

| | | | |
|----------------------------------|---|-----------------------------------|---------------------|
| Título: | POP de processamento de PBMC entre redes v7.0 | | |
| Data de criação: | 01 de abril de 2009 | Total de páginas: | 39 |
| Data de entrada em vigor: | 19 de agosto de 2024 | Número do POP: | HANC-LAB-P0001 v7.0 |
| Escrito por: | Grupo de trabalho de POP de processamento de PBMC entre redes | Substitui o POP datado de: | 26 de abril de 2018 |

| | Rede | Nome, Título | Assinatura | Data |
|-----------------------------|------|---|--|------------|
| Aprovado por (Rede): | ACTG | Grace Aldrovandi MD Investigadora principal do laboratório da rede ACTG | DocuSigned by: <i>Grace Aldrovandi</i> 6BE9A0BACDFE4FA... | 26/07/2024 |
| | HPTN | Estelle Piwowar-Manning, MT (ASCP) SI Diretora adjunta do laboratório da rede HPTN | Signed by: <i>Estelle Piwowar-Manning</i> 0E0BC1A7D726416... | 27/07/2024 |
| | HVTN | Kathryn Dougherty, MT (ASCP) Diretora associada de qualidade e conformidade de laboratório da HVTN | DocuSigned by: <i>Kathryn Dougherty</i> 7DCF2BEE1F91407... | 26/07/2024 |

| | |
|------------------------------|--|
| Histórico de Revisões | Para um histórico abrangente de revisões, consulte o Anexo H . |
|------------------------------|--|

| | Nome, Título | Assinatura | Data |
|------------------------------------|--------------|------------|------|
| Revisado por (Laboratório): | | | |
| | | | |
| | | | |

Índice

| | |
|---|----|
| Objetivo | 3 |
| Escopo..... | 3 |
| Antecedentes..... | 3 |
| Autoridade e responsabilidade | 3 |
| Relatório de resultados..... | 3 |
| Amostra | 5 |
| Equipamentos..... | 6 |
| Descartáveis..... | 7 |
| Equipamento de proteção individual | 8 |
| Reagentes | 8 |
| Preparação de reagentes | 10 |
| Introdução e diretrizes relacionadas ao processamento de PBMC..... | 13 |
| Separação de células e diluição de sangue por tubo de separação de células com barreira porosa e reposição de plasma (plasmaférese) | 13 |
| Separação de células por overlay ou underlay de meio de gradiente de densidade manual e diluição de sangue por separação de células de gradiente de densidade manual com reposição de plasma (plasmaférese) | 17 |
| Lavagem, contagem, ressuspensão, concentração e congelamento de taxa controlada de um dia para o outro | 20 |
| Controle de qualidade | 24 |
| Armazenamento de PBMC (temporário ou no local) | 25 |
| Preenchimento de documentos de processamento | 25 |
| Definições e abreviações | 26 |
| Referências | 27 |
| Anexos..... | 27 |
| Anexo A: Planilha de processamento de PBMC..... | 28 |
| Anexo B: Exemplo de registro de alterações de isopropanol Nalgene® Mr. Frosty™..... | 30 |
| Anexo C: Resolução de problemas: Recuperação de PBMC na ausência de uma banda de PBMC definida após centrifugação por gradiente de densidade | 31 |
| Anexo D: Agrupamento de camadas leucoplaquetárias (<i>buffy coat pooling</i>) para isolamento de PBMC em meio de gradiente de densidade | 33 |
| Anexo E: Exemplos de reagentes e suprimentos | 34 |
| Anexo F: Guia rápido para POP de PBMC - CSTFB | 35 |
| Anexo G: Guia rápido para POP de PBMC - Overlay manual | 37 |
| Anexo H: Histórico de revisões da versão 6.0 a 7.0 | 38 |

*O Anexo A também está disponível em formato editável para download no site público da HANC em <http://www.hanc.info/labs/labresources/procedures/Pages/pbmcSop.aspx>.

1. Objetivo

- 1.1. Este Procedimento Operacional Padrão (POP) descreve procedimentos para o isolamento e a criopreservação de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) a partir de sangue total.

2. Escopo

- 2.1. Este procedimento deve ser utilizado para o processamento de amostras de sangue para o isolamento, a criopreservação e o armazenamento de amostras de PBMC.
- 2.2. Instruções específicas do protocolo da rede substituem aquelas encontradas neste POP.

3. Antecedentes

- 3.1. PBMCs recém-coletadas ou criopreservadas são usadas para a avaliação de objetivos do estudo. Esses ensaios exigem que as PBMCs tenham sido isoladas e criopreservadas sob condições estritamente definidas que garantem recuperação, viabilidade e funcionalidade ideais. É ideal que o sangue seja processado e congelado dentro de 8 horas a partir do momento da coleta para que a função da célula seja mantida na sua função máxima em ensaios de monitoramento imunológico.

4. Autoridade e responsabilidade

- 4.1. Os diretores/IPs do centro laboratorial da rede (ou designados) têm autoridade para estabelecer, revisar e atualizar este procedimento.
- 4.2. O escritório da Coordenação de Redes do HIV/AIDS (HANC) é responsável por manter e controlar a documentação relacionada ao POP.
- 4.3. O Diretor do Laboratório de Processamento é responsável pela implementação deste POP da HANC e por garantir que todo o pessoal adequado seja treinado.
- 4.4. Todo o pessoal do centro e do laboratório envolvido na coleta, no processamento e/ou no manuseio de PBMCs é responsável por ler e compreender este POP antes de realizar os procedimentos descritos.
- 4.5. O POP de PBMC atual da HANC deve ser usado conforme redigido por todos os laboratórios para a obtenção de PBMCs para protocolos da rede.

5. Relatório de resultados

- 5.1. A utilização da Planilha de Processamento de PBMC e do Sistema de Gestão de Dados Laboratoriais (LDMS) é exigida para todas as redes para o monitoramento de detalhes importantes de processamento, incluindo o momento do processamento, os cálculos e a documentação de problemas que surjam durante o processamento.
- 5.2. A utilização de uma Planilha de Processamento de PBMC específica do protocolo em sua totalidade é exigida, a menos que seja especificado de outra forma no protocolo Instruções do Laboratório de Processamento de Amostras (SPLI), Gráfico de Processamento Laboratorial (LPC) ou Manual do Laboratório (LM). No caso raro em que a planilha de PBMC específica do protocolo não seja exigida, a planilha genérica contida no [Anexo A](#) e em <http://www.hanc.info/labs/labresources/procedures/Pages/pbmcSop.aspx> pode ser usada.
- 5.3. A utilização do LDMS é exigida para capturar informações do participantes e de processamento, gerar identificadores únicos, criar etiquetas para tubos criogênicos, capturar os locais de armazenamento e gerar manifestos de envio.

5.4. Os principais elementos exigidos para monitorar o processamento de PBMC incluem:

| Tabela de principais elementos | |
|---|----------------------------------|
| Principais elementos para monitorar o processamento de PBMC | Local de obtenção |
| Laboratório de processamento de amostras | W L |
| ID do participante | W L |
| Número da visita | W L |
| Protocolo | W L |
| ID de amostra global do LDMS | Automaticamente gerado pelo LDMS |
| Data/hora de início do processamento | W L |
| Iniciais do técnico do processamento (técnico) | W L |
| Método de contagem (nome do instrumento ou contagem manual) | W |
| Volume de ressuspensão de contagem WDR (V) | W |
| Concentração média de contagem de células (C) | W |
| Número total de células (T) = C x V | W L |
| Calcule o volume final de ressuspensão do CPS (V _f) | W |
| Data e hora do congelamento | W L |
| Comentários e desvios do protocolo, incluindo mas não limitado a: <ul style="list-style-type: none"> Todas as condições inesperadas de amostras Sangue coagulado (número de tubos com coágulos, número total de tubos do lote de PTID e detalhes de processamento) Rendimento celular abaixo da faixa esperada Anomalias de processamento Etapas realizadas de resolução de problemas Observar se o Tempo total for > 8 horas Tempo de processamento > 4 horas | W |
| Data/hora da coleta | W L |
| Reagentes (fabricantes, números de lotes e datas de validade para DMSO, FBS, WDR, CSTFB, meio de gradiente de densidade) | W |
| CPS (Volume de DMSO e FBS) | W |
| Tipo do tubo de amostra (HEP/ACD/EDTA/Outro) | W L |
| Condição do sangue (ex. SAT/HEM/CLT) | W L |
| Volume de sangue total utilizável medido | W L |
| Contagens de células | W |
| Número real de células por tubo | W L |
| Número de tubos criogênicos congelados | W L |
| Informações de armazenamento em freezer (Módulo de armazenamento do LDMS) | O L |
| Confirmação de CQ visual de reagentes (técnico) | O |
| Produção de células/mL de sangue total | W |
| Vol. estimado de ressuspensão de CPS (V ₁) | W |
| Confirmação de CQ de etiquetas do LDMS para conteúdo/códigos de barra (técnico) | W |
| Confirmação de transferência de tubos criogênicos para locais da caixa de armazenamento atribuídos pelo LDMS (técnico) | W |
| Data/hora em que os tubos criogênicos foram transferidos da unidade de congelamento de taxa controlada para a caixa de armazenamento. | W |
| Revisões finais, revisores/datas | W |

W= Requer controle em uma planilha de PBMC

L = Requer entrada/controle no LDMS

O = Controle em uma planilha ou outro material de controle é opcional

6. Amostra

6.1. Sangue total anticoagulado fresco coletado de acordo com os requisitos do protocolo.

6.2. Condições de manuseio

6.2.1. As amostras devem ser armazenadas em temperatura ambiente (15 a 25 °C ou até 30 °C, dependendo das condições climáticas) do momento da coleta até a entrega ao laboratório de processamento.

6.2.2. As amostras devem ser entregues ao laboratório de processamento o mais rápido possível (as boas práticas seriam de 30 minutos a 4 horas após a coleta) para permitir que o laboratório de processamento tenha tempo suficiente para concluir os procedimentos de criopreservação. A clínica deve discutir os requisitos específicos com o laboratório de processamento antes da inscrição no protocolo.

6.2.3. As amostras devem ser processadas pelo laboratório de processamento o mais rápido possível após o recebimento (as boas práticas seriam iniciar o processamento dentro de 30 minutos após o recebimento da amostra):

- O tempo de processamento (hora de início do processamento) é o momento em que o tubo é aberto pela primeira vez ou colocado na centrífuga, o que ocorrer primeiro.
- Tempo de congelamento é definido como o tempo quando:
 - o Agilent Technologies StrataCooler®, Nalgene® Mr. Frosty™ ou Corning® CoolCell® é colocado em um freezer configurado para - 80 °C. Consulte SPLI/LPC/LM para as variações de temperaturas aceitáveis para levar em conta as flutuações rotineiras nas temperaturas do freezer.
 - o programa de resfriamento do freezer de taxa controlada, como CryoMed®, iniciou.

Observação: Freezers de taxa controlada não são permitidos para amostras da HVTN.

- O Tempo total é calculado a partir da Hora da coleta da amostra e Hora de congelamento; de forma ideal, 8 horas ou menos, mas todas as amostras devem ser processadas independentemente do Tempo total.
- O Tempo total de processamento é calculado a partir da Hora de processamento e Hora de congelamento; menos que 4 horas é o recomendado sendo o ideal abaixo de 3 horas.

6.2.4. Não refrigerar ou congelar sangue total. Não colocar o sangue em contato direto com embalagens frias caso as esteja usando durante condições de calor extremo.

6.3. Amostras marginais

6.3.1. Amostras coaguladas

6.3.1.1. Todo sangue deve ser processado independentemente de estar ou não coagulado, a menos que o contrário seja indicado no protocolo.

6.3.1.2. Remover coágulos e processar normalmente.

6.3.1.3. Marque a condição como CLT na planilha e no LDMS. Inclua detalhes na seção de comentários da planilha de processamento.

6.3.2. Amostras hemolizadas

6.3.2.1. A hemólise pode afetar a qualidade das PBMCs.

6.3.2.2. Processar normalmente.

6.3.2.3. Marque a condição como HEM na planilha e no LDMS. Inclua detalhes na seção de comentários da planilha de processamento.

6.3.3. Baixa produção de células

6.3.3.1. Se a produção de células não for suficiente para atender às necessidades do protocolo, entre em contato com a clínica para uma possível substituição da amostra. Se a produção de células for $\leq 0,4 \times 10^6$ células/mL, entre em contato com a clínica para uma possível substituição da amostra e notifique o centro laboratorial da rede (HVTN, HPTN) ou equipe do protocolo (ACTG).

6.3.3.2. Registre as etapas realizadas para resolução de problemas ou verificação de dados na seção de comentários da planilha de processamento.

6.4. Amostras não aceitáveis

6.4.1. Amostras sem etiquetas ou etiquetadas de forma incorreta serão rejeitadas.

6.4.2. Siga a diretriz da rede para a rejeição de amostras atrasadas.

6.4.3. Vazamento de amostras: Notifique a clínica caso alguma das amostras esteja vazando e determine se as amostras são ou não utilizáveis. A esterilidade da amostra e a segurança do pessoal do laboratório que está manuseando as amostras são de extrema importância.

7. Equipamentos

7.1. Preparação e processamento

7.1.1. Gabinete de biossegurança Classe II (BSC) de nível 2 ou superior

7.1.2. Centrífuga, de baixa rotação (capacidade de 200 a 1000 x g), com rotor basculante, preferencialmente refrigerado, temperatura ambiente aceitável. São necessários copos com tampas.

7.1.3. Micropipetas, variação 20, 200, 1000µL

7.1.4. Pipetador portátil Pipet-Aid (de preferência sem fio) para uso com pipetas sorológicas descartáveis

7.1.5. Geladeira a 2 °C a 8 °C

7.1.6. Freezer a -20°C (ou inferior) sem descongelamento automático (para armazenamento de FBS)

7.1.7. Freezer a -80 °C (-65 °C a -95 °C para ACTG, -70 °C a -95 °C para HVTN e HPTN); para armazenamento de PBMC de curto prazo.

7.1.8. Banho-maria 37 °C a 56 °C (para inativação por calor de FBS, se necessário) (Observação para HVTN: Não exigido para protocolos da HVTN; FBS aprovado pela HVTN é fornecido aos laboratórios pela rede como inativados por calor).

7.1.9. Copo ou proveta para alvejante ou outro desinfetante

7.1.10. Racks adequados para comportar tubos de coleta de sangue, de 15 mL, e tubos cônicos de 50 mL na vertical durante as etapas de processamento e transporte

7.1.11. Rack para tubos criogênicos para permitir a abertura/fechamento com uma mão dos tubos criogênicos durante as etapas de alíquota (é preferível a utilização de racks específicos Nunc)

7.2. Equipamentos exigidos pelo LDMS. (Consulte o site do LDMS e requisitos específicos da rede para obter detalhes).

7.2.1. Especificações de reunião de computador definidas pela Frontier Science para o Web LDMS

7.2.2. Impressora para etiquetas geradas pelo LDMS

7.2.3. Leitor de código de barras 2D

7.2.4. Etiquetas compatíveis com LN₂ e área de impressão de 1x1 pol.

7.2.5. Faixa de impressão compatível com LN₂, específica para a impressora, resistente à abrasão e substâncias químicas

7.3. Equipamentos de nitrogênio líquido (LN₂) (se exigido pela rede)

7.3.1. Tanque de armazenamento de LN₂ (≤ -140 °C)

7.3.2. Transportador a seco (dry shipper) de LN₂ aprovado pela IATA

7.4. Contagem de células:

Observação: Os métodos de contagem podem precisar de aprovação da rede. Siga os procedimentos de calibração aplicáveis do fabricante se estiver usando um contador de células automatizado.

