagulants dans un lot PTID.

Suggestion : placer tous les tubes pour chaque PTID/anticoagulant sur un seul plateau. Différents plateaux peuvent être utilisés pour séparer les PTID ou les types de tubes, et une couleur de marqueur différente peut être utilisée pour chaque PTID afin d'éviter toute confusion.

15.3 Remplacement facultatif du plasma

N'effectuer cette étape de remplacement du plasma que si des aliquotes de plasma sont requises conformément aux instructions du protocole. Si des aliquotes de plasma ne sont pas requises, sauter cette étape et passer à l'étape 15.4.

Remarque pour l'IMPAACT : le remplacement du plasma est requis.

- 15.3.1 Les tubes de prélèvement sanguin peuvent être traités individuellement ou rassemblés dans des tubes coniques de 50 ml.
- 15.3.2 Marquer le volume de sang entier au niveau du ménisque.
- 15.3.3 Centrifuger le sang entier à une vitesse comprise entre 200 et 400 x g pendant 10 minutes.
- 15.3.4 Transférer le plasma dans un tube à centrifuger de 15 ou de 50 ml pour une deuxième centrifugation afin d'éliminer tout débris cellulaire.
- 15.3.5 Ajouter une quantité suffisante de WDR (voir section 9.1) pour ramener le sang entier à son volume d'origine, mélanger délicatement et continuer le traitement des PBMC à l'étape 15.4.
- 15.3.6 Terminer le traitement du plasma en centrifugeant le prélèvement plasmatique à une vitesse comprise entre 800 et 1 200 x g pendant 10 minutes. Cela peut s'effectuer plus tard, lorsque la centrifugeuse n'est pas utilisée pour le traitement des PBMC.
- 15.3.7 Aliquoter le plasma centrifugé dans des tubes d'aliquotes étiquetés, comme spécifié dans le protocole et éliminer tout débris cellulaire dans le tube de plasma centrifugé.

15.4 Dilution du sang et séparation cellulaire manuelle par gradient de densité

Remarque pour l'ACTG, l'IMPAACT et le HPTN : Pour des prélèvements plus importants de volume de sang, le rassemblement de couches leucocytaires est autorisé (voir l'annexe D : Rassemblement des couches leucocytaires pour isolation des PBMC par la méthode Ficoll).

Remarque pour le HVTN : Une mesure précise du volume de sang utilisable doit être déterminée et enregistrée.

Remarque : La dilution du sang avec du WDR peut aider à améliorer la séparation (voir l'annexe D).

- 15.4.1 Étiqueter chaque tube à centrifuger de 15 ou de 50 ml avec le PTID. Utiliser un tube de 50 ml pour chaque 15 à 20 ml de sang entier d'adulte (ou un tube de 15 ml pour chaque 4 à 5 ml de sang entier d'enfant).
- 15.4.2 Déboucher les tubes de sang anticoagulé.
- 15.4.3 Si un tube comporte de gros caillots (voir glossaire), jetez-le.
- 15.4.4 Documenter le type de sang reçu sur le formulaire de traitement des PBMC.
- 15.4.5 Enregistrer le nombre total de tubes éliminés ou tout autre problème noté avec le sang.
- 15.4.6 Enregistrer l'état du sang.
- 15.4.7 Enregistrer le volume total de sang entier non dilué.

Remarque : ne pas estimer le volume de sang utilisable en fonction de la taille du tube.

Remarque : ne pas inclure le volume de WDR utilisé pour diluer l'échantillon de sang.

- 15.4.8 Transférer le sang dans un tube à centrifuger stérile et étiqueté de 15 ou de 50 ml et ajouter suffisamment de WDR pour diluer le sang conformément à la notice du produit du milieu de séparation des lymphocytes (le rapport maximal entre le sang et le diluant doit être de 2 : 1).

Facultatif : l'ajout de WDR et le mélange peuvent avoir lieu dans le tube initial, s'il y a suffisamment de volume.

- 15.4.9 Séparation cellulaire avec gradient de densité :
Sur un échantillon donné, utiliser soit la méthode d'application sur couche (15.4.9.1) ou sous couche (15.4.9.2), mais pas les deux.

- 15.4.9.1 Méthode par application Ficoll®-Hypaque : en fonction du volume de sang dilué avec du WDR, déterminer le nombre et la taille des tubes à centrifuger stériles requis pour la séparation avec gradient de densité.

Ajouter de manière aseptique la quantité de Ficoll® ou de LSM requise dans les tubes à centrifuger stériles.

Remarque : le rapport entre le Ficoll® et le sang entier peut varier selon les recommandations du fabricant et l'expérience de laboratoire. Par exemple, certains fabricants recommandent quatre parties de sang dilués pour trois parties de réactif Ficoll® ; toutefois, l'expérience pratique a montré de bons résultats en utilisant trois parties de sang pour une partie de milieu à gradient de densité.)

Pipeter soigneusement et lentement le sang dilué sur le gradient de densité.

Suggestion : laisser le mélange de sang dilué avec du WDR couler doucement le long du tube et se déposer sur la surface du Ficoll® sans briser la surface plane.

- 15.4.9.2 Méthode sous couche de Ficoll®-Hypaque :

Si le plasma a été retiré pour la conservation, ajouter un volume de WDR égal au volume de plasma retiré.

Mélanger délicatement et complètement pour diminuer l'agrégat de cellules durant la séparation.

Facultatif : pour le sang entier ou le sang dilué avec du WDR, ajouter un autre volume de WDR égal au volume de sang total.

En fonction du volume de sang dilué avec du WDR, déterminer le volume de milieu à gradient de densité requis pour chaque tube. Pipetter soigneusement et lentement la solution de Ficoll®-hypaque SOUS le sang dilué avec du WDR dans des tubes à centrifuger stériles de 15 ml ou 50 ml.

Remarque : le rapport entre le Ficoll® et le sang entier peut varier selon les recommandations du fabricant et l'expérience laboratoire. Par exemple, certains fabricants recommandent quatre parties de sang dilué pour trois parties de réactif Ficoll®, toutefois, l'expérience pratique dans certains laboratoires a montré de bons résultats en utilisant trois parties de sang pour une partie de Ficoll®.

- 15.4.10 Boucher soigneusement les tubes.

15.5 Centrifugation de la densité lymphocytaire et recueil

15.5.1 Tenir les tubes en position verticale et les transférer délicatement dans la centrifugeuse.

15.5.2 Centrifuger à une vitesse de 400 x g pendant 30 minutes à une température comprise entre 15 et 30 °C avec le frein en position ARRÊT, comme indiqué dans la notice du produit qui accompagne le milieu à gradient.

Remarque : si le frein est en marche, cela perturbera les couches. Le frein de la centrifugeuse doit être en position ARRÊT pour que la séparation soit nette et optimiser la récupération des PBMC. Consulter le chapitre 20 Calculs pour convertir en g par tr/min pour la longueur de rotation.

15.5.3 Préparer le même nombre de nouveaux tubes coniques stériles de 15 ou de 50 ml que ceux de CSTFB utilisés pour l'étape de centrifugation.

15.5.4 Étiqueter chaque tube avec le PTID. Utiliser ces nouveaux tubes pour le lavage suivant.

15.5.5 Retirer les tubes de la centrifugeuse.

15.5.6 Si la couche cellulaire n'est pas visible, confirmer que la centrifugeuse fonctionne correctement. Corriger tous les problèmes rencontrés. Centrifuger de nouveau le tube. Documenter le problème et les actions prises.

Remarque : si la couche cellulaire n'est pas visible après la nouvelle centrifugation, documenter, retirer et éliminer le WDR supernageant et continuer.

15.5.7 Inspecter les tubes pour toute hémolyse ou petits caillots visibles à l'interface des cellules qui n'ont pas été notés précédemment et les documenter.

