

Título:	Versión 7.0 del SOP de procesamiento de PBMC entre redes		
Fecha de creación:	1 de abril de 2009	Total de páginas:	42
Fecha de entrada en vigor:	19 de agosto de 2024	Número de SOP:	Versión 7.0 de HANC-LAB-P0001
Redactado por:	Grupo de trabajo del SOP de PBMC entre redes	Reemplaza al SOP fechado el:	26 de abril de 2018

	Red	Nombre, cargo	Firma	Fecha
Aprobado por (red):	ACTG	Grace Aldrovandi, MD Investigadora principal del laboratorio de la red de ACTG	Firmado mediante DocuSign por: <i>Grace Aldrovandi</i> 6BE9A0BACDFE4FA...	26 de julio de 2024
	HPTN	Estelle Piwowar-Manning, MT (ASCP) SI Subdirectora del laboratorio de la Red HPTN	Firmado por: <i>Estelle Piwowar-Manning</i> 0E0BC1A7D726416...	27 de julio de 2024
	HVTN	Kathryn Dougherty, MT (ASCP) Directora asociada de HVTN para la calidad y el cumplimiento de los laboratorios	Firmado mediante DocuSign por: <i>Kathryn Dougherty</i> 7DCF2BEE1F91407...	26 de julio de 2024

Historial de cambios	Para obtener un historial de cambios completo, consulte el Apéndice H .
-----------------------------	---

	Nombre, cargo	Firma	Fecha
Revisado por (laboratorio):			

Índice

Objetivo	3
Alcance.....	3
Antecedentes.....	3
Autoridad y responsabilidad	3
Comunicación de resultados.....	3
Muestra.....	5
Equipos	6
Suministros desechables.....	7
Equipo de protección personal	8
Reactivos.....	8
Preparación de reactivos	10
Introducción y pautas del procesamiento de PBMC.....	13
Separación celular y dilución de sangre con reemplazo de plasma mediante tubo de separación celular con barrera de material sintetizado	14
Separación celular por método manual de colocación por encima o por debajo del medio de gradiente de densidad y dilución de sangre con reemplazo de plasma mediante separación celular manual con gradiente de densidad	18
Lavado, recuento, nueva suspensión, concentración y congelamiento a temperatura controlada durante la noche	21
Control de calidad	25
Almacenamiento de PBMC (temporal o en la institución)	26
Llenado de los documentos de procesamiento	27
Definiciones y acrónimos	28
Referencias	29
Apéndices.....	29
Apéndice A:Hoja de trabajo de procesamiento de PBMC	30
Apéndice B:Ejemplo de registro de cambios de isopropanol en Nalgene® Mr. Frosty™	32
Apéndice C: Solución de problemas: Recuperación de PBMC ante la ausencia de una banda de PBMC definida después de la centrifugación con gradiente de densidad.....	33
Apéndice D: Combinación de capas leucoplaquetarias para el aislamiento de PBMC en medios de gradiente de densidad	35
Apéndice E: Ejemplo de reactivos y suministros	36
Apéndice F: Guía rápida del SOP de PBMC: CSTFB	37
Apéndice G: Guía rápida del SOP de PBMC: Método manual de colocación por encima del medio de gradiente de densidad	39
Apéndice H:Historial de cambios de la versión 6.0 a 7.0	41

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

1. Objetivo

- 1.1. Este procedimiento operativo estándar (*Standard Operating Procedure, SOP*) describe los procedimientos para el aislamiento y la criopreservación de las células mononucleares de sangre periférica (*Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMC*) obtenidas de sangre completa.

2. Alcance

- 2.1. Este procedimiento deberá utilizarse para el procesamiento de muestras de sangre para el aislamiento, la criopreservación y el almacenamiento de muestras de PBMC.
- 2.2. Las instrucciones específicas del protocolo de la red sustituyen a las de este SOP.

3. Antecedentes

- 3.1. Las PBMC obtenidas recientemente o criopreservadas se utilizan para la evaluación de los objetivos del estudio. Estos ensayos requieren PBMC que se hayan aislado y criopreservado en condiciones definidas de manera estricta que garanticen una recuperación, viabilidad y funcionalidad óptimas. Resulta óptimo que la sangre se procese y congele dentro de 8 horas a partir del momento de la extracción de sangre para conservar la función máxima de las células en los análisis de control inmunitario.

4. Autoridad y responsabilidad

- 4.1. Los directores de los centros de laboratorio de la red/PI (o las personas designadas) tienen la autoridad de establecer, revisar y actualizar este procedimiento.
- 4.2. La Oficina de la Coordinación de Redes del VIH/SIDA (*HIV/AIDS Network Coordination, HANC*) es responsable de mantener y controlar la documentación del SOP.
- 4.3. El director del laboratorio de procesamiento es responsable de implementar este SOP de HANC y asegurarse de que todo el personal adecuado esté capacitado.
- 4.4. Todo el personal de la institución y del laboratorio implicado en la extracción, el procesamiento y/o el manejo de las PBMC es responsable de leer y entender este SOP antes de realizar los procedimientos descritos.
- 4.5. Todos los laboratorios deben utilizar el SOP de PBMC de HANC actual para obtener PBMC para protocolos de la red.

5. Comunicación de resultados

- 5.1. Se requiere que todas las redes utilicen una hoja de trabajo de procesamiento de PBMC y el sistema de gestión de datos de laboratorio (*Laboratory Data Management System, LDMS*) para llevar un registro de los detalles principales del procesamiento, incluido el momento del procesamiento, los cálculos y la documentación de problemas que surjan durante el procesamiento.
- 5.2. Se requiere el uso completo de una hoja de trabajo de procesamiento de PBMC específica del protocolo a menos que se comunique lo contrario en las instrucciones para el laboratorio de procesamiento de muestras (*Specimen Processing Laboratory Instructions, SPLI*), el diagrama de flujo de procesamiento del laboratorio (*Laboratory Processing Chart, LPC*) o en el manual del laboratorio (*Laboratory Manual, LM*) del protocolo. En el caso muy poco común en el que no se requiera una hoja de trabajo de PBMC específica del protocolo, se puede utilizar la hoja de trabajo genérica que se encuentra en el [Apéndice A](#) y en <http://www.hanc.info/labs/labresources/procedures/Pages/pbmcSop.aspx>.
- 5.3. Se requiere el uso de LDMS para registrar la información del participante y del procesamiento, generar identificadores únicos, crear etiquetas de crioviales, registrar ubicaciones de almacenamiento y generar manifiestos de envío.