7.4.1. Contador de células automatizado capaz de enumerar células viáveis (Beckman-Coulter Vi-Cell, Muse® ou equivalente). A HVTN geralmente não aprova essa classe de contadores de células para amostras frescas.

7.4.2. Contador de células automatizado não capaz de distinguir células viáveis (Coulter Counter, Abbott Cell-Dyn®, Sysmex® ou equivalente).

Observação: Um contador de células automatizado, não capaz de identificar células viáveis, pode ser usado para obter uma contagem total de células sem distinguir células viáveis. No entanto, as amostras que estão sendo preparadas para o Programa de Testagem Proficiente para Criopreservação de PBMC IQA devem incluir uma contagem de células viáveis.

Observação para HVTN: Se contadores automatizados forem usados para fins de protocolo, a rede tem uma forte preferência por essa classe de contadores. Os métodos de contagem devem ser revisados e pré-aprovados pela HVTN.

7.4.3. Câmara de contagem manual de células (hemacitômetro) e microscópio de campo de luz.

Observação: Se uma câmara de contagem manual de células for usada com azul de Tripán, as células viáveis devem ser enumeradas e usadas para cálculos de células. Se a violeta genciana for usada, a contagem total de células pode ser usada para cálculos de células.

7.5. Criopreservação

Observação: Uma das seguintes unidades de congelamento de taxa controlada (CRFUs) pode ser usada conforme as instruções do fabricante; StrataCooler® da Agilent Technologies e CoolCell® da Corning® são as preferidas.

Observação: Se as instruções do fabricante não forem seguidas, um estudo de validação deve ser realizado.

7.5.1. Módulo de criopreservação StrataCooler® da Agilent Technologies – 400005

7.5.1.1. StrataCooler® deve estar entre 2 °C e 8 °C antes de iniciar o resfriamento dos tubos criogênicos.

Não posicione os tubos criogênicos em um StrataCooler® que esteja abaixo da temperatura inicial de 2 °C.

7.5.2. CoolCell® da Corning® (antiga BioCision®)

7.5.2.1. Certifique-se de que todas as peças do CoolCell®, incluindo o anel central, voltem à temperatura ambiente (15 °C a 25 °C ou até 30 °C, dependendo das condições climáticas) entre os intervalos de utilização.

7.5.3. Nalgene® Mr. Frosty™, contêiner de criocongelamento 1 °C/minuto

7.5.3.1. Mr. Frosty™ deve ser armazenado em temperatura ambiente (15 °C a 25 °C ou até 30 °C, dependendo das condições climáticas) entre os intervalos de utilização.

7.5.3.2. O nível de isopropanol deve ser corrigido, e o isopropanol deve ser completamente substituído após o quinto ciclo de gelo-degelo. Um registro deve ser usado para controlar os ciclos de gelo/degelo e as trocas de reagentes. Consulte o [Anexo B](#).

7.5.4. Freezer de taxa controlada, como a Câmara de Congelamento CryoMed® (Gordinier). (Observação para HVTN: Freezers de taxa controlada não são permitidos para amostras da HVTN.)

8. Descartáveis

8.1. Materiais plásticos

8.1.1. Pipetas sorológicas, descartável, 1, 5, 10, 25, 50 mL, estéreis

8.1.2. Pontas de micropipeta, 20, 100, 200, 1000 µL, estéreis

8.1.3. Tubos descartáveis para centrífugas de 15 e 50 mL, estéreis, de fundo cônico, graduados, de polipropileno.

8.1.4. Tubo de separação de células de 50 mL com barreira porosa (CSTFB), seco (não comprado como pré-preenchido com mídia de separação de células).

8.1.4.1. Exigido para processamento da HVTN. Consulte LPC/SPLI/LM para requisitos específicos do protocolo para todas as redes.

8.1.5. Tubos criogênicos (criotubos) com roscas internas, de 1,8 a 2 mL, tampa rosqueada com anel, estéril, somente de polipropileno, independente, graduado, à prova de vazamento, formulado para preservação de LN₂ em fase de vapor (aproximadamente - 140 °C). Confirmar aceitabilidade de quaisquer substituições por tubos criogênicos com a(s) rede(s) antes da compra ([Consulte o Anexo E](#)).

Observação: Tubos com tampa de encaixar *não devem* ser usados. Além disso, os criotubos não devem ser preenchidos além da capacidade especificada pelo fabricante ou até o topo do tubo.

8.1.6. Opcional: Garrafas/frascos estéreis, descartáveis, de gargalo com 45 mm, 250 a 500 mL para guardar grandes volumes de coleta de sangue total antes da separação de PBMC.

8.1.7. Opcional: Pipetas de transferência estéreis de 5 mL, individualmente embaladas em plástico

8.1.8. Opcional: Tubos de separação de células pré-cheios de 50mL com barreira porosa (CSTFB).

Observação para HVTN: Não opcional para estudos da HVTN, a HVTN exige que os laboratórios comprem CSTFB “secos” (i.e., não comprados como pré-cheios); a utilização de outros CSTFB deve ser pré-aprovada pelo Centro de Laboratórios da HVTN.

8.2. Marcadores

Observação: Marcadores para escrever nos tubos e frascos de processamento devem ter ponta fina e utilizar tinta indelével de secagem rápida.

8.3. Etiquetas

Observação: Etiquetas e tintas criogênicas devem ser adequadas para temperaturas de armazenamento de fase de vapor de -80 °C ou LN₂.

9. Equipamento de proteção individual

Observação: Equipamento de proteção individual adequado para uso com patógenos sanguíneos é necessário. Siga as diretrizes e práticas locais do laboratório para o manuseio de produtos derivados do sangue.

9.1. Jaleco ou avental de laboratório

9.2. Proteção ocular

9.3. Luvas de nitrilo sem pó ou equivalente

9.4. Luvas criogênicas

9.5. Protetores faciais (com proteção para o queixo, se preferido ou exigido pelos regulamentos locais de biossegurança), necessários ao trabalhar com LN₂.

10. Reagentes

10.1. A compra de reagentes estéreis e o uso de técnicas de assepsia são necessários.

10.1.1. Armazene os frascos abertos na temperatura recomendada pelo fabricante até que sejam totalmente consumidos, até que seja instruído a descartá-los abaixo ou até a data de validade do fabricante, o que ocorrer primeiro.

10.1.2. [Consulte o Anexo E](#) para uma lista de produtos recomendados.

10.1.3. Descarte caso sinais visíveis de contaminação apareçam, como aparência turva.

10.2. Reagentes diluentes de lavagem (WDR)

10.2.1. 1X Solução salina balanceada de Hank (HBSS) sem cálcio ou magnésio, pronta para uso.

10.2.2. 1X Fosfato tamponado salino (PBS) sem cálcio ou magnésio, pronta para uso.

10.3. Volume de meio de gradiente de densidade (1,077 g/mL)

10.3.1. Meio estéril pronto para uso para isolamento de alta produção de linfócitos humanos do sangue periférico

10.3.2. [Consulte o Anexo E](#) para uma lista de produtos recomendados

10.4. Tubo de separação de células com barreira porosa (CSTFB, se utilizado). Exigido para HVTN a menos que haja alternativa anotada em SPLI/LPC/LM específico do protocolo.

10.4.1. Sistema de CSTFB não preenchido (combinação de um CSTFB seco com um meio de gradiente de densidade 1,077)

10.4.1.1. Leve o meio de gradiente de densidade (DGM) à temperatura ambiente (15 a 25 °C ou até 30 °C, dependendo das condições climáticas). Proteja da luz.

- 10.4.1.2. Trabalhe no BSC seguindo técnica asséptica
- 10.4.1.3. Registre informações relacionadas ao CSTFB e DGM diretamente da embalagem ou frasco usado na planilha de PBMC. Os CSTFBs preparados com antecedência devem ter etiquetas incluindo todas as informações necessárias, data de preparação e iniciais da pessoa que preparou os tubos.
- 10.4.1.4. Prepare os tubos pipetando o volume de DGM apropriado para o tamanho do tubo CSTFB que está sendo usado (conforme observado abaixo).

| Capacidade do tubo (mL) | Volume de meio de gradiente de densidade (mL) |
|-------------------------|---|
| 50 mL | 15 mL |

- 10.4.1.5. Tampe os CSTFBs com DGM adicionado e centrifugue a 800 x g por 30 segundos (ou ajuste de tempo mais baixo acima de 30 segundos) em temperatura ambiente (15 a 25 °C ou até 30 °C, dependendo das condições climáticas).
 - 10.4.1.6. O DGM agora deve estar abaixo da barreira porosa. Inspeção os tubos para verificar se há vazios ou bolhas grandes entre a camada de DGM e a barreira porosa ou se há DGM restante acima da barreira.
 - 10.4.1.7. Se houver vazios ou bolhas grandes abaixo da barreira, adicione mais meio, centrifugue o CSTFB novamente a 800-1000 x g por 30 segundos a 1 minuto (selecione a configuração de centrifuga mais baixa) e inspeção novamente.
 - 10.4.1.8. Se houver líquido (DGM) acima da barreira, centrifugue o CSTFB novamente a 800-1000 x g por 30 segundos a 1 minuto (selecione a configuração de centrifuga mais baixa). Se qualquer solução de gradiente de densidade permanecer acima da barreira após nova centrifugação, remova-a seguindo a técnica de assepsia.
 - 10.4.1.9. Siga as recomendações de armazenamento do fabricante do meio de gradiente de densidade.
- 10.4.2. CSTFB pré-preenchido (meio de gradiente de densidade 1,077)

Observação: A capacidade requerida do tubo dependerá do volume de sangue total Armazene na geladeira (2 a 8 °C).

Observação para HVTN: CSTFB adquiridos pré-cheios não são permitidos.

- Proteja da luz.
- Aparência turva indica deterioração do produto. Descarte caso note sinais visíveis de contaminação.
- Deixe o CSTFB pré-cheio atingir a temperatura ambiente (15 a 25 °C ou até 30 °C, dependendo das condições climáticas) antes de usar.

10.5. Reagentes de congelamento

- 10.5.1. Soro fetal bovino (FBS), de preferência inativado por calor. (Consulte a Seção 11.1 FBS inativado por calor para obter detalhes de manuseio e gerenciamento).

Observação para HVTN e estudos conjuntos com a HVTN: FBS aprovado pela HVTN é fornecido aos laboratórios pela rede; fornecedor e lote de FBS aprovado pela HVTN não estão disponíveis para compra fora da cadeia de suprimento/processo da HVTN.

- 10.5.1.1. Verifique com as redes aplicáveis para saber quem são os fornecedores de preferência.
- 10.5.1.2. Obtenha um certificado de análises do fornecedor para registro de controle de qualidade do laboratório.

Observação: Uma cópia do certificado de análises do FBS pode ser exigida para exportar (ou importar) alíquotas de PBMC entre países.

- 10.5.1.3. FBS armazenado congelado (≤ -20 °C/de acordo com as recomendações do fabricante) estará bom até a data de validade do fabricante.

- 10.5.1.4. FBS descongelado e armazenado entre 2 e 8 °C é estável por um mês corrido.
- 10.5.2. Dimetilsulfóxido (DMSO), para cultura de células
 - 10.5.2.1. Use DMSO do tipo para cultura de células.
 - 10.5.2.2. Armazene frascos não abertos a temperatura ambiente (15 a 25 °C ou até 30 °C, dependendo das condições climáticas). Verifique a data de validade de cada frasco e descarte se estiver fora do prazo.
 - 10.5.2.3. Uma vez aberto, o DMSO não diluído, quando protegido da luz e da umidade, é estável à temperatura ambiente (15 a 25 °C ou até 30 °C, dependendo das condições climáticas) por 6 meses (ou até a data de validade do fabricante, se essa data for < 6 meses a partir da data de abertura). Corrija a etiqueta no frasco para refletir a nova data de validade.
 - 10.5.2.4. Utilize uma técnica de assepsia ao remover o DMSO do frasco para evitar possível contaminação.
 - 10.5.2.5. Descarte o conteúdo do frasco aberto caso note sinais visíveis de contaminação.
 - 10.5.2.6. Os reagentes podem estar separados em alíquotas pequenas para ajudar a preservar a esterilidade. Etiquete as alíquotas com “DMSO”, nome do fabricante, número do lote, data de abertura/aliquotação, data de validade (seis meses a partir da abertura ou data de validade do frasco original, o que ocorrer primeiro) e iniciais do técnico. Proteja as alíquotas da luz.
- 10.5.3. Desinfetante
 - 10.5.3.1. Etanol desinfetante a 70% v/v, frasco borrifador
 - 10.5.3.2. Alvejante a 10% v/v, copo ou proveta e frasco borrifador (deve ser produzido diariamente)
 - 10.5.3.3. Outros desinfetantes conforme especificação da política local do laboratório
- 10.6. Reagentes de contagem de células

Observação: Os requisitos para reagentes de contagem de células irão variar dependendo do método utilizado. Consulte o POP/instruções aprovado pela rede para o método que está sendo usado. O uso de ácido acético glacial não é permitido para contagens manuais da HVTN.

 - 10.6.1. Solução de azul de Tripán a 0,4%
 - 10.6.2. Opcional: Solução de violeta genciana a 0,05% pode ser utilizada para tingir os núcleos das células a fim de identificar células mononucleares, e contá-las usando um hemacitômetro. Se for necessária a viabilidade, uma segunda contagem usando azul de Tripán pode ser realizada. A solução de violeta genciana de 0,05% contém: 0,05 g de violeta genciana, 2 mL de ácido acético glacial e 98 mL de H₂O destilado ou deionizado.

11. Preparação de reagentes

- 11.1. FBS inativado por calor (HI-FBS)

Observação: HI-FBS pode ser pedido do fabricante, ou pode-se pedir FBS do fabricante e inativá-lo por calor no laboratório. Siga estas instruções para descongelar, para separar em alíquotas e para utilizar.

Observação para HVTN: FBS aprovado pela HVTN é fornecido aos laboratórios pela rede como inativado por calor; fornecedor e lote de FBS aprovado pela HVTN geralmente não estão disponíveis para compra fora da cadeia de suprimento/processo da HVTN.

 - 11.1.1. Remova o FBS do freezer.
 - 11.1.2. Descongele na geladeira (2 a 8 °C), de preferência, ou por algumas horas à temperatura ambiente (15 a 25 °C ou até 30 °C, dependendo das condições climáticas). Não permita que o FBS fique à temperatura ambiente por mais tempo que o necessário para completar o processo de descongelamento.
 - 11.1.3. Mexa girando suavemente duas ou três vezes durante o período de descongelamento.
 - 11.1.4. Siga estas instruções adicionais se o FBS não tiver sido inativado pelo calor. Se o FBS tiver sido inativado por calor pelo fabricante, vá para 11.1.5.
 - 11.1.4.1. Coloque o FBS 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 FBS.

Observação: O nível de água no banho-maria deve cobrir o nível do FBS no frasco, mas não deve tocar a tampa do frasco. Isso ajuda a assegurar o aquecimento homogêneo do FBS e evitar a contaminação.

- 11.1.4.2. Quando a temperatura do banho-maria tiver chegado a 56 °C (55 a 57 °C), aqueça o FBS por 30 minutos, mexendo a cada 5 a 10 minutos. Aquecer por períodos mais longos pode degradar os componentes do FBS.

Observação: Limpe o frasco com etanol 70% v/v antes de abrir.

- 11.1.5. Misture o HI-FBS de forma cuidadosa, mas consistente, usando técnica de assepsia.

- 11.1.6. Separe em alíquotas de tubos cônicos de centrifuga de 50 mL, estéreis, etiquetados, ou alíquotas de outros tamanhos adequadas à carga de trabalho planejada.

