


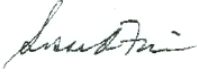



Owner	HIV/AIDS Network Coordination (HANC)
-------	--------------------------------------

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

Índice

1	Objetivo.....	3
2	Escopo	3
3	Antecedentes.....	3
4	Autoridade e responsabilidade.....	3
5	Amostra.....	4
6	Equipamento	5
7	Descartáveis	7
8	Equipamento de proteção individual.....	7
9	Reagentes.....	8
10	Preparação de reagentes.....	10
11	Calibragem.....	12
12	Controle da qualidade.....	13
13	Introdução e diretrizes para o processamento de CMSP	15
14	Separação de células e diluição de sangue com reposição plasmática opcional por tubo de separação de células com barreira de frita (TSCBF)	
	O Capítulo 14 pode ser usado por todas as redes; verificar requisitos protocolares e materiais disponíveis. -- Use o Capítulo 14 ou o Capítulo 15, mas não ambos.	16
15	Separação de células pelo processo manual de superposição ou sedimentação com Ficoll® e diluição do sangue com reposição plasmática opcional pelo processo manual de separação celular com gradiente de densidade	
	O Capítulo 15 pode ser usado por todas as redes; verificar requisitos protocolares e materiais disponíveis. Use o Capítulo 14 ou o Capítulo 15, mas não ambos.	20
16	Lavagem, contagem, ressuspensão, concentração e congelamento controlado de um dia para o outro	
	O Capítulo 16 aplica-se a todas as redes.	24
17	Armazenamento no local a -70/-80 °C	
	O Capítulo 17 aplica-se à ACTG e à HVTN.....	29
18	Seção 6B do Processamento de CMSP: armazenamento no local em nitrogênio líquido (LN2)	
	O Capítulo 18 aplica-se a IMPAACT, HPTN e MTN	30
19	Registro dos resultados	31
20	Cálculos	31
21	Limitações do procedimento	32
22	Observações procedimentais	32
23	Glossário de termos	32
24	Referências	34
25	Documentação adicional (a ser mantida pelo laboratório).....	35
26	Anexos.....	35
	Anexo A: Planilha de processamento de CMSP*	A1
	Anexo B: Exemplo de relatório de troca do isopropanol NALGENE® Mr. Frosty	B1
	Anexo C: Solução de problemas: recuperação de CMSP na ausência de uma faixa CMSP definida após a centrifugação com gradiente de densidade	C1
	Anexo D: Agregação de camadas de creme leucocitário para isolamento de CMSP com Ficoll®	D1
	Anexo E: Guia de consulta rápida interrede do POP de CMSP—tubos TSCBF	E1
	Anexo F: Guia de consulta rápida interrede do POP de CMSP—método de superposição manual	F1

*O Anexo A é também fornecido como um formulário que pode ser baixado e editado no portal público da HANC: <http://www.hanc.info/labs/Pages/PBMCSOP.aspx>.

1 Objetivo

- 1.1 Este procedimento operacional padrão (POP) descreve procedimentos para o isolamento e para a criopreservação de células mononucleares sanguíneas periféricas (CMSP) a partir do sangue integral.

2 Escopo

- 2.1 Este procedimento deve ser usado para o processamento de amostras de sangue para o isolamento, a criopreservação e o armazenamento de amostras de CMSP.

3 Antecedentes

- 3.1 CMSPs recém-coletadas ou criopreservadas são usadas na avaliação da resposta imunológica celular induzida por vacinas ou por terapia antirretroviral, das alterações associadas ao HIV na resposta imunológica e da recuperação de vírus de replicação competente. Estes ensaios requerem CMSPs que tenham sido isoladas ou criopreservadas sob condições rigorosamente definidas que asseguram o nível ideal de recuperação, viabilidade e funcionalidade. Alguns estudos de validação indicam que o ideal é que o sangue seja processado e congelado dentro de 8 horas a partir da hora da coleta de sangue para manter a máxima funcionalidade das células nos ensaios de monitoramento imunológico. A HVTN requer que o tempo total da coleta ao congelamento seja menor ou igual a 8 horas. Para outras redes, o limite de tempo pode variar; consulte os documentos protocolares apropriados.

4 Autoridade e responsabilidade

- 4.1 O diretor de laboratório da rede (ou o seu designado) tem autoridade para estabelecer, analisar e atualizar este procedimento.
- 4.2 O Gabinete de coordenação da rede AIDS/HIV (HIV AIDS Network Coordination, HANC) é responsável pela manutenção e pelo controle da documentação de POP.
- 4.3 O pesquisador principal/gerente de laboratório é responsável pela implementação deste procedimento ou uma versão de rede equivalente e por assegurar que todo o pessoal apropriado seja treinado.
- 4.4 Todos os técnicos são responsáveis por ler e compreender este POP antes de realizar os procedimentos descritos.

5 Amostras

5.1 Preparação do paciente

Nenhuma

5.2 Tipo de amostra

Sangue integral anticoagulado coletado em tubos de coleta de sangue.

5.3 Volume de amostra ideal/mínimo

Volume de sangue requerido pelo protocolo.

5.4 Condições de manuseio

- 5.4.1 As amostras de sangue integral fresco e anticoagulado devem ser armazenadas à temperatura ambiente (15 a 30 °C) da hora da coleta até a entrega ao laboratório/unidade de processamento.
- 5.4.2 As amostras de sangue integral fresco e anticoagulado devem ser entregues à unidade de processamento laboratorial tão logo quanto possível após a coleta, para proporcionar ao laboratório de processamento bastante tempo para concluir os procedimentos de criopreservação.
- 5.4.3 As amostras de sangue integral fresco e anticoagulado devem ser processadas pela unidade de processamento laboratorial tão logo quanto possível após o recebimento. A HVTN requer que o tempo total da coleta ao congelamento seja menor ou igual a 8 horas. Para outras redes, este limite de tempo pode variar; verifique os documentos protocolares apropriados. Registre a hora da coleta na **Planilha de processamento de CMSP** (Anexo A) e/ou no SGDL.
- 5.4.4 Não refrigere ou congele sangue integral.
- 5.4.5 Registre a hora do início do processamento na **Planilha de processamento de CMSP** ou em documento de registro equivalente.
- Obs.:** o uso da **Planilha de processamento de CMSP** é **requerido** para a HVTN para rastrear o tempo de processamento e documentar os problemas que possam surgir durante o processamento. A **Planilha de processamento de CMSP** está disponível nos anexos e no site <http://www.hanc.info/labs/Pages/PBMCSOP.aspx>.
- Obs.:** o uso da **Planilha de processamento de CMSP** é **recomendado** para ACTG, HPTN, IMPAACT e MTN, mas tais redes também podem usar um documento de registro equivalente, tal como o Sistema de gerenciamento de dados laboratoriais (SGDL), para este objetivo.
- 5.4.6 Se alguns dos tubos de amostra de sangue contiverem pequenos coágulos, tente remover os coágulos antes do processamento. Registre o número total de tubos que continham pequenos coágulos na seção de comentários da **Planilha de processamento de CMSP** ou no SGDL.

- 5.4.7 A hemólise pode afetar a qualidade das CMSPs. Anote qualquer evento de hemólise na **Planilha de processamento de CMSP**, usando as definições de hemólise encontradas na seção Glossário de termos. Se as amostras estiverem amplamente hemolisadas (3+ a 4+), tente realizar isolamento de CMSP e criopreservação. Se o rendimento celular estiver significativamente abaixo do intervalo esperado, armazene as CMSPs com as observações apropriadas e entre em contato com a clínica para possível substituição da amostra.

5.5 Amostras inaceitáveis

- 5.5.1 Amostras não rotuladas ou erroneamente rotuladas serão rejeitadas.
- 5.5.2 Se apenas alguns tubos Vacutainer® de sangue de um lote de NIP estiverem amplamente coagulados (vide glossário), tais tubos podem ser descartados, se tal procedimento for uma prática aceitável para a rede (vide observações abaixo), e os não coagulados são processados.

Obs. para HVTN: processe os tubos de sangue coagulado, registrando os comentários apropriados na **Planilha de processamento de CMSP**. Se o rendimento celular for $<0,4 \times 10^6$ células/mL, entre em contato com a clínica para possível substituição da amostra.

Obs. para ACTG, IMPAACT, HPTN e MTN: todo o sangue deve ser processado, e as complicações devem ser anotadas na **Planilha de processamento de CMSP** e/ou no SGDL, salvo orientação contrária do DPL (Diagrama de processamento laboratorial), PEC (Protocolo específico do centro) ou POP (Procedimento operacional padrão). Se todos os tubos Vacutainer® com sangue de um lote de NIP estiverem coagulados, remova os coágulos e continue a processar a fração restante.

Obs.: na seção “Observações e desvios do protocolo” da **Planilha de processamento de CMSP**, anote a quantidade de tubos coagulados e a quantidade total de tubos deste lote de NIP. Se aplicável, registre os detalhes do processamento do sangue coagulado. Se sangue coagulado for processado, insira “a partir de sangue coagulado” na seção de comentários da entrada SGDL da amostra de CMSP e também das amostras de plasma.

Registre o total de tubos que foram descartados devido a coágulos amplos ou hemólise ampla na seção de comentários da **Planilha de processamento de CMSP**.

- 5.5.3 Documente todas as condições não esperadas das amostras na **Planilha de processamento de CMSP**, inserindo as informações no sistema de gerenciamento de dados laboratoriais, tais como na seção de comentários do Sistema de gerenciamento de dados laboratoriais (SGDL).

6 Equipamentos

Os fornecedores e os equipamentos recomendados estão listados. Salvo especificado de outra forma, podem ser usados equipamentos de qualidade igual ou superior à dos recomendados.

6.1 Preparação e processamento

- 6.1.1 Gabinete com segurança biológica para fluxo laminar, conforme montado pelo laboratório (P2, P2.5 ou P3)
- 6.1.2 Centrífuga de baixa velocidade (capacidade de 300 a 1000 x g), com rotor de cuba móvel, de preferência refrigerado, temperatura ambiente aceitável
- 6.1.3 Micropipetas de 20, 200 e 1000µL

- 6.1.4 Pipet-Aid (de preferência sem fio) para pipetas sorológicas descartáveis
- 6.1.5 2 a 8 °C
- 6.1.6 -20 °C (ou inferior) **sem** descongelamento automático (para armazenamento de SBF)
- 6.1.7 -80 °C (-65 a -95 °C) para armazenamento de CMSPs de curto prazo
- 6.1.8 Banho-maria entre 37 a 56 °C
- 6.1.9 Balde ou béquer para alvejante ou outro desinfetante para o enxágue de pipetas, se requerido pela prática de segurança local

6.2 Equipamento de nitrogênio líquido (LN2) (se requerido pela rede)

- 6.2.1 Tanque de armazenamento de LN2 (≤ -140 °C)
- 6.2.2 Transportador de LN2 seco aprovado pela IATA

6.3 Contagem celular (escolha uma das seguintes opções)

- 6.3.1 Contador celular automatizado capaz de enumerar células viáveis (Beckman-Coulter Vi-Cell, Guava PCA® ou equivalente)
- 6.3.2 Câmara para contagem celular manual (hemocitômetro Neubauer) e microscópio de campo luminoso
- 6.3.3 Contador celular automatizado sem capacidade de enumerar células viáveis (Coulter Counter, Abbott CelDyne™, Sysmex® ou equivalente) usado em paralelo com um hemocitômetro para enumerar células viáveis.

Obs. para HVTN: um contador celular automatizado sem capacidade de identificar células viáveis pode ser usado para obter uma contagem total de células sem enumerar células viáveis.

Observação para os laboratórios participantes do Programa de teste de proficiência em criopreservação de CMSP do Instituto de Garantia da Qualidade do Reino Unido (IQA): a avaliação de viabilidade é requerida.

6.4 Criopreservação (use uma das seguintes opções)

- 6.4.1 StrataCooler® Cryo (Stratagene). O StrataCooler® Cryo deve estar entre 2 e 8 °C antes de começar o resfriamento dos frascos criogênicos. Não coloque os frascos criogênicos no StrataCooler® Cryo se a temperatura inicial estiver abaixo de 2 °C.
- 6.4.2 Contentor de congelamento criogênico de 1° C/minuto NALGENE® Mr. Frosty. O Mr. Frosty deve ser armazenado à temperatura ambiente (15 a 30 °C).

Obs.: troque o isopropanol a cada cinco ciclos de congelamento/descongelamento. Um registro deve ser usado para o rastreamento de ciclos de congelamento/ descongelamento e de trocas de reagente.

Vide Anexo B.
- 6.4.3 Congelador controlado, tais como a câmara de congelamento CryoMed® (Gordinier)

7 Descartáveis

7.1 Plásticos

- 7.1.1 Pipetas sorológicas descartáveis de 1, 5, 10, 25 e 50 mL, estéreis
- 7.1.2 Ponteiras de precisão para pipetas de 20, 100, 200 e 1000 µL, estéreis
- 7.1.3 Tubos de propileno de centrifugação estéreis descartáveis, de 15 e de 50 mL, de fundos cônicos e graduados.
- 7.1.4 Frascos criogênicos de 1,8 a 2 mL estéreis com tampa de rosca e anel vedação (o-ring), exclusivamente de propileno, autossustentáveis, graduados, à prova de vazamento, formulados para preservação com LN2 em fase de vapor (aproximadamente -140 °C).