Remarque : chercher un signe d'hémolyse ou de caillots après la centrifugation. Donner une note de +1 à +4 à l'hémolyse selon la description donnée dans le glossaire. Enregistrer les observations.

15.5.8 À l'aide d'une nouvelle pipette stérile (pipette sérologique ou de transfert), pour chaque PTID, retirer la fraction supérieure jaunâtre de plasma-WDR jusqu'à approximativement 1 à 2 cm de la bande de PBMC blanc trouble située à l'interface entre la fraction plasma-WDR (jaunâtre) et la séparation claire de solution de milieu. Éliminer la fraction de plasma-WDR selon la politique du laboratoire.

Remarque : alternativement, la fraction supérieure de plasma-WDR peut être laissée en place et la bande de PBMC blanc trouble peut être retirée en insérant avec précaution une pipette à travers la couche supérieure de la bande de PBMC.

15.5.9 À l'aide d'une pipette sérologique ou de transfert stérile, recueillir toutes les cellules à l'interface blanc trouble. Prendre soin de ne pas aspirer plus de la solution de milieu de séparation que nécessaire.

15.5.10 Transférer les cellules recueillies d'un tube à centrifuger dans un tube conique unique correspondant, préétiqueté et stérile, de 15 ou de 50 ml. Les tubes peuvent être préremplis avec 5 ml (pour les tubes de 15 ml) ou avec 25 ml (pour les tubes de 50 ml) de WDR pour gagner du temps.

15.5.11 Reboucher le tube à centrifuger contenant les cellules érythrocytaires/milieu de séparation restants et jeter le tube comme déchet biologique selon la politique du laboratoire.

Poursuivre au chapitre 16.

16 Lavage, numération, resuspension, concentration et congélation pendant la nuit à vitesse contrôlée

Tous les réseaux se conforment au chapitre 16.

16.1 Lavage 1 :

16.1.1 QS la fraction de PBMC à approximativement 10 ml (pour les tubes coniques de 15 ml) ou 45 ml (pour les tubes coniques de 50 ml) en ajoutant du WDR. Mélanger délicatement.

16.1.2 Reboucher tous les tubes de cellules récoltées.

16.1.3 Centrifuger les cellules diluées à une vitesse comprise entre 200 et 400 x g pendant 10 minutes, à une température comprise entre 15 et 30 °C (frein facultatif).

16.1.4 Retirer les tubes de la centrifugeuse et vérifier tout culot cellulaire.

Si aucun culot cellulaire n'est visible, confirmer que la centrifugeuse fonctionne correctement. Corriger tous les problèmes rencontrés. Centrifuger de nouveau le tube. Documenter le problème et les actions prises dans la section des commentaires du **formulaire de traitement des PBMC**. Si aucun culot cellulaire n'est toujours pas visible après avoir de nouveau centrifugé le tube, documenter.

16.1.5 Retirer et éliminer le supernageant sans perturber le culot cellulaire.

16.2 Lavage 2 :

16.2.1 Pour des tubes coniques de 15 ml et de 50 ml, suspendre de nouveau chaque culot cellulaire dans un petit volume (pas plus de 10 ml au total) de WDR en mélangeant délicatement, mais complètement pour obtenir une suspension de cellules homogène.

16.2.2 Pour des tubes coniques de 50 ml, combiner jusqu'à quatre suspensions de culots cellulaires (<20 ml au total) pour le même donneur. Pour des tubes coniques de 15 ml, combiner jusqu'à deux suspensions de culots cellulaires (<10 ml au total) pour le même donneur. Il s'agit du tube de cellules récoltées. QS la fraction de PBMC à approximativement 10 ml (pour les tubes coniques de 15 ml) ou 45 ml (pour les tubes coniques de 50 ml) en ajoutant du WDR. Mélanger délicatement.

16.2.3 Rincer les tubes à partir desquels les culots cellulaires ont été transférés avec un petit volume de WDR.

Remarque : la solution de rinçage et le volume récolté combinés ne doivent pas dépasser 45 ml (pour les tubes de 50 ml) ou 10 ml (pour les tubes de 15 ml).

16.2.4 Recueillir le rinçage de WDR dans le tube de cellules récoltées.

16.2.5 Reboucher les tubes et les placer dans la centrifugeuse.

- 16.2.6 Centrifuger les cellules diluées à une vitesse comprise entre 200 et 400 x g pendant 10 minutes, à une température comprise entre 15 et 30 °C (frein facultatif).

Retirer les tubes de la centrifugeuse et vérifier tout culot cellulaire.

Si aucun culot cellulaire n'est visible, confirmer que la centrifugeuse fonctionne correctement. Corriger tout problème éventuel. Centrifuger de nouveau le tube. Documenter le problème et les actions prises dans la section des commentaires du **formulaire de traitement des PBMC**. Si aucun culot cellulaire n'est toujours pas visible après avoir de nouveau centrifugé le tube, documenter.

- 16.2.7 Retirer et éliminer le supernageant sans perturber le culot cellulaire.

16.3 Numération cellulaire de PBMC

- 16.3.1 Enregistrer la méthode de numération utilisée sur le **formulaire de traitement des PBMC**.

- 16.3.2 Calculer et enregistrer sur le formulaire de traitement la numération WDR du volume de resuspension (V). Il s'agit du volume sur lequel la numération cellulaire est basée.

Remarque : le volume de resuspension doit être approximativement de 20 % du volume de sang entier utilisable arrondi au ml le plus proche. Selon la taille du culot cellulaire, le volume de resuspension représente généralement de 10 % à 50 % du volume de sang entier utilisable.

- 16.3.3 Si l'on dispose de plus d'un culot cellulaire, utiliser une petite quantité de WDR pour resuspendre délicatement et combiner les culots cellulaires dans un seul tube. Rincer les tubes à partir desquels les cellules ont été transférées avec le volume restant. Ajouter le rinçage au tube de cellules récoltées.

- 16.3.4 Compléter la numération de cellules à l'aide de la SOP pour choisir la méthode de numération cellulaire approuvée au laboratoire.

- 16.3.5 Mélanger les cellules délicatement, mais complètement, avant de prélever un échantillon pour la numération cellulaire.

- 16.3.6 Transférer une petite quantité de la resuspension dans un petit tube pour la numération.

Remarque : si des numérations répétées sont nécessaires, diminuer le volume d'échantillon nécessaire.

- 16.3.7 Suivre la SOP pour choisir la méthode de numération approuvée au laboratoire de traitement et le **formulaire de traitement des PBMC** pour déterminer la concentration x 10^6 par ml.

Remarque : cellules à $10^3/\mu\text{L}$ = cellules à $10^6/\text{ml}$.

- 16.3.8 Utiliser la section Numération cellulaire appropriée sur le **formulaire de traitement des PBMC** pour enregistrer les concentrations de numération cellulaire pour chaque PTID (cellules x 10^6 par ml).

Remarque : les numérations automatiques ne peuvent être effectuées qu'une fois. Les numérations manuelles doivent compter au moins quatre grands carrés (1 mm^2).

- 16.3.9 Sur le **formulaire de traitement des PBMC**, enregistrer la numération cellulaire automatisée ou manuelle.

16.3.10 Calculer le nombre total de cellules en utilisant la formule suivante :

$$T = C \times V$$

T = nombre total de cellules

C = concentration (10^6 /ml) déterminée dans la méthode de numération

V = numération du volume de resuspension de WDR en ml

16.3.11 Enregistrer le nombre total de cellules (T) sur le **formulaire de traitement des PBMC**.

16.3.12 Calculer le rendement cellulaire en cellules/ml de sang entier utilisable à l'aide de la formule ci-dessous.

$$\text{Rendement cellulaire (} 10^6 \text{ cellules/ml)} = T / \text{volume de sang entier utilisable}$$

16.3.13 Enregistrer le rendement cellulaire sur le **formulaire de traitement des PBMC**.

Remarque : le rendement cellulaire est calculé uniquement à des fins de qualité. Consulter la section 12 Contrôle de qualité pour la fourchette de valeurs attendue de rendements cellulaires. Si le rendement cellulaire se trouve en dehors de la fourchette de valeurs attendue, suivre les directives de dépannage dans la section Contrôle de la qualité. Diluer de nouveau et recompter si nécessaire.