Observação: As etiquetas devem identificar esses tubos como “HI-FBS” e devem incluir nome do fabricante, número de lote, data da alíquota, condições de armazenamento, data de validade original do fabricante e iniciais do técnico. O FBS é estável por 1 mês (se o período de 1 mês não exceder a data de validade original do fabricante) entre 2 e 8 °C, ou até a data de validade original do fabricante, se mantido a -20°C. Lembre-se de atualizar a data de validade e as condições de armazenamento nas alíquotas/frascos removidos do armazenamento a -20°C para uso.

- 11.1.7. Refrigere (2 a 8 °C) o número de tubos de alíquota necessários à carga de trabalho esperada. Misture bem antes de usar. Os tubos de alíquota que não forem necessários imediatamente podem ser colocados no freezer e estarão estáveis até a data de validade original do fabricante.

Observação: Ciclos repetidos de gelo/degelo terão um efeito adverso na qualidade do FBS. Não recongele alíquotas que tiverem sido armazenadas a temperaturas de refrigerador.

- 11.1.7.1. Para usar as alíquotas congeladas, descongele com antecedência na geladeira de um dia para o outro, de preferência, ou a temperatura ambiente (15 a 25 °C ou até 30 °C, dependendo das condições climáticas) por várias horas. Não permita que o FBS fique à temperatura ambiente por mais tempo que o necessário para completar o processo de descongelamento.

- 11.1.7.2. Uma vez descongelado, o FBS é estável por 1 mês entre 2 e 8 °C, ou até a data de validade do frasco original, o que ocorrer primeiro. Lembre-se de atualizar a data de validade e as condições de armazenamento em alíquotas/frascos removidos do armazenamento a -20 °C para uso. Misture bem antes de usar.

11.2. Solução fresca de criopreservação (CPS)

11.2.1. Componentes da CPS

| Componentes | Porcentagem (v/v) |
|---------------------------|-------------------|
| DMSO | 10% |
| FBS (inativado por calor) | 90% |

11.2.2. Preparação de CPS

- 11.2.2.1. Use tubos de centrifuga cônicos esterilizados, etiquetados e descartáveis de 15 mL ou 50 mL para armazenar o CPS preparado.

Observação: A mistura de DMSO e FBS é uma reação exotérmica.

- 11.2.2.2. A CPS precisa ser preparada de antemão e resfriada no refrigerador (2 a 8 °C) por, pelo menos, 30 minutos antes do uso, ou em banho de gelo por, pelo menos, 15 minutos antes do uso.

Observação: A CPS pode ser armazenada de 2 e 8 °C por 1 dia útil (< 18 horas).

- 11.2.3. Utilize a fórmula abaixo para fazer uma estimativa do volume de CPS a ser preparado para ressuspensão de PBMC. Exemplos também são apresentados.

Sangue total utilizável (mL) x Produção de células (células/mL) x Concentração de redução de congelamento (mL/células) = CPS estimada (mL)

Arredonde para cima esse resultado para o mL inteiro mais próximo.

Observação: O volume de sangue total utilizável (UWBV) é o volume de sangue total que será de fato processado. (O volume de sangue total utilizável pode não ser igual à capacidade do tubo.)

Observação: Ao processar sangue coletado em tubos ACD, inclua a capacidade de coleta e o anticoagulante líquido ao considerar volumes máximos, medições e cálculos de produção de células.

- Por exemplo, um tubo ACD de 8,5 mL contém 1,5 mL de anticoagulante e coletará um volume máximo de sangue de 8,5 mL. Ao estimar e medir tubos ACD, a capacidade máxima será de 10,0 mL por tubo de coleta de 8,5 mL (8,5 mL de sangue total, 1,5 mL de anticoagulante líquido = 10,0 mL).

Observação: Os lotes de CPS devem ser feitos antes da obtenção do volume de sangue total utilizável medido. Para fazer isso, execute o cálculo acima usando o volume máximo esperado de sangue total (ou seja, capacidade do tubo de coleta incluindo anticoagulante, multiplicado pelo número esperado de tubos a serem coletados na visita). Ao preparar a CPS, o laboratório também deve considerar as produções médias obtidas com sua população participante. Comece com uma produção de células média de $1,5 \times 10^6$ células/1,0 mL para o cálculo inicial. Monitore o uso diário da CPS para maximizar a eficiência e minimizar o desperdício.

- Por exemplo, se grandes quantidades de CPS são descartadas regularmente no final do dia, ajuste a produção de células para baixo para refletir com mais precisão a população de participantes. Se o cálculo gerar volumes de CPS insuficientes, ou seja, vários lotes precisarem ser produzidos, aumente a produção de células no cálculo ou considere aumentar o volume final em uma porcentagem fixa, como 20%.

Exemplos: Sangue adulto — lote diário de CPS - várias visitas agendadas:

- A concentração de congelamento alvo (mL/células) para todos é (1,0 mL/15 x 10^6 células) ou 15 milhões de células congeladas em 1 mL (V2) de CPS.
- Calcule o volume total esperado:

Observação: Lembre-se de incluir o anticoagulante líquido ao calcular os volumes totais esperados dos tubos ACD. Os tubos de NaHep e EDTA não contêm anticoagulantes líquidos, portanto, o volume do tubo registrado na requisição do laboratório é o volume máximo possível.

- A primeira visita agendada inclui 18 tubos ACD de 8,5 mL para processamento de PBMC
- A segunda visita agendada inclui 8 tubos ACD de 8,5 mL para processamento de PBMC
- A terceira visita agendada inclui 8 tubos de NaHep de 10,0 mL para processamento de PBMC
- Total de tubos esperados (18+8+8) = 34, 34 tubos x 10,0 mL = 340,0 mL volume máximo esperado

| Sangue total utilizável x | Produção de células x | Concentração de redução de congelamento = | Estimativa de CPS a ser preparada |
|---------------------------|-------------------------------------|---|-----------------------------------|
| (340,0 mL) x | ($1,5 \times 10^6$ células/1 mL) x | (1,0 mL/15 x 10^6 células) = | 34,0 mL |

Exemplo: Sangue de adulto - Coleta de sangue de volume grande. A concentração de congelamento alvo (mL/células) é (1,0 mL/15 x 10^6 células) ou 15 milhões de células congeladas em 1 mL (V2) de CPS. Lote de CPS criado após a medição do UWBV.

| Sangue total utilizável x | Produção de células x | Concentração de redução de congelamento = | Estimativa de CPS a ser preparada |
|---------------------------|-------------------------------------|---|-----------------------------------|
| (135,0 mL) x | ($1,5 \times 10^6$ células/1 mL) x | (1,0 mL/15 x 10^6 células) = | 14,0 mL |

Exemplo: Sangue adulto — 8 x 10,0 mL de coleta de sangue NaHep. A concentração de congelamento alvo (mL/células) é (1,0 mL/10 x 10^6 células) ou 10 milhões de células congeladas em 1 mL (V2) de CPS. Lote de CPS criado antes da medição do UWBV.

| | | | |
|---------------------------|--|---|-----------------------------------|
| Sangue total utilizável x | Produção de células x | Concentração de redução de congelamento = | Estimativa de CPS a ser preparada |
| (80,0 mL) x | (1,5 x 10 ⁶ células/1 mL) x | (1,0 mL/10 x 10 ⁶ células) = | 12,0 mL |

11.2.4. Use a seguinte fórmula para calcular as quantidades de DMSO e de FBS necessárias.

$$CPS = 1 \text{ parte de DMSO} + 9 \text{ partes de FBS}$$

Exemplos:

| Volume de CPS estimado | Volume de DMSO = (.1)(volume de CPS) | Volume de HI-FBS = Volume de CPS – (volume de DMSO) | Volume de CPS total = Volume de DMSO + Volume de FBS |
|------------------------|--------------------------------------|---|--|
| 10,0 mL | 1,0 mL | 9,0 mL | 10,0 mL |
| 5,0 mL | 0,5 mL | 4,5 mL | 5,0 mL |

11.2.5. Registre os volumes de CPS, DMSO e FBS na planilha de PBMC. Ao criar lotes compartilhados, também é recomendável registrar a hora da criação e as iniciais da pessoa que criou o lote.

12. Introdução e diretrizes relacionadas ao processamento de PBMC

Estes são princípios padrão e etapas comuns a todos os procedimentos de processamento de PBMC. Existem variações dependendo da escolha de técnicas de separação (CSTFB pré-preenchida ou overlay manual), do tratamento do sangue (diluição com ou sem reposição de plasma ou coleta direta de plasma), concentração final de células e congelamento/armazenamento. Selecione as seções correspondentes para os procedimentos de separação de células e tratamento do sangue, e para congelamento e armazenamento de acordo com os requisitos da rede e do protocolo.

13. Separação de células e diluição de sangue por tubo de separação de células com barreira porosa (CSTFB) com reposição de plasma

A Seção 13 pode ser usada por todas as redes; consulte os requisitos de protocolo e materiais disponíveis. Para qualquer amostra, use a Seção 13 ou a Seção 14, mas nunca as duas.

13.1. Separação de linfócitos do sangue periférico usando tubos de separação CSTFB com meio de gradiente de densidade (DGM) adicionado em temperatura ambiente (15 a 25 °C ou até 30 °C, dependendo das condições climáticas).

13.1.1. Realize toda pipetagem e mistura em um gabinete de biossegurança (BSC) Classe II, de nível 2 ou superior.

13.1.2. Borrife etanol 70% v/v, ou desinfetante equivalente, sobre todas as superfícies, racks e frascos de reagentes sempre antes de entrar e iniciar o uso do BSC.

13.1.3. A menos que indicado de outra forma, o procedimento é realizado à temperatura ambiente (15 a 25 °C ou até 30 °C, dependendo das condições climáticas).

13.1.4. Utilize uma pipeta nova para cada número de identificação de participante (PTID) e para cada aditivo.

13.2. Prepare amostras de sangue total, reagentes e suprimentos.

13.2.1. Prepare e resfrie a CPS (consulte a Seção 11 Preparação de reagentes) antes do processamento ou com antecedência suficiente para misturar com PBMC, caso seja necessário CPS adicional.

Observação: Os lotes de CPS devem ser preparados antes do início das etapas de processamento da amostra. Os volumes de lote devem ser monitorados e a criação de lotes adicionais, quando necessário, deve ser capturada em detalhes completos na planilha de PBMC.

13.2.2. Prepare tubos CSTFB suficientes para gerenciar a quantidade máxima de sangue esperada.

13.2.2.1. Para tubos CSTFB de 50 mL, planeje um volume máximo de 20 mL, ou um CSTFB para cada dois tubos de coleta de sangue de 8,5-10,0 mL. Dica: Divida o número total de tubos de coleta de 8,5-10,0 mL a serem recebidos por 2. Se o resultado for uma fração (um número ímpar de tubos de coleta de sangue), arredonde para o número inteiro mais próximo (ou seja, adicione um tubo CSTFB adicional).

13.2.2.2. Exemplos:

- A visita 1 tem 3 tubos de NaHep de 10,0 mL. Prepare 2 tubos CSTFB.
- A visita 10 tem 10 tubos ACD de 8,5 mL. Prepare 5 tubos CSTFB

13.2.3. Certifique-se de que os tubos CSTFB preparados contendo DGM estejam em temperatura ambiente (15 a 25 °C ou até 30 °C, dependendo das condições climáticas) antes de iniciar as etapas de processamento.

13.2.4. Inspeção visualmente os tubos CSTFB cheios para confirmar se não há bolhas grandes, se há lacunas entre o DGM e a barreira porosa e se não há DGM presente acima da barreira porosa antes de adicionar o WDR ou sangue aos tubos. (Consulte as instruções de preparação do CSTFB na Seção 10.4 para obter instruções sobre como gerenciar problemas de volume do DGM quando observados).

13.2.5. Reúna o mesmo número de tubos de centrifuga de polipropileno graduados, de fundo cônico e estéreis de 50 mL que os CSTFB preparados (consulte a Seção 13.2.2) para uso. Esses tubos de “lavagem” serão usados para as células coletadas e as etapas de lavagem subsequentes.

| Tamanho do CSTFB (mL) | Tamanho de tubo cônico de centrifuga (mL) |
|-----------------------|---|
| 50 | 50 |

13.2.6. Se for necessária a reposição de plasma, reúna um tubo de centrifuga de polipropileno graduado, de fundo cônico e estéril, de 15 ou 50 mL, apropriado para o volume de plasma a ser coletado. Adicione etiqueta com PTID, anticoagulante e derivado.

13.2.7. Se os tubos de amostra estiverem frios ao toque (devido a condições ambientais frias como o transporte em meses mais frios), deixe os tubos atingirem a temperatura ambiente (15 a 25 °C ou até 30 °C, dependendo das condições climáticas) antes de processar.

13.2.8. Verifique cuidadosamente o PTID em todos os tubos de sangue recebidos. Organize os tubos primários de forma que não haja possibilidade de misturar tubos entre PTID/PIDs ou anticoagulantes.

Sugestão: Coloque todos os tubos para cada PTID/anticoagulante em um mesmo rack. Racks diferentes podem ser usados para separar PTIDs ou tipos de tubos, e uma cor diferente de marcador pode ser usada para cada PTID para evitar confusão.

13.3. Reposição de plasma

Observação: Execute esta etapa de reposição de plasma somente se forem necessárias alíquotas de plasma dos tubos de coleta de PBMC conforme o protocolo ou SPLI/LPC/LM; prossiga para a etapa 13.4 se alíquotas de plasma não forem necessárias.

13.3.1. Os tubos de coleta de sangue do mesmo PTID e do mesmo anticoagulante devem ser processados individualmente (não reunidos em tubos cônicos de centrifuga de 50 mL), a menos que indicado de outra forma no SPLI/LPC/LM específico do protocolo.

13.3.2. Marque o volume de sangue total em cada tubo de coleta no menisco.

13.3.3. Centrifugue o sangue total de 200 a 400 x g por 10 minutos. Registre o horário de início do processamento na planilha de PBMC.

13.3.4. Transfira o plasma para um tubo de centrifuga cônico etiquetado de 15 ou 50 mL para a segunda centrifugação e remova qualquer fragmento celular.

13.3.5. Adicione uma quantidade suficiente de WDR para trazer o sangue de volta ao seu volume original de sangue total, misture suavemente e continue o processamento de PBMC na etapa 13.4.

13.3.6. Complete o plasma processando por centrifugação o plasma coletado de 800 a 1200 x g por 10 minutos para obter alíquotas PL2, ou de acordo com o protocolo ou SPLI/LPC/LM. Isso pode ser feito em momento posterior, quando a centrífuga não estiver em uso pelo processamento de PBMC.

13.3.7. Divida o plasma duplamente centrifugado em tubos de alíquota etiquetados conforme SPLI/LPC/LM específico do protocolo e descarte os fragmentos celulares restantes.

13.4. Diluição de sangue para separação CSTFB

Observação: A proporção máxima de sangue para WDR deveria ser de aproximadamente 2:1. Use um tubo de 50 mL para cada 12 a 20 mL de sangue total. Utilize quantos CSTFB forem necessários para distribuir todo o sangue para cada PID/PTID.

Observação: O meio de gradiente de densidade é tóxico para as células; trabalhe de forma rápida e eficiente durante as etapas de separação.