5.4. Los elementos clave necesarios para el seguimiento del procesamiento de PBMC incluyen los siguientes:

Tabla de elementos clave	
Elementos clave para el seguimiento del procesamiento de PBMC	Lugar del registro
Laboratorio de procesamiento de la muestra	W L
ID del participante	W L
Número de visita	W L
Protocolo	W L
ID de la muestra global del LDMS	Generado de manera automática por LDMS
Fecha/hora de inicio del procesamiento	W L
Iniciales del técnico de procesamiento (técnico)	W L
Método de recuento (nombre del instrumento o recuento manual)	W
Volumen de la nueva suspensión para el recuento de WDR (V)	W
Concentración promedio del recuento celular (C)	W
Cantidad total de células (T) = C x V	W L
Cálculo del volumen final de la nueva suspensión en CPS (V _f)	W
Fecha y hora de congelamiento	W L
Los comentarios y las desviaciones del protocolo incluyen, entre otros: <ul style="list-style-type: none"> • Todas las condiciones inesperadas de la muestra • Coagulación de sangre (cantidad de tubos con coágulos, cantidad total de tubos del lote del PTID y detalles del procesamiento) • Rendimiento de células por debajo del rango esperado • Anomalías en el procesamiento • Medidas tomadas para la solución de problemas • Nota si el tiempo total es mayor a 8 horas • Tiempo de procesamiento mayor a 4 horas 	W
Fecha/hora de la extracción	W L
Reactivos (fabricantes, números de lote y fechas de vencimiento de DMSO, FBS, WDR, CSTFB, medio de gradiente de densidad)	W
CPS (volumen de DMSO y FBS)	W
Tipo de tubo de muestra (HEP/ACD/EDTA/otro)	W L
Condición de la sangre (por ejemplo, SAT/HEM/CLT)	W L
Volumen medido de sangre completa utilizable	W L
Recuentos de células	W
Cantidad real de células por vial	W L
Cantidad de crioviales congelados	W L
Información de almacenamiento en el congelador (módulo de almacenamiento de LDMS)	O L
Confirmación de QC visual de los reactivos (técnico)	O
Rendimiento de células/ml de sangre completa	W
Volumen estimado de la nueva suspensión de CPS (V ₁)	W
Confirmación de control de calidad de la etiqueta de LDMS para contenido/códigos de barras (técnico)	W
Confirmación de transferencia de crioviales a los lugares de la caja de almacenamiento asignados por LDMS (técnico)	W
Fecha/hora a la que los crioviales se transfirieron del equipo de congelamiento a temperatura controlada a la caja de almacenamiento	W
Revisiones finales, revisores/fechas	W

W= Se requiere el seguimiento en una hoja de trabajo de PBMC

L = Se requiere el registro/seguimiento en el LDMS

O = El seguimiento en una hoja de trabajo o material de seguimiento complementario es opcional

6. Muestra

6.1. Extracción de sangre completa nueva con anticoagulante según los requisitos del protocolo.

6.2. Condiciones de manejo

6.2.1. Las muestras deben almacenarse a temperatura ambiente (de 15 a 25 °C o hasta 30 °C, según las condiciones climáticas) a partir del momento de la extracción hasta la entrega al laboratorio de procesamiento.

6.2.2. Las muestras deben entregarse al laboratorio de procesamiento tan pronto como sea posible (la mejor práctica debe ser dentro de 30 minutos a 4 horas a partir de la extracción) para permitir que el laboratorio de procesamiento tenga bastante tiempo para finalizar los procedimientos de crioconservación. La clínica debe analizar los requisitos específicos con el laboratorio de procesamiento antes del enrolamiento en el protocolo.

6.2.3. El laboratorio de procesamiento debe procesar las muestras tan pronto como sea posible después de recibirlas (la mejor práctica sería comenzar el procesamiento dentro de 30 minutos a partir de la recepción de la muestra):

- La hora de procesamiento (hora de inicio del procesamiento) es la hora en el que se abre el tubo por primera vez o se coloca en la centrífuga, lo que ocurra primero.
- La hora de congelamiento se define como la hora en que:
 - Se coloca el Agilent Technologies StrataCooler®, Nalgene® Mr. Frosty™ o Corning® CoolCell® en un congelador a - 80 °C. Consulte los SPLI/LPC/LM para conocer los rangos de temperatura aceptables para tomar en cuenta los cambios en la rutina en las temperaturas del congelador.
 - Se inicia el programa de enfriamiento del congelador de temperatura controlada, como CryoMed®.

Nota: Los congeladores de temperatura controlada no están permitidos para las muestras de HVTN.
- El tiempo total se calcula a partir de la hora de obtención de la muestra y la hora de congelamiento. De manera ideal, este es de 8 horas o menos, pero todas las muestras deben procesarse sin importar el tiempo total.
- El tiempo de procesamiento total se calcula a partir de la hora de procesamiento y la hora de congelamiento; se recomienda que sea menor a cuatro horas y lo ideal es que sea menor a 3 horas.

6.2.4. No refrigere ni congele la sangre completa. No coloque la sangre en contacto directo con compresas de hielo si las está utilizando durante condiciones de calor extremo.

6.3. Muestras marginales

6.3.1. Muestras coaguladas

6.3.1.1. Toda la sangre debe procesarse sin importar si está coagulada, a menos que el protocolo indique lo contrario.

6.3.1.2. Retire los coágulos y procese de la manera habitual.

6.3.1.3. Marque la condición como CLT en la hoja de trabajo y en el LDMS. Incluya detalles en la sección de comentarios de la hoja de trabajo de procesamiento.

6.3.2. Muestras hemolizadas

6.3.2.1. La hemólisis puede afectar a la calidad de las PBMC.

6.3.2.2. Procese de la manera habitual.

6.3.2.3. Marque la condición como HEM en la hoja de trabajo y en el LDMS. Incluya detalles en la sección de comentarios de la hoja de trabajo de procesamiento.

6.3.3. Bajo rendimiento de células

6.3.3.1. Si el rendimiento de células es insuficiente para cumplir con las necesidades del protocolo, comuníquese con la clínica para obtener un posible reemplazo de la muestra.

Si el rendimiento de células es igual o menor a 0.4×10^6 células/ml, comuníquese con la clínica para obtener un posible reemplazo de la muestra y comuníquese con el centro de laboratorio de la red (HVTN, HPTN) o con el equipo del protocolo (ACTG).

6.3.3.2. Registre las medidas tomadas para resolver el problema o verificar datos en la sección de comentarios de la hoja de trabajo de procesamiento.