16.3.14 Enregistrer toutes les anomalies du traitement dans la section des commentaires du **formulaire de traitement des PBMC**.

16.4 Calcul du volume de resuspension final

16.4.1 Calculer le volume de resuspension de la CPS congelée requis en complétant les étapes ci-après pour la concentration cellulaire finale ciblée.

La concentration cellulaire finale ciblée varie selon le réseau et le protocole. Utiliser le tableau ci-après afin de déterminer la concentration ciblée habituelle et la fourchette de valeurs acceptables.

Réseau	Concentration ciblée (cellules/ml)	Fourchette acceptable (cellules/ml)
HVTN	15×10^6	10 à 20×10^6
ACTG, HPTN et MTN	10×10^6	5 à 10×10^6
IMPAACT	10×10^6	10×10^5

Calculer le volume de resuspension de CPS congelée estimé (V1) requis en utilisant la concentration cellulaire finale ciblée à partir du tableau ci-dessus.

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

T = nombre total de cellules

N1 = concentration cellulaire finale désirée

V2 = volume d'aliquote final en ml

Enregistrer le volume estimé (V1) sur le **formulaire de traitement des PBMC**.

Arrondir le V1 à la baisse au 0,1 ml le plus proche afin de déterminer le volume réel de resuspension de la CPS (Vf).

Remarque pour le HVTN : arrondir le V1 à la baisse au ml entier (1,0) le plus proche afin de déterminer le Vf.

Remarque : pour certains réseaux, V2 sera de 1 ml/tube cryogénique pour que le nombre de tubes requis soit égal aux millilitres de la CPS. Pour l'ACTG et l'IMPAACT, ajuster le volume par tube cryogénique conformément au LPC ou au protocole.

Enregistrer le volume de resuspension réel de la CPS (V_f) sur le **formulaire de traitement des PBMC**.

- 16.4.2 Calculer le nombre réel de cellules par tube (N_2) en utilisant le volume réel de CPS congelée (V_f) déterminé dans le calcul précédent.

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

N_2 = nombre réel de cellules par flacon

T = nombre total de cellules

V_2 = volume d'aliquote final en ml

- 16.4.3 Enregistrer le nombre final de cellules par tube (N_2) sur le **formulaire de traitement des PBMC**.

- 16.4.4 Confirmer que le **Formulaire de traitement des PBMC** est rempli et que les calculs sont exacts.

16.5 Étiquetage

- 16.5.1 Compléter l'impression et l'étiquetage des tubes cryogéniques AVANT la centrifugation finale.

Remarque : il est important de veiller à ce que les cellules ne restent pas sous forme de culot cellulaire pendant une trop longue période.

- 16.5.2 Les étiquettes des tubes cryogéniques seront générées en utilisant le système de gestion des données de laboratoire (LDMS).

Suivre les pratiques laboratoires du réseau pour compléter la saisie des données.

Vérifier chaque type de dérivatif des étiquettes des tubes cryogéniques pour des erreurs de saisie par rapport au formulaire de demande de laboratoire et de traitement AVANT l'étiquetage du tube cryogénique.

Inspecter visuellement le code-barres de l'étiquette et la zone d'impression pour l'alignement, ainsi que la qualité de l'impression.

Corriger toutes les erreurs de saisie de données dans le système de gestion des données de laboratoire (LDMS) et imprimer de nouveau les étiquettes, le cas échéant (en veillant à ce que les ID globales appropriées soient sélectionnées).

- 16.5.3 Appliquer les étiquettes sur les tubes cryogéniques pour que les renseignements puissent être lus aisément et que le contenu du tube puisse être clairement vu.

Remarque pour le HVTN : scanner les tubes cryogéniques étiquetés et vides en se conformant aux directives actuelles de l'HVTN.

16.6 Centrifugation finale

- 16.6.1 Placer le tube de cellules récoltées dans la centrifugeuse.

Facultatif pour le HVTN : QS la suspension cellulaire à 45 ml avec du WDR avant la centrifugation.

16.6.2 Centrifuger les cellules diluées à une vitesse comprise entre 200 et 400 x g pendant 10 minutes, à une température comprise entre 15 et 30 °C (frein facultatif).

16.6.3 Vérifier que tous les tubes cryogéniques sont étiquetés et facilement accessibles.

16.7 Aliquotage pour la cryoconservation

Remarque : les étapes suivantes doivent être effectuées rapidement afin de préserver l'intégrité des cellules. Il est recommandé de garder les tubes au frais sur de la glace mouillée. Ne pas laisser les tubes être immergés dans la glace mouillée. Ne pas laisser les bouchons des tubes entrer en contact avec de l'humidité.

16.7.1 Retirer et éliminer le WDR supernageant. Garder le culot cellulaire.

Remarque pour l'ACTG et l'IMPACT : si les cellules doivent être congelées sous la forme de culots de PBMC non viables, la resuspension des cellules dans un milieu congelé (CPS) n'est pas recommandée, car le DMSO est un puissant inhibiteur de la PCR. Si les PBMC ont été en contact avec du DMSO (par exemple, milieu congelé), laver deux fois le culot de PBMC non viables avec du WDR avant la conservation.

16.7.2 Suspendre de nouveau le culot cellulaire en utilisant le volume de CPS froide (V_f) déterminé à la section 16.4.

Suspendre de nouveau **délicatement** le culot cellulaire avant d'ajouter la CPS en tapotant, raclant ou pipetant.

Ajouter **délicatement** la CPS aux cellules resuspendues en ne cessant pas de tourner.

Le prérefroidissement des tubes et/ou le travail sur glace mouillée est autorisé.

16.7.3 Travailler **rapidement** une fois que la CPS a été ajoutée. Ne pas laisser les cellules rester dans la solution congelée pendant plus de 10 minutes avant de les placer dans le congélateur.

16.7.4 Aliquoter de 0,5 à 1 ml par tube, selon les exigences du réseau et du protocole. Préparer une aliquote partielle finale avec tout excès de volume qui pourrait être présent en raison de la taille du culot cellulaire.

Remarque pour le HVTN : au lieu de créer une aliquote partielle finale, distribuer de manière homogène tout excès de volume entre tous les tubes pour ce PTID.

16.8 Congélation pendant la nuit à vitesse contrôlée

16.8.1 Suite au traitement et à la numération, les cellules doivent être immédiatement congelées.

16.8.2 Sélectionner la méthode de congélation à utiliser : StrataCooler® Cryo, NALGENE® Mr. Frosty ou CryoMed®.

Remarque : StrataCooler® Cryo doit être conservé à une température comprise entre 2 et 8 °C avant chaque utilisation.

Remarque : idéalement, laisser NALGENE® Mr. Frosty s'équilibrer à une température comprise entre 2 et 8 °C avant chaque utilisation dans un réfrigérateur antidéflagrant. Si l'on ne dispose pas d'un réfrigérateur antidéflagrant, laisser NALGENE® Mr. Frosty s'équilibrer à température ambiante avant chaque utilisation. Le niveau d'isopropanol doit être correct et complètement remplacé après le cinquième cycle de congélation – décongélation.

Suivre la SOP sur place appropriée pour un congélateur à vitesse contrôlé, tel que le CryoMed®.

- 16.8.3 Transférer immédiatement tous les tubes cryogéniques dans le conteneur à congélation à vitesse contrôlée.