13.4.1. Coloque etiqueta em cada CSTFB e tubo de “lavagem” da centrífuga cônica estéril correspondente com o PTID (e anticoagulante, se apropriado)

13.4.2. Utilize uma pipeta estéril, adicione WDR a cada CSTFB etiquetado e preparado:

| Tamanho do CSTFB (mL) | Volume aproximado de WDR (mL) |
|-----------------------|-------------------------------|
| 50 | 5 |

13.4.3. Usando uma pipeta sorológica estéril, adicione WDR a cada tubo de “lavagem” cônico estéril e pré-etiquetado da centrífuga:

| Tamanho do CSTFB (mL) | Tamanho de tubo cônico de centrífuga (mL) | Volume de WDR pré-cheio (mL) |
|-----------------------|---|------------------------------|
| 50 | 50 | 25 |

13.4.4. Destampe os tubos de sangue anticoagulado. Se as etapas de reposição de plasma não foram necessárias/executadas, registre o horário da remoção da tampa como hora de início do processamento na planilha de PBMC.

13.4.5. Se o sangue em um tubo de coleta estiver coagulado ou muito hemolisado, consulte a Seção 6.3.

13.4.6. Use uma pipeta sorológica estéril para misturar o sangue total suavemente e depois transfira o sangue para os CSTFBs etiquetados.

Observação: O sangue deve ser transferido usando uma pipeta sorológica de 10 mL, em quantidades medidas de 10,0 mL até que reste menos de 10,0 mL. Distribua o sangue pelos tubos CSTFB em incrementos fixos para garantir o rastreamento preciso dos volumes para medição de UWV durante a distribuição do sangue total.

13.4.7. Transferência de meta de 15 a 20 mL de quantidade total de sangue para cada CSTFB etiquetado. (A variação expandida abaixo é permitida apenas em certas situações em que a variação pretendida não é possível). Não comece a encher um novo CSTFB de 50 mL a menos que um mínimo de 12 mL de sangue esteja disponível/restante.

| Tamanho do CSTFB (mL) | Volume de sangue aproximado (mL)* |
|-----------------------|---|
| 50 | 15-20 (12 a 22 permitidos em certos cenários) |

*Volumes de sangue menores, especialmente na presença de poucos hematócritos, podem fazer com que a camada leucoplaquetária chegue próxima à barreira, tornando a coleta difícil. Volumes maiores de sangue podem contribuir para aumento de sobras/fragmentos das amostras. Consulte as diretrizes específicas do protocolo para retirada de volumes menores de sangue.

13.4.8. Determine e registre uma medida precisa do volume de sangue total utilizável em medidas de 0,1 mL.

Observação: O volume de sangue total utilizável não precisa ser igual ao tamanho do tubo.

13.4.9. Utilizando uma pipeta estéril, enxágue cada tubo original de sangue anticoagulado com WDR, adicione volumes de enxágue ao CSTFB certificando-se de que não exceda o limite de volume total do tubo (WDR + Sangue total).

| Tamanho do CSTFB (mL) | Limite de volume total do tubo (mL) (Sangue total + WDR) |
|-----------------------|---|
| 50 | 30 |

13.4.10. Tampe cuidadosamente o CSTFB.

13.5. Centrifugação de densidade e coleta de CSTFB

13.5.1. Posicione os tubos verticalmente, coloque-os em um rack e transfira-os para a centrífuga.

13.5.2. Centrifugue de 800 a 1000 x g por 15 minutos entre 15 e 25 °C (ou até 30 °C, dependendo das condições climáticas) com o freio desligado (OFF)/configurado para zero.

Observação: Se o freio estiver ligado, as camadas serão afetadas.

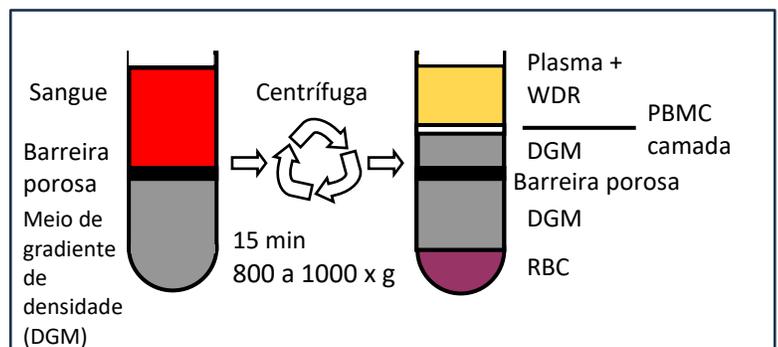
13.5.3. Enquanto os tubos CSTFB estiverem girando, descarte todos os tubos de coleta esvaziados seguindo as práticas de laboratório, limpe a superfície do BSC e organize para as próximas etapas.

13.5.4. Confirme se o número correto de tubos de centrifuga cônica estéreis e etiquetados, pré-cheios com WDR (tubos de “lavagem”) estão prontos no BSC para as etapas de coleta/lavagem.

13.5.5. Quando a centrifuga parar completamente, remova cuidadosamente cada CSTFB da centrífuga para não afetar as camadas. Use um rack para apoiar os tubos e transfira cuidadosamente para o BSC.

13.5.6. Os resultados da centrifugação no conteúdo do tubo dividem-se em seis camadas distintas, incluindo a barreira. Da parte superior do tubo, são elas:

- Plasma + WDR
- Camada PBMC
- Meio de gradiente de densidade (DGM)
- Barreira porosa
- Meio de gradiente de densidade (DGM)
- Hemácias concentradas (RBC) e granulócitos



13.5.7. Inspeção dos tubos para verificar se há algum dos seguintes problemas possíveis. Documente as observações e qualquer ação de acompanhamento tomada de acordo com os requisitos da rede e do laboratório.

- Hemólise no plasma + Camada WDR
- Coágulos visíveis na barreira porosa após a centrifugação.
- Camadas de PBMC mal definidas devido a erro na centrifugação, como velocidade, tempo ou freio. Camada de PBMC aparece menor e indistinta, enquanto a camada de Plasma + WDR pode estar levemente turva. Consulte o [Anexo C](#) para resolução de problemas.
- Camada de PBMC formada na barreira porosa devido a baixa contagem de eritrócitos ou volume de hematócritos.
- Camada de RBC imediatamente abaixo e tocando a camada de PBMC.

13.5.8. Usando uma pipeta sorológica nova e estéril para cada PTID, remova reduzindo a fração amarelada de plasma-WDR até aproximadamente 1 a 2 cm da faixa branca turva de PBMC localizada na interface entre a fração plasma-WDR (amarelada) e a solução de separação de meio transparente. Tenha cuidado para não afetar a camada de células durante esse processo. Descarte a fração de plasma-WDR de acordo com a política do laboratório.

Observação: Alternativamente, a faixa branca turva de PBMC pode ser removida inserindo cuidadosamente a pipeta através da camada superior de plasma-WDR.

- 13.5.9. Utilizando uma pipeta sorológica estéril, colete todas as células na interface branca turva acima da barreira porosa. Cuidado para não aspirar quantidade maior da solução de separação de meio do que o necessário.
 - 13.5.9.1. Transfira as células coletadas de um CSTFB para um tubo de “lavagem” cônico de centrifuga estéril individual correspondente, pré-etiquetado (preparado conforme indicado na Seção 13.4). Os tubos podem ser pré-cheios com WDR para ganhar tempo.
- 13.5.10. Tampe novamente o CSTFB contendo as hemácias restantes e o meio de separação. Descarte o CSTFB como resíduo de risco biológico de acordo com a política do laboratório.
- 13.6. Garanta que todos os elementos-chave sejam registrados de acordo com os requisitos da rede e do laboratório. Avance para a Seção 15.

14. Separação de células por overlay ou underlay de meio de gradiente de densidade manual e diluição de sangue por separação de células de gradiente de densidade manual com reposição de plasma (plasmaférese)

A Seção 14 pode ser usada por todas as redes; consulte os requisitos de protocolo e materiais disponíveis. Para qualquer amostra, use a Seção 13 ou a Seção 14, mas nunca as duas.

Observação para HVTN: A HVTN não recomenda o uso do método de underlay. A pré-aprovação do método de underlay deve ser obtida do Centro de Laboratório da HVTN antes do uso para amostras de protocolo.

- 14.1. Separação de linfócitos de sangue periférico usando o método de meio de gradiente de densidade de overlay
 - 14.1.1. Realize toda pipetagem e mistura em um gabinete de biossegurança (BSC) Classe II, de nível 2 ou superior.
 - 14.1.2. Borrife etanol 70% v/v sobre todas as superfícies, racks e frascos de reagentes sempre antes de entrar e iniciar o uso do BSC.
 - 14.1.3. A menos que indicado de outra forma, o procedimento é conduzido à temperatura ambiente (15 a 25 °C ou até 30 °C, dependendo das condições climáticas).
 - 14.1.4. Utilize uma pipeta nova para cada número de identificação de participante (PTID) e para cada aditivo.
- 14.2. Prepare amostras de sangue total, reagentes e suprimentos
 - 14.2.1. Prepare e resfrie a CPS (consulte a Seção 11 Preparação de reagentes) antes do processamento ou com antecedência suficiente para misturar com PBMC, caso seja necessário CPS adicional.

Observação: Os lotes de CPS devem ser preparados antes do início das etapas de processamento da amostra. Os volumes de lote devem ser monitorados e a criação de lotes adicionais, quando necessário, deve ser capturada em detalhes completos na planilha de PBMC.
 - 14.2.2. Permita que o meio de gradiente de densidade chegue à temperatura ambiente (15 a 25 °C ou até 30 °C, dependendo das condições climáticas). Consulte a Seção 10 Reagentes para obter mais informações.
 - 14.2.3. Reúna tubos de centrifuga de polipropileno graduados, estéreis e de fundo cônico, de 50 mL, suficientes para gerenciar todas as etapas de diluição, overlay/underlay e lavagem.
 - 14.2.4. Se for necessária a reposição de plasma, reúna um tubo de centrifuga de polipropileno graduado, de fundo cônico e estéril, de 15 ou 50 mL, apropriado para o volume de plasma a ser coletado. Adicione etiqueta com PTID, anticoagulante e derivado.
 - 14.2.5. Se os tubos de amostra estiverem frios ao toque (devido a condições ambientais frias como o transporte em meses mais frios), deixe os tubos atingirem a temperatura ambiente (15 a 25 °C ou até 30 °C, dependendo das condições climáticas) antes de processar.
 - 14.2.6. Verifique cuidadosamente o PTID em todos os tubos de sangue recebidos. Organize os tubos primários de forma que não haja possibilidade de misturar tubos entre PTID ou anticoagulantes em uma coleta de PTID.

Sugestão: Coloque todos os tubos para cada PTID/anticoagulante em um mesmo rack. Racks diferentes podem ser usados para separar PTIDs ou tipos de tubos, e uma cor diferente de marcador pode ser usada para cada PTID para evitar confusão.

- 14.2.7. Determine e registre uma medição precisa do volume de sangue total utilizável de até 0,1 mL usando uma pipeta sorológica de 10 mL (ou outro método aprovado pela rede). Lembrando que o volume de sangue total utilizável não precisa ser igual ao tamanho do tubo.

Observação para HVTN: Não é permitido o uso de tubos de referência ou tubos cônicos para fins de medição.

14.3. Reposição de plasma

Observação: Execute esta etapa de reposição de plasma somente se forem necessárias alíquotas de plasma dos tubos de coleta de PBMC conforme o protocolo ou SPLI/LPC/LM; prossiga para a etapa 14.4 se alíquotas de plasma não forem necessárias.

- 14.3.1. Tubos de coleta de sangue do mesmo PTID e com o mesmo anticoagulante podem ser processados individualmente ou em conjunto em tubos de centrifuga de 50 mL (agrupamento não permitido para HVTN).
- 14.3.2. Marque o volume de sangue total em cada tubo de coleta no menisco.
- 14.3.3. Centrifugue o sangue total de 200 a 400 x g por 10 minutos. Registre o horário de início do processamento na planilha de PBMC.
- 14.3.4. Transfira o plasma para um tubo de centrifuga cônico etiquetado de 15 ou 50 mL para a segunda centrifugação e remova qualquer fragmento celular.
- 14.3.5. Adicione uma quantidade suficiente de WDR para trazer o sangue de volta ao seu volume original de sangue total, misture suavemente e continue o processamento de PBMC na etapa 14.4.
- 14.3.6. Complete o plasma processando por centrifugação o plasma coletado de 800 a 1200 x g por 10 minutos para obter alíquotas PL2, ou de acordo com o SPLI/LPC/LM específico do protocolo. Isso pode ser feito em momento posterior, quando a centrifuga não estiver em uso pelo processamento de PBMC.
- 14.3.7. Divida o plasma duplamente centrifugado em tubos de alíquota etiquetados conforme SPLI/LPC/LM específico do protocolo e descarte os fragmentos celulares restantes.

14.4. Diluição de sangue para separação manual de células por gradiente de densidade

- 14.4.1. Destampe os tubos de sangue anticoagulado. Se as etapas de reposição de plasma não foram necessárias/executadas, registre o horário da remoção da tampa como hora de início do processamento na planilha de PBMC.

- 14.4.2. Se um tubo estiver muito coagulado ou muito hemolizado, consulte a Seção 6.3.

Observação: O agrupamento de camadas leucoplaquetárias é permitido de acordo com as diretrizes contidas no [Anexo D](#): Agrupamento de camadas leucoplaquetárias para isolamento PBMC em meio de gradiente de densidade. Para agrupar camadas leucoplaquetárias, substitua as etapas 14.4.3 e 14.4.4 pelas instruções dadas no [Anexo D](#).

- 14.4.3. Etiquete cada tubo cônico de centrifuga com o PTID e anticoagulante.

| Tamanho de tubo cônico de centrifuga (mL) | Volume aproximado de sangue (mL) |
|---|----------------------------------|
| 50 | 12 a 22 |
| 15 | 4 a 5 |

- 14.4.4. Transfira o sangue para um tubo cônico de centrifuga estéril, etiquetado, de 15 ou 50 mL, e adicione volume suficiente de WDR para diluir o sangue de acordo com as instruções contidas na embalagem do meio de gradiente de densidade (a proporção máxima de sangue para diluente deve ser de 2:1).

14.5. Para separação de células por gradiente de densidade:

Observação: Use o método de overlay (Seção 14.5.1) ou o método de underlay (Seção 14.5.2), mas não ambos.

- 14.5.1. Método de overlay:

- 14.5.1.1. Prepare um tubo de centrifuga cônico estéril etiquetado para cada tubo contendo sangue diluído.