6.4. Muestras inaceptables

6.4.1. Se rechazarán las muestras no etiquetadas o mal etiquetadas.

6.4.2. Siga las pautas de la red sobre el rechazo de muestras retrasadas.

6.4.3. Muestras con fugas: Comuníquese a la clínica si alguna de las muestras tiene fuga y determine si las muestras son útiles. La esterilidad de la muestra y la seguridad del personal del laboratorio que maneja las muestras son particularmente importantes.

7. Equipos

7.1. Preparación y procesamiento

7.1.1. Gabinete de bioseguridad de clase II (*biosafety cabinet*, BSC) de nivel 2 en adelante.

7.1.2. Centrífuga, de velocidad baja (capaz de alcanzar 200 a 1000 x g) con rotor de cubeta oscilante, de preferencia refrigerada, con temperatura ambiente aceptable. Se requiere el uso de cubetas con tapa/tapón.

7.1.3. Micropipetas, rango de 20, 200, 1000 μ l.

7.1.4. Pipet-Aid® (de preferencia inalámbrica) para su uso con pipetas serológicas desechables.

7.1.5. Refrigerador a una temperatura de 2 a 8 °C.

7.1.6. Congelador a una temperatura de -20 °C (o menor) sin descongelamiento automático (para el almacenamiento de FBS).

7.1.7. Congelador a una temperatura de -80 °C (de -65 a -95 °C para ACTG, de -70 a -95 °C para HVTN y HPTN); para almacenamiento de PBMC a corto plazo.

7.1.8. Baño María a una temperatura de 37 a 56 °C (para la inactivación térmica de FBS, si es necesario) (nota para HVTN: No se requiere para los protocolos de HVTN. El FBS aprobado por HVTN se entrega a los laboratorios de la red con inactivación térmica).

7.1.9. Cubeta o vaso de precipitados para cloro u otro desinfectante.

7.1.10. Gradillas aptas para sostener los tubos de extracción de sangre, tubos cónicos de 15 ml y 50 ml en posición vertical durante los pasos de procesamiento y traslado.

7.1.11. Gradilla para criovial para permitir que los crioviales puedan abrirse/cerrarse con una mano durante los pasos de alícuota (de preferencia una gradilla específica para Nunc).

7.2. Se requiere equipo del LDMS. (Consulte el sitio web del LDMS y los requisitos específicos de la red para obtener detalles).

7.2.1. La computadora cumple con las especificaciones definidas por Frontier Science para el LDMS de la web.

7.2.2. Impresora para las etiquetas generadas por el LDMS.

7.2.3. Escáner de código de barras en 2D.

7.2.4. Etiquetas compatibles con LN₂ con un área de impresión de 1x1 pulg.

7.2.5. Cinta de impresión compatible con LN₂, específico para la impresora, resistente a la abrasión y a sustancias químicas.

7.3. Equipo de nitrógeno líquido (LN₂) (si lo requiere la red)

7.3.1. Tanque de almacenamiento de LN₂ (igual o menor a -140 °C).

7.3.2. Contenedor seco de LN₂ aprobado por IATA.

7.4. Recuento celular:

Nota: Es posible que los métodos de recuento necesiten aprobación de la red. Siga los procedimientos de calibración correspondientes del fabricante si utiliza un contador de células automático.

7.4.1. Contador de células automático capaz de enumerar las células viables (Beckman-Coulter Vi-Cell, Muse® o un contador equivalente). De manera habitual, HVTN no aprueba esta clase de contadores de células para las muestras nuevas.

7.4.2. Contador de células automático incapaz de distinguir entre células viables (Coulter Counter, Abbott Cell-Dyn®, Sysmex® o un contador equivalente).

Nota: Se puede utilizar un contador de células automático incapaz de identificar células viables para obtener un recuento total de células sin distinguir entre células viables. Sin embargo, las muestras que se preparan para el Programa de Análisis de Desempeño de Criopreservación de PBMC de IQA deben incluir un recuento de células viables.

Nota para HVTN: Si los contadores automáticos se utilizarán para los fines del protocolo, la red tiene una marcada preferencia por esta clase de contadores. HVTN debe revisar y aprobar previamente los métodos de recuento.

7.4.3. Cámara para recuento celular manual (hemocitómetro) y microscopio de campo claro.

Nota: Si se utiliza una cámara de recuento celular manual con azul de tripano, se deben enumerar las células viables y utilizarse para obtener los cálculos de células. Si se utiliza violeta de genciana, se puede utilizar un recuento total de células para los cálculos de células.

7.5. Criopreservación

Nota: Se puede utilizar uno de los siguientes equipos de congelamiento a temperatura controlada (*controlled-rate freezing unit*, CRFU) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se prefiere el uso de Agilent Technologies StrataCooler® y Corning® CoolCell®.

Nota: Si no se siguen las instrucciones del fabricante, debe realizarse un estudio de validación.

7.5.1. Módulo de criopreservación StrataCooler® de Agilent Technologies: 400005.

7.5.1.1. StrataCooler® debe estar a una temperatura de 2 a 8 °C antes de iniciar el enfriamiento de los crioviales. No coloque los crioviales en un StrataCooler® que se encuentre debajo de una temperatura inicial de 2 °C.

7.5.2. Corning® (anteriormente BioCision®) CoolCell®.

7.5.2.1. Asegúrese de que todas las partes de CoolCell®, incluido el anillo central, regresen a temperatura ambiente (de 15 a 25 °C o hasta 30 °C, según las condiciones climáticas) entre un uso y otro.

7.5.3. Recipiente para criopreservación de 1 °C/minuto Nalgene® Mr. Frosty™.

7.5.3.1. Mr. Frosty™ debe guardarse a temperatura ambiente (de 15 a 25 °C o hasta 30 °C, según las condiciones climáticas) entre un uso y otro.

7.5.3.2. El nivel de isopropanol debe ser correcto y debe reemplazarse por completo después del quinto ciclo de congelamiento y descongelación. Debe llevarse una bitácora para registrar los ciclos de congelamiento y descongelación, así como los cambios de reactivos. Consulte el [Apéndice B](#).

7.5.4. Congelador de temperatura controlada, como la cámara de congelamiento CryoMed® (Gordinier).

(Nota para HVTN: Los congeladores de temperatura controlada no están permitidos para las muestras de HVTN).