Pour NALGENE® Mr. Frosty et StrataCooler® Cryo, fermer le conteneur et le placer dans un congélateur à une température de -80 °C (entre -65 et -95 °C), dans un endroit qui n'est pas dérangé par des accès répétés au congélateur (c'est-à-dire, loin de l'ouverture ou dans la partie supérieure du congélateur près de la porte/couvercle d'ouverture) pendant quatre heures au minimum pour Mr. Frosty et toute la nuit pour StrataCooler® Cryo.

Pour CryoMed®, commencer le programme de refroidissement.

- 16.8.4 Enregistrer la date et l'heure auxquelles les tubes cryogéniques ont été transférés dans le congélateur à -80 °C (entre -65 et -95 °C) sur le **formulaire de traitement des PBMC**.

Remarque : il s'agit du temps de fin de traitement.

- 16.8.5 Enregistrer le nombre réel de tubes cryogéniques congelés sur le **formulaire de traitement de PBMC**.

Passer au chapitre 17 (pour l'ACTG et le HVTN) ou au chapitre 18 (pour les HPTN, l'IMPACT et les MTN).

17 Conservation sur place à -70/-80 °C

Se conformer au chapitre 17 uniquement pour les PBMC qui sont traitées pour l'ACTG ou le HVTN.

17.1 Transférer les tubes cryogéniques de PBMC dans un congélateur à -70/-80 °C

17.1.1 Transférer les tubes cryogéniques du système de refroidissement à vitesse contrôlée dans le lieu de conservation désigné à -70/-80 °C.

Remarque : ne pas conserver dans de l'azote liquide (LN2).

Transférer les tubes cryogéniques après un minimum de quatre heures pour NALGENE® Mr. Frosty et après une nuit pour StrataCooler® Cryo. Si CryoMed® est utilisé, transférer les tubes cryogéniques dès la fin du programme dans un congélateur à -70/-80 °C.

17.1.2 Enregistrer les initiales de la personne s'occupant du transfert ainsi que la date/l'heure du transfert sur le **formulaire de traitement des PBMC**.

17.1.3 Enregistrer les renseignements appropriés relatifs à la conservation sur le **formulaire de traitement des PBMC** selon le programme de conservation défini par le laboratoire.

17.1.4 Conserver à une température comprise entre -65 et -95 °C jusqu'au moment de l'expédition.

Remarque pour le HVTN : expédier sur de la glace carbonique au dépôt central dans les deux semaines suivant le recueil.

Remarque pour l'ACTG : expédier sur de la glace carbonique dans les trois à cinq semaines suivant la date de congélation.

17.1.5 Ne PAS conserver temporairement les échantillons dans du LN2 sauf instructions de la part du réseau ou du protocole. Ne PAS transférer de nouveau les échantillons du LN2 dans des congélateurs à -70/-80 °C, sauf si instructions de la part du réseau ou de l'équipe du protocole.

17.1.6 S'adresser au personnel des opérations de laboratoire du réseau si des échantillons ne peuvent pas atteindre leur destination finale pendant la période de conservation temporaire allouée par le réseau. Il est nécessaire d'obtenir l'autorisation de transférer les échantillons du LN2 et de les envoyer dans du LN2 de transport si la conservation temporaire et les conditions d'expédition ne peuvent pas être satisfaites.

17.2 Examen final du formulaire

17.2.1 Le technicien doit confirmer que le **formulaire de traitement des PBMC** est rempli et que les calculs sont exacts.

17.2.2 Un deuxième examinateur vérifie que le formulaire est complet et exact puis appose ses initiales et date le **formulaire de traitement des PBMC**.

Remarque : le HVTN exige que tous les examens soient réalisés dans les deux jours du traitement.

17.2.3 Conserver le **formulaire de traitement des PBMC** selon la politique du laboratoire.

Cela marque la fin du traitement et de la conservation.

Suivre les procédures de laboratoire appropriées pour la préparation et le traitement des expéditions.

18 Section 6B du traitement des PBMC : conservation sur place dans de l'azote liquide (LN2)

Se conformer au chapitre 18, uniquement si les PBMC sont traitées pour les HPTN, l'IMPAACT ou les MTN.

18.1 Transfert des tubes cryogéniques de PBMC dans du LN2

- 18.1.1 Le jour ouvrable suivant, transférer les tubes cryogéniques du système de refroidissement à vitesse contrôlée à l'endroit de conservation désigné dans le système de conservation du LN2.
- 18.1.2 Enregistrer les initiales de la personne procédant au transfert avec la date/l'heure du transfert sur le **formulaire de traitement des PBMC**.
- 18.1.3 Enregistrer les renseignements appropriés relatifs à la conservation sur le **formulaire de traitement des PBMC** selon le programme de conservation défini par le laboratoire.
- 18.1.4 Les échantillons de PBMC congelés peuvent être conservés indéfiniment en toute sécurité dans du LN2 (phase vapeur de préférence).
- 18.1.5 Une fois que les échantillons ont été conservés dans du LN2, tous les transferts ou toutes les expéditions doivent être maintenus dans du LN2 (≤ -140 °C) ; les échantillons ne peuvent pas être expédiés sur de la glace carbonique.
Remarque pour l'IMPAACT : les échantillons peuvent être expédiés sur de la glace carbonique après conservation dans du LN2.
- 18.1.6 Ne pas conserver temporairement les échantillons dans du LN2.
- 18.1.7 Ne PAS transférer les échantillons du LN2 de nouveau dans des congélateurs à -70 °C ou à -80 °C sauf instruction de la part du réseau ou de l'équipe du protocole.

18.2 Examen final du formulaire

- 18.2.1 Le technicien doit confirmer que le **formulaire de traitement des PBMC** est rempli et que les calculs sont exacts.
- 18.2.2 Un deuxième examinateur vérifie que le formulaire est complet et exact puis appose ses initiales et date le **formulaire de traitement des PBMC**.
Remarque : les examens doivent être terminés dans les deux jours ouvrables suivant le traitement.
- 18.2.3 Conserver le **formulaire de traitement des PBMC** selon la politique du laboratoire

Cela marque la fin du traitement et de la conservation.

Suivre les procédures de laboratoire appropriées pour la préparation et le traitement des expéditions.

19 Rapport des résultats

19.1 Le formulaire de traitement des PBMC rempli n'est requis que pour le HVTN.

19.2 Exigences pour tous les réseaux :

19.2.1 Les données sont saisies dans le système de gestion des données de laboratoire pour la génération d'étiquettes de tubes cryogéniques, la documentation de l'endroit de conservation et les exigences manifestes d'expédition.

19.2.2 Les écarts sont signalés selon le protocole du laboratoire.

20 Calculs

20.1 Les tr/min sont généralement lus à partir d'un graphique nomogramme. Les graphiques nomogrammes sont souvent inclus dans le manuel d'entretien de la centrifugeuse. Veiller à utiliser les graphiques propres à la centrifugeuse et au rotor.

20.2 Il est recommandé que la conversion g en tr/min appropriée soit affichée sur la centrifugeuse pour pouvoir s'y reporter facilement.

20.3 Si un graphique nomogramme n'est pas disponible, les forces g peuvent être converties en tr/min à l'aide de la formule suivante.

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

r = rayon du rotor en centimètres

g = force centrifuge relative exprimée en unités de gravité

$RPM = tr/min$ = révolutions par minute

21 Limites de la procédure

- 21.1** La durée de traitement optimale entre le prélèvement et la congélation de sang frais pour les PBMC est inférieure à huit heures à partir du moment du prélèvement. La fonction cellulaire peut diminuer pour les spécimens plus anciens.
- 21.2** La durée de traitement optimale pour les PBMC est inférieure à trois heures entre le moment de l'ajout de sang dans les tubes de séparation cellulaire (Accuspin™ ou équivalent) et l'initiation du cycle de congélation à vitesse contrôlée.
- 21.3** Des études indiquent que les spécimens prélevés dans un EDTA anticoagulant donnent des rendements plus faibles avec le temps.
- 21.4** Éviter de retirer les quantités en excès du milieu de séparation avec la bande de PBMC, car cela peut augmenter la contamination de granulocytes.
- 21.5** Éviter de retirer le supernageant en excès avec la bande de PBMC afin de limiter la contamination à partir des protéines plasmatiques.