- 14.5.1.2. Adicione o volume apropriado de meio de gradiente de densidade aos tubos de centrífuga cônicos estéreis vazios.
Observação: O volume do meio de gradiente de densidade dependerá da proporção do meio de gradiente de densidade para sangue diluído recomendada pelo fabricante.
- 14.5.1.3. Pipete de forma cuidadosa e lenta o sangue diluído sobre o meio de gradiente de densidade.
Sugestão: Deixe a mistura de sangue diluído com WDR fluir suavemente pelo lado do tubo e se juntar sobre a superfície do meio de gradiente de densidade sem romper o plano da superfície.
- 14.5.1.4. Tampe os tubos cuidadosamente. Avance para a Seção 14.6.
- 14.5.2. Método de underlay:
- 14.5.2.1. Misture de forma suave e total para reduzir aglutinações das células durante a separação.
Opcional: Tanto para sangue total quanto para sangue-WDR, adicione outro volume de WDR igual ao volume de sangue total.
- 14.5.2.2. Com base no volume de sangue diluído em WDR, determine o volume do meio de gradiente de densidade para cada tubo.
Observação: O volume do meio de gradiente de densidade dependerá da proporção do meio de gradiente de densidade para sangue diluído recomendada pelo fabricante.
- 14.5.2.3. Pipete de forma cuidadosa e lenta o meio de gradiente de densidade SOB o sangue-WDR.
- 14.5.2.4. Tampe os tubos cuidadosamente. Avance para a Seção 14.6.
- 14.6. Centrifugação de densidade e coleta de linfócitos:
- 14.6.1. Posicione os tubos verticalmente, coloque-os em um rack e, com cuidado, transfira-os para a centrífuga.
- 14.6.2. Centrifugue a 400 x g por 30 minutos entre 15 e 25 °C (ou até 30 °C, dependendo das condições climáticas) com o freio desligado (OFF)/configurado para zero, ou conforme descrito nas instruções da embalagem que acompanha o meio de gradiente.
Observação: Se o freio estiver ligado, as camadas serão afetadas. O freio da centrífuga precisa ser DESLIGADO para que a separação seja limpa e para maximizar a captação de PBMCs.
- 14.6.3. Enquanto os tubos CSTFB estiverem girando, descarte todos os tubos de coleta esvaziados seguindo as práticas de laboratório, limpe a superfície do BSC e organize para as próximas etapas.
- 14.6.4. Coloque etiqueta (com o PTID/anticoagulante) com o mesmo número e tamanho de tubos de centrífuga cônicos novos e estéreis que os usados na etapa de separação por centrifugação. Use esses novos tubos para as etapas de coleta e lavagem seguintes.
- 14.6.5. Usando uma pipeta estéril, adicione WDR a cada tubo de “lavagem” cônico estéril e pré-etiquetado da centrífuga:
- | Tamanho de tubo cônico de centrífuga (mL) | Volume de WDR pré-cheio (mL) |
|---|------------------------------|
| 50 | 25 |
| 15 | 5 |
- 14.6.6. Quando a centrífuga parar completamente, remova cuidadosamente cada tubo cônico da centrífuga para não afetar as camadas. Use um rack para apoiar os tubos e transfira cuidadosamente para o BSC.
- 14.6.7. Se a camada de células não for visível, confirme se a centrífuga está operando corretamente. Corrija qualquer problema encontrado. Realize a centrifugação do tubo novamente. Documente o problema e qualquer ação tomada de acordo com os requisitos da rede e do laboratório.
- 14.6.8. Documente hemólise ou pequenos coágulos visíveis na interface celular.
Observação: Verifique a presença de hemólises, ou coágulos, após a centrifugação. Classifique as hemólises de +1 e +4, com base na descrição dada no glossário. Registre suas observações.
- 14.6.9. Usando uma pipeta nova e estéril (pipeta para transferência ou sorológica) para cada PTID, remova reduzindo a fração amarelada de plasma-WDR até 1 a 2 cm da faixa branca turva de PBMC localizada na interface entre a fração plasma-WDR (amarelada) e a solução de separação de meio transparente.

Tenha cuidado para não afetar a camada de células durante esse processo. Descarte a fração de plasma-WDR de acordo com a política do laboratório.

Observação: Alternativamente, a faixa branca turva de PBMC pode ser removida inserindo cuidadosamente a pipeta através da camada superior de plasma-WDR.

- 14.6.10. Usando uma pipeta sorológica ou de transferência estéril, colete todas as células na interface branca turva. Cuidado para não aspirar quantidade maior da solução de separação de meio do que o necessário.
- 14.6.11. Transfira as células coletadas do tubo cônico de centrifuga para uma tubo cônico de centrifuga estéril, pré-etiquetado único correspondente. Os tubos podem ser pré-cheios com WDR para ganhar tempo (Seção 14.6.5).
- 14.6.12. Tampe novamente o tubo cônico de centrifuga contendo o restante das hemácias/meio de separação e descarte o tubo como resíduo de risco biológico de acordo com a política do laboratório.
- 14.7. Garanta que todos os elementos-chave sejam registrados de acordo com os requisitos da rede e do laboratório. Avance para a Seção 15.

15. Lavagem, contagem, ressuspensão, concentração e congelamento de taxa controlada de um dia para o outro

15.1. Lavagem 1:

- 15.1.1. QS (aumente o volume da fração de PBMC) para aproximadamente 45 mL (para tubos cônicos de centrifuga de 50 mL) ou 10 mL (para tubos cônicos de centrifuga de 15 mL) adicionando WDR. Misture com cuidado.
- 15.1.2. Tampe novamente todos os tubos cônicos que agora contêm células coletadas diluídas em WDR.
- 15.1.3. Centrifugue as células diluídas de 200 a 400 x g por 10 minutos de 15 a 25 °C (ou até 30 °C, dependendo das condições climáticas) (freio baixo opcional).
- 15.1.4. Remova os tubos da centrífuga e verifique quanto a presença de pellets de células.
 - 15.1.4.1. Se não houver pellets de células visíveis, confirme se a centrífuga está operando corretamente. Corrija qualquer problema encontrado. Realize a centrifugação dos tubos novamente. Documente o problema e qualquer ação tomada de acordo com os requisitos da rede e do laboratório. Se o pellet de células ainda não estiver visível após a re-centrifugação do tubo, continue as etapas de processamento e documente os detalhes na planilha de processamento.
- 15.1.5. Remova e descarte o sobrenadante do WDR cuidadosamente, sem afetar o pellet de células, decantando-o rapidamente no recipiente de resíduos líquidos designado no BSC. Métodos alternativos, como remoção com pipeta sorológica ou por aspiração, podem ser usados para pellets de células soltos ou que contenham grandes quantidades de hemácias.

15.2. Lavagem 2:

- 15.2.1. Ressuspenda cada pellet em uma mistura de pouco volume de WDR, cuidadosamente, mas de forma completa, em uma suspensão homogênea de células.

| Tamanho do tubo (mL) | Volume de ressuspensão de WDR (mL) |
|----------------------|------------------------------------|
| 50 | ≤ 5 |
| 15 | ≤ 3 |

- 15.2.2. Combine as suspensões de pellet do mesmo PTID/anticoagulante. Este é o tubo de células coletadas.

| Tamanho do tubo (mL) | Número de suspensões de pellets a combinar | Volume total (mL) |
|----------------------|--|-------------------|
| 50 | ≤ 4 | ≤ 20 |
| 15 | ≤ 2 | ≤ 6 |

- 15.2.3. Utilize um pequeno volume de WDR para enxaguar os tubos dos quais os pellets foram transferidos. Colete o enxágue de WDR nos tubos de células coletadas.

15.2.4. Adicione WDR à fração de PBMC para a QS e misture suavemente.

| Tamanho do tubo (mL) | Volume de QS (mL) |
|----------------------|-------------------|
| 50 | ≤ 45 |
| 15 | ≤ 10 |

15.2.5. Tampe novamente os tubos e coloque-os na centrífuga.

15.2.6. Centrifugue as células diluídas de 200 a 400 x g por 10 minutos de 15 a 25 °C (ou até 30 °C, dependendo das condições climáticas) (freio baixo opcional).

15.2.7. Remova os tubos da centrífuga e verifique quanto a presença de pellets de células.

Observação: Se não houver pellets de células visíveis, confirme se a centrífuga está operando corretamente. Corrija qualquer problema e centrifugue o tubo novamente. Documente o problema e qualquer ação tomada de acordo com os requisitos da rede e do laboratório. Se o pellet de células ainda não estiver visível após a re-centrifugação do tubo, continue as etapas de processamento e documente os detalhes na planilha de processamento.

15.2.8. Remova e descarte o sobrenadante do WDR cuidadosamente, sem afetar o pellet de células, decantando-o rapidamente no recipiente de resíduos líquidos designado no BSC. Métodos alternativos, como remoção com pipeta sorológica ou por aspiração, podem ser usados para pellets de células soltos ou que contenham grandes quantidades de hemácias.

15.3. Contagem de células PBMC

15.3.1. Determine e registre o volume (V) de ressuspensão de contagem de WDR com precisão de 0,1 mL. V é importante pois este é o volume no qual a contagem de células é baseado.

Observação: O volume de ressuspensão da contagem (V) é 20% do volume de sangue total utilizável medido, arredondado para o mL inteiro mais próximo (registrado X.0) em quase todos os casos.

Exemplo: Volume de sangue total utilizável medido registrado como 78,6 mL. O volume de ressuspensão da contagem seria de 16,0 mL ($78,6 \times 20\% = 15,72$. 15,72 arredondado para o número inteiro mais próximo 16,0 mL)

Exemplos de cenários onde V pode ser modificado:

- O V calculado excede ligeiramente a capacidade do tubo cônico. UWBV medido e registrado como 255,2 mL. 20% arredondado para o número inteiro mais próximo 51,0mL. Neste cenário, V pode ser reduzido para 45,0 mL para permitir uma mistura segura e subsequente centrifugação em um tubo cônico de 50 mL.
- Os resultados da amostra do participante mostram faixas de células muito fracas e subsequentes pellets de células significativamente pequenas. Nesse cenário, o V pode ser reduzido para evitar contagens de células fora da variação.

15.3.2. Se houver mais de um pellet no mesmo PTID/anticoagulante, use uma pequena quantidade de WDR para suavemente ressuspender e combinar dos dois pellets em um só tubo. Utilizando o volume de ressuspensão remanescente, enxágue os tubos com os quais as células foram transferidas. Adicione o enxágue ao tubo contendo a suspensão de células.

15.3.3. Misture suavemente as células, mas de modo completo, imediatamente antes de retirar amostras para a contagem de células.

15.3.4. Transfira um volume pequeno de ressuspensão para um tubo pequeno para a contagem. Siga as orientações do instrumento ou do POP de contagem para volumes apropriados.

Observação: Caso sejam necessárias contagens repetidas, minimize o volume de amostra necessário.

15.3.5. Siga o POP para o método de contagem de células aprovado no laboratório de processamento para determinar a concentração de células x 10^6 por mL.

Observação: Células a $10^3/\mu\text{L} = \text{células a } 10^6/\text{mL}$.

Observação: Contagens automáticas podem ser feitas apenas uma vez. Contagens manuais devem realizar a contagem de, pelo menos, quatro quadrados grandes (1 mm^2).

15.3.6. Calcule o número total de células utilizando a seguinte fórmula:

$$T = C \times V$$

T = Número total de células

C = Concentração (10^6 /mL) determinada no método de contagem

V = Volume de ressuspensão de contagem de WDR em mL

15.3.7. Calcule a produção de células em células/mL de sangue total utilizável usando a fórmula abaixo.

$$\text{Produção de células (10}^6 \text{ células/mL)} = T / \text{Volume de sangue total utilizável}$$

Observação: Calcule a produção de células para fins de qualidade. Consulte a Seção 16 Controle de qualidade para as variações de produção de células esperadas e dicas de resolução de problemas.

15.4. Cálculo do volume de ressuspensão final

15.4.1. Calcule o volume da ressuspensão de congelamento reduzido de CPS requerido realizando as etapas a seguir para a concentração de células alvo final.

Observação: A concentração de células alvo final varia por rede e por protocolo. Consulte o protocolo ou SPLI/LPC/LM específico do protocolo para obter informações sobre a concentração de células alvo final.

15.4.2. Calcule o volume da ressuspensão de congelamento reduzido de CPS (V1) requerido utilizando a concentração de células alvo final.

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

T = Número total de células

N1 = Concentração de células alvo final

V2 = Volume total de alíquota em mL

Arredonde V1 para baixo ao número inteiro mais próximo (1,0) mL para determinar V_f .

15.4.3. Calcule o número real de células por tubo (N2) usando o volume real de CPS de congelamento reduzido (V_f) determinado no cálculo anterior.

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

N2 = Número real de células por tubo

T = Número total de células

V2 = Volume final da alíquota em mL (1,0 mL, a menos que indicado de outra forma na documentação específica do protocolo).

15.5. Etiquetagem

15.5.1. Realize a impressão, o controle de qualidade e a etiquetagem dos tubos criogênicos ANTES da centrifugação final.

Observação: É importante minimizar o tempo que as células permanecem em um pellet.

15.5.2. Gere etiquetas de criotubos usando o LDMS.

15.5.2.1. Siga a prática de laboratório da rede para preencher os dados inseridos.

15.5.2.2. Confira cada etiqueta de tipo de tubo criogênico derivado quanto a erros de registro de dados comparando à requisição do laboratório e a planilha de processamento ANTES de etiquetar o tubo criogênico.

15.5.2.3. Inspeção visualmente o código de barras da etiqueta e da área de impressão para verificar o alinhamento e a qualidade da impressão.

15.5.2.4. Corrija quaisquer erros de entrada de dados no LDMS e reimprima as etiquetas conforme necessário.

15.5.3. Aplique as etiquetas nos criotubos de modo que o conteúdo do tubo fique visível.

15.5.4. Digitalize os criotubos vazios e etiquetados em ordem sequencial GSID no módulo de armazenamento LDMS para garantir que o código de barras seja digitalizável; a verificação da capacidade de digitalização e a atribuição de locais de armazenamento são combinadas nesta etapa.

Observação: É altamente recomendado o uso de racks Nunc para permitir a abertura/fechamento de tubos com uma mão. As tampas dos criotubos não podem ser colocadas em nenhuma superfície.

15.6. Centrifugação final

Observação: Se as células forem congeladas como pellets de PBMC não viáveis (PEL) e como células viáveis, remova o volume de PBMCs necessário para criar pellets de células não viáveis antes da etapa final de centrifugação e conclua o processamento dos pellets de células não viáveis e siga as instruções específicas do protocolo para pellets de PBMC não viáveis.

- 15.6.1. QS (aumente o volume da suspensão de células) para 45 mL com WDR e coloque o(s) tubo(s) cônico(s) contendo as células coletadas diluídas na centrífuga.
- 15.6.2. Centrifugue as células diluídas de 200 a 400 x g por 10 minutos de 15 a 25 °C (ou até 30 °C, dependendo das condições climáticas) (freio opcional).
- 15.6.3. Verifique se todos os tubos criogênicos estão etiquetados e facilmente acessíveis.
- 15.6.4. Selecione a unidade de congelamento de taxa controlada: StrataCooler®, Mr. Frosty™, CoolCell®. Coloque as etiquetas nas unidades de congelamento adequadamente para permitir que a equipe do laboratório determine o conteúdo. Certifique-se de que a unidade esteja na temperatura correta para uso no momento do envase e facilmente acessível antes da remoção dos pellets de células finais da centrífuga. Consulte a Seção 7.5 para obter informações sobre armazenamento e manutenção.

15.7. Separando alíquotas para criopreservação

Observação: As etapas a seguir podem ser realizadas rapidamente para preservar a integridade das células.

- 15.7.1. Remova e descarte o sobrenadante do WDR cuidadosamente, sem afetar o pellet de células, decantando-o rapidamente no recipiente de resíduos líquidos designado no BSC. Métodos alternativos, como remoção com pipeta sorológica ou por aspiração, podem ser usados para agregados soltos ou que contenham grandes quantidades de hemácias.
- 15.7.2. Realize a ressuspensão do(s) pellet(s) utilizando o volume de CPS frio (Vf) determinado na Seção 15.4.
Observação: O pré-resfriamento dos tubos e/ou o trabalho com gelo molhado são permitidos.
Observação para HVTN: O pré-resfriamento de criotubos e o trabalho em gelo molhado não são preferíveis e devem ser aprovados pelo Centro de Laboratório da HVTN antes do uso com amostras da rede HVTN.

15.7.2.1. Com cuidado, ressuspensa o pellet de células agitando, sacudindo ou pipetando antes de adicionar o CPS.

15.7.2.2. A HVTN recomenda ressuspender o pellet com o mesmo volume medido/monitorado de CPS usado nas etapas anteriores para ressuspensão do pellet. Lembre-se de subtrair esse volume do volume final total de CPS a ser adicionado se o volume final total de ressuspensão de CPS for maior que o volume usado para ressuspender o pellet.