Produtos das marcas NALGENE® NUNC® número de catálogo 377267; Wheaton, número de catálogo 985742; Fisher Scientific, número de catálogo 05-669-57; Corning, número de catálogo 430659 (12,7x49mm), SARSTEDT, número de catálogo 72.694.006.

Obs.: nem todas as marcas de frascos criogênicos são adequadas para armazenamento de longo prazo em LN2. Verifique com a(s) rede(s) aplicável(is) ou o fabricante antes da substituição deste item.
- 7.1.5 Opcional: frascos/balões estéreis descartáveis de 250 a 500 mL com gargalo de 45 mm
- 7.1.6 Opcional: pipetas de transferência plásticas estéreis, de 5 mL embaladas individualmente
- 7.1.7 Opcional: se não forem usados tubos de separação celular com barreira de frita (TSCBF) previamente enchidos, serão requeridos tubos TSCBF vazios (vide 9.2 para mais detalhes) ou tubos de centrifugação descartáveis de 15 e de 50 mL, como na seção 7.1.3.

7.2 Marcadores

Os marcadores para escrita nos tubos e frascos de processamento devem ter ponta fina e conter tinta indelével de secagem rápida. (p. ex.: caneta marcadora Fisher Scientific com ponta de feltro e linha fina).

Opcional: marcadores de várias cores podem ser úteis para codificar por cor diferentes NIPs.

7.3 Rótulos

Rótulos criogênicos adequados para temperaturas de -80 °C e para LN2.

Exemplos: rótulos para congelador Cryo-Tags® e Cryo-Babies® da Diversified Biotech, Brady B461 ou B490 da Shamrock.

8 Equipamento de proteção individual

É requerido equipamento de proteção individual adequado para uso com agentes patogênicos transportados pelo sangue. Siga as diretrizes e práticas laboratoriais locais para o manuseio de produtos hematológicos.

8.1 Jaleco de laboratório

8.2 Proteção ocular

8.3 Luvas nitrílicas não empoadas ou equivalentes.

8.4 Luvas criogênicas e protetores faciais (com tirante maxilar opcional) são necessários se você estiver usando LN2.

9 Reagentes

9.1 Reagentes diluentes de lavagem (RDL)

Solução salina balanceada de Hanks (SSBH*) sem cálcio ou magnésio, pronta para uso.

*Alternativa: 1X solução salina fosfatada tamponada sem cálcio ou magnésio, pronta para uso.

**Alternativa para ACTG e IMPAACT: meio RPMI sem SBF ou antibióticos.

Obs.: armazene os frascos abertos à temperatura recomendada pelo fabricante até o uso ou até a data de validade do fabricante. Descarte se sinais visíveis de contaminação, tais como aparência nebulosa, desenvolvam-se.

9.2 Tubo de separação celular previamente enchido com barreira de frita (TSCBF)

A capacidade do tubo requerida irá depender do volume total de sangue

Volume total de sangue (mL)	Capacidade do tubo (mL)
≥ 15	50
< 15	12 ou 14

Tubos TSCBF previamente enchidos de 12 a 14 mL ou 50 mL com meios de gradiente de densidade 1,077 (p. ex.: Accuspin™ System Histopaque®-1077 da Sigma ou Ficoll-Paque™ PLUS da Greiner Bio-One):

Condições de armazenamento:

- armazenar em refrigerador (2 a 8 °C);
- proteger da luz;
- usar antes da data de validade do fabricante;
- a aparência nebulosa indica deterioração do produto;
- deixar os tubos TSCBF atingirem a temperatura ambiente (15 a 30 °C) antes de usá-los.

Alternativas para o sistema de TSCBFs previamente enchidos:

Combine um TSCBF seco com meios de gradiente de densidade 1,077

Capacidade do tubo (mL)	Volume dos meios de gradiente de densidade (mL)
50 mL	15 mL
12 a 14 mL	3 mL

Exemplos listados abaixo:

TSCBF secos (tubos)

- Tubos de separação Accuspin™ secos (12 mL ou 50 mL)
- Tubos de separação Leucosep® secos (14 mL ou 50 mL)

Meios de gradiente de densidade 1,077

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

Obs.: se estiver usando o TSCBF, use o [Capítulo 14](#). Se estiver usando superposição ou sedimentação manual (sem barreiras de frita), use o [Capítulo 15](#).

9.3 Reagentes de congelamento

9.3.1 Soro bovino fetal (SBF) inativado por aquecimento, de preferência

Consulte a(s) rede(s) aplicável(is) sobre os fornecedores preferenciais. Nem todas as marcas de SBF são equivalentes. Questões referentes ao controle de qualidade, toxicidade, antecedente e despacho/importação devem ser resolvidas antes da troca de fornecedores.

Solicite um certificado de análise ao fornecedor para os registros de controle de qualidade do laboratório local.

Obs.: uma cópia do certificado de análise do SBF pode ser requerida para exportação (ou importação) de alíquotas CMSP entre países.

O SBF armazenado congelado ($\leq -20\text{ }^{\circ}\text{C}$) pode ser usado até a data de validade indicada pelo fabricante.

O SBF descongelado e armazenado de 2 a 8 °C é estável por um mês.

9.3.2 Dimetilsulfóxido (DMSO), grau de cultura celular

Certifique-se de usar DMSO em grau de cultura celular, p. ex.: Hybrimax, Sigma-Aldrich - nº de catálogo D2650, testado com endotoxina e com hibridoma.

Armazene os frascos que não foram abertos à temperatura ambiente (15 a 30 °C). Verifique o frasco quanto à data de validade.

O DMSO deve ser fresco e a sua esterilidade deve ser mantida. (O reagente pode ser alíquotado em pequenas quantidades para ajudar a preservar a esterilidade.) Rotular com a data quando da abertura.

Após a abertura, o DMSO não diluído é estável à temperatura ambiente (15 a 30 °C), quando protegido da luz e da umidade, por 6 meses.

Use técnicas assépticas quando remover o DMSO do frasco para evitar possível contaminação.

Descarte frascos abertos se sinais de contaminação forem observados.

9.3.3 Desinfetante

9.3.3.1 Desinfetante com etanol a 70% v/v, frasco com spray.

9.3.3.2 Alvejante a 10% v/v, balde ou béquer e frasco com spray.

9.3.3.3 Outro desinfetante conforme especificado pela política laboratorial local

9.4 Reagentes de contagem celular

Se estiver realizando contagens manuais de células, os seguintes reagentes são necessários:

9.4.1 Solução azul de tripano a 0,4%

9.4.2 Opcional: pode ser usada solução de violeta de cristal a 0,05% para tingir o núcleo celular para que células mononucleares possam ser identificadas e contadas usando um hemocítômetro. Se for requerida viabilidade, uma segunda contagem manual usando azul de tripano pode ser realizada.

A solução de violeta de cristal a 0,05% contém:

- 0,05 g de violeta de cristal;
- 2 mL de ácido acético glacial;
- 98 mL de H₂O destilada ou deionizada.

10 Preparação do reagente

10.1 SBF inativado por aquecimento (SBF-IA)

O SBF-IA pode ser pedido diretamente ao fabricante. Se você receber o SBF-IA, siga as seguintes instruções para descongelamento, alíquotação e uso.

10.1.1 Remova o SBF-IA do congelador a -20 °C.

10.1.2 Descongele, de preferência, no refrigerador (2 a 8 °C) ou por várias horas à temperatura ambiente. Não permita que o SBF-IA permaneça à temperatura ambiente por um tempo maior do que o necessário para concluir o processo de descongelamento.

10.1.3 Gire cuidadosamente duas ou três vezes durante o curso do descongelamento.

10.1.4 Uma vez descongelado, misture o SBF-IA cuidadosa, mas completamente, usando técnicas assépticas. Aliquotar em tubos cônicos estéreis rotulados de 50 mL ou em outros tamanhos de alíquotas apropriados para a carga de trabalho prevista.

Obs.: os rótulos devem identificar estes tubos como “SBF-IA”, incluindo o número de lote, a data da alíquota, a data de validade e a rubrica do técnico. O SBF é estável por 1 mês entre 2 e 8 °C, ou até a data de validade do fabricante a -20 °C.

10.1.5 Refrigere (2 a 8 °C) a quantidade de tubos de alíquota necessários para a carga de trabalho esperada. Misture bem antes de usar. Os tubos de alíquota que não são imediatamente necessários podem ser colocados no congelador a -20 °C, sendo estáveis até a data de validade original do fabricante.

Obs.: ciclos repetidos de congelamento/descongelamento terão um efeito adverso na qualidade do SBF. Não recongele alíquotas que tenham sido armazenadas a temperaturas refrigeradas.

10.1.6 Para usar as alíquotas congeladas, descongele-as, de preferência, durante a noite no refrigerador, ou por várias horas à temperatura ambiente. Mude a data de validade para um mês. Misture bem antes de usar.

10.2 Preparação da inativação por aquecimento do SBF

Se o SBF não for inativado por aquecimento pelo fabricante, faça a inativação por aquecimento usando as instruções abaixo.

10.2.1 Remova o SBF do congelador a -20 °C.

- 10.2.2 Descongele, de preferência, no refrigerador (2 a 8 °C), ou por várias horas à temperatura ambiente. Não deixe o SBF permanecer à temperatura ambiente por tempo maior que o necessário para realizar o processo de descongelamento.
- 10.2.3 Gire cuidadosamente duas ou três vezes durante o curso do descongelamento.
- 10.2.4 Coloque o SBF em banho-maria a 56 °C (55 a 57 °C). Monitore cuidadosamente a temperatura do banho-maria. **Temperaturas mais altas podem degradar os componentes do SBF.**
- Obs.:** o nível da água no banho-maria deve cobrir o nível do SBF contido no frasco, não devendo, porém, tocar a tampa do frasco. Isto ajudará a garantir o aquecimento uniforme do SBF e a evitar contaminação.
- 10.2.5 Uma vez que o banho-maria tenha retornado aos 56 °C (55 a 57 °C) aqueça o SBF por 30 minutos, misturando a cada 5 a 10 minutos. **Aquecer por períodos de tempo mais longos pode degradar os componentes do SBF.**
- Obs.:** se o topo do frasco entrar em contato com o banho-maria, esfregue o topo do frasco com etanol 70% v/v antes de abrir.
- 10.2.6 Misture o SBF, cuidadosa, mas completamente, usando técnicas assépticas. Aliquote em tubos cônicos estéreis rotulados de 50 mL.
- Obs.:** os rótulos devem identificar estes tubos como “SBF-IA” (SBF inativado por aquecimento) e inclua o número de lote, a data da alíquota, a data de validade e a rubrica do técnico. O SBF é estável por 1 mês a 2 a 8 °C, ou até a data de validade original do fabricante se armazenado a -20 °C.
- Refrigere (2 a 8 °C) a quantidade de tubos de alíquota necessários para a carga de trabalho esperada. Misture bem antes de usar.
- Obs.:** ciclos repetidos de congelamento/descongelamento terão um efeito adverso na qualidade do SBF. Não recongele alíquotas que tenham sido armazenadas a temperaturas refrigeradas.
- 10.2.7 Os tubos de alíquota restantes podem ser devolvidos ao congelador a -20 °C e são estáveis até a data de validade original do fabricante.
- 10.2.8 Quando estiver pronto para usar as alíquotas congeladas, descongele-as, de preferência, durante a noite no refrigerador, ou por várias horas à temperatura ambiente. Mude a data de validade para um mês. Misture bem antes de usar.

10.3 Solução criopreservativa (SCP) fresca

10.3.1

Componentes	Percentual (v/v)
DMSO	10%
SBF (inativado por aquecimento)	90%

10.3.2 Preparação da SCP

Use um contentor estéril descartável de 15 mL ou de 50 mL para preparar a SCP. A mistura do DMSO e do SBF é uma reação exotérmica. A SCP deve ser preparada com antecedência, e resfriada no refrigerador (2 a 8 °C) por, no mínimo, 30 minutos, ou por imersão em um banho de gelo por, no mínimo, 15 minutos antes de usar.

Obs. para HPTN, HVTN e MTN: a SCP pode ser armazenada entre 2 e 8 °C por 1 dia útil (<18 horas).

Obs. para ACTG e IMPAACT: a SCP pode ser preparada em lotes maiores e armazenada a -20 °C por, no máximo, uma semana útil e descongelada entre 2 e 8 °C antes de usar.

10.3.3 Use a fórmula abaixo para **estimar** o volume de SCP a ser preparado. Exemplos também são mostrados.

Sangue integral utilizável (mL) x rendimento celular (células/mL) x concentração de congelamento (mL/células) = SCP estimada (mL)
Arredondar para cima para o valor inteiro mais próximo em mL.