22 Remarques procédurales

- 22.1** Si le plasma est très trouble, il peut être difficile de voir l'interface du gradient Ficoll®. Il est possible d'améliorer le recueil des lymphocytes en retirant la majorité du plasma au-dessus de l'interface avec une pipette de 10 ml et en ne laissant qu'un reste de 0,5 cm. Cela permet un meilleur positionnement de l'embout de la pipette pour le recueil des cellules.
- 22.2** La conservation dans de l'azote liquide (LN2) en phase vapeur est la cuve de conservation qui se trouve au-dessus du LN2 liquide dans la partie inférieure de la cuve.

23 Glossaire

Durée	Définition
ACTG	Groupes des essais cliniques sur le sida
Caillots, gros	Plus des trois quarts de la masse de sang entier comportent des caillots et il reste très peu de sang entier libre.
Caillots, petits	Les petits caillots ne seront généralement pas vus dans le tube de sang entier, mais peuvent être observés sur le tube de séparation à barrière frittée après centrifugation.
CPS	Solution de cryoconservation
CSR	Dépôt central de spécimens
CSTFB	Tube de séparation cellulaire avec barrière frittée
HBSS	Solution saline équilibrée de Hank

Durée	Définition
<i>Hémolyse</i>	<p>Une coloration du sérum ou du plasma de rose à rouge due à la lyse des érythrocytes. L'hémolyse est gradée et rapportée conformément à l'échelle suivante :</p> <p>1+ couleur rose-rouge pâle du sérum ou du plasma, possibilité de lire clairement des caractères d'imprimerie à travers le tube de sang</p> <p>2+ couleur rose-rouge du sérum ou du plasma, les caractères d'imprimerie peuvent être lus à travers le tube, mais pas aussi clairement</p> <p>3+ couleur rose-rouge foncé du sérum ou du plasma, les caractères d'imprimerie sont obscurcis</p> <p>4+ couleur rouge acajou foncé du sérum ou du plasma, impossibilité de lire les caractères d'imprimerie</p> <p>Remarque : les érythrocytes lysés colorent le sérum ou le plasma qui reste clair alors que la contamination des érythrocytes donne au sérum ou au plasma une qualité trouble.</p>
<i>HPTN</i>	Réseaux d'essais pour la prévention du VIH
<i>HVTN</i>	Réseau d'essais du vaccin contre le VIH
<i>Ictérique</i>	Un plasma teinté en vert ou en orange, laissant présumer la présence d'une augmentation de la bilirubine.
<i>IMPAACT</i>	Réseau d'essais internationaux menés sur la transmission du sida par voie fœto-maternelle aux enfants et aux adolescents
<i>LDMS</i>	Système de gestion des données de laboratoire
<i>Milieu DG</i>	Milieu à gradient de densité
<i>MTN</i>	Réseaux d'essais sur les microbicides
<i>PBMC</i>	Cellules mononucléées de sang périphérique
<i>PBS</i>	Tampon phosphate salin
<i>PTID/PID</i>	Numéro d'identification du participant
<i>QS</i>	Quantité suffisante - ajouter une quantité suffisante de liquide pour atteindre le volume spécifié
<i>SVF</i>	Sérum fœtal bovin
<i>SVF-IC</i>	Sérum fœtal bovin inactivé par la chaleur
<i>Température ambiante (TA)</i>	de 15 à 30 °C
<i>Température de centrifugation</i>	de 15 à 30 °C

Durée	Définition
WDR	Réactif diluant de lavage (HBSS, PBS ou RPMI ; le RPMI ne peut être utilisé que pour les réseaux ACTG/IMPAACT)

24 Références

- 24.1 Bull M., Lee B., Stucky J., Chiu Y.L., Rubin A., Horton H. et McElrath MJ. Définition des paramètres du traitement sanguin pour la détection optimale des réponses spécifiques à des antigènes cryoconservés pour les essais sur le vaccin contre le VIH. *J. Immunol. Methods* 322:57-69 (2007).
- 24.2 SOP CHAVI pour l'isolation et la cryoconservation des PBMC, CHAVI-A0001, v5, 3 nov. 2008.
- 24.3 Cox J.H., DeSouza M., Ratto-Kim S., Ferrari G., Weinhold K.J. et Birx B.L. Essais sur l'immunité cellulaire pour l'évaluation de l'efficacité d'un vaccin dans les pays en développement. *Manual of Clinical laboratory Immunology*. Rose N.R., Hamilton R.G., Detrick B. Eds. (6e éd.) p.301-315 (2002).
- 24.4 Islam B., Lindbert A. et Christensen B. La préparation des cellules de sang périphérique influence le niveau d'expression de la surface cellulaire des leucocytes comme évalué avec la cytométrie en flux multi couleurs. *Cytométrie* 22:128-134 (1995).
- 24.5 Immunovirologie (IVRN) : séparation et conservation du sérum, du plasma et des PBMC. IVRN. Dec 12 1007.
- 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. et Casimiro B.R. Taux et amplitude des réponses immunitaires décelés par rapport à un vaccin contre le VIH : effet de l'utilisation d'une procédure optimisée pour l'isolation des PBMC. *AIDS Res Hum Retroviruses* 23:86-92 (2007).
- 24.7 Shearer WT, Rosenblatt HM, Gelman RS, Oyomopito R, Plaeger S, Stiehm ER, Wara DW, Douglas SD, Luzuriaga K, McFarland EJ, Yogev R, Rathore MH, Levy W, Graham BL, Spector SA ; Groupe des essais cliniques pédiatriques sur le sida. Sous-ensembles lymphocytaires chez des enfants sains depuis la naissance jusqu'à 18 ans : étude P1009 du Groupe des essais cliniques pédiatriques sur le sida. *J Allergy Clin Immunol.* 112(5):973-80 (2003).
- 24.8 Système Sigma-Aldrich Accuspin™ -Histopaque®-1077, numéro de procédure A6929/A7054/A0561, daté 2003-09.
- 24.9 Weinberg A., Betensky R., Zhang L. et Ray G. Effet de l'expédition, de la conservation, de l'anticoagulant et de la séparation cellulaire sur la prolifération des lymphocytes chez les patients infectés par le virus de l'immunodéficience humaine. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 5:804-807 (1998).

25 Documents supplémentaires (tenus à jour par le laboratoire)

- 25.1 Notice du produit SVF (et certificat d'analyse)
- 25.2 Notice du produit WDR (HBSS, PBS ou RPMI)
- 25.3 Notice du produit du milieu à gradient de densité
- 25.4 Notice du produit des tubes de séparation cellulaire avec barrière frittée

26 Annexes

26.1 Annexe A : Formulaire de traitement des PBMC

L'annexe A est également disponible en version téléchargeable et révisable sur le site Internet public HANC à l'adresse <http://www.hanc.info/labs/Pages/PBMCSOP.aspx>.