15.7.2.3. Com cuidado, mexendo e girando, adicione o CPS às células ressuspensas.

15.7.3. Trabalhe de forma rápida após a adição do CPS. Não deixe as células repousarem em solução de congelamento por mais de 10 minutos antes de colocá-las no freezer.

15.7.4. Misture a suspensão suavemente, mas rapidamente, com uma pipeta sorológica antes de fazer alíquotas. Mantenha a suspensão durante todo o processo de envase.

15.7.4.1. Alíquota de 1,0 mL por criotubo, a menos que seja determinado de outra forma pelo SPLI/LPC/LM específico do protocolo.

Observação: Distribua uniformemente qualquer excesso de volume entre todos os criotubos para aquele PTID.

15.8. Congelamento controlado de um dia para o outro

- 15.8.1. Após o processamento e a contagem, conclua as etapas necessárias para congelar as células imediatamente.

- 15.8.2. Posicione a unidade de congelamento de taxa controlada selecionada para transferências: Agilent Technologies StrataCooler®, Nalgene® Mr. Frosty™, Corning® CoolCell®. Consulte a Seção 7.5 para obter informações sobre armazenamento e manutenção.
- 15.8.3. Transfira imediatamente todos os criotubos em ordem sequencial de identificação de amostras global para a unidade de congelamento de taxa controlada.
Para todos os CRFUs, Nalgene® Mr. Frosty™, Corning® CoolCell® e Agilent Technologies StrataCooler®, feche o recipiente e coloque-o em um freezer a -80°C (-65 a -95°C para ACTG, -70 a -95°C para HVTN e HPTN), em um local que não seja afetado pelo acesso repetido ao freezer (ou seja, longe da parte frontal ou superior do freezer, perto da porta/tampa de abertura). Não empilhe. É recomendado que todos os CRFUs permaneçam no freezer durante a noite.
Para CryoMed® ou outro freezer mecânico de taxa controlada, inicie o programa de resfriamento conforme o POP local apropriado. (Observação para HVTN: Freezers de taxa controlada não são permitidos para amostras da HVTN).
- 15.8.4. Registre a data/hora de congelamento imediatamente na planilha de PBMC. Insira a data/hora de congelamento registrada na planilha no LDMS.

15.9. Documente todos os elementos-chave de acordo com os requisitos de rede e do laboratório.

16. Controle de qualidade

16.1. Produção de células

É importante estar ciente da recuperação esperada para a população de participantes para a qual o processamento está sendo realizado. A produção de células pode servir como marcador de controle de qualidade interno para cada ciclo. Produções fora das variações esperadas podem indicar erros de procedimento, deterioração de reagentes, erro de contagem de células ou erro de cálculos.

Observação: As recomendações oferecidas abaixo são para fornecer diretrizes para ajudar a identificar erros técnicos graves antes da criopreservação. Esses valores podem variar dependendo do anticoagulante utilizado.

16.1.1. Produções de células esperadas para populações de adultos:

| População | Faixa de produção de células mononucleares (células/mL) |
|-----------|---|
| Adulto | (0,8 a 3,2) x 10 ⁶ |

16.1.2. Produções de células inesperadas

16.1.2.1. Se as produções de células estiverem fora da faixa esperada, reveja os esquemas de diluição, os cálculos, as técnicas de processamento (especialmente a mistura adequada de suspensões de contagem de células) e a história de PTID, se estiver disponível, para encontrar possíveis causas.

16.1.2.2. Produções de células de pacientes que vivem com HIV podem ser menores do que aquelas mostradas nas tabelas acima.

16.1.2.3. Se houver suspeita de erros de diluição ou de contagem, faça uma diluição nova e recontagem.

16.1.3. Registre todos os resultados e qualquer problema que ocorra durante o processo e as ações tomadas de acordo com os requisitos da rede e do laboratório. Consulte a Seção 5 para obter detalhes.

Observação para HVTN e HPTN: Registre quaisquer problemas e ações na Planilha de processamento de PBMC específica do protocolo da HVTN, entradas para alíquotas no LDMS e na seção de comentários de produção de células do Programa Atlas HVTN PBMC, se apropriado. Entre em contato com o Centro de Laboratório da HVTN caso tenha alguma dúvida.

16.2. Viabilidade celular

16.2.1. A viabilidade de PBMC isoladas frescas deve ser de > 95%.

16.2.2. Se a viabilidade de PBMC frescas for < 95%, reveja os resultados com o supervisor e documente de acordo com os requisitos da rede e do laboratório.

Observação: Se as amostras tiverem sido preparadas para o Programa de Testagem Proficiente para Criopreservação de PBMC, uma contagem de células viáveis é necessária.

17. Armazenamento de PBMC (temporário ou no local)

17.1. Realize a manutenção da cadeia de frio durante todas as etapas de transferência para evitar danos às células.

Observação para HVTN: Envie em gelo seco para o repositório central de amostras dentro de 1 semana após a coleta, a menos que seja determinado de outra forma pelo SPLI específico do protocolo da HVTN (a frequência de envio é baseada na região e depende dos requisitos do protocolo). Continuar para 17.2

Observação para HPTN: Siga as instruções fornecidas no Manual de Laboratório específico do protocolo

Observação para ACTG: Envie em gelo seco em até 4 semanas da data do congelamento, a menos que indicado de outra forma no LPC. Continuar para 17.2

17.2. Transfira as PBMCs para armazenamento temporário em um freezer a -80°C .

17.2.1. Transfira os criotubos do sistema de congelamento de taxa controlada para o local de armazenamento designado a -65 a -95°C para ACTG, -70 a -95°C para HVTN e HPTN.

17.2.2. Transfira os criotubos após um mínimo de 4 horas para Nalgene® Mr. Frosty™ e Corning® CoolCell® e de um dia para o outro para StrataCooler® (o armazenamento de um dia para o outro para todos os CRFUs é recomendado como prática padrão para reduzir o risco às amostras). Para CryoMed®, transfira os tubos criogênicos para o freezer a -80°C após o término do programa.

Observação: Requerido para HVTN e HPTN, recomendado para ACTG: O uso de uma bandeja de transferência de gelo seco é permitido apenas para unidades de congelamento de taxa controlada; refrigeradores altos pré-resfriados são necessários para caixas de armazenamento/congelamento de PBMC. Consulte as Diretrizes da cadeia de refrigeração entre redes (Seção 7, Procedimentos de transferência de amostras) para obter detalhes adicionais. Certifique-se de que a caixa do freezer de criotubos e a tampa estão completamente cobertas em todas as suas laterais por gelo seco. Trabalhe de forma rápida e eficiente para minimizar a exposição do tubo criogênico à temperatura ambiente.

Observação: Não armazene em nitrogênio líquido (LN_2). Armazene entre -65 e -95°C para ACTG, entre -70 e -95°C para HVTN e HPTN até o envio.

Observação: Pré-resfrie o recipiente de gelo seco e use um refrigerador pré-resfriado de laterais altas durante as etapas de controle de qualidade e embalagem. Certifique-se de que o transportador de gelo seco esteja completamente cheio de gelo seco antes da vedação.

17.2.3. Entre em contato com o pessoal do centro de laboratório da rede se as amostras não forem chegar ao destino final dentro do tempo de armazenamento temporário estabelecido pela rede. O centro de laboratório da rede determinará se a transferência para transportador de armazenamento em LN_2 e de envio em LN_2 é apropriada.

17.3. Transfira as PBMCs para um dewar de LN_2 ou freezer mecânico a -150°C .

Observação para HVTN: Armazenamento em LN_2 ou uso de dewars de LN_2 ou freezers mecânicos a -150°C não são permitidos para armazenamento de PBMC da HVTN, com raras exceções. Os laboratórios não devem transferir amostras de freezers de -80°C , a menos que sejam orientados de acordo com o LC da HVTN.

17.3.1. Dentro de 72 horas após o congelamento dos criotubos no sistema de resfriamento de taxa controlada, transfira-os em gelo seco para o local de armazenamento designado no dewar de LN_2 ou no sistema de armazenamento a -150°C .

17.3.2. Amostras de PBMC congeladas são viáveis em fase de vapor de LN_2 indefinidamente. NÃO transfira amostras do LN_2 ou -150°C de volta a freezers de -80°C , exceto se orientado pela rede ou pela equipe do protocolo.

17.3.3. Uma vez que as amostras foram armazenadas em LN_2 , todas as transferências ou remessas devem ser mantidas em LN_2 ($\leq -140^{\circ}\text{C}$) e enviados em um transportador a seco de LN_2 aprovado pela IATA.

18. Preenchimento de documentos de processamento

18.1. Certifique-se de que todas as informações adequadas sejam documentadas, seguindo as boas práticas de documentação, de acordo com os requisitos da rede e do laboratório e de que todos os cálculos estejam corretos. Consulte a Seção 5 para obter detalhes.

18.2. Guarde as requisições laboratoriais, planilhas de processamento PBMC e qualquer outro documento de rastreio de acordo com a política do laboratório.

19. Definições e abreviações

| Termo | Definição |
|--|---|
| ACTG | Avançando a terapia clínica globalmente |
| Temperatura da centrifuga | 15 a 25 °C ou até 30 °C, dependendo das condições climáticas |
| Coagulado, grosseiramente | Mais de ¾ de toda a massa sanguínea está coagulada. |
| Coágulo, pequeno | Pequenos coágulos observados após o processamento de PBMC no tubo de sangue total, mas observado no tubo de separação com barreira porosa após a centrifugação. |
| CPS | Solução de criopreservação |
| CSTFB | Tubo de separação de células com barreira porosa |
| DGM | Meio de gradiente de densidade |
| FBS | Soro fetal bovino |
| HBSS | Solução salina balanceada de Hank |
| Hemólise | Uma coloração de rosada a vermelha no soro ou plasma devido à lise das hemácias. Classifique a hemólise de acordo com a seguinte escala: 1+ Cor rosada-vermelha pálida em soro ou plasma; pode-se ler claramente texto de jornal colocado atrás do tubo de sangue 2+ Cor rosada-vermelha em soro ou plasma; texto de jornal é legível, mas não tanto 3+ Cor rosada-vermelha escura em soro ou plasma; texto de jornal aparece obscurecido. 4+ Cor vermelho mogno em soro ou plasma; não se pode ler texto de jornal. <u>Observação:</u> As hemácias lisadas dão ao soro ou plasma uma coloração, mas qualidade límpida onde a contaminação de hemácias dá ao soro ou plasma uma qualidade turva. |
| HI-FBS | Soro fetal bovino inativado por calor |
| HPTN | Rede de ensaios de prevenção do HIV |
| HVTN | Rede de estudos de vacina contra o HIV |
| Ictérico | Plasma com cor verde ou alaranjada sugerindo a presença de bilirrubina aumentada. |
| LDMS | Sistema de Gestão de Dados Laboratoriais |
| LM | Manual de Laboratório (HPTN) |
| LPC | Gráfico de Processamento de Laboratório (ACTG) |
| PBMC | Células sanguíneas periféricas mononucleares |
| PBS | Fosfato tamponado salino |
| IP | Investigador(a) principal |
| PTID/PID | Número de identificação do participante |
| QS | Quantidade Suficiente — adicionar quantidade suficiente de líquido para completar volume especificado. |
| Temperatura Ambiente (RT) | 15 a 25 °C ou até 30 °C, dependendo das condições climáticas |
| SPLI | Instruções do laboratório de processamento de amostras |
| Volume de sangue total utilizável (UWBV) | O volume medido de sangue total que é realmente processado (o volume de sangue total utilizável pode não ser igual à capacidade do tubo) |
| Armazenamento em fase de vapor | Armazenamento em nitrogênio líquido (LN ₂) em fase de vapor é o espaço no tanque de armazenamento que está acima do LN ₂ líquido da parte inferior do tanque. |
| WDR | Reagente diluente de lavagem (HBSS, PBS) |

20. Referências

- 20.1. Bull M., Lee B., Stucky J., Chiu Y.L., Rubin A., Horton H., and McElrath MJ. Defining blood processing parameters for optimal detection of cryopreserved antigen-specific responses for HIV vaccine trials. *J. Immunol. Methods* 322:57-69 (2007).
- 20.2. CHAVI SOP for PBMC Isolation and Cryopreservation, CHAVI-A0001, v5, Nov 3 2008.
- 20.3. Cox J.H., DeSouza M., Ratto-Kim S., Ferrari G., Weinhold K.J., and Birx B.L. Cellular Immune assays for evaluation of Vaccine efficacy in developing countries. *Manual of Clinical laboratory Immunology*. Rose N.R., Hamilton R.G., Detrick B. Eds. (6th ed.) p.301-315 (2002).
- 20.4. Islam B., Lindbert A., and Christensen B. Peripheral blood cells preparation influences the level of expression of leukocyte cell surface markers as assessed with quantitative multicolor flow cytometry. *Cytometry* 22:128-134 (1995).
- 20.5. Immunovirology Research Network (IVRN) Laboratory Manual: Separation and storage of serum, plasma and PBMCs. IVRN. Dec 12 2007.
- 20.6. 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., and Casimiro B.R. Enhanced rates and magnitude of immune responses detected against an HIV vaccine: effect of using an optimized process for isolating PBMC. *AIDS Res Hum Retroviruses* 23:86-92 (2007).
- 20.7. 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. Lymphocyte subsets in healthy children from birth through 18 years of age: the Pediatric AIDS Clinical Trials Group P1009 study. *J Allergy Clin Immunol.* 112(5):973-80 (2003).
- 20.8. Sigma-Aldrich Accuspin™ System-Histopaque®-1077, procedure number A6929/A7054/A0561, Dated 2003-09.
- 20.9. Weinberg A., Betensky R., Zhang L., and Ray G. Effect of shipment, storage, anticoagulant, and cell separation on lymphocyte proliferation assays for human immunodeficiency virus-infected patients. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 5:804-807 (1998).
- 20.10. Weinberg A, Song LY, Wilkening CL, Fenton T, Hural J, Louzao R, Ferrari G, Etter PE, Berrong M, Canniff JD, Carter D, Defawe OD, Garcia A, Garrelts TL, Gelman R, Lambrecht LK, Pahwa S, Pilakka-Kanthikeel S, Shugarts DL, and Tustin NB. Optimization of storage and shipment of cryopreserved peripheral blood mononuclear cells from HIV-infected and uninfected individuals for ELISPOT assays. *J Immunol Methods.* 363(1):42-50 (2010).