8. Suministros desechables

8.1. Plásticos

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

8.1.2. Puntas para micropipeta de 20, 100, 200, 1000 µl, estériles.

8.1.3. Tubos desechables para centrifuga cónicos, de 15 y 50 ml, estériles, graduados, de polipropileno.

8.1.4. Tubos de separación celular de 50 ml con barreras de material sintetizado (*cell separation tubes with frit barriers*, CSTFB), secos (no comprados como prellenados con medios de separación celular).

8.1.4.1. Requeridos para el procesamiento de HVTN. Revise el LPC/SPLI/LM para consultar los requisitos específicos del protocolo para todas las redes.

8.1.5. Viales criogénicos (crioviales) con rosca interna, de 1.8 ml a 2 ml, con tapa de rosca con junta tórica, estériles, de polipropileno únicamente, que se mantienen en pie por sí solos, graduados, a prueba de filtraciones, formulados para conservación en LN₂ en fase de vapor (aproximadamente -140 °C). Confirme la aceptabilidad de cualquier sustitución de viales criogénicos con las redes antes de realizar una compra ([consulte el Apéndice E](#)).

Nota: No deben utilizarse los tubos con tapa a presión. Además, no se deben llenar los crioviales más allá de la capacidad especificada por el fabricante ni hasta la parte superior del tubo.

8.1.6. Opcional: Frascos/matracas estériles, desechables, con cuello de 45 mm, de entre 250 y 500 ml para mezclar extracciones de sangre completa de gran volumen antes de la separación de PBMC.

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

8.1.8. Opcional: Tubos de separación celular prellenados de 50 ml con barreras de material sintetizado (CSTFB).

Nota para HVTN: No es opcional para los estudios de HVTN. HVTN requiere que los laboratorios compren CSTFB “secos” (es decir, no comprados como prellenados). El centro de laboratorios de HVTN debe aprobar previamente el uso de otras CSTFB).

8.2. Marcadores

Nota: Los marcadores para escribir en los tubos de procesamiento y viales deben ser de punta fina y contener tinta indeleble de secado rápido.

8.3. Etiquetas

Nota: Las etiquetas criogénicas y la tinta debe ser apta para temperaturas de almacenamiento en fase de vapor a -80 °C o para LN₂.

9. Equipo de protección personal

Nota: Se requiere el uso de equipo de protección personal adecuado para el uso con patógenos transmitidos por la sangre. Siga las pautas y prácticas del laboratorio local para el manejo de productos derivados de la sangre.

9.1. Bata de laboratorio.

9.2. Protección ocular.

9.3. Guantes de nitrilo, sin polvo o equivalentes.

9.4. Crioguantas.

9.5. Caretas (con sujeción en la barbilla si se prefiere o si las normativas de bioseguridad locales lo requieren). Se deben utilizar cuando se trabaje con LN₂.

10. Reactivos

10.1. Se requiere la compra de reactivos estériles y el uso de técnicas asépticas.

10.1.1. Guarde los frascos abiertos a la temperatura recomendada por el fabricante hasta que los utilice por completo, hasta que las instrucciones a continuación indiquen que deben desecharse o hasta la fecha de vencimiento del fabricante, lo que ocurra primero.

10.1.2. [Consulte el Apéndice E](#) para ver los productos recomendados.

10.1.3. Deseche si se presentan signos visibles de contaminación, como un aspecto turbio.

10.2. Reactivos de dilución y lavado (*Wash Diluent Reagent*, WDR).

10.2.1. Solución salina balanceada de Hanks (*Hanks' Balanced Salt Solution*, HBSS) 1X sin calcio ni magnesio, lista para usarse.

10.2.2. Solución salina tamponada con fosfato (*Phosphate-Buffered Saline*, PBS) 1X sin calcio ni magnesio, lista para usarse.

10.3. Medio de gradiente de densidad (densidad de 1.077 g/ml).

10.3.1. Medio estéril listo para usarse para aislamiento de alto rendimiento de linfocitos de seres humanos a partir de sangre periférica.

10.3.2. [Consulte el Apéndice E](#) para ver los productos recomendados.

10.4. Tubo de separación celular con barrera de material sintetizado (CSTFB, si se utiliza) Se requiere para HVTN a menos que se anote una alternativa en los SPLI/LPC/LM específicos para el protocolo.

10.4.1. Sistema de CSTFB no llenado (combina un CSTFB seco con un medio de gradiente de densidad 1.077).

10.4.1.1. Lleve el medio de gradiente de densidad (*density gradient media*, DGM) a temperatura ambiente (de 15 a 25 °C o hasta 30 °C, según las condiciones climáticas). Protéjalo de la luz.

10.4.1.2. Trabaje en el BSC después de realizar una técnica aséptica.

10.4.1.3. Registre la información relacionada del CSTFB y DGM directamente del contenedor o frasco utilizado en la hoja de trabajo de PBMC. Los CSTFB preparados por adelantado deben tener etiquetas que incluyan toda la información requerida, fecha de preparación e iniciales de la persona que preparó los tubos.

10.4.1.4. Prepare los tubos; para ello, coloque el volumen de DGM apropiado para el tamaño del tubo CSTFB que se utiliza mediante una pipeta (según se indica a continuación).

Capacidad del tubo (ml)	Volumen del medio de gradiente de densidad (ml)
50 ml	15 ml

10.4.1.5. Tape los CSTFB con el DGM agregado y centrifugue a 800 x g durante 30 segundos (o la configuración más baja de tiempo mayor a 30 segundos) a temperatura ambiente (de 15 a 25 °C o hasta 30 °C, según las condiciones climáticas).

10.4.1.6. El DGM ahora debe estar debajo de la barrera de material sintetizado. Revise los tubos para detectar huecos o burbujas grandes entre la capa de DGM y la barrera de material sintetizado o para detectar que no haya quedado DGM encima del material sintetizado.

10.4.1.7. Si hay huecos o burbujas grandes debajo del material sintetizado, agregue medio adicional, centrifugue el CSTFB nuevamente a entre 800 y 1000 x g durante 30 segundos a 1 minuto (seleccione la configuración más baja de la centrifuga) y vuelva a inspeccionar.

10.4.1.8. Si hay líquido (DGM) arriba del material sintetizado, centrifugue el CSTFB nuevamente a entre 800 y 1000 x g durante 30 segundos a 1 minuto (seleccione la configuración más baja de la centrifuga). Si queda solución de gradiente de densidad por encima del material sintetizado después de volver a centrifugar, retírelo siguiendo la técnica aséptica.

10.4.1.9. Siga las recomendaciones de almacenamiento del fabricante del medio de gradiente de densidad.

10.4.2. CSTFB prellenado (medio de gradiente de densidad de 1.077).

Nota: La capacidad del tubo requerido dependerá del volumen de sangre completa. Almacene en el refrigerador (de 2 a 8 °C).