26.2 Annexe B : Exemple Journal des modifications isopropanol de Mr. Frosty NALGENE®

26.3 Annexe C : Dépannage : Récupération des PBMC en l'absence de bande PBMC définie après centrifugation en gradient de densité

26.4 Annexe D : Récupération des couches leucocytaires pour isolation des PBMC par la méthode Ficoll

26.5 Annexe E : Guide rapide de la SOP sur le traitement des PBMC inter-réseaux - tubes CSTFB

26.6 Annexe F : Guide rapide de la SOP sur le traitement des PBMC inter-réseaux - Méthode manuelle d'application sur couche

Annexe A : Formulaire de traitement des PBMC (requis pour le HVTN)

Laboratoire de traitement des spécimens :

ID du participant (PTID) : _____ Visite : _____ Protocole : _____

Date du prélèvement : _____ Heure : _____

Date du début de la procédure : _____ Heure : _____ Traité par : _____

Réactifs/Fabricant	Numéro de lot			Date d'expiration
DMSO (Fabricant : _____)				
SVF (Fabricant : _____)				
HBSS ou autre WDR (Fabricant : _____)				
Tube de séparation cellulaire (Fabricant : _____)				
Milieu à gradient de densité (Fabricant : _____)				
	Volume en ml			
CPS	CPS	DMSO	SVF	Un jour ouvrable
Données à saisir durant le traitement				Échantillon
Type de tube d'échantillon (entourer une réponse)				NaHep/ACD /EDTA
État du sang (entourer une ou plusieurs réponses)				NORM/HÉMO/CAILLOTS
Volume de sang entier utilisable				ml
Méthode de numération (nom de l'instrument ou numération manuelle)				
Numération du volume de resuspension du HBSS (ou autre WDR) (V)				ml
Concentration moyenne de la numération cellulaire (C)				x 10 ⁶ cellules/ml
Nombre total de cellules (T) = C x V				x 10 ⁶ cellules
Calculer le rendement cellulaire/ml de sang entier (vérification QC)= $(T/\text{volume de sang entier utilisable})$				x 10 ⁶ cellules/ml
Calculer le volume estimé de la resuspension de CPS (V1)				ml
Calculer le volume de la resuspension en CPS (Vf), arrondi à la BAISSÉ au ml complet le plus proche				ml
Calculer le nombre réel de cellules par flacon N2 = $(\text{volume de l'aliquote} * T)/(V_f)$; pour le HVTN, le volume de l'aliquote est égal à 1 ml.				x 10 ⁶ cellules/flacon
Date et heure de la fin du traitement (Noter dans la partie réservée aux commentaires si le temps est en dehors des huit heures suivant le début du traitement)				heures:minutes
Imprimer le contenu/code-barres des étiquettes QC LDMS (initiales de la personne effectuant le QC)				
Nombre de tubes cryogéniques réellement congelés Remarque : doit être égal au volume congelé de la resuspension pour des aliquotes de 1 ml.				
Pour l'HVTN, compléter les saisies sur le LDMS, y compris la durée de congélation.				

Annexe A : Formulaire de traitement des PBMC (Requis pour le HVTN)

Laboratoire de traitement des spécimens :

PTID :

Transfert des tubes cryogéniques dans le congélateur de conservation	
Personne qui a transféré les tubes cryogéniques dans le congélateur de conservation affectée par LDMS	
Date (jjmmaaaa)/heure auxquelles les tubes cryogéniques ont été transférés depuis le dispositif de refroidissement lent dans le congélateur de conservation. (L'échantillon doit être conservé à une température de -70/-80°C durant le transfert)	
Examen final	
Examineur/date	

Numérations à l'hémacytomètre	Numération totale	Cellules viables	Non viables	
Carré n° 1 (cellules/mm ²)				
Carré n° 2 (cellules/mm ²)				
Carré n° 3 (cellules/mm ²)				
Carré n° 4 (cellules/mm ²)				
Numération cellulaire moyenne par carré (cellules/mm ²)				
Facteur de dilution des PBMC (1 : DF*)				
Facteur hémacytomètre pour cellules/ml	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	
Concentration de la numération cellulaire (C) = (Numération cellulaire moyenne/mm ²)(DF)(10 ⁴) ; convertir à 10 ⁶ cellules/ml	x 10 ⁶ cellules/ml	x 10 ⁶ cellules/ml	x 10 ⁶ cellules/m l	
% viabilité = (cellules viables/total des cellules)(100)	Sans objet		Sans objet	Sans objet
Numérations cellulaires automatisées (10 ³ /μl=10 ⁶ /ml)	Numération n° 1			
Numération cellulaire (C) par cellules x 10 ⁶ /ml				
Facteur de dilution des PBMC (1/DF*)				
Concentration cellulaire = (C)(DF)	x 10 ⁶ cellules/ml			

*Remarque : facteur de dilution (DF) = (parties cellules + parties liquides de dilution)/parties cellules

Numérations cellulaires par compteur en flux Guava (10 ³ /μl=10 ⁶ /ml)	Numération n° 1			
Numération cellulaire (C) par cellules x 10 ⁶ /ml				
Total cellulaire (T) par cellules x 10 ⁶				
% viabilité				

Commentaires et écarts au protocole :

Cette page est laissée intentionnellement vierge.

Annexe C : Dépannage : Rétablissement des PBMC en l'absence de bande PBMC définie après centrifugation en gradient de densité

C.1 Contexte :

- C.1.1 Si quelque chose a mal tourné durant la centrifugation à gradient de densité du sang, les couches de Ficoll® et de plasma se mélangeront et il n'y aura pas de couche de PMBC visible. Ne pas paniquer. Les PBMC peuvent être récupérées à l'aide d'étapes supplémentaires

C.2 Identifier le problème :

- C.2.1 Retirer les tubes de la centrifugeuse et les transférer sur un plateau.
- C.2.2 Essayer d'identifier pourquoi l'échantillon s'est mélangé. Des causes possibles sont indiquées ci-dessous :
- C.2.2.1 Le tube est tombé.
 - C.2.2.2 Le frein est resté en marche.
 - C.2.2.3 La vitesse de centrifugation a été trop élevée. Vérifier que le réglage en tr/min était correct pour la procédure (CSTFB ou séparation cellulaire manuelle à gradient de densité) en vérifiant le graphique RCF/tr/min pour le rotor. Certaines centrifugeuses nécessitent que les réglages de la centrifugeuse correspondent au type de récipient utilisé. Si les réglages ne sont pas corrects, il est possible que la centrifugeuse calcule mal sa vitesse.
 - C.2.2.4 La centrifugeuse s'est arrêtée en raison d'une coupure de l'alimentation électrique.
 - C.2.2.5 La barrière frittée s'est déplacée. (Cela est souvent dû à une vitesse trop élevée de la centrifugeuse, mais il peut arriver occasionnellement qu'un tube du lot soit défectueux).
 - C.2.2.6 La centrifugeuse a été mal équilibrée.

C.3 Parmi toutes les causes ci-dessus, les cinq premières peuvent être facilement réglées. Si la cause est due à une centrifugeuse mal équilibrée, déterminer la raison de ce déséquilibre. Vérifier ce qui suit :

- C.3.1 Vérifier que les tubes ont été équilibrés.
- C.3.2 Vérifier que les récipients de la centrifugeuse ont été équilibrés.
- C.3.3 Vérifier que les bras de la centrifugeuse et les récipients ont été correctement graissés et huilés

Remarque : en cas de doute à propos d'une centrifugeuse, utiliser un autre appareil.