Exemplos: sangue adulto—coleta de grande volume de sangue

Sangue integral utilizável x	Rendimento celular x	Concentração de congelamento =	SCP estimada a preparar
(10 mL) x	(1,5 x 10 ⁶ células/1mL) x	(1 mL/15 x 10 ⁶ células) =	1 mL
(85 mL) x	(1,0 x 10 ⁶ células/1 mL) x	(1 mL/15 x 10 ⁶ células) =	6 mL
(140 mL) x	(1,5 x 10 ⁶ células/1mL) x	(1 mL/15 x 10 ⁶ células) =	14 mL

Exemplos: sangue adolescente/pediátrico—coleta de pequeno volume de sangue

Sangue integral utilizável x	Rendimento celular x	Concentração de congelamento =	SCP estimada a preparar
(10 mL) x	(1,5 x 10 ⁶ células/1mL) x	(0,5 mL/5 x 10 ⁶ células) =	2 mL
(2 mL) x	(1,0 x 10 ⁶ células/1 mL) x	(0,5 mL/2,5 x 10 ⁶ células) =	1 mL

10.3.4 Use as seguintes fórmulas para calcular as quantidades necessárias de DMSO e de SBF.

Volume SCP estimado	Volume DMSO = (0,1)(volume SCP)	Volume SBF-IA = Volume SCP – volume DMSO	Volume SCP total = Volume DMSO + volume SBF
1 mL	0,1 mL	0,9 mL	1 mL
9 mL	0,9 mL	8,1 mL	9 mL
50 mL	5 mL	45 mL	50 mL

10.3.5 Registre os volumes de SCP, DMSO e SBF na **Planilha de processamento de CMSP**.

10.4 Reagentes de contagem

Os requisitos de reagentes de contagem irão variar dependendo do método usado. Consulte as instruções para o método que está sendo usado.

10.4.1 Solução azul de tripano a 0,4%

10.4.2 Opcional: solução de violeta de cristal a 0,05%

11 Calibragem

11.1 Não é necessária qualquer calibragem para as etapas de processamento.

11.2 Siga os procedimentos aplicáveis de calibragem do laboratório se estiver usando um contador automatizado de células.

12 Controle de qualidade

12.1 Rendimento celular

O rendimento celular é bastante consistente em populações. Populações infantis normalmente apresentam rendimentos linfocitários maiores do que os das populações adultas. Similarmente, **pacientes com AIDS ou enfermidade avançada causada por HIV podem ser linfopênicos. É importante ter conhecimento da recuperação esperada que deve ser obtida** para a população de participantes para a qual processamento está sendo feito. Com base em tal consistência, os rendimentos celulares podem servir como marcadores internos de controle de qualidade para cada lote. Rendimentos fora dos intervalos esperados podem indicar um erro procedimental, deterioração de reagente, erro na contagem celular ou erro de cálculo. As recomendações fornecidas abaixo pretendem fornecer diretrizes para ajudar a identificar erros técnicos notórios antes da criopreservação. Estes valores podem variar dependendo do anticoagulante usado.

12.1.1 Rendimento celular esperado

População	Intervalo de rendimento celular mononuclear (células/mL)
Adultos	$0,7 \times 10^6$ a 3×10^6
Pediátrico—menos de 6 meses	3×10^6 a 10×10^6
Pediátrico—6 meses a 2 anos	2×10^6 a 9×10^6
Pediátrico—2 a 5 anos	1×10^6 a 6×10^6
Pediátrico—mais de 5 anos	$0,8 \times 10^6$ a 4×10^6
Pediátrico—idade desconhecida	1×10^6 a 10×10^6

12.1.2 Rendimento celular não esperado

Se o rendimento celular ficar fora do intervalo esperado, analise os esquemas de diluição, os cálculos, a técnica de processamento (em especial a mistura adequada das suspensões de contagem celular) e o histórico do NIP, se disponível, quanto às possíveis causas. Rendimentos celulares de pacientes infectados com o HIV podem ser menores do que os mostrados na tabela acima. Em caso de suspeita de erros na diluição ou na contagem celular, prepare uma nova diluição repita a contagem.

Registre todos os resultados e eventuais problemas que ocorram durante o processamento na **Planilha de processamento de CMSP**.

Obs. para HVTN: registre quaisquer problemas e ações relativos a rendimento celular na seção de comentários dos registros de Controle de qualidade interno.

12.2 Viabilidade celular

A viabilidade celular das CMSPs frescas é razoavelmente consistente. Tempo longo de processamento, técnicas precárias e, eventualmente, uma amostra de um participante específico podem afetar adversamente a viabilidade. Para redes que requeiram viabilidade celular (vide seção 6.3), calcule e registre a % de células viáveis na planilha.

12.2.1 A viabilidade de CMSPs recém-isoladas deve ser >95%.

12.2.2 Se a viabilidade de CMSPs frescas for <95%, analise os resultados com o supervisor, documentando-os na Planilha de processamento de CMSP.

12.3 Tempos de manuseio

Os tempos de manuseio podem afetar adversamente a recuperação e a viabilidade celular. Os tempos de coleta, manuseio e processamento devem ser registrados na **Planilha de processamento de CMSP** e/ou no SGDL.

12.3.1 Tempos esperados

- A HVTN requer que o tempo total da coleta ao congelamento seja menor ou igual a 8 horas. Para outras redes, este limite de tempo pode variar.
- A HVTN requer que o tempo efetivo de processamento, da introdução do sangue fresco nos tubos de gradiente de densidade até o início do congelamento controlado, seja concluído em até 2 a 3 horas, para maximizar a integridade celular. Para outras redes, este limite de tempo pode variar.

12.3.2 Tempos de processamento não esperados (longos)

Analise com o supervisor quaisquer tempos longos de processamento e documente na **Planilha de processamento de CMSP** e/ou no SGDL.

12.4 Planilha de processamento de CMSP

Para a HVTN: o uso da **Planilha de processamento de CMSP** é *requerido* para rastrear o tempo de processamento, os cálculos e a documentação de problemas que surjam durante o processamento. A **Planilha de processamento de CMSP** é fornecida no Anexo A. Esta planilha também está disponível como um formulário que pode ser baixado e editado no site <http://www.hanc.info/labs/Pages/PBMCSOP.aspx>.

Para outras redes: o uso da **Planilha de processamento de CMSP** é recomendado.

13 Introdução e diretrizes do processamento de CMSP

Existem princípios e etapas padronizadas e comuns a todos os procedimentos de processamento de CMSP. Ocorrem variações quanto à escolha das técnicas de separação (TSCBF previamente enchido em comparação com a superposição manual), ao tratamento do sangue (diluição com ou sem reposição plasmática em comparação com a coleta plasmática direta), à concentração celular final e ao congelamento/armazenamento. Selecione as seções procedimentais apropriadas quanto à separação celular, ao tratamento do sangue, ao congelamento e ao armazenamento, com base nos requisitos protocolares e de rede.

Capítulo sobre o processamento de CMSP	Use para estas redes
<p><i>Separação celular e tratamento de sangue</i></p> <p>Capítulo 14: Separação de células e diluição de sangue com reposição plasmática opcional por tubo de separação celular com barreira de frita (TSCBF)</p> <p style="text-align: center;">OU</p> <p>Capítulo 15: Separação celular por superposição ou sedimentação manual com Ficoll® e diluição sanguínea com reposição plasmática opcional por separação celular manual com gradiente de densidade</p>	<p>Pode ser usado para todas as redes; verifique os requisitos protocolares e os materiais disponíveis</p> <p>Pode ser usado para todas as redes; verifique os requisitos protocolares e os materiais disponíveis</p>
<p><i>Lavagem, contagem, ressuspensão, concentração e congelamento noturno controlado</i></p> <p>Capítulo 16</p>	<p>Todas as redes</p>
<p><i>Armazenamento no local</i></p> <p>Capítulo 17: Armazenamento no local a -70/-80 °C</p> <p style="text-align: center;">OU</p> <p>Capítulo 18: Armazenamento no local com nitrogênio líquido (LN2)</p>	<p>ACTG e HVTN</p> <p>IMPAACT, HPTN e MTN</p>

14 Separação de células e diluição de sangue com reposição plasmática opcional por tubo de separação celular com barreira de frita (TSCBF)

O Capítulo 14 pode ser usado para todas as redes; verifique os requisitos protocolares e os materiais disponíveis. Para qualquer amostra dada, use Capítulo 14 ou o Capítulo 15, mas não ambos.

14.1 Separação de linfócitos do sangue periférico com o uso de tubos de separação TSCBF previamente enchidos

- 14.1.1 Toda a pipetagem e mistura são realizadas em um gabinete de segurança biológica (BSC) de nível 2 ou superior.
- 14.1.2 Vaporize todas as superfícies, cremalheiras e frascos de reagentes com etanol a 70% v/v ou desinfetante equivalente antes de entrar e usar o gabinete de segurança biológica.
- 14.1.3 Salvo orientação contrária, este procedimento deve ser realizado à temperatura ambiente (15 a 30 °C).
- 14.1.4 Use uma pipeta nova para cada número de identificação do participante (NIP) e aditivo.

14.2 Prepare as amostras de sangue integral, os reagentes e os suprimentos.

- 14.2.1 Antes do processamento, ou com antecedência suficiente antes da mistura com as CMSPs, prepare e resfrie a SCP (vide Capítulo 10, Preparação de reagentes).
- 14.2.2 Se os tubos das amostras estiverem frios ao toque (devido a condições de frio ambiental, tal como transporte em meses mais frios), deixe os tubos atingirem a temperatura ambiente antes de processar.
- 14.2.3 Registre na **Planilha de processamento de CMSP** (e/ou equivalente): NIP, número da consulta, protocolo, data/hora da coleta, data/hora de início do processamento, números de lote e data de validade de todos os reagentes, volumes SCP, DMSO e SBF.
- 14.2.4 Antes de acrescentar o sangue, verifique visualmente os tubos TSCBF para ver se há líquido acima da frita. Se houver líquido acima da frita, centrifugue os tubos TSCBF a 1000 x g por 30 segundos. Se qualquer volume de solução gradiente de densidade permanecer acima da frita após a centrifugação, ele deve ser aspirado.
- 14.2.5 Confira cuidadosamente o NIP em todos os tubos de sangue recebidos. Organize os tubos primários tal que não haja nenhuma possibilidade de misturar tubos de diferentes NIPs ou anticoagulantes em um mesmo conjunto NIP.

Sugestão: coloque todos os tubos para cada NIP/anticoagulante em uma cremalheira. Podem ser usadas cremalheiras diferentes para separar NIPs ou tipos de tubos e uma caneta de cor diferente pode ser usada para cada NIP, para evitar confusão.

14.3 Reposição plasmática opcional

Realize esta etapa de reposição plasmática **somente** se alíquotas de plasma forem requeridas por instruções protocolares. Se não forem requeridas alíquotas de plasma, pule esta etapa e prossiga para a etapa 14.4.

Obs. para IMPAACT: a reposição plasmática é requerida.

- 14.3.1 Os tubos de sangue coletados do mesmo NIP e com o mesmo anticoagulante podem ser processados individualmente ou agregados em tubos cônicos de 50 mL.

- 14.3.2 Marque o volume do sangue integral no menisco.
- 14.3.3 Centrifugue o sangue integral entre 200 e 400 x g por 10 minutos.
- 14.3.4 Transfira o plasma para um tubo de centrifugação de 15 ou de 50 mL para uma segunda centrifugação, para remover quaisquer restos celulares.
- 14.3.5 Acrescente uma quantidade suficiente de RDL (vide seção 9.1) para levar o volume de sangue de volta ao volume original de sangue integral, misturando cuidadosamente, e continue o processamento de CMSP na etapa 14.4.
- 14.3.6 Conclua o processamento plasmático, centrifugando o plasma coletado entre 800 e 1200 x g por 10 minutos. Isto pode ser feito posteriormente, quando a centrífuga não estiver sendo usada para o processamento de CMSP.
- 14.3.7 Aliquote o plasma centrifugado em tubos de alíquota rotulados conforme especificado por protocolo e descarte quaisquer restos celulares no tubo de plasma centrifugado.

14.4 Diluição de sangue para separação em TSCBF

Obs.: uma medida precisa do volume de sangue utilizável deve ser determinada e registrada na **Planilha de processamento de CMSP** e no SGDL, onde aplicável. Isto pode ser conseguido usando uma pipeta estéril para transferir o sangue integral para os tubos TSCBF, rastreando o volume de sangue durante a pipetagem, ou agregando o sangue em um contentor estéril graduado, antes da transferência para os tubos TSCBF, tomando-se a medida do contentor.

Obs.: a razão máxima de sangue para RDL deve ser aproximadamente 2:1. Use um tubo de 50 mL para cada 10 a 20 mL de sangue integral adulto (ou um tubo de 12 a 14 mL para cada 4 a 5 mL de sangue integral pediátrico). Use tantos tubos TSCBF quantos forem requeridos para distribuir todo o sangue de cada NIP.

Obs.: o Ficoll® é tóxico para células; trabalhe rápida e eficientemente durante as etapas de separação.