21. Anexos

- 21.1. Anexo A: Planilha de Processamento PBMC exigida pela HVTN
Observação: O Anexo A também é fornecido em formato editável para download no site público da HANC em <https://www.hanc.info/resources/sops-guidelines-resources/laboratory/cross-network-pbmc-processing-sop.html>
- 21.2. Anexo B: Exemplo de registro de alterações de isopropanol Nalgene® Mr. Frosty
- 21.3. Anexo C: Resolução de problemas: Recuperação de PBMC na ausência de uma banda de PBMC definida após centrifugação por gradiente de densidade
- 21.4. Anexo D: Agrupamento de camadas leucoplaquetárias para isolamento PBMC em meio de gradiente de densidade
- 21.5. Anexo E: Guia rápido para POP de PBMC entre redes - CSTFB
- 21.6. Anexo F: Guia rápido para POP de PBMC entre redes - Método de overlay manual
- 21.7. Anexo G: Exemplos de reagentes
- 21.8. Anexo H: Histórico de Revisões

Anexo A: Planilha de processamento de PBMC

Observação: Os campos desta planilha devem ser preenchidos à mão, com caneta.

| Laboratório de processamento de amostras: | | Protocolo: | | |
|--|-----------------------------------|----------------------------|-----|---------------------------------|
| ID do participante (PTID/ PID): | Número da visita: | Tipo de visita: | | |
| Data da coleta: | Hora da coleta: | | | |
| Data de início do processamento: | Hora de início de processamento: | Processado por (iniciais): | | |
| Reagentes | Fabricante | Número do lote | | Data de validade |
| DMSO | | | | |
| FBS | | | | |
| WDR: HBSS ou PBS (circule uma opção) | | | | |
| Tubo de separação de células (barreira porosa) | | | | |
| Meio de gradiente de densidade | | | | |
| | Volume em mL (registrar como X.Y) | | | Data de validade |
| CPS | CPS | DMSO | FBS | 1 dia útil (< 18hrs) |
| Dados a serem capturados durante o processamento | | | | Amostra |
| Tipo de tubo de amostra (circule um ou registre "outro" tipo de tubo) | | | | ACD / HEP / EDT Outro: _____ |
| Condição sanguínea (circule uma ou mais; adicione comentários no verso, conforme necessário) | | | | SAT/ HEM / CLT |
| Volume de sangue total utilizável medido (com precisão de 0,1 mL) | | | | mL |
| Indique o método de processamento (circule uma opção) | | | | CSTFB / overlay / underlay |
| Método de contagem: Nome do instrumento específico ou contagem manual (registrar no campo à direita) | | | | |
| Volume de ressuspensão contínua de HBSS (ou outro WDR) (V) (registrado como X.Y) | | | | mL |
| Concentração média de contagem de células (C) | | | | x 10 ⁶ células/mL |
| Número total de células (T) = C x V | | | | x 10 ⁶ células |
| Calcule a produção de células/mL do sangue total (Verificação de QC)= (T/Volume de sangue total útil) | | | | x 10 ⁶ células/mL |
| Calcule o vol. de ressuspensão de CPS estimada (V1)=(T/15x10 ⁶ células/mL)(1 mL) | | | | mL |
| Calcule o volume de ressuspensão de CPS final (Vf), (V1 arredondado para BAIXO para o mais próximo (X.0) mL inteiro) | | | | mL |
| Calcule o número real de células por frasco N2 = (T/Vf) x V2; (V2=1 mL). | | | | x 10 ⁶ células/tubo |
| Impresso e conteúdo/código de barras da etiqueta de QC do LDMS (iniciais da(s) pessoa(s) que realiza o QC) | | | | |
| Data e hora do congelamento (ddMMMAaaa /HH:MM) (Explique na seção de comentários se não estiver dentro de 4 horas do tempo de início do processamento) | | | | |
| Número de tubos criogênicos congelados no momento Observação: Deve ser igual ao volume de ressuspensão de CPS final para alíquotas de 1 mL (Vf). | | | | |
| Conclua as entradas restantes no LDMS incluindo a contagem de células total e tempo de congelamento (iniciais) | | | | |

Anexo A: Planilha de processamento de PBMC Página 2 de 2

Observação: Os campos desta planilha devem ser preenchidos à mão, com caneta.

Laboratório de processamento de amostras:

PTID/PID:

| | |
|--|--|
| Transferência de tubos criogênicos para caixa de armazenamento em freezer | |
| A pessoa que transferiu os tubos criogênicos para locais da caixa de armazenamento atribuídos pelo LDMS | |
| Data(ddMMMAaaa)/hora em que os tubos criogênicos foram transferidos da unidade de congelamento de taxa controlada para a caixa de armazenamento. (A amostra deve ser mantida a -80 °C durante a transferência) | |
| Revisão inicial (primária) (iniciais/data) | |
| Revisão final (secundária) (iniciais/data) | |

| Contagens de Hemocitômetro | Contagem total | Células viáveis | Não viável |
|--|-----------------|------------------------------|-----------------|
| Quadrado Nº1 (células/mm ²) | | | |
| Quadrado Nº2 (células/mm ²) | | | |
| Quadrado Nº3 (células/mm ²) | | | |
| Quadrado Nº4 (células/mm ²) | | | |
| Média de contagem de células por quadrado (células/mm ²) | | | |
| Fator de diluição de PBMC (1:DF*) | | | |
| Fator de hemocitômetro para células/mL | 10 ⁴ | 10 ⁴ | 10 ⁴ |
| Concentração da contagem de células (C) = (Média de células/mm ²)(DF)(10 ⁴); converter em 10 ⁶ células/mL | Não aplicável | x 10 ⁶ células/mL | Não aplicável |
| % viabilidade = (Células viáveis 4 quadrados/células totais 4 quadrados) (100) | Não aplicável | | Não aplicável |

*Observação: Fator de diluição (DF) = (células das partes + fluido de diluição das partes)/ células das partes

| | |
|--|------------------------------|
| Contagem de células automatizada (10 ³ /μl=10 ⁶ /mL) | Contagem Nº 1 |
| Contagem de célula (C) como células x 10 ⁶ /mL | |
| Fator de diluição de PBMC (1:DF**) | |
| Concentração de células = (C)(DF) | x 10 ⁶ células/mL |
| % viabilidade (se aplicável) | |

**Observação: Diluições para contadores automatizados são extremamente raras. Se estiver realizando contagens diretas, insira 1 na caixa DF e preencha a coluna.

| |
|---|
| Comentários, desvios de protocolo e informações adicionais não registrados em nenhuma outra parte desta planilha: |
|---|

Anexo C: Resolução de problemas: Recuperação de PBMC na ausência de uma banda de PBMC definida após centrifugação por gradiente de densidade

C.1. Antecedentes: Se algo deu errado durante a centrifugação de gradiente de densidade do sangue, o meio de gradiente de densidade e a camada de plasma não vão se separar de forma limpa e a camada de PBMC poderá não ser vista. Não entre em pânico. As PBMC podem ser recuperadas parcialmente através de etapas adicionais.

C.2 Identifique o problema:

C.2.1 Remova os tubos da centrífuga e transfira-os para um rack.

C.2.2 Tente identificar por que não há uma camada clara de PBMC. Algumas possíveis causas estão listadas abaixo:

- O tubo sofreu queda ou batida.
- O freio ficou ligado.
- A velocidade da centrífuga estava alta demais. Verifique se a configuração de rpm estava correta para o procedimento utilizado (CSTFB ou separação de células manual por gradiente de densidade) consultando a tabela de RCF/rpm para o rotor. Algumas centrífugas requerem que os ajustes da centrífuga sejam feitos de acordo com o copo usado. Se os ajustes não estiverem corretos, então a centrífuga pode ter calculado a velocidade errado.
- A centrífuga parou devido à descontinuidade no fornecimento de energia elétrica.
- A barreira porosa foi deslocada. (Isso frequentemente ocorre devido à velocidade de centrifugação ser alta demais, mas ocasionalmente existe um tubo defeituoso no lote)
- A centrífuga estava desequilibrada.
- O doador possui contagens baixas de linfócitos, glóbulos brancos ou hematócritos.

C.3 Das causas acima, as primeiras cinco causas são as mais fáceis de corrigir. Se a causa for devido a uma centrífuga desequilibrada, determine por que a centrífuga não está equilibrada. Verifique o seguinte:

C.3.1 Verifique se os tubos estão equilibrados.

C.3.2 Verifique se os copos da centrífuga estão equilibrados.

C.3.3 Verifique se os braços e copos da centrífuga estão lubrificados corretamente

Observação: Sempre que houver dúvidas sobre uma centrífuga, utilize outra.

C.4 Assumindo que o problema tenha sido corrigido, recentrifugue as amostras como segue:

C.4.1 Reagentes:

- Meio de gradiente de densidade
- Tubos cônicos de centrífuga de 50 mL
- Pipetas

C.4.2 Método:

Observação: O meio de gradiente de densidade é tóxico para as células, portanto, trabalhe de forma eficiente

C.4.2.1 Adicione 15 mL de meio de gradiente de densidade a tubos estéreis de 50 mL (não CSTFB).

C.4.2.2 Permita que o meio de gradiente de densidade atinja a temperatura ambiente (15 a 25 °C ou até 30 °C, dependendo das condições climáticas) enquanto trabalha com a amostra.

- C.4.2.3 Para cada tubo misturado, etiquete tubos de 50 mL com o PTID do sujeito. Use uma pipeta para remover lentamente o conteúdo da amostra misturada da separação ou CSTFB. (Geralmente, a barreira do CSTFB estará deslocada.)
- C.4.2.4 Transfira até 30 mL da amostra misturada para o tubo contendo o meio de gradiente de densidade.
- 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 equilibrados.
- C.4.2.7 Centrifugue por 30 a 40 minutos a 400 x g com o freio desligado (OFF) em temperatura ambiente (15 a 25 °C ou até 30 °C, dependendo das condições climáticas).
- C.4.2.8 Uma camada de PBMC deverá agora estar visível. (Frequentemente, algumas células terão se perdido, então a camada pode ser fina).
- C.4.2.9 Transfira cuidadosamente a camada de PBMC para um tubo cônico de centrífuga de 50 mL etiquetado com o identificador PTID. Use um tubo novo para cada tubo de meio de gradiente de densidade.
- C.4.2.10 Tampe novamente o tubo de meio de gradiente de densidade.
- C.4.2.11 Volte à Seção 15 do protocolo principal.

Observação: Na Seção “Comentários e desvios de protocolo” da **Planilha de processamento de PBMC**, registre os detalhes do desvio do POP (ou seja, que etapas do “Anexo B” foram realizadas para recuperar a PBMC devido a ausência de uma faixa de PBMC definida após a centrifugação do gradiente de densidade). Além disso, observe quanto tempo levou a recentrifugação, de forma a fornecer uma estimativa de quanto tempo as células estiveram em meio de gradiente de densidade.

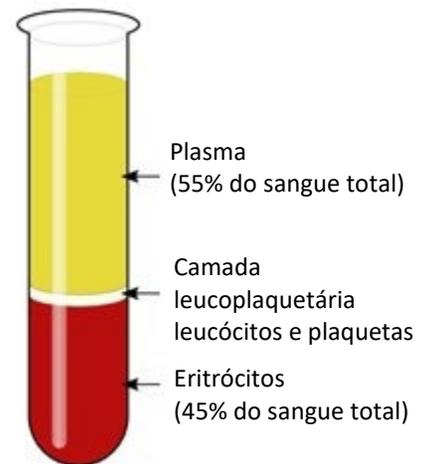
Anexo D: Agrupamento de camadas leucoplaquetárias para isolamento PBMC em meio de gradiente de densidade

Este procedimento pode ser utilizado ao isolar PBMCs de vários tubos de sangue da mesma combinação PTID-anticoagulante. Este procedimento permite que se consolidem as camadas leucoplaquetárias para reduzir o uso de reagentes e suprimentos, aumentar a recuperação e diminuir a contaminação.

A camada leucoplaquetária é a fração de sangue total anticoagulado que contém glóbulos brancos (WBCs) e plaquetas, e ocorre após a centrifugação na interface entre as camadas de plasma e de hemácias. A maioria das WBCs encontrada na camada leucoplaquetária com apenas uma pequena fração (< 1 milhão ao total) permanece no pacote de hemácias após a coleta da camada leucoplaquetária. A camada leucoplaquetária é coletada com uma pequena fração de plasma e hemácias (aproximadamente 1,5 mL) e então é diluída antes do overlay em um meio de gradiente para separação de linfócitos.

Procedimento:

- D1. Certifique-se de que as etapas das Seções 14.4.1 a 14.4.2 foram realizadas.
- D2. Centrifugue o sangue total de 200 a 400 x g por 10 minutos.
- D3. Colete o plasma (e guarde conforme necessário - consulte a Seção 14.3.4 a 14.3.7) de cada tubo de aproximadamente 5 mm da camada leucoplaquetária (que é bastante óbvia na maior parte dos casos, exceto se o paciente estiver gravemente neutropênico ou linfopênico).
- D4. Determine a capacidade e número de tubos cônicos de centrífuga que serão necessários para cada combinação PTID-anticoagulante. Não agrupe amostras de PTIDs/anticoagulantes diferentes. Em geral:
 - Camadas leucoplaquetárias de dois tubos de coleta de sangue de 10 mL podem ser combinadas em um tubo cônico de centrífuga de 15 mL.
 - Camadas leucoplaquetárias de tubos de coleta de sangue de até 10 mL podem ser combinadas em um tubo cônico de centrífuga de 50 mL.
- D5. Etiquete cada tubo cônico de centrífuga com o PTID.
- D6. Adicione WDR a cada tubo cônico de centrífuga estéril.



| Capacidade do tubo cônico de centrífuga (mL) | Volume WDR (mL) |
|--|-----------------|
| 15 | 3 |
| 50 | 10-15 |

- D7. Posicione o tubo de plasma depletado (que agora contém uma quantidade pequena de resíduo de plasma e células aglutinadas) a um ângulo aproximado de 30°.
- D8. Utilize uma pipeta de diâmetro largo, de 2,5 mL, descartável, de polipropileno para coletar a camada leucoplaquetária. Aspire a camada leucoplaquetária abaixando a parte de baixo do tubo. Retire lentamente o plasma seguido pela camada leucoplaquetária, que “escorregará” pela camada de hemácias (aproximadamente 1,5 mL de aspirado). Transfira a camada leucoplaquetária para o tubo contendo WDR, enxaguando a pipeta 2 a 3 vezes com a suspensão de WDR/células.
- D9. Colete e junte as camadas leucoplaquetárias dos tubos remanescentes para aquela combinação PTID- anticoagulante.
- D10. Adicione WDR à suspensão de WDR/células à QS de volume desejado para realizar a separação de células por densidade de gradiente. Misture cuidadosamente o total de camada leucoplaquetária de 3 a 4 vezes com uma pipeta.
- D11. prossiga com a separação de células por densidade de gradiente da etapa na Seção 14.5. Para 14.5, “sangue diluído” significa “camada leucoplaquetária diluída”.