C.4 En supposant que le problème a été réglé, centrifuger de nouveau les échantillons comme suit :

- C.4.1 Réactifs :
- C.4.1.1 Ficoll®
 - C.4.1.2 Tubes de 50 ml
 - C.4.1.3 Pipettes

C.4.2 Méthode :

Remarque : le Ficoll® est toxique pour les cellules, travailler donc de manière efficace

- C.4.2.1 Ajouter 15 ml de Ficoll® dans des tubes stériles de 50 ml (pas de tubes CSTFB).
- C.4.2.2 Laisser le Ficoll® se réchauffer à température ambiante tout en travaillant avec l'échantillon.
- C.4.2.3 Pour chaque tube mélangé, étiqueter les tubes de 50 ml avec le PTID du sujet. Utiliser une pipette pour retirer lentement le contenu de l'échantillon mélangé du tube de séparation ou du tube CSTFB. (Généralement, la barrière frittée du CSTFB se sera déplacée).
- C.4.2.4 Transférer jusqu'à 30 ml de l'échantillon mélangé dans le tube contenant du Ficoll®.
- C.4.2.5 Répéter cette étape pour tous les échantillons mélangés.
- C.4.2.6 Placer les tubes dans la centrifugeuse en vérifiant que les tubes sont équilibrés.
- C.4.2.7 Centrifuger pendant 30 à 40 minutes à une vitesse de 400 x g avec le frein en position ARRÊT, à une température comprise entre 15 et 30 °C.
- C.4.2.8 Une couche de PBMC devrait être maintenant visible. (Souvent, certaines cellules auront été perdues, la couche peut être alors fine).
- C.4.2.9 La couche supérieure, qui est du plasma potentiellement contaminé par le Ficoll®, peut être recueillie à ce stade et traitée comme dans les sections « Isolation des PBMC et du plasma » et « Conservation du plasma » du protocole principal. Toutefois, les informations relatives à la potentielle contamination de l'échantillon plasmatique par le Ficoll® doivent être saisies dans la section des commentaires pour cet échantillon dans le LDMS.
- C.4.2.10 Transférer soigneusement la couche de PBMC dans un tube à centrifuger de 50 ml étiqueté avec l'identifiant PTID. Utiliser un nouveau tube pour chaque tube de Ficoll®.
- C.4.2.11 Reboucher le tube de Ficoll®.
- C.4.2.12 Retourner au chapitre 16 du protocole principal.

Remarque : dans la section « Commentaires et écarts au protocole » du **formulaire de traitement des PBMC**, enregistrer les détails de l'écart par rapport à la SOP (c'est-à-dire, les étapes de « l'annexe B » ont été suivies pour récupérer les PBMC en raison de l'absence d'une bande de PBMC définie après la centrifugation avec gradient de densité). En outre, noter la durée de la centrifugation, afin de fournir une estimation de la durée au cours de laquelle les cellules ont été en contact avec du Ficoll®. De plus, noter que l'échantillon plasmatique récupéré a été potentiellement contaminé par le Ficoll® sur le **formulaire de traitement des PBMC** et dans la section des commentaires de la saisie dans le LDMS pour les spécimens plasmatiques.

Annexe D : Rassemblement des couches leucocytaires pour isolation des PBMC par la méthode Ficoll

La procédure peut être utilisée lors de l'isolation des PBMC dans de multiples tubes de sang. Cette procédure permet de consolider les couches leucocyto-plaquettaires afin de réduire la consommation de Ficoll. Quand elles sont bien effectuées, les couches leucocyto-plaquettaires rassemblées procurent un grand rendement de cellules qui sont généralement très propres.

Généralement, les couches leucocyto-plaquettaires de deux tubes de 10 ml peuvent être mises en couche dans 6 ml de Ficoll® ou de solution à gradient de densité équivalent dans un tube conique de 15 ml. En rassemblant les couches leucocyto-plaquettaires, un tube conique unique de 50 ml contenant du Ficoll® peut être utilisé pour traiter jusqu'à six tubes d'EDTA de 10 ml.

Procédure :

- D1. Centrifuger les tubes de sang EDTA (ou hépariné ou ACD) à une vitesse de 400 x g pendant 10 minutes.
- D2. Récolter le plasma de chaque tube jusqu'à environ 5 mm de la couche leucocytaire blanche.
- D3. Ajouter 2 ml de WDR dans un tube en polypropylène de 10 ml stérile et laisser sous la hotte à flux laminaire.
- D4. Tenir le tube de plasma déplété (qui ne contient plus maintenant que les cellules concentrées) à un angle d'environ 30°. Utiliser une pipette jetable stérile en polypropylène à grand diamètre pour récolter la couche leucocyto-plaquettaire. Aspirer la couche leucocyto-plaquettaire en baissant la partie inférieure du tube. La couche leucocyto-plaquettaire « glissera » au fond de la couche d'érythrocytes concentrés avec la plupart des leucocytes venant dans le premier ml aspiré. Transférer la couche leucocyto-plaquettaire dans le tube contenant le WDR, en rinçant deux ou trois fois la pipette contenant la suspension WDR/cellules. Récolter et rassembler les couches leucocyto-plaquettaires des tubes restants. Selon le nombre original de tubes de prélèvement sanguin, la suspension de couches leucocyto-plaquettaires sera d'environ 5 ml.
- D5. Pour capturer les cellules accrochées à la pipette jetable, verser 3 ml de WDR dans un tube jetable stérile de 5 ml et rincer le contenu de la pipette dans le tube de 3 ml de WDR frais. Rassembler les cellules rincées avec les principales couches leucocyto-plaquettaires rassemblées.
- D6. Mélanger délicatement trois ou quatre fois les couches leucocyto-plaquettaires rassemblées avec une pipette standard de 10 ml et appliquer la couche leucocyto-plaquettaire en suspension sur le Ficoll.
- D7. Poursuivre avec la SOP standard relative à l'isolation du Ficoll.

Matériel supplémentaire nécessaire :

- un tube en polypropylène de 10 ml stérile pour la récolte de 15 ml de Ficoll ;
OU
un tube de 50 ml pour une récolte de 50 ml de Ficoll (avec l'expérience, le Ficoll peut être mis en couche sous le rassemblement d'un tube de 50 ml) ;
- un tube stérile de 5 ml pour le rinçage de la pipette ;
- une pipette stérile de 2,5 ml en polypropylène, à grand diamètre.

Remarque : essayer d'appliquer les couches leucocyto-plaquettaires rassemblées de telle manière que le matériel rassemblé soit dilué à un rapport d'environ 1/2 (couche leucocyto-plaquettaire/diluant), de la même manière que pour le sang entier.

Cette page est laissée intentionnellement vierge.

Annexe E : Guide rapide de la SOP sur le traitement des PBMC inter-réseaux - tubes CSTFB

L'utilisation du **formulaire de traitement des PBMC** (Annexe A) est **requis pour le HVTN**. Avant d'utiliser ce guide rapide pour la première fois, veiller à examiner la SOP complète relative aux PBMC pour les remarques et les détails importants ainsi que les directives propres aux réseaux.