Nota para HVTN: No se permite comprar CSTFB prellenados.

- Protéjalo de la luz.
- Un aspecto turbio indica deterioro del producto. Deseche si nota signos visibles de contaminación.
- Permita que el CSTFB prellenado llegue a temperatura ambiente (de 15 a 25 °C o hasta 30 °C, según las condiciones climáticas) antes de su uso.

10.5. Reactivos de congelación

10.5.1. Se requiere suero bovino fetal (*Fetal Bovine Serum*, FBS), con inactivación térmica. (Consulte la Sección 11.1 FBS con inactivación térmica para obtener detalles de manejo y gestión).

Nota para HVTN y estudios conjuntos con HVTN: La red proporciona a los laboratorios FBS aprobado por HVTN. El proveedor y el lote de FBS aprobado por HVTN no está disponible para su compra fuera de la cadena de suministro/proceso de HVTN.

- 10.5.1.1. Consulte con las redes correspondientes los proveedores preferidos.
- 10.5.1.2. Obtenga un certificado de análisis del proveedor para los registros de control de calidad del laboratorio local.
Nota: Es posible que se requiera una copia del certificado de análisis del FBS para exportar (o importar) alícuotas de PBMC entre países.
- 10.5.1.3. El FBS almacenado congelado (igual o menor a -20 °C/ de acuerdo con las recomendaciones del fabricante) se conserva en buen estado hasta la fecha de vencimiento del fabricante.
- 10.5.1.4. El FBS descongelado y almacenado entre 2 y 8 °C es estable durante un mes natural.
- 10.5.2. Dimetilsulfóxido (*Dimethylsulfoxide*, DMSO), grado de cultivo celular.
 - 10.5.2.1. Utilice DMSO de grado de cultivo celular.
 - 10.5.2.2. Almacene los frascos sin abrir a temperatura ambiente (entre 15 y 25 °C o hasta 30 °C, según las condiciones climáticas). Revise el frasco para conocer la fecha de vencimiento y deséchelo si está vencido.
 - 10.5.2.3. Después de abrirse, el DMSO sin diluir permanece estable a temperatura ambiente (de 15 a 25 °C o hasta 30 °C, según las condiciones climáticas), cuando se protege de la luz y la humedad, durante 6 meses (o hasta la fecha de vencimiento del fabricante, si esta fecha es menor a 6 meses a partir de la fecha de apertura). Corrija la etiqueta en el frasco para reflejar la nueva fecha de vencimiento.
 - 10.5.2.4. Utilice una técnica aséptica cuando elimine el DMSO del frasco para evitar una posible contaminación.
 - 10.5.2.5. Deseche el contenido del frasco abierto si nota signos visibles de contaminación.
 - 10.5.2.6. Los reactivos pueden dividirse en alícuotas en cantidades pequeñas para ayudar a conservar la esterilidad. Etiquete las alícuotas con “DMSO”, el nombre del fabricante, número de lote, fecha en que se abrió/dividió en alícuotas, fecha de vencimiento (seis meses a partir de la apertura o fecha de vencimiento del frasco original, lo que suceda antes) e iniciales del técnico. Proteja las alícuotas de la luz.
- 10.5.3. Desinfectante.
 - 10.5.3.1. Frasco rociador de desinfectante de etanol al 70 % v/v.
 - 10.5.3.2. Cubeta o vaso de precipitados y frasco rociador con cloro al 10 % v/v (debe producirse cada día).
 - 10.5.3.3. Otro desinfectante, según las especificaciones de la política del laboratorio local.
- 10.6. Reactivos para el recuento celular.

Nota: Los requisitos para los reactivos de recuento variarán según el método empleado. Consulte las instrucciones/SOP aprobado por la red para el método empleado. El uso de ácido acético glacial no se permite para los recuentos manuales de HVTN.

- 10.6.1. Solución de azul de tripano al 0.4 %.
- 10.6.2. Opcional: Se puede usar solución de violeta de genciana al 0.05 % para teñir el núcleo de la célula, a fin de poder identificar las células mononucleares y contarlas con un hemocitómetro. Si se requiere viabilidad, deberá realizarse un segundo recuento manual utilizando azul de tripano. La solución de violeta de genciana al 0.05 % contiene: 0.05 g de violeta de genciana, 2 ml de ácido acético glacial y 98 ml de H₂O destilada o desionizada.

11. Preparación de reactivos

- 11.1. FBS con inactivación térmica (*Heat-Inactivated*, HI-FBS).

Nota: Se puede solicitar HI-FBS del fabricante o se puede solicitar FBS del fabricante e inactivarlo térmicamente en el laboratorio. Siga estas instrucciones para descongelar, dividir en alícuotas y usar.

Nota para HVTN: La red proporciona a los laboratorios FBS aprobado por HVTN con inactivación térmica. Por lo general, el proveedor y el lote de FBS aprobado por HVTN no está disponible para su compra fuera de la cadena de suministro/proceso de HVTN.