- 14.4.1 Rotule cada TSCBF com o NIP.
- 14.4.2 Se um tubo estiver amplamente coagulado (vide glossário), descarte-o.
- 14.4.3 Documente o tipo de amostra recebido, a quantidade total de tubos descartados e a condição do sangue na **Planilha de processamento de CMSP**.
- 14.4.4 Usando uma pipeta estéril, acrescente 5 mL (para adultos) ou 2 mL (para pediátricos) de RDL a cada TSCBF.
- 14.4.5 Misture o sangue integral cuidadosamente, usando em seguida uma pipeta estéril para transferir 10 a 20 mL (para adultos) ou 4 a 5 mL (para pediátricos) de sangue para os TSCBFs rotulados.
- 14.4.6 Usando uma pipeta estéril, enxágue com RDL cada um dos tubos originais de sangue anticoagulado, adicione os volumes de enxágue aos tubos TSCBF, certificando-se de que o volume total não ultrapasse 30 mL (para adultos) ou 7,5 mL (para pediátricos) (RDL + sangue integral).
- 14.4.7 Registre o volume de sangue utilizável na **Planilha de processamento de CMSP**.
 - Obs.:** não estime o volume de sangue utilizável baseando-se no tamanho do tubo.
 - Obs.:** não inclua o volume de RDL usado para diluir a amostra de sangue.
- 14.4.8 Tampe cuidadosamente os tubos TSCBF.

14.5 Centrifugação por densidade TSCBF e coleta

14.5.1 Segure os tubos em uma posição vertical e transfira-os cuidadosamente para a centrífuga.

14.5.2 Centrifugue entre 800 e 1000 x g por 15 minutos entre 15 e 30 °C com o freio DESLIGADO.

Obs.: a separação de CMSP pode ser melhorada para algumas amostras centrifugando a 1000 x g.

Obs.: se o freio estiver ligado, as camadas serão interrompidas. Consulte o Capítulo 20 (Cálculos) para converter g em RPM para o comprimento do seu rotor.

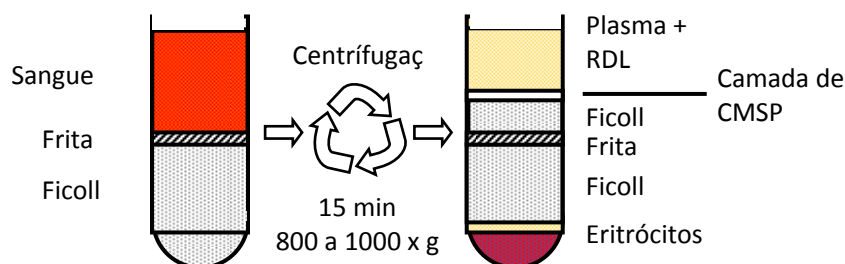
14.5.3 Prepare a mesma quantidade de novos tubos cônicos estéreis de 50 mL (para adultos) ou de 15 mL (para pediátricos) que a de tubos TSCBF usados na etapa de centrifugação separatória.

14.5.4 Rotule cada tubo com o NIP. Use estes novos tubos para a próxima lavagem.

14.5.5 Retire cuidadosamente os tubos TSCBF da centrífuga de forma a não perturbar as camadas.

14.5.6 A centrifugação resulta na divisão do conteúdo do tubo em seis camadas distintas, incluindo a frita. A partir do topo do tubo, são elas:

- plasma + RDL;
- camada de CMSP;
- Ficoll®;
- frita;
- Ficoll®;
- agregado de eritrócitos e de granulócitos.



14.5.7 Inspeccione os tubos quanto aos seguintes problemas possíveis

Hemólise na camada de plasma + RDL. Se presente, classifique a hemólise de +1 a +4, com base nas descrições dadas no Glossário de termos 29.

Coágulos visíveis na frita após a centrifugação.

Camada de CMSP precária devido a erro na centrifugação, tais como velocidade, tempo ou freio. A camada de CMSP se apresentará reduzida e indistinguível, enquanto a camada de plasma + RDL pode se apresentar ligeiramente nebulosa. Consulte o Anexo C para solução dos problemas.

Formação da camada de CMSP na frita, devido a baixos volume de hematócrito ou contagem leucocitária.

Registre as observações na seção de comentários da **Planilha de processamento de CMSP** e/ou no SGDL. Documente quaisquer ações de acompanhamento tomadas.

- 14.5.8 Usando uma nova pipeta estéril (pipeta sorológica ou de transferência) para cada NIP, remova a fração superior amarelada de plasma-RDL para aproximadamente 1 a 2 cm da faixa branca nebulosa de CMSP, localizada na interface da fração plasma-RDL (amarelada) e da solução clara do meio de separação. Descarte a fração de plasma-RDL, de acordo com a política do laboratório.
- Obs.:** opcionalmente, a fração superior plasma-LDR pode ser deixada no lugar e a faixa branca nebulosa de CMSP pode ser removida, inserindo-se cuidadosamente a pipeta através da camada superior até a faixa de CMSP.
- 14.5.9 Usando uma pipeta estéril sorológica ou de transferência, colete todas as células da interface branca nebulosa acima da frita. Cuide para não aspirar a solução do meio de separação mais do que o necessário.
- 14.5.10 Transfira as células coletadas de um tubo TSCBF para um único tubo cônico correspondente pré-rotulado estéril de 50 mL (para adultos) ou de 15 mL (para pediátricos). Para poupar tempo, os tubos podem ser previamente enchidos até 25 mL (para adultos) ou até 5 mL (para pediátricos) com RDL.
- 14.5.11 Volte a tampar o tubo TSCBF contendo os eritrócitos e os meios de separação restantes. Descarte o tubo TSCBF como rejeito biológico seguindo a política do laboratório.

Pule o Capítulo 15 e prossiga para o Capítulo 16.

15 Separação celular por superposição ou sedimentação manual com Ficoll® e diluição sanguínea com reposição plasmática opcional por separação celular manual com gradiente de densidade

O Capítulo 15 pode ser usado para todas as redes; verifique os requisitos protocolares e os materiais disponíveis. Para qualquer amostra dada, use o Capítulo 14 ou o Capítulo 15, mas não ambos.

15.1 Separação de linfócitos do sangue periférico usando o método manual de superposição com Ficoll®

- 15.1.1 Toda a pipetagem e mistura ocorre em um gabinete com nível 2 ou superior de segurança biológica.
- 15.1.2 Vaporize todas as superfícies, cremalheiras e frascos de reagentes com etanol a 70% v/v antes de adentrar e usar o gabinete de segurança biológica.
- 15.1.3 Salvo observação contrária, o procedimento é realizado à temperatura ambiente (15 a 30 °C).
- 15.1.4 Use uma pipeta nova para cada número de identificação do participante (NIP) e aditivo.

15.2 Prepare as amostras de sangue integral, os reagentes e os suprimentos (utilize a Planilha de processamento de CMSP ou outra ferramenta de rastreamento conforme definido pelo protocolo ou pela rede para documentar e rastrear o processamento de amostras).

- 15.2.1 Antes do processamento, ou com antecedência suficiente antes da mistura com as CMSPs, prepare e resfrie a SCP (vide Capítulo 10, Preparação de reagentes).
- 15.2.2 Se os tubos das amostras estiverem frios ao toque (devido a condições de frio ambiental, tal como transporte em meses mais frios), deixe os tubos atingirem a temperatura ambiente (15 a 30 °C) antes de processar.
- 15.2.3 Deixe o Ficoll-Hypaque™ (ou meios de gradiente de densidade equivalente) atingir a temperatura ambiente (15 a 30 °C). Consulte a seção Reagentes deste documento para mais informações.
- 15.2.4 Complete as seções amostra e reagente da **Planilha de processamento de CMSP**.
- 15.2.5 Verifique cuidadosamente o NIP em todos os tubos de sangue recebidos. Organize os tubos primários de forma que não haja a possibilidade de mistura entre tubos de diferentes NIPs ou anticoagulantes em um mesmo conjunto NIP.

Sugestão: coloque todos os tubos para cada NIP/anticoagulante em uma cremalheira. Podem ser usadas cremalheiras diferentes para separar NIPs ou tipos de tubos e uma caneta marcadora de cor diferente pode ser usada para cada NIP, para evitar confusão.

15.3 Reposição plasmática opcional

Realize esta etapa de reposição plasmática somente se alíquotas de plasma forem requeridas por instruções protocolares. Se não forem requeridas alíquotas de plasma, pule esta etapa e prossiga para a etapa 15.4.

Obs. para IMPAACT: a reposição plasmática é requerida.

- 15.3.1 Os tubos de sangue coletado podem ser processados individualmente ou agregados em tubos cônicos de 50 mL.

- 15.3.2 Marque o volume de sangue integral em cada tubo no menisco.
- 15.3.3 Centrifugue o sangue integral entre 200 e 400 x g por 10 minutos.
- 15.3.4 Transfira o plasma para um tubo de centrifugação de 15 ou de 50 mL para uma segunda centrifugação para remover quaisquer restos celulares.
- 15.3.5 Acrescente uma quantidade suficiente de RDL (vide seção 9.1) para levar o volume de sangue para o volume original do sangue integral, misturando cuidadosamente, e continue o processamento de CMSP na etapa 15.4.
- 15.3.6 Conclua o processamento plasmático, centrifugando o plasma coletado entre 800 e 1200 x g por 10 minutos. Isto pode ser feito posteriormente, quando a centrífuga não estiver sendo usada para o processamento de CMSP.
- 15.3.7 Aliquote o plasma centrifugado em tubos de alíquota rotulados conforme especificado por protocolo, descartando quaisquer restos celulares no tubo de plasma centrifugado.

15.4 Diluição do sangue e separação celular manual por gradiente de densidade

Obs. para ACTG, IMPAACT e HPTN: para maiores volumes de sangue coletado, é permitida a agregação de creme leucocitário (vide Anexo D: Agregação de camadas de creme leucocitário para isolamento de CMSP com Ficoll).

Obs. para HVTN: uma medida precisa do volume de sangue utilizável deve ser determinada e registrada.

Obs.: a diluição do sangue com RDL pode ajudar a melhorar a separação (vide Anexo D).

- 15.4.1 Rotule cada tubo de centrifugação de 15 ou de 50 mL com o NIP. Use um tubo de 50 mL para cada 15 a 20 mL de sangue integral adulto (ou um tubo de 15 mL para cada 4 a 5 mL de sangue integral pediátrico).
- 15.4.2 Destampe os tubos de sangue anticoagulado.
- 15.4.3 Se um tubo estiver amplamente coagulado (vide glossário), descarte-o.
- 15.4.4 Documente o tipo de sangue recebido na Planilha de CMSP.
- 15.4.5 Registre a quantidade total de tubos descartados ou quaisquer outros problemas observados com o sangue.
- 15.4.6 Registre a condição do sangue.
- 15.4.7 Registre o volume total de sangue integral não diluído.

Obs.: não estime o volume de sangue utilizável baseando-se no tamanho do tubo.

Obs.: não inclua o volume de RDL usado para diluir a amostra de sangue.

- 15.4.8 Transfira o sangue para um tubo de centrifugação estéril rotulado de 15 mL ou de 50 mL e acrescente um volume suficiente de RDL para diluir o sangue, de acordo com a bula do meio de separação de linfócitos (a razão máxima de sangue para diluente deve ser 2:1).

Opcional: a adição de RDL e a mistura podem ser feitas no tubo inicial de sangue, se houver volume suficiente disponível.

15.4.9 Para separação celular por gradiente de densidade:

Para qualquer amostra dada, use o método de superposição (15.4.9.1) ou o método de sedimentação (15.4.9.2), mas não ambos.

15.4.9.1 Método de **superposição** com Ficoll®-Hypaque: com base no volume de sangue diluído com RDL, determine a quantidade e o tamanho dos tubos estéreis de centrifugação requeridos para a separação por gradiente de densidade.

Acrescente assepticamente o Ficoll® ou o LSM requerido aos tubos estéreis de centrifugação.

Obs.: a razão de Ficoll® para sangue integral pode variar de acordo com a recomendação do fabricante e com a experiência laboratorial. Por exemplo, alguns fabricantes recomendam 4 partes de sangue diluído para 3 partes de reagente Ficoll®; entretanto, a experiência prática tem demonstrado bons resultados com o uso de 3 partes de sangue para 1 parte de meio gradiente.)

Pipete cuidadosa e lentamente o sangue diluído sobre o meio gradiente.

Sugestão: deixe, cuidadosamente, que a mistura de sangue diluído com RDL flua pela lateral do tubo e agregue-se sobre a superfície do Ficoll®, sem romper a superfície plana.

15.4.9.2 Método de **sedimentação** com Ficoll®-Hypaque

Se o plasma tiver sido removido para armazenamento, acrescente um volume de RDL igual ao volume de plasma removido.

Misture cuidadosa e completamente, para reduzir a agrupação das células durante a separação.

Opcional: tanto para o sangue integral como para a combinação sangue-RDL, acrescente outro volume de RDL igual ao volume total de sangue.

Com base no volume de sangue diluído com RDL, determine o volume de meio de gradiente de densidade requerido para cada tubo. Pipete cuidadosa e lentamente a solução Ficoll®-Hypaque SOB a combinação sangue-RDL em tubos estéreis de centrifugação de 15 mL ou de 50 mL.

Obs.: a razão de Ficoll® para sangue integral pode variar de acordo com as recomendações do fabricante e com a experiência laboratorial. Por exemplo, alguns fabricantes recomendam 4 partes de sangue diluído para 3 partes de reagente Ficoll®; entretanto, a experiência prática de alguns laboratórios tem demonstrado bons resultados usando 3 partes de sangue para 1 parte de Ficoll®.