Étapes (Les quantités pour des volumes plus petits sont en <i>italiques</i> .)	Se reporter à la SOP
1. Préparer et refroidir la CPS.	10.3
2. Préparer les échantillons de sang entier, les réactifs et les fournitures.	14.2
3. Si des aliquotes de plasma sont requises selon les instructions du protocole : a. Centrifuger le sang entier à une vitesse comprise entre 200 et 400 x g pendant 10 minutes. b. Marquer le volume total de sang entier au niveau du ménisque puis transférer le plasma dans un tube à centrifuger de 15 ou de 50 ml pour la suite du traitement (vitesse comprise entre 800 et 1 200 x g pendant 10 minutes, frein facultatif) c. Ajouter une quantité suffisante de WDR pour ramener le sang à son volume de sang entier original, mélanger délicatement et continuer le traitement des PBMC.	14.3
4. Ajouter 5 ml (<i>2 ml</i>) de WDR à chaque tube CSTFB. 5. Transférer entre 10 et 20 ml (<i>entre 4 et 5 ml</i>) de sang dans les tubes CSTFB étiquetés. 6. Ajouter le WDR de rinçage de tube et le WDR final dans les tubes CSTFB jusqu'à 30 ml (<i>7,5 ml</i>) (WDR + sang entier).	14.4
7. Centrifuger à une vitesse comprise entre 800 et 1 000 x g pendant 15 minutes à une température comprise entre 15 et 30 °C avec le <u>frein sur ARRÊT</u> . 8. Inspecter les tubes à la recherche d'éventuels problèmes. 9. Récolter chaque couche leucocyto-plaquettaire des tubes CSTFB dans un tube conique unique correspondant de 50 ml (<i>15 ml</i>).	14.5
10. Ajouter WDR au QS pour obtenir un volume total de 45 ml (<i>10 ml</i>) et mélanger délicatement. 11. Lavage n° 1 – centrifuger à une vitesse comprise entre 200 et 400 x g pendant 10 minutes, à une température comprise entre 15 et 30 °C (frein facultatif). 12. Vérifier s'il y a des culots cellulaires ! 13. Retirer délicatement le supernageant sans déranger les culots cellulaires.	16.1
14. Resuspendre les culots cellulaires dans de petites quantités de WDR pour obtenir une suspension des cellules homogène. 15. Combiner jusqu'à quatre suspensions de culots cellulaires dans un tube conique de 50 ml (<i>deux dans un tube de 15 ml</i>). 16. Ajouter le WDR de rinçage du tube et le WDR final de 45 ml (<i>10 ml</i>) au tube des cellules. 17. Lavage n° 2 – centrifuger à une vitesse comprise entre 200 et 400 x g pendant 10 minutes, à une température comprise 15 entre 30 °C (frein facultatif). 18. Vérifier s'il y a des culots cellulaires ! 19. Retirer délicatement le supernageant sans déranger les culots cellulaires.	16.2
20. Calculer le volume de la numération du WDR en resuspension (V). 21. Combiner les culots cellulaires dans un tube en utilisant le volume de resuspension du WDR. Il s'agit du volume sur lequel la numération cellulaire est basée. 22. Compter et calculer le nombre total de cellules. 23. Calculer le rendement cellulaire en cellules/ml de sang entier utilisable.	16.3
24. Calculer le volume de resuspension de la CPS final. Vérifier les calculs.	16.4
25. Compléter l'impression, l'étiquetage et le contrôle de qualité des tubes cryogéniques AVANT	16.5

Étapes (Les quantités pour des volumes plus petits sont en <i>italiques</i> .)	Se reporter à la SOP
la centrifugation finale.	
26. Centrifuger à une vitesse comprise entre 200 et 400 x g pendant 10 minutes, à une température comprise entre 15 et 30 °C (frein facultatif).	16.6
27. Retirer délicatement le supernageant sans déranger les culots cellulaires. 28. Resuspendre délicatement le culot cellulaire dans de la CPS froide (V_f) tout en tournant le tube pour obtenir une distribution homogène. Il est recommandé de travailler sur de la glace mouillée. 29. Composer délicatement les aliquotes de CPS-cellules.	16.7
30. Transférer immédiatement (≤ 10 minutes) tous les tubes cryogéniques dans un appareil de congélation à vitesse contrôlée et commencer la congélation.	16.8
31. Après la durée appropriée, transférer les tubes cryogéniques dans l'appareil de conservation sur place et expédier pendant la période indiquée par le réseau.	17 ou 18
32. Pour le HVTN, examiner le formulaire de traitement des PBMC pour vérifier qu'il est complet et exact.	17.2

Annexe F : Guide rapide de la SOP sur le traitement des PBMC inter-réseaux - méthode manuelle d'application sur couche

L'utilisation du **formulaire de traitement des PBMC** (Annexe A) est **requis pour le HVTN**. Avant d'utiliser ce guide rapide pour la première fois, veiller à examiner la SOP complète relative aux PBMC pour les remarques et les détails importants ainsi que les directives propres aux réseaux.

Étapes (Les quantités pour des volumes plus petits sont en <i>italiques</i> .)	Se reporter à la SOP.
1. Préparer et refroidir la CPS.	10.3
2. Préparer les échantillons de sang entier, les réactifs et les fournitures.	14.2
3. Si des aliquotes de plasma sont requises selon les instructions du protocole : a. Centrifuger le sang entier à une vitesse comprise entre 200 et 400 x g pendant 10 minutes. b. Marquer le volume total de sang entier au niveau du ménisque puis transférer le plasma dans un tube à centrifuger de 15 ou de 50 ml pour la suite du traitement (vitesse comprise entre 800 et 1 200 x g pendant 10 minutes, frein facultatif). c. Ajouter une quantité suffisante de WDR pour ramener le sang à son volume de sang entier original, mélanger délicatement et continuer le traitement des PBMC.	15.3
4. Transférer le sang entier dans un tube à centrifuger stérile de 50 ml (<i>15 ml</i>) et diluer avec du WDR, selon le besoin.	15.4
5. Appliquer soigneusement et lentement le sang sur le milieu à gradient de densité. (La méthode d'application sous couche est une alternative approuvée.)	
6. Centrifuger à une vitesse de 400 x g pendant 30 minutes avec le <u>frein en position ARRÊT</u> . 7. Vérifier chaque tube à centrifuger à la recherche de problèmes éventuels. 8. Récolter chaque couche leucocytaire dans un tube conique à centrifuger unique de 50 ml (<i>15 ml</i>).	15.5
9. Ajouter une quantité suffisante de WDR pour obtenir un volume total de 45 ml (<i>10 ml</i>) et mélanger délicatement. 10. Lavage n° 1 – centrifuger à une vitesse comprise entre 200 et 400 x g pendant 10 minutes, à une température comprise entre 15 et 30 °C (frein facultatif). 11. Vérifier s'il y a des culots cellulaires ! 12. Retirer délicatement le supernageant sans déranger les culots cellulaires.	16.1
13. Resuspendre les culots cellulaires dans de petites quantités de WDR pour obtenir une suspension des cellules homogène. 14. Combiner jusqu'à quatre suspensions de culots cellulaires dans un tube conique de 50 ml (<i>2 dans un tube de 15 ml</i>). 15. Ajouter le WDR de rinçage du tube et le WDR final de 45 ml (<i>10 ml</i>) au tube des cellules. 16. Lavage n° 2 - centrifuger à une vitesse comprise entre 200 et 400 x g pendant 10 minutes, à une température comprise entre 15 et 30 °C (frein facultatif). 17. Vérifier s'il y a des culots cellulaires ! 18. Retirer délicatement le supernageant sans déranger les culots cellulaires.	16.2
19. Calculer le volume de la numération du WDR en resuspension (V). 20. Combiner les culots cellulaires dans un tube en utilisant le volume de resuspension du WDR. Il s'agit du volume sur lequel la numération cellulaire est basée. 21. Compter et calculer le nombre total de cellules. 22. Calculer le rendement cellulaire en cellules/ml de sang entier utilisable.	16.3
23. Calculer le volume de resuspension de la CPS final. Vérifier les calculs.	16.4
24. Compléter l'impression, l'étiquetage et le contrôle de qualité des tubes cryogéniques AVANT la centrifugation finale.	16.5

Étapes (Les quantités pour des volumes plus petits sont en <i>italiques</i> .)	Se reporter à la SOP.
25. Centrifuger à une vitesse comprise entre 200 et 400 x g pendant 10 minutes, à une température comprise entre 15 et 30 °C (frein facultatif).	16.6
26. Retirer délicatement le supernageant sans déranger les culots cellulaires. 27. Resuspendre délicatement le culot cellulaire dans de la CPS froide (<i>V_f</i>) tout en tournant le tube pour obtenir une distribution homogène. Il est recommandé de travailler sur de la glace mouillée. 28. Composer délicatement les aliquotes de CPS-cellules.	16.7
29. Transférer immédiatement (≤ 10 minutes) tous les tubes cryogéniques dans un appareil de congélation à vitesse contrôlée et commencer la congélation.	16.8
30. Après la durée appropriée, transférer les tubes cryogéniques dans l'appareil de conservation sur place et expédier pendant la période indiquée par le réseau.	17 ou 18
31. Pour le HVTN, examiner le formulaire de traitement des PBMC pour vérifier qu'il est complet et exact.	17.2