- 11.1.1. Saque el FBS del congelador.
 - 11.1.2. Descongélalo en el refrigerador (entre 2 y 8 °C), preferentemente, o durante varias horas a temperatura ambiente (de 15 a 25 °C o hasta 30 °C, según las condiciones climáticas). No permita que el FBS permanezca a temperatura ambiente más de lo necesario para finalizar el proceso de descongelación.
 - 11.1.3. Agite suavemente dos o tres veces durante la descongelación.
 - 11.1.4. Si no se inactivó térmicamente el FBS, siga estas instrucciones adicionales. Si el fabricante activó térmicamente el FBS, pase a la Sección 11.1.5.
 - 11.1.4.1. Coloque el FBS en baño maría a 56 °C (de 55 a 57 °C). Controle cuidadosamente la temperatura del baño maría. Las temperaturas más altas pueden degradar los componentes del FBS.
Nota: El nivel de agua del baño maría debe cubrir el nivel del FBS del frasco, pero no debe tocar la tapa del frasco. Esto ayudará a garantizar que el FBS se caliente de manera homogénea y evita la contaminación.
 - 11.1.4.2. Una vez que la temperatura del baño maría regrese a los 56 °C (entre 55 y 57 °C), caliente el FBS durante 30 minutos y mézclelo cada 5 a 10 minutos. Calentarlo durante más tiempo puede degradar los componentes del FBS.
Nota: Limpie el frasco con etanol al 70 % v/v antes de abrirlo.
 - 11.1.5. Mezcle bien y con cuidado el HI-FBS utilizando una técnica aséptica.
 - 11.1.6. Divídalo en alícuotas en tubos de centrifuga cónicos, de 50 ml, estériles, etiquetados, graduados, de polipropileno o en alícuotas de otros tamaños según sea adecuado para la carga de trabajo anticipada.
Nota: Las etiquetas deben identificar estos tubos como “HI-FBS” e incluir el nombre del fabricante, número de lote, fecha de división en alícuotas, las condiciones de almacenamiento, la fecha de vencimiento original del fabricante y las iniciales del técnico. El FBS permanece estable durante 1 mes (si el período de 1 mes no excede la fecha de vencimiento original del fabricante) a una temperatura de entre 2 y 8 °C, o hasta la fecha de vencimiento original del fabricante si se conserva a -20 °C. Recuerde actualizar la fecha de vencimiento y las condiciones de almacenamiento en las alícuotas/frascos que salgan del almacenamiento a -20 °C para su uso.
 - 11.1.7. Refrigere (entre 2 y 8 °C) la cantidad de tubos de alícuotas necesarios para la carga de trabajo esperada. Mezcle bien antes de usar. Los tubos de alícuotas que no se necesiten inmediatamente deben congelarse y permanecen estables hasta la fecha de vencimiento original del fabricante.
Nota: La repetición de ciclos de congelamiento/descongelación tendrá un efecto adverso en la calidad del FBS. No vuelva a congelar las alícuotas que se guardaron a temperatura de refrigeración.
 - 11.1.7.1. Para usar las alícuotas congeladas, de preferencia descongélalas en el refrigerador durante la noche, o durante varias horas a temperatura ambiente (de 15 a 25 °C o hasta 30 °C, según las condiciones climáticas). No permita que el FBS permanezca a temperatura ambiente más de lo necesario para finalizar el proceso de descongelación.
 - 11.1.7.2. Cuando se descongela, el FBS permanece estable durante 1 mes a una temperatura de entre 2 y 8 °C o hasta la fecha de vencimiento del frasco original, lo que ocurra primero. Recuerde actualizar la fecha de vencimiento y las condiciones de almacenamiento en las alícuotas/frascos que retire del almacenamiento a -20 °C para su uso. Mezcle bien antes de usar.
- 11.2. Solución para crioconservación (*Cryopreservation Solution, CPS*) nueva.
- 11.2.1. Componentes de la CPS.

Componentes	Porcentaje (v/v)
DMSO	10 %
FBS (con inactivación térmica)	90 %

11.2.2. Preparación de la CPS.

11.2.2.1. Utilice tubos para centrifuga cónicos, de 15 ml o 50 ml, estériles, etiquetados y desechables para contener la CPS preparada.

Nota: La mezcla de DMSO y FBS es una reacción exotérmica.

11.2.2.2. La CPS debe prepararse con antelación y enfriarse en el refrigerador (entre 2 y 8 °C) durante al menos 30 minutos o en un baño de hielo durante al menos 15 minutos antes de usarla.

Nota: La CPS puede almacenarse a una temperatura de entre 2 y 8 °C durante un día hábil (menos de 18 horas).

11.2.3. Utilice la fórmula que aparece a continuación para calcular el volumen de CPS que se debe preparar para la nueva suspensión final de PBMC. También se muestran ejemplos.

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

Redondee al mililitro entero superior más próximo.

Nota: El volumen de sangre completa utilizable (*usable whole blood volume, UWBV*) es el volumen de sangre completa total que se procesa. (Es posible que el volumen de sangre completa utilizable no sea igual a la capacidad del tubo).

Nota: Cuando procese la sangre extraída en los tubos con ACD, incluya la capacidad de extracción y el anticoagulante líquido cuando considere los volúmenes máximos, mediciones y cálculos de rendimiento celular.

- Por ejemplo, un tubo con ACD de 8.5 ml contiene 1.5 ml de anticoagulante y se extraerá un volumen máximo de sangre de 8.5 ml. Al momento de estimar y medir los tubos con ACD, la capacidad máxima será de 10.0 ml por tubo de extracción de 8.5 ml (8.5 ml de sangre completa + 1.5 ml de anticoagulante líquido = 10.0 ml).

Nota: Los lotes de CPS deben producirse antes de obtener el volumen medido de sangre completa utilizable. Para esto, realice el cálculo que se muestra arriba utilizando el volumen máximo de sangre completa esperado (es decir, la capacidad del tubo de extracción incluido el anticoagulante, multiplicado por la cantidad esperada de tubos que se extraerán en la visita). Cuando prepare la CPS, el laboratorio también debe considerar los rendimientos promedio alcanzados con su población de participantes. Comience con un rendimiento celular promedio de 1.5×10^6 células/1.0 ml para el cálculo inicial. Controle el uso diario de CPS para aprovechar al máximo la eficacia y reducir al mínimo los desperdicios.

- Por ejemplo, si se desechan grandes cantidades de CPS de manera habitual al final del día, ajuste a la baja el rendimiento celular para reflejar con más precisión la población participante. Si el cálculo arroja volúmenes de CPS que no son suficientes, es decir, se deben producir varios lotes, aumente el rendimiento celular en el cálculo o considere aumentar el volumen final en un porcentaje fijo, como 20 %.

Ejemplos: Sangre de adulto: Lote diario de CPS - múltiples visitas programadas:

- La concentración congelada objetivo (ml/células) para todos es de (1.0 ml/15 x 10^6 células) o 15 millones de células congeladas en 1 ml (V2) de CPS.
- Calcule el volumen total esperado:

Nota: Recuerde incluir el anticoagulante líquido cuando calcule los volúmenes totales esperados de los tubos con ACD. Los tubos con NaHep y EDTA no contienen anticoagulantes líquidos, por lo que el volumen del tubo tal como se registra en la solicitud del laboratorio es el volumen máximo posible.

- La primera visita programada incluye 18 tubos con ACD de 8.5 ml para el procesamiento de PBMC.