15.4.10 Tampe os tubos cuidadosamente.

15.5 Centrifugação por densidade e coleta de linfócitos

15.5.1 Segure os tubos em uma posição vertical, transferindo-os cuidadosamente para a centrífuga.

- 15.5.2 Centrifugue a 400 x g por 30 minutos entre 15 a 30 °C com o freio DESLIGADO, como descrito na bula que acompanha o meio gradiente.
- Obs.:** se o freio estiver ligado, as camadas serão interrompidas. O freio da centrífuga deve ser DESLIGADO para que a separação seja limpa e para maximizar a recuperação das CMSPs. Consulte:
20 Cálculos para conversão de g em RPM para o comprimento de seu rotor.
- 15.5.3 Prepare a mesma quantidade de novos tubos cônicos estéreis de 15 ou 50 mL usados na etapa de separação por centrifugação.
- 15.5.4 Rotule cada tubo com o NIP. Use estes novos tubos para a próxima lavagem.
- 15.5.5 Remova os tubos da centrífuga.
- 15.5.6 Se a camada celular não estiver visível, confirme que a centrífuga está funcionando adequadamente. Corrija quaisquer problemas encontrados. Recentrifugue o tubo. Documente o problema e as ações realizadas.
- Obs.:** se a camada celular ainda não estiver visível após a recentrifugação, documente, remova e descarte o sobrenadante do RDL e prossiga.
- 15.5.7 Inspeccione os tubos quanto a hemólise ou pequenos coágulos visíveis na interface celular que não forma observados anteriormente e os documente.
- Obs.:** procure por hemólise ou coágulos após a centrifugação. Classifique a hemólise de +1 a +4, com base nas descrições dadas no glossário. Registre as suas observações.
- 15.5.8 Usando uma nova pipeta estéril (pipeta sorológica ou de transferência) para cada NIP, mova a fração superior amarelada de plasma-RDL para cerca de 1 a 2 cm da faixa branca nebulosa de CMSP, localizada na interface entre a fração plasma-RDL (amarelada) e a solução clara de meio de separação. Descarte a fração de plasma-RDL, de acordo com a política do laboratório.
- Obs.:** opcionalmente, a fração superior plasma-LDR pode ser deixada no local e a faixa branca nebulosa de CMSP pode ser removida inserindo-se cuidadosamente a pipeta através da camada superior até a faixa de CMSP.
- 15.5.9 Usando uma pipeta estéril sorológica ou de transferência, colete todas as células da interface branca nebulosa. Cuide para não aspirar qualquer quantidade da solução do meio de separação além do necessário.
- 15.5.10 Transfira as células coletadas de um tubo de centrifugação para um único tubo cônico estéril pré-rotulado de 15 ou de 50 mL correspondente. Os tubos podem ser previamente enchidos até 5 mL (para tubo de 15 mL) ou 25 mL (para tubo de 50 mL) com RDL, para poupar tempo.
- 15.5.11 Volte a tampar o tubo de centrifugação contendo o restante dos eritrócitos/meio de separação e descarte o tubo como rejeito biológico seguindo a política do laboratório.

Prossiga para o Capítulo 16.

16 Lavagem, contagem, ressuspensão, concentração e congelamento noturno controlado

Use o Capítulo 16 para todas as redes.

16.1 Lavagem nº 1:

- 16.1.1 COMPLETAR a fração de CMSP até cerca de 10 mL (para tubos cônicos de 15 mL) ou 45 mL (para tubos cônicos de 50 mL), acrescentando RDL. Misture cuidadosamente.
- 16.1.2 Volte a tampar todos os tubos com as células coletadas.
- 16.1.3 Centrifugue as células diluídas entre 200 a 400 x g por 10 minutos entre 15 e 30 °C (freio opcional).
- 16.1.4 Remova os tubos da centrífuga e verifique o bolo celular.

Se o bolo celular não estiver visível, confirme que a centrífuga está funcionando adequadamente. Corrija quaisquer problemas encontrados. Recentrifugue o tubo. Documente o problema e as ações tomadas na seção de comentários da **Planilha de processamento de CMSP**. Se o bolo celular ainda não estiver visível após a recentrifugação do tubo, documente.
- 16.1.5 Remova e descarte o sobrenadante sem perturbar o bolo celular.

16.2 Lavagem nº 2:

- 16.2.1 Para tubos cônicos de 15 mL e de 50 mL, ressuspenda cada bolo celular em um pequeno volume (no total, não mais de 10 mL) de RDL, misturando cuidadosa, mas completamente, produzindo uma suspensão celular homogênea.
- 16.2.2 Nos tubos cônicos de 50 mL, combine até quatro suspensões de bolos celulares (total <20 mL) do mesmo doador. Para tubos cônicos de 15 mL, combine até duas suspensões de bolos celulares (total <10 mL) do mesmo doador. Este é o tubo de células coletadas. COMPLETAR para aproximadamente 10 mL (para tubos cônicos de 15 mL) ou aproximadamente 45 mL (para tubos cônicos de 50 mL), acrescentando RDL. Misture cuidadosamente.
- 16.2.3 Use um pequeno volume de RDL para enxaguar os tubos dos quais os bolos foram transferidos.

Obs.: a combinação entre o enxágue e o volume coletado não deve ultrapassar 45 mL (para o tubo de 50 mL) ou 10 mL (para o tubo de 15 mL).
- 16.2.4 Colete o enxágue RDL no tubo de células coletadas.
- 16.2.5 Volte a tampar os tubos e coloque os tubos na centrífuga.
- 16.2.6 Centrifugue as células diluídas entre 200 a 400 x g por 10 minutos entre 15 e 30 °C (freio opcional).

Remova os tubos da centrífuga e verifique o bolo celular.

Se o bolo celular não estiver visível, confirme que a centrífuga está funcionando adequadamente. Corrija quaisquer problemas. Recentrifugue o tubo. Documente o problema e as ações tomadas na seção de comentários da **Planilha de processamento de CMSP**. Se o bolo celular ainda não estiver visível após a recentrifugação do tubo, documente.

16.2.7 Remova e descarte o sobrenadante sem perturbar o bolo celular.

16.3 Contagem celular CMSP

16.3.1 Registre o método de contagem celular usado na **Planilha de processamento de CMSP**.

16.3.2 Calcule e registre, na planilha de processamento, o volume da contagem de ressuspensão RDL (V). Este é o volume com base no qual a contagem celular é realizada.

Obs.: o volume de ressuspensão deve ser de aproximadamente 20% do volume de sangue integral utilizável, arredondando-se para o valor em mL mais próximo. Dependendo do tamanho do bolo celular, o volume de ressuspensão normalmente varia de 10% a 50% do volume de sangue integral utilizável.

16.3.3 Se houver mais de um bolo celular, use uma pequena quantidade de RDL para ressuspender cuidadosamente e combinar os bolos celulares em um único tubo. Usando o volume restante, enxágue os tubos dos quais as células foram transferidas. Acrescente o enxágue ao tubo com as células coletadas.

16.3.4 Complete a contagem celular, usando o POP para o método de contagem celular aprovado no laboratório.

16.3.5 Misture as células cuidadosa, mas completamente, antes de fazer a amostragem para a contagem celular.

16.3.6 Transfira um pequeno volume da ressuspensão para um pequeno tubo para contagem.

Obs.: se forem necessárias repetidas contagens, minimize o volume de amostra necessário.

16.3.7 Siga o POP para o método de contagem aprovado no laboratório de processamento e a **Planilha de processamento de CMSP** para determinar a concentração celular x 10⁶ por mL.

Obs.: células a 10³/μL = células a 10⁶/mL.

16.3.8 Use a seção apropriada de Contagens de células da **Planilha de processamento de CMSP** para registrar as concentrações da contagem celular para cada NIP (células x 10⁶ por mL).

Obs.: contagens automatizadas podem ser feitas uma vez. As contagens manuais devem contar pelo menos os quatro grandes quadrantes (1mm²).

16.3.9 Na **Planilha de processamento de CMSP**, registre a contagem automatizada ou a contagem manual de células.

16.3.10 Calcule o número total de células usando a seguinte fórmula:

$$T = C \times V$$

T = Número total de células

C = Concentração (10⁶/mL) determinada no método de contagem

V = Volume de contagem de ressuspensão com RDL em mL

16.3.11 Registre o número total de células (T) na **Planilha de processamento de CMSP**.

16.3.12 Calcule o rendimento celular em células/mL, do sangue integral utilizável, usando a fórmula a seguir.

Rendimento celular (em 10⁶ células/mL) = T/volume de sangue integral utilizável

16.3.13 Registre o rendimento celular na **Planilha de processamento de CMSP**.

Obs.: o rendimento celular é calculado somente para fins de qualidade. Consulte a seção 12 (Controle de qualidade) para o intervalo esperado de rendimento celular. Se o rendimento celular não estiver no intervalo esperado, siga as diretrizes de solução de problemas da seção de Controle de qualidade. Redilua e reconte se necessário.

16.3.14 Registre quaisquer anomalias no processamento na seção de comentários da **Planilha de processamento de CMSP**.

16.4 Cálculo do volume final de ressuspensão

16.4.1 Calcule o volume de ressuspensão de congelamento com SCP requerido completando as etapas abaixo para a meta final de concentração celular.

A meta final de concentração celular varia de acordo com a rede e com o protocolo. Use a tabela abaixo para determinar a meta de concentração normal apropriada e o intervalo aceitável.

Rede	Meta de concentração (células/mL)	Intervalo aceitável (células/mL)
HVTN	15×10^6	10 a 20×10^6
ACTG, HPTN e MTN	10×10^6	5 a 10×10^6
IMPAACT	10×10^6	10×10^6

Calcule o volume estimado de ressuspensão de congelamento com SCP (V1) requerido, usando a meta de concentração celular final apresentada na tabela acima.

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

T = Número total de células

N1 = Meta de concentração final de células

V2 = Volume final da alíquota em mL

Registre o volume estimado (V1) na **Planilha de processamento de CMSP**.

Arredonde V1 para baixo pelo décimo (0,1) de mL mais próximo para determinar o volume efetivo de ressuspensão SCP (Vf).

Obs. para HVTN: arredonde V1 para baixo pelo valor de (1,0) mL inteiro mais próximo para determinar Vf.

Obs.: para algumas redes, V2 será 1 mL/frasco criogênico, para que o número requerido de frascos irá se igualar ao de mililitros de SCP. Para ACTG e IMPAACT, ajustar o volume por frasco criogênico de acordo com a CPL ou com o protocolo.

Registre o volume efetivo de ressuspensão SCP (Vf) na **Planilha de processamento de CMSP**.

16.4.2 Calcule o número efetivo de células por frasco (N2), usando o volume efetivo de SCP de congelamento (Vf) determinado no cálculo anterior.

$$N2 = (T / Vf) \times V2$$

N2 = Número efetivo de células por frasco

T = Número total de células

V2 = Volume final da alíquota em mL

- 16.4.3 Registre o número final de células por frasco (N2) na **Planilha de processamento de CMSP**.
- 16.4.4 Confirme que a **Planilha de processamento de CMSP** está completa e que os cálculos estão corretos.

16.5 Rotulagem

- 16.5.1 Conclua a impressão e a rotulagem dos frascos criogênicos ANTES da centrifugação final.
Obs.: isto é importante para assegurar que as células não fiquem em um bolo por um período de tempo alongado.
- 16.5.2 Os rótulos dos frascos criogênicos serão gerados usando-se o Sistema de gerenciamento de dados laboratoriais (SGDL).
Siga as práticas laboratoriais da rede para concluir a entrada de dados.
Revise cada tipo derivado de rótulo de frasco criogênico quanto a erros de entrada de dados, comparando com a requisição laboratorial e com a planilha de processamento ANTES de rotular o frasco criogênico.
Inspeccione visualmente o código de barra e a área impressa do rótulo quanto ao alinhamento e à qualidade da impressão.
Corrija quaisquer erros de entrada de dados no SGDL e reimprima os rótulos, conforme necessário (certificando-se de que as identificações globais apropriadas estão selecionadas).
- 16.5.3 Aplique os rótulos nos frascos criogênicos de forma que as informações possam ser lidas com facilidade e que o conteúdo do tubo possa ser visualizado claramente.
Obs. para HVTN: examine os frascos criogênicos vazios e rotulados, observando as diretrizes atuais da HVTN.

16.6 Centrifugação final

- 16.6.1 Coloque o tubo com as células coletadas na centrífuga.
Opcional para HVTN: COMPLETAR a suspensão celular até 45 mL com RDL antes da centrifugação.
- 16.6.2 Centrifugue as células diluídas entre 200 a 400 x g por 10 minutos entre 15 e 30 °C (freio opcional).
- 16.6.3 Confira se todos os frascos criogênicos estão rotulados e facilmente acessíveis.

16.7 Aliquotação para criopreservação

Obs.: as seguintes etapas devem ser realizadas com rapidez, para preservar a integridade celular. Recomenda-se que os frascos sejam mantidos refrigerados em gelo úmido. Não deixe que os frascos fiquem submersos no gelo úmido. Não deixe acumular umidade próximo às tampas dos frascos.

- 16.7.1 Remova e descarte o sobrenadante de RDL. Conserve o bolo celular.