Anexo E: Exemplos de reagentes e suprimentos

Observação: Todos os reagentes precisam ser adquiridos estéreis e o uso de técnica de assepsia é requerido.

| Reagente/suprimento | Exemplo(s) | Opcional/requerido |
|--|---|--|
| CSTFB seco | <ul style="list-style-type: none"> • Tubos de separação Accuspin™ • Tubos de separação Leucosep® | Opcional (Observação para HVTN: Requerido) |
| Tubos de separação de células pré-cheios de com barreira porosa (CSTFB). Meio de gradiente de densidade de 1,077 | <ul style="list-style-type: none"> • Sistema Accuspin™ com Histopaque®-1077 | Opcional (Observação para HVTN: Não permitido sem aprovação da rede) |
| Meio de gradiente de densidade de 1,077 | <ul style="list-style-type: none"> • Ficoll-Paque PLUS e PREMIUM • Lymphoprep™ • Meio de separação de linfócitos – LSM™ | Opcional |
| Dimetilsulfóxido (DMSO), para cultura de células | <ul style="list-style-type: none"> • Hybrimax, Sigma-Aldrich cat# D2650, testado para endotoxinas, testado para hibridoma • Ou produto equivalente | Requerido |
| Soro fetal bovino (FBS) | | <p>ACTG e HPTN: Consulte as informação sobre lotes atuais validados pelo IQA.</p> <p>HVTN (e certos protocolos entre redes com a HVTN): FBS aprovado pela HVTN é fornecido aos laboratórios pela rede como inativado por calor; fornecedor e lote de FBS aprovado pela HVTN não estão disponíveis para compra fora da cadeia de suprimento/processo da HVTN.</p> |
| Tubos criogênicos | <ul style="list-style-type: none"> • Nunc CryoTubes™, rosca interna, tubos e tampa de polipropileno (PP) #377267 • Criotubos Greiner, rosca interna, tampa de rosca natural, polipropileno (PP), fundo redondo, área de escrita, pé com design de estrela, estéril #122263 • Tubo criogênico Corning® de 2mL, de polipropileno, de rosca interna, independente, de fundo redondo #430488 | <p>Nunc preferido/rosca interna necessária para todas as redes.</p> <p>Observação para HVTN: Criotubos Nunc™ #377267 são necessários para protocolos de rede da HVTN. Quaisquer substituições devem ser aprovadas pela HVTN antes de serem compradas pelos laboratórios.</p> |
| Etiquetas criogênicas | <ul style="list-style-type: none"> • Cryo-Tags® e Cryo-Babies® Brady B461 ou B490 • Etiquetas de freezer Shamrock. | Opcional |
| Marcadores permanentes | <ul style="list-style-type: none"> • Marcadores permanentes Fisherband* #13-379 • Caneta/marcador permanente de laboratório Nalgene® #6310/#6311 | Opcional |

Anexo F: Guia rápido para POP de PBMC - CSTFB

O uso de uma **Planilha de processamento PBMC** e do LDMS é **requerido para todas as redes** (consulte a Seção 5 para obter detalhes). Antes de utilizar este guia rápido pela primeira vez, certifique-se de ler o POP de PBMC completo para obter observações e detalhes importantes, e para diretrizes específicas da rede.

| Etapas | Use o POP como referência. |
|---|-----------------------------------|
| 1. Prepare e esfrie o CPS. | 11.2 |
| 2. Prepare amostras de sangue total, reagentes e suprimentos. | 13.2 |
| 3. Se alíquotas de plasma forem requeridas por instrução do protocolo: a. Centrifugue o sangue total de 200 a 400 x g por 10 minutos. b. Marque o volume total de sangue no menisco e transfira o plasma para um tubo cônico de centrifuga de 15 ou 50 mL para continuar o processamento (800 a 1200 x g por 10 minutos, freio opcional) c. Adicione quantidade suficiente de WDR para trazer o sangue de volta ao seu volume original de sangue total, misture suavemente e continue o processamento de PBMC. | 13.3 |
| 4. Adicione 5 mL de WDR a cada CSTFB etiquetado e 25 mL de WDR a cada tubo de lavagem cônico de 50 mL correspondente etiquetado. (Observação: Pode ser executado anteriormente como parte da configuração [etapa 2]). 5. Transfira de 15 a 20 mL (12-22 permitido) de sangue para CSTFBs etiquetados. a. Monitore cuidadosamente os volumes medidos. O registro mediu o UWBV com precisão de 0,1 mL. 6. Adicione enxágue de tubo WDR e WDR final ao CSTFB até 30 mL (WDR + Sangue total). | 13.4 |
| 7. Centrifugue de 800 a 1000 x g por 15 minutos entre 15 e 30°C com o <u>freio desligado (OFF)/configurado para zero</u> . 8. Inspeção os tubos quanto a possíveis problemas. 9. Colete cada camada leucoplaquetária de CSTFB em um tubo de centrifuga cônico de 50 mL, etiquetado individualmente e correspondente, pré-cheio com 25 mL de WDR. | 13.5 |
| 10. Adicione WDR até QS para um volume total de 45 mL e misture suavemente. 11. Lavagem N° 1 — centrifugue de 200 a 400 x g por 10 minutos entre 15 e 30°C (freio opcional). 12. Verifique se há pellets de células! Documente observações inesperadas. 13. Remova com cuidado o sobrenadante sem afetar o pellet de células. | 15.1 |
| 14. Ressuspenda o pellet de células em pequena quantidade de WDR fazendo uma suspensão de células homogênea. 15. Combine até 4 suspensões de pellets em um tubo cônico de centrifuga de 50 mL. 16. Adicione enxágue de tubo WDR e WDR final de 45 mL ao tubo de células. 17. Lavagem N° 2 — centrifugue de 200 a 400 x g por 10 minutos entre 15 e 30°C (freio opcional). 18. Verifique se há pellets de células! Documente observações inesperadas. 19. Remova com cuidado o sobrenadante sem afetar o pellet de células. | 15.2 |
| 20. Calcule o volume de WDR de ressuspensão de contagem (V). 21. Combine pellets de células em um tubo usando volume de WDR de ressuspensão. Esse é o volume no qual a contagem de células é baseada. 22. Conte e calcule o número total de células. 23. Calcule a produção de células em células/mL de sangue total utilizável. | 15.3 |
| 24. Calcule o volume de ressuspensão de CPS final. Verifique os cálculos. | 15.4 |
| 25. Realize a impressão, etiquetagem e QC de tubos criogênicos ANTES da centrifugação final. | 15.5 |
| 26. Centrifugue de 200 a 400 x g por 10 minutos entre 15 e 30°C (freio opcional). | 15.6 |
| 27. Remova com cuidado o sobrenadante sem afetar o pellet de células. 28. Com cuidado, ressuspenda o pellet em CPS frio (V_f) enquanto gira o tubo para obter distribuição por igual. Separe cuidadosamente as alíquotas de CPS-células. | 15.7 |

| Etapas | Use o POP como referência. |
|--|-----------------------------------|
| 29. Imediatamente (≤ 10 minutos após a adição do CPS à amostra) transfira todos os criotubos para a unidade de congelamento de taxa controlada e coloque no freezer. | 15.8 |
| 30. Após o período de tempo apropriado, transfira os tubos criogênicos para o equipamento de armazenamento local e envie dentro do período de tempo determinado pela rede. | 17 |
| 31. Preencha e revise a Planilha de processamento de PBMC e entradas de dados conforme orientado pela rede. | 18.1 |

Anexo G: Guia rápido para POP de PBMC — Overlay Manual

O uso de uma **Planilha de processamento PBMC** e do LDMS é **requerido para todas as redes** (consulte a Seção 5 para obter detalhes). Antes de utilizar este guia rápido pela primeira vez, certifique-se de ler o POP de PBMC completo para obter observações e detalhes importantes, e para diretrizes específicas da rede.

| Etapas (Quantidades para volumes menores de amostras estão em <i>itálico</i> .) | Use o POP como referência. |
|---|-----------------------------------|
| 1. Prepare e esfrie o CPS. | 11.2 |
| 2. Prepare amostras de sangue total, reagentes e suprimentos. | 14.2 |
| 3. Se alíquotas de plasma forem requeridas por instrução do protocolo: a. Centrifugue o sangue total de 200 a 400 x g por 10 minutos. b. Marque o volume total de sangue no menisco e transfira o plasma para um tubo cônico de centrifuga de 15 ou 50 mL para continuar o processamento (800 a 1200 x g por 10 minutos, freio opcional). c. Adicione quantidade suficiente de WDR para trazer o sangue de volta ao seu volume original de sangue total, misture suavemente e continue o processamento de PBMC. | 14.3 |
| 4. Transfira o sangue total para um tubo cônico de centrifuga estéril, de 50 mL (15 mL) e dilua com WDR conforme necessário. 5. Com cuidado e lentamente, realize o overlay do sangue sobre o meio de gradiente de densidade. (O método de underlay é uma alternativa aprovada, com exceção dos protocolos da HVTN.) | 14.4 |
| 6. Centrifugue de 400 a 800 x g por 15-30 minutos com o <u>freio desligado (OFF)/configurado para zero</u> . 7. Verifique cada tubo cônico de centrifuga quanto a possíveis problemas. 8. Colete cada camada leucoplaquetária em um tubo cônico de centrifuga correspondente, de 50 mL (15 mL). | 14.5 |
| 9. Adicione WDR até QS para um volume total de 45 mL (10 mL) e misture cuidadosamente. 10. Lavagem N° 1 — centrifugue de 200 a 400 x g por 10 minutos entre 15 e 30°C (freio opcional). 11. Verifique se há pellets de células! 12. Remova com cuidado o sobrenadante sem afetar o pellet de células. | 15.1 |
| 13. Ressuspenda o pellet de células em pequena quantidade de WDR fazendo uma suspensão de células homogênea. 14. Combine até 4 suspensões de pellets em um tubo cônico de centrifuga de 50 mL (2 em tubo de 15 mL). 15. Adicione enxágue de tubo WDR e WDR final de 45 mL (10 mL) ao tubo de células. 16. Lavagem N° 2 — centrifugue de 200 a 400 x g por 10 minutos entre 15 e 30°C (freio opcional). 17. Verifique se há pellets de células! 18. Remova com cuidado o sobrenadante sem afetar o pellet de células. | 15.2 |
| 19. Calcule o volume de WDR de ressuspensão de contagem (V). 20. Combine pellets de células em um tubo usando volume de WDR de ressuspensão. Esse é o volume no qual a contagem de células é baseada. 21. Conte e calcule o número total de células. 22. Calcule a produção de células em células/mL de sangue total utilizável. | 15.3 |
| 23. Calcule o volume de ressuspensão de CPS final. Verifique os cálculos. | 15.4 |
| 24. Realize a impressão, etiquetagem e QC de tubos criogênicos ANTES da centrifugação final. | 15.5 |
| 25. Centrifugue de 200 a 400 x g por 10 minutos entre 15 e 30°C (freio opcional). | 15.6 |
| 26. Remova com cuidado o sobrenadante sem afetar o pellet de células. 27. Com cuidado, ressuspenda o pellet em CPS frio (V_f) enquanto gira o tubo para obter distribuição por igual. Recomenda-se trabalhar em gelo molhado. | 15.7 |
| 28. Separe cuidadosamente as alíquotas de CPS-células. | |

| | Use o POP como referência. |
|--|----------------------------|
| Etapas (Quantidades para volumes menores de amostras estão em <i>italico</i> .) | |
| 29. Imediatamente (≤ 10 minutos após a adição do CPS à amostra) transfira todos os criotubos para a unidade de congelamento de taxa controlada e coloque no freezer. | 15.8 |
| 30. Após o período de tempo apropriado, transfira os tubos criogênicos para o equipamento de armazenamento local e envie dentro do período de tempo determinado pela rede. | 17 |
| 31. Preencha e revise a Planilha de processamento de PBMC e entradas de dados conforme orientado pela rede. | 18.1 |

Anexo H: Histórico de revisões da versão 6.0 a 7.0

| Versão Data efetiva (dd/mmm/aa) | Seção(ões) | Revisão |
|---------------------------------------|---------------------------|--|
| 7.0 19 de agosto de 2024 | Todos | Logotipo HANC revisado adicionado no cabeçalho |
| | Todos | Referência à MTN removida |
| | Todos | Referência ao IMPAACT removida |
| | Todos | Atualização abrangente de todas as seções para alinhamento com diretrizes, protocolos e práticas atuais. |
| | Aprovações | Autorização MTN removida |
| | Aprovações | Autorização IMPAACT removida |
| | Aprovações | Kathryn Dougherty substituiu John Hural para autorização da HVTN |
| | 8.1.5 | Requisito para criotubos com rosca interna para armazenamento de PBMC |
| | 15.4 | Método de envase alinhado entre ACTG, HPTN e HVTN |
| 6.0 26 de abril de 2018 | Aprovações | Grace Aldrovandi substituiu Bob Coombs para autorização da ACTG. John Hural substituiu Constance Ducar para autorização da HVTN. Edward Livant substituiu Charlene Dezzutti para autorização da MTN. |
| | 8.1.4 | Requisitos adicionais capturados no memorando de 7 de outubro de 2016 para laboratórios ACTG e IMPAACT apenas. Requisitos extras relacionados a criotubos também foram adicionados para todas as redes. |
| | 18.2.1 | Diretrizes adicionais foram adicionadas para as temperaturas de ponto de ajuste do freezer. |
| | Anexo D | Alterou "A maior parte das WBCs..." para "A maioria das WBCs..." |
| | Anexo G | Informações adicionais foram adicionadas à seção Criotubo relacionadas ao uso do microtubo SARSTEDT com tampa de rosca. |
| 5.2 22 de setembro de 2014 | 5.1.3 | Alterado "O laboratório pode usar a Planilha de processamento de PBMC HVTN , ou modificá-la para adequação aos procedimentos de laboratório" para "O laboratório pode usar a Planilha de processamento de PBMC da HVTN, modificada para seguir os requisitos de rede correspondentes e adequados aos procedimentos do laboratório". |
| 5.1 30 de julho de 2014 | 5.1.3 | Gráfico de diretrizes para controle do processamento de PBMC: Número total de células: "(opcional para a HVTN)" foi adicionado ao lado do N |
| | 16.4.5 | A observação foi omitida, uma vez que não há nenhuma barreira porosa nos tubos cônicos ao realizar overlay e underlay manuais |
| | 16.4.6 | Referências sobre o método de overlay foi alterado para 16.4.6.1 e método de underlay para 16.4.6.2 |
| | 18.1 | Diretrizes HPTN, IMPAACT e MTN para tempo de armazenamento/transferência foram adicionadas. |
| | 14, 18.1, 18.3, 18.3.1 | Alterado "congelador mecânico de LN2 /-150°C" para "dewar de LN2 ou congelador mecânico de -150oC" |

| | | |
|-----------------------------|---------------|--|
| | 18.3 | Linguagem simplificada para PBMCs armazenadas em dewar LN2 ou congelador mecânico de -150°C e excluiu a estipulação “mais de 4 semanas”. |
| | 18.3.1-18.3.2 | Diretriz para tempo de transferência exigido alterada de “no próximo dia útil” para “Dentro de 72 horas” |
| | 18.3.1 | Alterado “LN2/-150°C” para “LN2 ou -150°C” |
| | 22, 24.2 | Opção RPMI foi excluída |
| | Anexo E, F | Referência de POP Etapa 1 alterada de “11.3” para “11.2” |
| | Anexo E | Referência de POP Etapa 31 alterada de “18 ou 19” para “18” |
| | Anexo E | Referência de POP Etapa 32 alterada de “19.2” para “19.1” |
| | Anexo E | Declaração de Etapa 32 alterada para “Preencher a planilha de processamento de PBMC conforme indicado pela rede.” |
| | Anexo F | Etapas 9-12: alterado “16.1” para “17.1” |
| | Anexo F | Etapas 13-18: alterado “16.2” para “17.2” |
| | Anexo F | Etapas 19-22: alterado “16.3” para “17.3” |
| | Anexo F | Referência de POP Etapa 30 alterada de “18 ou 19” para “18” |
| | Anexo F | Referência de POP Etapa 31 alterada de “19.2” para “19.1” |
| | Anexo F | Declaração de Etapa 31 alterada para “Preencher a planilha de processamento de PBMC conforme indicado pela rede.” |
| 5.0 1 de maio de 2014 | Aprovações | Grace Aldrovandi substituiu Susan Fiscus para autorização IMPAACT |
| | 5.1.3 | Gráfico de diretrizes para controle do processamento de PBMC: Instruções: “L = Controle no LDMS é requerido pelo LDMS” foi alterado para “L = Campo obrigatório no LDMS para amostras de rede” |
| | 5.1.3 | Diretrizes para controle da tabela de processamento de PBMC-: “Número de amostra no LDMS” foi alterado para “ID global de amostras no LDMS” |
| | 5.1.3 | Células preenchidas em cinza para indicar que a informação não é necessária foram alteradas para preto. |
| | 7.1.8 | HPTN e MTN adicionadas |
| | 10.2 | Alternativa para o uso de RPMI como substituto foi excluída |
| | 14 | Alterações de formatação |
| | 18 e 19 | Instruções combinadas de armazenamento temporário e no local, Seção 18. |
| | 19 | O idioma de preenchimento dos documentos de processamento repetido na Seção 18 e 19 foi separado tem sua própria seção. |
| | Anexo H | Foram excluídas outras alterações do histórico de versões, mantendo apenas as alterações da versão atual apropriadas para este documento. |