- La segunda visita programada incluye 8 tubos con ACD de 8.5 ml para el procesamiento de PBMC.
- La tercera visita programada incluye 8 tubos con NaHep de 10.0 ml para el procesamiento de PBMC.
- Tubos esperados en total $(18+8+8) = 34$, $34 \text{ tubos} \times 10.0 \text{ ml} = 340.0 \text{ ml}$ de volumen máximo esperado

Sangre completa utilizable x	Rendimiento celular x	Concentración congelada =	CPS estimada que se debe preparar
$(340.0 \text{ ml}) \times$	$(1.5 \times 10^6 \text{ células/1 ml}) \times$	$(1.0 \text{ ml}/15 \times 10^6 \text{ células}) =$	34.0 ml

Ejemplo: Sangre de adulto: Extracción de un gran volumen de sangre. La concentración congelada objetivo (ml/células) es de $(1.0 \text{ ml}/15 \times 10^6 \text{ células})$ o 15 millones de células congeladas en 1 ml (V2) de CPS. Lote de CPS creado después de medir el UWBV.

Sangre completa utilizable x	Rendimiento celular x	Concentración congelada =	CPS estimada que se debe preparar
$(135.0 \text{ ml}) \times$	$(1.5 \times 10^6 \text{ células/1 ml}) \times$	$(1.0 \text{ ml}/15 \times 10^6 \text{ células}) =$	14.0 ml

Ejemplo: Sangre de adulto: Extracción de sangre con 8 tubos con NaHep de 10.0 ml La concentración congelada objetivo (ml/células) es de $(1.0 \text{ ml}/10 \times 10^6 \text{ células})$ o 10 millones de células congeladas en 1 ml (V2) de CPS. Lote de CPS creado antes de medir el UWBV.

Sangre completa utilizable x	Rendimiento celular x	Concentración congelada =	CPS estimada que se debe preparar
$(80.0 \text{ ml}) \times$	$(1.5 \times 10^6 \text{ células/1 ml}) \times$	$(1.0 \text{ ml}/10 \times 10^6 \text{ células}) =$	12.0 ml

11.2.4. Utilice la siguiente fórmula para calcular la cantidad de DMSO y FBS necesario.

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

Ejemplos:

Volumen estimado de CPS	Volumen de DMSO = $(.1)(\text{volumen de CPS})$	Volumen de HI-FBS = $\text{Volumen de CPS} - \text{volumen de DMSO}$	Volumen total de CPS = $\text{Volumen de DMSO} + \text{volumen de FBS}$
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 los volúmenes de CPS, DMSO y FBS en la hoja de trabajo de PBMC. Si se crean lotes compartidos, también se recomienda registrar la hora de creación y las iniciales de la persona que crea el lote.

12. Introducción y pautas del procesamiento de PBMC

Existen principios estándar y pasos en común para todos los procedimientos de procesamiento de PBMC. Se presentan variaciones con la elección de técnicas de separación (CSTFB en comparación con la colocación manual por encima del medio de gradiente de densidad), el tratamiento de la sangre (dilución con o sin reemplazo de plasma en comparación con la obtención directa de plasma), concentración celular final y congelamiento/almacenamiento. Seleccione las secciones de procedimiento adecuadas para la separación de células y el tratamiento de la sangre, de congelamiento y almacenamiento con base en los requisitos de la red y del protocolo.

13. Separación celular y dilución de sangre con reemplazo de plasma mediante tubo de separación celular con barrera de material sintetizado (CSTFB)

La Sección 13 puede utilizarse para todas las redes. Revise los requisitos del protocolo y los materiales disponibles. Para cualquier muestra, utilice la Sección 13 o 14, pero no ambas.

- 13.1. Separación de linfocitos a partir de sangre periférica mediante tubos de separación CSTFB con medio de gradiente de densidad (DGM) agregado a temperatura ambiente (de 15 a 25 °C o hasta 30 °C, según las condiciones climáticas).
 - 13.1.1. Realice todo el trabajo con pipeta y mezcle en un gabinete de bioseguridad de clase II (BSC) de nivel 2 en adelante.
 - 13.1.2. Rocíe todas las superficies, gradillas y frascos de reactivos con etanol al 70 % v/v o con un desinfectante equivalente cada vez antes de ingresar y utilizar el BSC.
 - 13.1.3. A menos que se indique lo contrario, el procedimiento se realiza a temperatura ambiente (de 15 a 25 °C o hasta 30 °C, según las condiciones climáticas).
 - 13.1.4. Utilice una pipeta nueva para cada número de identificación del participante (PTID) y aditivo.

13.2. Prepare las muestras de sangre completa, los reactivos y los suministros.

- 13.2.1. Prepare y enfríe la CPS (consulte la Sección 11, Preparación de reactivos) antes de procesar o con suficiente antelación antes de mezclar con PBMC, si se necesita más CPS.

Nota: Los lotes de CPS deben prepararse antes de comenzar con los pasos de procesamiento de muestras. Se deben controlar los volúmenes de lotes y, cuando sea necesario, se debe capturar la creación de lotes adicionales con todos los detalles en la hoja de trabajo de PBMC.

- 13.2.2. Prepare suficientes tubos CSTFB para manejar la cantidad máxima de sangre que se espera.
 - 13.2.2.1. Para tubos CSTFB de 50 ml, prevea un volumen máximo de 20 ml o un CSTFB por cada dos tubos de extracción de sangre de 8.5 ml a 10.0 ml. Sugerencia: Divida entre 2 la cantidad total de tubos de extracción de 8.5 ml a 10.0 ml que se recibirán. Si el resultado es una fracción (un número impar de tubos de extracción de sangre), redondee hasta el siguiente número entero (es decir, agregue un tubo CSTFB adicional).
 - 13.2.2.2. Ejemplos:
 - La visita 1 tiene 3 tubos con NaHep de 10.0 ml. Prepare 2 tubos CSTFB.
 - La visita 10 tiene 10 tubos con ACD de 8.5 ml. Prepare 5 tubos CSTFB.
 - 13.2.3. Asegúrese de que los tubos CSTFB preparados que contienen DGM se encuentren a temperatura ambiente (de 15 a 25 °C o hasta 30 °C, según las condiciones climáticas) antes de comenzar los pasos de procesamiento.
 - 13.2.4. Inspeccione de manera visual los tubos CSTFB llenados para confirmar que no haya burbujas grandes o huecos entre el DGM y la barrera de material sintetizado y que no haya DGM por encima del material sintetizado antes de agregar el WDR o la sangre a los tubos. (Consulte las instrucciones de preparación de CSTFB en la Sección 10.4 para ver las instrucciones sobre el manejo de problemas con los volúmenes de DGM cuando se presenten).
 - 13.2.5. Reúna la misma cantidad de tubos para centrifuga nuevos, cónicos, de 50 ml, estériles, graduados, de polipropileno como CSTFB preparados para su uso (consulte la Sección 13.2.2). Estos tubos “de lavado” se utilizarán para las células obtenidas y los siguientes pasos de lavado.