Obs. para ACTG e IMPAACT: se as células tiverem que ser congeladas como bolos de CMSPs não viáveis, a ressuspensão celular em meio congelado (SCP) não é recomendada, porque o DMSO é um poderoso inibidor da RCP. Se as CMSPs tiverem entrado em contato com o DMSO (p. ex., meio congelante), lave o bolo celular duas vezes com RDL antes do armazenamento.

- 16.7.2 Ressuspenda o bolo celular usando o volume de SCP resfriado (V_i) que você determinou em 16.4.
- Ressuspenda **cuidadosamente** o bolo celular antes de acrescentar a SCP com batidas, sacudindo ou pipetando.
- Acrescente **cuidadosamente** a SCP às células em ressuspensão, girando continuamente.
- É permitido o pré-resfriamento dos frascos e/ou trabalhar usando gelo úmido.
- 16.7.3 Trabalhe com **rapidez** assim que a SCP tiver sido acrescentada. Não deixe que as células permaneçam na solução congelante por mais de 10 minutos antes de colocá-las no congelador.
- 16.7.4 Aliquote de 0,5 a 1 mL por tubo, dependendo dos requisitos da rede e de protocolo. Prepare uma alíquota parcial final com qualquer volume excessivo que possa estar presente devido ao tamanho do bolo celular.
- Obs. para HVTN:** em vez de gerar uma alíquota parcial final, distribua igualmente qualquer volume excessivo entre todos os tubos para aquele NIP.

16.8 Congelamento noturno controlado

- 16.8.1 Após o processamento e a contagem, as células devem ser imediatamente congeladas.
- 16.8.2 Selecione o método de congelamento a ser usado: StrataCooler® Cryo, NALGENE® Mr. Frosty ou CryoMed®.
- Obs.:** o StrataCooler® Cryo deve ser armazenado entre 2 e 8 °C antes de cada uso.
- Obs.:** idealmente, deixe o NALGENE® Mr. Frosty atingir o equilíbrio entre 2 e 8 °C antes de cada uso em um refrigerador à prova de explosão. Se um refrigerador à prova de explosão não estiver, deixe o NALGENE® Mr. Frosty equilibrar-se à temperatura ambiente antes de cada uso. O nível de isopropanol deve ser o correto e o isopropanol deve ser completamente trocado depois do quinto ciclo de congelamento-descongelamento.
- Siga o POP do local apropriado para um congelador controlado, tal como o CryoMed®.
- 16.8.3 Transfira imediatamente todos os frascos criogênicos para o contentor de congelamento controlado.
- Para o NALGENE® Mr. Frosty e o StrataCooler® Cryo, feche o contentor e coloque-o em um congelador a -80 °C (-65 a -95 °C), em um local que não seja perturbado por acesso repetido ao congelador (isto é, longe da parte frontal ou superior do congelador, próximo à porta/tampa de entrada) por, no mínimo, 4 horas para o Mr. Frosty e um dia para o outro para o StrataCooler® Cryo.
- Para o CryoMed®, inicie o programa de congelamento.
- 16.8.4 Registre a data e a hora em que os frascos criogênicos foram levados para o congelador a -80 °C (-65 a -95 °C) na **Planilha de processamento de CMSP**.
- Obs.:** este é o tempo de conclusão do processamento.
- 16.8.5 Registre o número efetivo de frascos criogênicos congelados na **Planilha de processamento de CMSP**.

Prossiga para o Capítulo 17 (para ACTG e HVTN) ou para o Capítulo 18 (para HPTN, IMPAACT e MTN).

17 Armazenamento no local a -70/-80 °C

Use o Capítulo 17 apenas se CMSP estão sendo processadas para ACTG ou HVTN.

17.1 Transfira os frascos criogênicos CMSP para o congelador a -70/-80 °C.

17.1.1 Transfira os frascos criogênicos do sistema de refrigeração controlado para o local de armazenagem designado a -70/-80 °C.

Obs.: não armazenar em hidrogênio líquido (LN2).

Transfira os frascos criogênicos após, no mínimo, 4 horas para o NALGENE® Mr. Frosty e um dia para o outro para o StrataCooler® Cryo. Se o CryoMed® estiver sendo usado, transfira os frascos criogênicos após a conclusão do programa para o congelador a -70/-80 °C.

17.1.2 Registre a rubrica da pessoa responsável pela transferência e a data/hora da transferência, na **Planilha de processamento de CMSP**.

17.1.3 Registre as informações de armazenagem apropriadas na **Planilha de processamento de CMSP** com base no programa armazenagem definido pelo seu laboratório.

17.1.4 Armazene entre -65 a -95 °C até o despacho.

Obs. para HVTN: despache com gelo seco para o repositório central de amostra em, no máximo, 2 semanas a contar da coleta.

Obs. para ACTG: despache com gelo seco em, no máximo, 3 a 5 semanas da data de congelamento.

17.1.5 NÃO armazene temporariamente amostras em LN2, salvo se instruído a fazê-lo pela rede ou por protocolo. NÃO transfira amostras do LN2 de volta para congeladores a -70/-80 °C, salvo se instruído a fazê-lo pela equipe da rede ou do protocolo.

17.1.6 Entre em contato com a equipe de operações laboratoriais da rede caso as amostras não consigam chegar a seus destinos finais dentro do tempo de armazenagem temporária alocado pela rede. Será necessária permissão para levar amostras para o armazenagem com LN2, e despacho em contentores de LN2 se as condições de armazenagem temporário e de despacho não puderem ser satisfeitas.

17.2 Inspeção final da planilha

17.2.1 O técnico deve conferir se a **Planilha de processamento de CMSP** está completa e se os cálculos estão corretos.

17.2.2 Um segundo inspetor verifica a completude e a precisão da planilha e, então, rubrica e data a **Planilha de processamento de CMSP**.

Obs.: a HVTN requer que todas as inspeções sejam realizadas em, no máximo, dois dias após o processamento.

17.2.3 Armazene a **Planilha de processamento de CMSP** de acordo com a política do laboratório.

Isto marca o fim do processamento e do armazenagem.

Siga os devidos procedimentos laboratoriais para preparação e processamento dos despachos.

18 Seção 6B do Processamento de CMSP: Armazenamento no local com nitrogênio líquido (LN2)

Use o Capítulo 18 apenas se CMSP estão sendo processadas para HPTN, IMPAACT ou MTN.

18.1 Transferência de frascos criogênicos de CMSP para o LN2

- 18.1.1 No próximo dia útil, transfira os frascos criogênicos do sistema de refrigeração controlada para o local de armazenamento designado no sistema de armazenamento de LN2.
- 18.1.2 Registre a rubrica da pessoa responsável pela transferência e a data/hora da transferência, na **Planilha de processamento de CMSP**.
- 18.1.3 Registre as informações de armazenamento apropriadas na **Planilha de processamento de CMSP** com base no programa de armazenamento definido de seu laboratório.
- 18.1.4 Amostras CMSP congeladas podem ser armazenadas com segurança, e por tempo indeterminado, em LN2 (sendo preferida a fase de vapor).
- 18.1.5 Uma vez que as amostras tenham sido armazenadas em LN2, todas as transferências ou despachos devem ser mantidos em LN2 (≤ -140 °C) e as amostras não podem ser despachadas em gelo seco.

Obs. para IMPAACT: as amostras podem ser despachadas em gelo seco após armazenamento em LN2.
- 18.1.6 Não armazene amostras temporariamente em LN2.
- 18.1.7 **NÃO** transfira amostras do LN2 de volta para congeladores a -70 °C ou -80 °C, salvo se instruído a fazê-lo pela equipe da rede ou do protocolo.

18.2 Inspeção final da planilha

- 18.2.1 O técnico deve conferir se a **Planilha de processamento de CMSP** está completa e se os cálculos estão corretos.
- 18.2.2 Um segundo inspetor verifica a completude e a precisão da planilha e, então, rubrica e data a **Planilha de processamento de CMSP**.

Obs.: as inspeções devem ser concluídas em até 2 dias úteis a contar do processamento.
- 18.2.3 Armazene a **Planilha de processamento de CMSP** de acordo com a política do laboratório.

Isto marca o fim do processamento e do armazenamento.

Siga os procedimentos laboratoriais apropriados para preparação e processamento dos despachos.

19 Registro de resultados

19.1 É necessário preencher uma Planilha de processamento de CMSP somente para a HVTN.

19.2 Requisitos para todas as redes

19.2.1 Os dados são inseridos no Sistema de gerenciamento de dados laboratoriais para a geração de etiquetas para os frascos criogênicos, documentação do local de armazenamento e requisitos do manifesto de despacho.

19.2.2 Os desvios são relatados de acordo com o protocolo laboratorial.

20 Cálculos

20.1 A RPM é normalmente lida a partir de um diagrama nomográfico. Os diagramas nomográficos são frequentemente incluídos no manual de manutenção da centrífuga. Certifique-se de usar os diagramas específicos da centrífuga e do rotor.

20.2 É recomendado que a conversão apropriada de g para RPM seja posta na sua centrífuga para fácil referência.

20.3 Se um diagrama nomográfico não estiver disponível, as forças g podem ser convertidas para RPMs usando a seguinte fórmula:

$$RPM = \sqrt{\frac{g}{1,18r \times 10^{-5}}}$$

r = raio do rotor em centímetros

g = força centrífuga relativa, expressa em unidades de gravidade

RPM = rotações por minuto

21 Limitações do procedimento

- 21.1 O período ideal de processamento para CMSP, da coleta ao congelamento do sangue fresco, é <8 horas a contar da hora da coleta. A função celular pode cair para amostras mais velhas.
- 21.2 O período ideal de processamento para CMSP é <3 horas da hora da adição do sangue nos tubos de separação celular (Accuspin™ ou equivalente) ao início do ciclo de congelamento controlado.
- 21.3 Estudos indicam que as amostras coletadas em um anticoagulante EDTA fornecem rendimentos mais baixos ao longo do tempo.
- 21.4 Evite remover quantidades excessivas dos meios de separação com a faixa CMSP, uma vez que isto pode aumentar a contaminação de granulócitos.
- 21.5 Evite remover excesso de sobrenadante com a faixa CMSP para limitar a contaminação de proteínas plasmáticas.

22 Observações procedimentais

- 22.1 Se o plasma estiver muito nublado, pode ser difícil ver da interface do gradiente Ficoll®. É possível aprimorar a coleta de linfócitos retirando-se a maior parte do plasma acima da interface com uma pipeta de 10 mL, deixando apenas 0,5 cm restantes. Isto permite melhor posicionamento da ponta da pipeta para a coleta de células.
- 22.2 Armazenagem de fase de vapor de nitrogênio líquido (LN2) é o espaço no tanque de armazenamento que fica acima do LN2 líquido no fundo do tanque.

23 Glossário de termos

Termo	Definição
ACTG	Grupo de ensaios clínicos da AIDS
CMSP	Células mononucleares do sangue periférico
<i>Coagulado, amplamente</i>	Mais de ¾ da massa de sangue integral está coagulada e há muito pouco sangue integral livre restante.
<i>Coagulado, pouco</i>	Pequenos coágulos normalmente não serão vistos no tubo de sangue integral, mas podem ser vistos no tubo de separação de frita após a centrifugação.
COMPLETAR	Acrescentar a quantidade suficiente de um líquido para atingir um volume especificado

Termo	Definição
<i>Hemólise</i>	<p>Uma coloração de rosa a vermelho de soro ou plasma devido à lise dos eritrócitos. A hemólise é classificada e relatada de acordo com a seguinte escala:</p> <p>1+ Cor vermelha-rosada pálida no soro ou plasma, capaz de ler claramente impressão de jornal colocada atrás do tubo de sangue.</p> <p>2+ Cor vermelha-rosada pálida no soro ou plasma, impressão de jornal é legível, mas não com a mesma nitidez.</p> <p>3+ Cor vermelha-rosada escura no soro ou plasma, impressão de jornal parece obscurecida.</p> <p>4+ Cor vermelho escuro mogno no soro ou plasma, incapaz de ler impressão de jornal.</p> <p>Obs.: eritrócitos lisados dão ao soro ou plasma uma qualidade colorida, mas clara, ao passo que a contaminação por eritrócitos dá ao soro ou plasma uma qualidade nebulosa.</p>
<i>HPTN</i>	Rede de ensaios para a prevenção do vírus da imunodeficiência humana (HIV Prevention Trials Network)
<i>HVTN</i>	Rede de ensaios de vacinas para o vírus da imunodeficiência humana (HIV Vaccine Trials Network)
<i>Ictérico</i>	Plasma tingido de verde ou de cor-de-laranja, sugerindo presença de bilirrubina aumentada.
<i>IMPAACT</i>	Rede de ensaios clínicos internacionais da AIDS em pacientes maternos, pediátricos e adolescentes (International Maternal Pediatric Adolescent AIDS Clinical Trials Network)
<i>Meios GD</i>	Meios de gradiente de densidade
<i>MTN</i>	Rede de ensaios de microbicidas (Microbicides Trials Network)
<i>NIP</i>	Número de identificação do participante
<i>RCA</i>	Repositório central de amostra
<i>RDL</i>	Reagente diluente de lavagem (SSBH, SBF ou RPMI [meio de cultura de tecido animal desidratado]; o RPMI pode ser usado somente para ACTG/IMPAACT)
<i>SBF</i>	Soro bovino fetal
<i>SBF-IA</i>	Soro bovino fetal inativado por aquecimento
<i>SCP</i>	Solução criopreservativa
<i>SGDL</i>	Sistema de gerenciamento de dados laboratoriais
<i>SSBH</i>	Solução salina balanceada de Hanks
<i>SSF</i>	Solução salina fosfatada-tamponada

Termo	Definição
<i>Temperatura ambiente (TA)</i>	15 a 30 °C
<i>Temperatura de centrifugação (TC)</i>	15 a 30 °C
<i>TSCBF</i>	Tubo de separação celular com barreira de frita

24 Referências

- 24.1 Bull M., Lee B., Stucky J., Chiu Y.L., Rubin A., Horton H. e McElrath MJ. Defining blood processing parameters for optimal detection of cryopreserved antigen-specific responses for HIV vaccine trials. [Definição de parâmetros de processamento de sangue para a detecção ideal de respostas específicas de antígenos criopreservados para os ensaios de vacinas para o HIV] *J. Immunol. Methods* 322:57-69 (2007).
- 24.2 CHAVI SOP for PBMC Isolation and Cryopreservation [POP CHAVI para isolamento e criopreservação de CMSP], CHAVI-A0001, v5, Nov 3 2008.
- 24.3 Cox J.H., DeSouza M., Ratto-Kim S., Ferrari G., Weinhold K.J. e Birx B.L. Cellular Immune assays for evaluation of Vaccine efficacy in developing countries. [Ensaio imunocelulares para avaliação da eficácia de vacinas em países em desenvolvimento] *Manual of Clinical laboratory Immunology*. [Manual de imunologia clínico-laboratorial] Rose N.R., Hamilton R.G., Detrick B. Eds. (6a. ed.) p.301-315 (2002).
- 24.4 Islam B., Lindbert A. e Christensen B. Peripheral blood cells preparation influences the level of expression of leukocyte cell surface markers as assessed with quantitative multicolor flow cytometry. [A preparação de células sanguíneas periféricas influencia o nível de expressão dos marcadores superficiais celulares de leucócitos segundo avaliação por citometria quantitativa de fluxo multicolor] *Cytometry* 22:128-134 (1995).
- 24.5 Immunovirology Research Network (IVRN) Laboratory Manual: Separation and storage of serum, plasma and PBMCs. [Manual laboratorial da Rede de Pesquisa Imunoviológica (IVRN): separação e armazenamento de soro, plasma e CMSPs] IVRN. Dez 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. e Casimiro B.R. Enhanced rates and magnitude of immune responses detected against an HIV vaccine: effect of using an optimized process for isolating PBMC. [Índices e magnitude aprimorados da resposta imunológica detectada contra uma vacina HIV: efeito do uso de um processo otimizado para isolamento CMSP] *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; Pediatric AIDS Clinical Trials Group [Grupo de Ensaios Clínicos sobre a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida Pediátrica]. Lymphocyte subsets in healthy children from birth through 18 years of age: the Pediatric AIDS Clinical Trials Group P1009 study. [Subconjuntos linfocitários em crianças saudáveis desde o nascimento e até os dezoito anos de idade: estudo P1009 do Grupo de Ensaios

Clínicos sobre a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida Pediátrica] *J Allergy Clin Immunol.* 112(5):973-80 (2003).

- 24.8 Sigma-Aldrich Accuspin™ System-Histopaque®-1077, procedure number A6929/A7054/A0561, Dated 2003-09. [Sigma-Aldrich Accuspin™ System-Histopaque®-1077, número de procedimento A6929/A7054/A0561, datado de setembro de 2003]
- 24.9 Weinberg A., Betensky R., Zhang L. e Ray G. Effect of shipment, storage, anticoagulant, and cell separation on lymphocyte proliferation assays for human immunodeficiency virus-infected patients. [Efeito de despacho, armazenamento, anticoagulação e separação celular nos ensaios de proliferação linfocitária em pacientes contaminados pelo vírus da imunodeficiência humana] *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 5:804-807 (1998).

25 Documentos adicionais (a serem mantidos pelo laboratório)

- 25.1 Bula (e certificado de análise) do SBF
- 25.2 Bula do RDL (SSBH, SBF ou meio de cultura de tecido animal desidratado [MCTAD, RPMI])
- 25.3 Bula do meio de gradiente de densidade
- 25.4 Bula do tubo de separação de células com barreira de frita

26 Anexos

26.1 Anexo A: Planilha de processamento de CMSP

O Anexo A é fornecido também como formulários que podem ser baixados e editados no portal público do HANC: <http://www.hanc.info/labs/Pages/PBMCSOP.aspx>.

- 26.2 **Anexo B: Exemplo de relatório de troca do Isopropanol NALGENE® Mr. Frosty**
- 26.3 **Anexo C: Solução de problemas: recuperação de CMSP na ausência de uma faixa CMSP definida após a centrifugação com gradiente de densidade**
- 26.4 **Anexo D: Agregação de camadas de creme leucocitário para isolamento de CMSP com Ficoll**
- 26.5 **Anexo E: Guia de consulta rápida interrede do POP de CMSP—tubos TSCBF**
- 26.6 **Anexo F: Guia de consulta rápida interrede do POP de CMSP—método de superposição manual**

Esta página foi deixada em branco propositadamente.

Anexo A: Planilha de processamento de CMSP (requerida para a HVTN)

Laboratório de processamento de amostra:

Identificação do participante (NIP):

Consulta:

Protocolo:

Data de coleta:

Hora:

Data de início do processamento:

Hora:

Processado por:

Reagentes/Fabricante	Lote nº			Data de validade
DMSO (Fabricante: _____)				
SBF (Fabricante: _____)				
SSBH ou outro RDL (Fabricante: _____)				
Tubo de separação celular (Fabricante: _____)				
Meio de gradiente de densidade (Fabricante: _____)				
	Volume em mL			
SCP	SCP	DMSO	SBF	1 dia útil
Dados a serem coletados durante o processamento				Amostra
Tipo de tubo da amostra (circular somente um)				NaHep / ACD / EDTA
Estado do sangue (circular um ou mais)				NORMAL / HEMOLIZADO / COAGULADO
Volume de sangue integral utilizável				mL
Método de contagem (nome do instrumento ou da contagem manual)				
Volume de ressuspensão da contagem com SSBH (ou com outro RDL) (V)				mL
Concentração média da contagem celular (C)				x 10 ⁶ células/mL
Número total de células (T) = C x V				x 10 ⁶ células
Calcular o rendimento celular/mL de sangue integral (verificação CQ) = (T/Volume de sangue integral utilizável)				x 10 ⁶ células/mL
Calcular volume de ressuspensão estimado com SCP (V1)				mL
Calcular volume de ressuspensão com SCP (V _f), arredondado PARA BAIXO ao valor inteiro mais próximo em mL				mL
Calcular o número efetivo de células por frasco $N2 = (\text{volume da alíquota} * T) / (V_f)$; volume da alíquota HVTN é igual a 1 mL.				x 10 ⁶ células/frasco
Data e hora da conclusão do processamento (anotar nas observações caso tenha sido ultrapassado o limite de oito horas a contar da hora de início do processamento)				horas: minutos
Imprimir e realizar CQ do conteúdo do rótulo/códigos de barra SGDL (rubrica do indivíduo responsável pelo CQ)				
Número de frascos criogênicos efetivamente congelados Obs.: deve ser igual ao volume de ressuspensão de congelamento para alíquotas de 1 mL.				
Para a HVTN, os dados de SGDL devem ser preenchidos, incluindo o tempo de congelamento.				

Anexo A: Planilha de processamento de CMSP (requerida para a HVTN)

Laboratório de processamento da amostra:

NIP:

Transferência dos frascos criogênicos para o armazenamento em congelador	
Pessoa responsável pela transferência dos frascos criogênicos para os locais das caixas de armazenamento designados pelo SGDL	
Data (ddmmaaa)/hora que os frascos criogênicos foram transferidos do dispositivo de resfriamento lento para a caixa de armazenamento. (A amostra deve ser mantida a -70/-80 °C durante a transferência)	
Inspeção final	
Inspetor/data	

Contagens de hemocitômetro	Contagem total	Células viáveis	Inviáveis	
Quadrado nº 1 (células/mm ²)				
Quadrado nº 2 (células/mm ²)				
Quadrado nº 3 (células/mm ²)				
Quadrado nº 4 (células/mm ²)				
Contagem média de células por quadrado (células/mm ²)				
Fator de diluição CMSP (1:FD*)				
Fator de hemocitômetro para células/mL	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	
Concentração da contagem celular (C) = (média de células/mm ²) (FD) (10 ⁴); converter para 10 ⁶ células/mL	x 10 ⁶ células/ml	x 10 ⁶ células/ml	x 10 ⁶ células/ml	
% viabilidade = (células viáveis/células totais) (100)	Não aplicável		Não aplicável	Não aplicável
Contagens de células automatizadas (10³/µl=10⁶/mL)	Contagem nº 1			
Contagem de células (C) como células x 10 ⁶ /mL				
Fator de diluição CMSP (1:FD*)				
Concentração de células = (C) (FD)	x 10 ⁶ células/ml			

***Obs.:** Fator de diluição (FD) = (partes de células + partes de fluido diluente) / partes de células

Contagens de células pelo contador Guava (10³/µl=10⁶/mL)	Contagem nº 1			
Contagem de células (C) como células x 10 ⁶ /mL				
Células totais (T) como células x 10 ⁶				
% viabilidade				

Comentários e desvios do protocolo:

Esta página foi deixada em branco propositadamente.

Anexo C: Solução de problemas: recuperação de CMSP na ausência de uma faixa CMSP definida após a centrifugação com gradiente de densidade

C.1 Antecedentes:

C.1.1 Se algo deu errado durante a centrifugação de gradiente de densidade do sangue, a camada de Ficoll® e plasma estará misturada e não haverá camada de CMSP visível. Não entre em pânico. As CMSPs ainda podem ser recuperadas com algumas etapas adicionais.

C.2 Identifique o problema:

C.2.1 Remova os tubos da centrífuga e transfira-os para uma cremalheira.

C.2.2 Tente identificar por que a amostra ficou misturada. As possíveis causas são listadas abaixo:

C.2.2.1 O tubo tombou.

C.2.2.2 O freio foi deixado ligado.

C.2.2.3 A velocidade de centrifugação estava alta demais. Verifique que a configuração de RPM estava correta para o procedimento usado (separação de células com gradiente de densidade manual ou TSCBF), checando o diagrama RCF/RPM para o rotor. Algumas centrífugas requerem que as configurações da centrífuga sejam compatíveis com o tipo de cuba usada. Se as configurações não estiverem corretas, então a centrífuga pode calcular equivocadamente sua velocidade.

C.2.2.4 A centrífuga parou devido à descontinuidade no fornecimento de eletricidade.

C.2.2.5 A frita foi desalojada. (Isto, frequentemente, é devido à velocidade de centrifugação que estava alta demais, podendo, eventualmente, dever-se a algum tubo defeituoso no lote.)

C.2.2.6 A centrífuga estava fora de balanço.

C.3 Das causas acima, as cinco primeiras causas são facilmente corrigidas. Se a causa for devido a uma centrífuga fora de balanço, determine por que a centrífuga estava fora de balanço. Verifique o seguinte:

C.3.1 Verifique se os tubos estavam balanceados.

C.3.2 Verifique se as cubas da centrífuga estavam balanceadas.

C.3.3 Verifique se os braços e as cubas da centrífuga estavam devidamente engraxados e lubrificados.

Obs.: caso tenha alguma dúvida sobre uma centrífuga, use outra.

C.4 Presumindo que o problema tenha sido sanado, recentrifugue as amostras como a seguir:

C.4.1 Reagentes:

C.4.1.1 Ficoll®

C.4.1.2 Tubos de 50 mL

C.4.1.3 Pipetas

C.4.2 Método:

Obs.: o Ficoll® é tóxico para as células, então trabalhe eficientemente

- C.4.2.1 Acrescente 15 mL de Ficoll® a tubos estéreis de 50 mL (não tubos TSCBF).
- C.4.2.2 Deixe o Ficoll® aquecer até atingir a temperatura ambiente enquanto trabalha com a amostra.
- C.4.2.3 Para cada tubo misturado, rotule tubos de 50 mL com o NIP do participante. Use uma pipeta para retirar, lentamente, os conteúdos da amostra misturada da separação ou do tubo TSCBF. (Normalmente, a frita do TSCBF terá se desalojado.)
- C.4.2.4 Transfira até 30 mL da amostra misturada para o tubo contendo Ficoll®.
- C.4.2.5 Repita isso para todas as amostras misturadas.
- C.4.2.6 Coloque os tubos na centrífuga, verificando se os tubos estão balanceados.
- C.4.2.7 Centrifugue por 30 a 40 minutos a 400 x g com o freio DESLIGADO entre 15 e 30 °C
- C.4.2.8 Uma camada de CMSP deve agora estar visível. (Com frequência, algumas células terão sido perdidas, então a camada pode ser fina).
- C.4.2.9 A camada superior, contendo plasma possivelmente contaminado com Ficoll®, pode ser coletada neste estágio e processada de acordo com as seções “Isolamento de CMSP e de plasma” e “Armazenamento de plasma” do protocolo principal. Não obstante, a informação de que essa amostra de plasma está potencialmente contaminada com Ficoll® deve ser inserida na seção de comentários dessa amostra no SGDL.
- C.4.2.10 Transfira cuidadosamente a camada CMSP para um tubo de centrifugação de 50 mL rotulado com o identificador NIP. Use um tubo novo para cada tubo Ficoll®.
- C.4.2.11 Volte a tampar o tubo Ficoll®.
- C.4.2.12 Retorne ao Capítulo 16 do protocolo principal.

Obs.: na seção “Comentários e desvios do protocolo” da **Planilha de processamento de CMSP**, registre os detalhes do desvio do POP (p. ex., que etapas do “Anexo B” foram tomadas para recuperar CMSP devido à ausência de uma faixa definida de CMSP após a centrifugação com gradiente de densidade.). Além disso, anote quanto tempo levou a recentrifugação, para fornecer uma estimativa de quanto tempo as células estiveram no Ficoll®. Anote, também, tanto na **Planilha de processamento de CMSP** como no capítulo de comentários da entrada do SGDL para as amostras de plasma, que a amostra de plasma recuperado estava potencialmente contaminada com Ficoll®.

Anexo D: Agregação de camadas de creme leucocitário para isolamento de CMSP com Ficoll

O procedimento pode ser usado quando do isolamento de CMSPs de múltiplos tubos de sangue. Este procedimento permite que se consolidem as camadas de creme leucocitário para reduzir o consumo de Ficoll. Se bem executado, as camadas agregadas de creme leucocitário rendem uma grande quantidade de células que são, normalmente, bastante limpas.

Geralmente, os cremes leucocitários de dois tubos de 10 mL podem ser depositados em 6 mL de Ficoll® ou de solução de separação por gradiente de densidade equivalente em um tubo cônico de 15 mL. Ao agregar os cremes leucocitários, um único tubo cônico de 50 mL com Ficoll® pode ser usado para processar até seis tubos EDTA de 10 mL.

Procedimento:

- D1. Centrifugue o sangue em EDTA (ou heparina ou ACD) a 400 x g por 10 minutos.
- D2. Colete o plasma de cada tubo até cerca de 5 mm da camada branca de creme leucocitário.
- D3. Acrescente 2 mL de RDL a um tubo estéril de propileno de 10 mL, deixando que o fluxo laminar o cubra.
- D4. Segure o tubo desprovido de plasma (que agora contém somente células agregadas) a um ângulo de cerca de 30°. Use uma pipeta estéril descartável de polipropileno de rombo largo para coletar o creme leucocitário. Aspire o creme leucocitário movendo para baixo a extremidade inferior do tubo. O creme leucocitário irá “escorrer” a camada de eritrócitos agregados com a maior parte dos leucócitos vindo no primeiro 1mL aspirado. Transfira o creme leucocitário para o tubo contendo RDL, enxaguando a pipeta 2 a 3 vezes com a suspensão RDL/células. Colete e agregue o creme leucocitário dos tubos restantes. Dependendo da quantidade de tubos originais de coleta de sangue, a suspensão de creme leucocitário será de cerca de 5 mL.
- D5. Para capturar as células que aderirem à pipeta descartável, coloque 3 mL de RDL em um tubo estéril descartável de 5 mL e enxágue o conteúdo da pipeta em 3 mL de RDL fresco. Agregue as células enxaguadas com o primeiro agregado de creme leucocitário.
- D6. Misture cuidadosamente o agregado de creme leucocitário 3 a 4 vezes com uma pipeta padrão de 10 mL e deposite a suspensão de creme leucocitário no Ficoll.
- D7. Prossiga com o isolamento padrão com Ficoll do POP.

Materiais adicionais necessários:

- Um tubo estéril de polipropileno de 10 mL para coleta de Ficoll de 15 mL.
OU
Um tubo de 50 mL para uma coleta de 50 mL com Ficoll (com a experiência, o Ficoll pode ficar depositado sob o agregado do tubo de 50 mL).
- Um tubo estéril de 5 mL para o enxágue com pipeta.
- Uma pipeta de propileno estéril de 2,5 mL de rombo largo.

Obs.: tente depositar os agregados de creme leucocitário de tal forma que o material agregado seja diluído cerca de 1:2 (creme leucocitário:diluyente), da mesma maneira que com o sangue integral.

Esta página foi deixada em branco propositadamente.

Anexo E: Guia de consulta rápida do POP de CMSP—tubos TSCBF

O uso da **Planilha de processamento de CMSP** (Anexo A) é **requerido para a HVTN**. Antes de usar este guia de consulta rápida pela primeira vez, certifique-se de analisar a íntegra do POP CMSP e suas importantes observações e detalhes, e as diretrizes específicas de rede.

Etapas (Quantidades para volumes menores de amostra estão em <i>itálico</i> .)	Consulte o POP
1. Prepare e resfrie a SCP.	10.3
2. Prepare as amostras de sangue integral, os reagentes e os suprimentos.	14.2
3. Se forem requeridas alíquotas de plasma de acordo com as instruções protocolares: a. Centrifugue o sangue integral entre 200 e 400 x g por 10 minutos. b. Assinale o volume de sangue total no menisco e, então, transfira o plasma para um tubo de centrifugação de 15 ou de 50 mL para continuar o processamento (800 a 1200 x g por 10 minutos, freio opcional). c. Acrescente uma quantidade suficiente de RDL para levar o sangue de volta ao volume original do sangue integral, misturando cuidadosamente e continue o processamento de CMSP.	14.3
4. Acrescente 5 mL (<i>2 mL</i>) de RDL em cada TSCBF. 5. Transfira 10 a 20 mL (<i>4 a 5 mL</i>) de sangue para os TSCBFs rotulados. 6. Acrescente o RDL de enxágue do tubo e o RDL final aos tubos de TSCBF até 30 mL (<i>7,5 mL</i>) (RDL + sangue integral).	14.4
7. Centrifugue entre 800 e 1000 x g por 15 minutos entre 15 e 30 °C com o <u>freio DESLIGADO</u> . 8. Inspeção os tubos quanto a possíveis problemas. 9. Colete cada tubo TSCBF de creme leucocitário em um único tubo cônico de 50 mL (<i>15 mL</i>) correspondente.	14.5
10. Acrescente RDL até COMPLETAR um volume total de 45 mL (<i>10 mL</i>) e misture cuidadosamente. 11. Lavagem nº 1—centrifugue entre 200 e 400 x g por 10 minutos entre 15 e 30 °C (freio opcional). 12. Verifique os bolos celulares! 13. Remova o sobrenadante cuidadosamente, sem perturbar o bolo celular.	16.1
14. Ressuspenda o bolo celular em uma quantidade pequena de RDL, fazendo uma suspensão celular homogênea. 15. Combine até 4 suspensões de bolos em um tubo cônico de 50 mL (<i>2 em tubo de 15 mL</i>). 16. Adicione o enxágue do tubo de RDL e o RDL final de 45 mL (<i>10 mL</i>) ao tubo celular. 17. Lavagem nº 2—centrifugue entre 200 e 400 x g por 10 minutos entre 15 e 30 °C (freio opcional). 18. Verifique os bolos celulares! 19. Remova o sobrenadante cuidadosamente, sem perturbar o bolo celular.	16.2
20. Calcule o volume de ressuspensão da contagem em RDL (V). 21. Combine os bolos celulares em um tubo usando o volume de ressuspensão em RDL. Este é o volume com base no qual a contagem celular é realizada. 22. Conte e calcule o número total de células 23. Calcule o rendimento celular em células/mL de sangue integral utilizável.	16.3
24. Calcule o volume final de ressuspensão SCP. Verifique os cálculos.	16.4
25. Conclua a impressão, a rotulagem e o CQ dos frascos criogênicos ANTES da centrifugação final.	16.5
26. Centrifugue entre 200 e 400 x g por 10 minutos entre 15 e 30 °C (freio opcional).	16.6

Etapas (Quantidades para volumes menores de amostra estão em <i>itálico</i> .)	Consulte o POP
27. Remova o sobrenadante cuidadosamente sem perturbar o bolo celular.	16.7
28. Ressuspenda o bolo cuidadosamente na SCP resfriada (<i>V_f</i>), enquanto gira o tubo para obter uma distribuição uniforme. Recomenda-se trabalhar em gelo úmido.	
29. Faça alíquotas celulares SCP cuidadosamente.	
30. Transfira imediatamente (≤ 10 minutos) todos os frascos criogênicos para o equipamento de congelamento controlado e inicie o congelamento.	16.8
31. Após o período de tempo apropriado, transfira os frascos criogênicos para o equipamento de armazenamento no local e despache-os dentro do período de tempo designado pela rede.	17 ou 18
32. Para a HVTN, analise a Planilha de processamento de CMSP para completude e precisão.	17.2

Anexo F: Guia de consulta rápida do POP CMSP—superposição manual

O uso da **Planilha de processamento de CMSP** (Anexo A) é **requerido para a HVTN**. Antes de usar este guia de consulta rápida pela primeira vez, certifique-se de analisar a íntegra do POP CMSP e suas importantes observações e detalhes, e as diretrizes específicas de rede.

Etapas (Quantidades para volumes menores de amostra estão em <i>itálico</i> .)	Consulte o POP
1. Prepare e resfrie a SCP.	10.3
2. Prepare as amostras de sangue integral, os reagentes e os suprimentos.	14.2
3. Se forem requeridas alíquotas de plasma de acordo com as instruções protocolares: a. Centrifugue o sangue integral entre 200 e 400 x g por 10 minutos. b. Assinale o volume de sangue total no menisco e transfira o plasma para um tubo de centrifugação de 15 ou de 50 mL para continuar o processamento (800 a 1200 x g por 10 minutos, freio opcional). c. Acrescente quantidade suficiente de RDL para levar o sangue de volta ao volume original do sangue integral, misture cuidadosamente e continue com o processamento de CMSP.	15.3
4. Transfira o sangue integral para um tubo estéril de centrifugação de 50 mL (<i>15 mL</i>) e dilua com RDL conforme necessário. 5. Cuidadosa e lentamente sobreponha o sangue em cima do meio de gradiente de densidade. (O método de sedimentação é uma alternativa aprovada.)	15.4
6. Centrifugue a 400 x g por 30 minutos com o freio DESLIGADO . 7. Verifique cada tubo de centrifugação em busca de possíveis problemas. 8. Colete cada creme leucocitário em um único tubo cônico correspondente de 50 mL (<i>15 mL</i>) para centrifugação.	15.5
9. Acrescente RDL até COMPLETAR o volume total de 45 mL (<i>10 mL</i>), misturando cuidadosamente. 10. Lavagem nº 1—centrifugue entre 200 e 400 x g por 10 minutos entre 15 e 30 °C (freio opcional). 11. Verifique os bolos celulares! 12. Remova o sobrenadante cuidadosamente, sem agitar o bolo celular.	16.1
13. Ressuspenda o bolo celular em uma quantidade pequena de RDL, fazendo uma suspensão celular homogênea. 14. Combine até 4 suspensões de bolos em um tubo cônico de 50 mL (<i>2 em tubo de 15 mL</i>). 15. Adicione o enxágue do tubo de RDL e o RDL final de 45 mL (<i>10 mL</i>) ao tubo celular. 16. Lavagem nº 2—centrifugue entre 200 e 400 x g por 10 minutos entre 15 e 30 °C (freio opcional). 17. Verifique os bolos celulares! 18. Remova o sobrenadante cuidadosamente, sem agitar o bolo celular.	16.2
19. Calcule o volume de ressuspensão da contagem em RDL (V). 20. Combine os bolos celulares em um tubo usando o volume de ressuspensão em RDL. Este é o volume com base no qual a contagem celular é realizada. 21. Conte e calcule o número total de células 22. Calcule o rendimento celular em células/mL do sangue integral utilizável.	16.3
23. Calcule o volume final de ressuspensão SCP. Verifique os cálculos.	16.4
24. Conclua a impressão, a rotulagem e o CQ dos frascos criogênicos ANTES da centrifugação final.	16.5
25. Centrifugue entre 200 e 400 x g por 10 minutos entre 15 e 30 °C (freio opcional).	16.6

Etapas (Quantidades para volumes menores de amostra estão em <i>itálico</i> .)	Consulte o POP
26. Remova o sobrenadante cuidadosamente, sem perturbar o bolo celular.	16.7
27. 27. Ressuspenda o bolo cuidadosamente na SCP resfriada (V_f), enquanto gira o tubo para obter distribuição uniforme. Recomenda-se trabalhar em gelo úmido.	
28. Faça alíquotas celulares SCP cuidadosamente.	
29. Transfira imediatamente (≤ 10 minutos) todos os frascos criogênicos para o equipamento de congelamento controlado e inicie o congelamento.	16.8
30. Após o período de tempo apropriado, transfira os frascos criogênicos para o equipamento de armazenamento no local e despache-os dentro do período de tempo designado pela rede.	17 ou 18
31. Para a HVTN, analise a Planilha de processamento de CMSP para completude e precisão.	17.2