Tamaño de CSTFB (ml)	Tamaño del tubo para centrifuga cónico (ml)
50	50

- 13.2.6. Si se requiere reemplazar el plasma, reúna un tubo para centrifuga cónico, de 15 o 50 ml, estéril, graduado, de polipropileno adecuado para el volumen requerido de plasma que se obtendrá. Etiquételo con PTID, anticoagulante y derivado.

- 13.2.7. Si los tubos de muestra están fríos al tacto (debido a condiciones ambientales frías, como traslado en meses fríos), permita que los tubos alcancen la temperatura ambiente (de 15 a 25 °C o hasta 30 °C, según las condiciones climáticas) antes de procesarlos.
- 13.2.8. Revise cuidadosamente el PTID de todos los tubos de sangre recibidos. Organice los tubos primarios de forma que no haya posibilidad de mezclar tubos entre PTID/PID o anticoagulantes.
Sugerencia: Coloque todos los tubos para cada PTID/anticoagulante en una gradilla. Se pueden utilizar distintas gradillas para separar los PTID o tipos de tubo y utilizar marcadores de colores distintos para cada PTID para evitar confusiones.

13.3. Reemplazo de plasma.

Nota: Realice este paso de reemplazo de plasma únicamente si se requieren alícuotas de plasma de los tubos de extracción de PBMC de acuerdo con el protocolo o los SPLI/LPC/LM. Continúe con el paso 13.4 si no se requieren alícuotas de plasma.

- 13.3.1. Los tubos de extracción de sangre del mismo PTID y el mismo anticoagulante deben procesarse de manera individual (no deben mezclarse en tubos para centrífuga cónicos, de 50 ml) a menos que se indique lo contrario en los SPLI/LPC/LM específicos del protocolo.
- 13.3.2. Marque el volumen de sangre completa en cada tubo de extracción en el menisco.
- 13.3.3. Centrifugue la sangre completa a entre 200 y 400 x g durante 10 minutos. Registre la hora de inicio del procesamiento en la hoja de trabajo de PBMC.
- 13.3.4. Transfiera el plasma a un tubo para centrífuga cónico, de 15 o 50 ml, etiquetado para realizar un segundo centrifugado que elimine cualquier residuo de células.
- 13.3.5. Agregue una cantidad suficiente de WDR para regresar la sangre a su volumen original de sangre completa, mezcle con cuidado y continúe el procesamiento de PBMC en el paso 13.4.
- 13.3.6. Complete el procesamiento de plasma centrifugando el plasma obtenido entre 800 y 1200 x g durante 10 minutos para obtener alícuotas de PL2 o según el protocolo o los SPLI/LPC/LM. Este paso puede realizarse después, cuando la centrífuga no se esté utilizando para el procesamiento de PBMC.
- 13.3.7. Divida el plasma doblemente centrifugado en alícuotas y colóquelas en tubos de alícuotas etiquetados como se especifica en los SPLI/LPC/LM específicos para el protocolo y deseche el residuo de células.

13.4. Dilución de sangre para la separación de CSTFB.

Nota: La relación máxima entre sangre y WDR debe ser de aproximadamente 2:1. Utilice un tubo de 50 ml por cada 12 a 20 ml de sangre completa. Utilice tantos tubos CSTFB como sea necesario para distribuir toda la sangre para cada PID/PTID.

Nota: El medio de gradiente de densidad es tóxico para las células; trabaje con rapidez y eficacia durante los pasos de separación.

- 13.4.1. Etiquete cada CSTFB y tubo “de lavado” para centrífuga cónico y estéril correspondiente con el PTID (y anticoagulante, si corresponde).
- 13.4.2. Con una pipeta serológica estéril, agregue WDR a cada CSTFB etiquetado y preparado:

Tamaño de CSTFB (ml)	Volumen aproximado de WDR (ml)
50	5

- 13.4.3. Con una pipeta serológica estéril, agregue WDR a cada tubo “de lavado” para centrífuga cónico, estéril, previamente etiquetado:

Tamaño de CSTFB (ml)	Tamaño del tubo para centrífuga cónico (ml)	Volumen de prellenado con WDR (ml)
50	50	25

- 13.4.4. Destape los tubos de sangre con anticoagulante. Si no se requirieron/realizaron los pasos para el reemplazo de plasma, registre la hora en la que retira la tapa como la hora de inicio del procesamiento en la hoja de trabajo de PBMC.
- 13.4.5. Si la sangre en un tubo de extracción está coagulada o muy hemolizada, consulte la Sección 6.3.
- 13.4.6. Utilice una pipeta serológica estéril para mezclar la sangre completa con cuidado y luego transfiera la sangre en los CSTFB etiquetados.

Nota: La sangre debe transferirse con una pipeta serológica de 10 ml en cantidades medidas de 10.0 ml a menos que sobre menos de 10.0 ml. Distribuya la sangre en tubos CSTFB en incrementos fijos para asegurar el seguimiento preciso de los volúmenes para la medición de UWV a lo largo de la distribución de la sangre completa.

- 13.4.7. Transferencia objetivo de 15 a 20 ml de cantidad total de sangre para cada CSTFB etiquetado. (El rango ampliado que aparece abajo se permite únicamente en determinadas situaciones en las que el rango objetivo no es posible). No comience a llenar un CSTFB nuevo de 50 ml a menos que esté disponible/sobre un mínimo de 12 ml de sangre.

Tamaño de CSTFB (ml)	Volumen aproximado de sangre (ml)*
50	De 15 a 20 (se permite de 12 a 22 en determinados escenarios)

*Los volúmenes de sangre menores, especialmente en presencia de una baja cantidad de hematocritos, pueden hacer que la capa leucoplaquetaria descienda hasta quedar cerca del material sintetizado o sobre este, lo que dificulta la obtención. Los volúmenes de sangre mayores pueden hacer que haya más partículas/fondo en las muestras. En el caso de tener volúmenes de extracción de sangre menores, consulte las pautas específicas del protocolo.

- 13.4.8. Determine y registre una medición precisa del volumen de sangre completa utilizable dentro de 0.1 ml.

Nota: El volumen de sangre completa utilizable no necesariamente equivale al tamaño del tubo.

- 13.4.9. Con una pipeta estéril, enjuague cada tubo de sangre con anticoagulante original con WDR, agregue volúmenes de enjuague a los CSTFB y asegúrese de no superar el límite del volumen total del tubo (WDR más sangre completa).

Tamaño de CSTFB (ml)	Límite del volumen total del tubo (ml) (sangre completa más WDR)
50	30

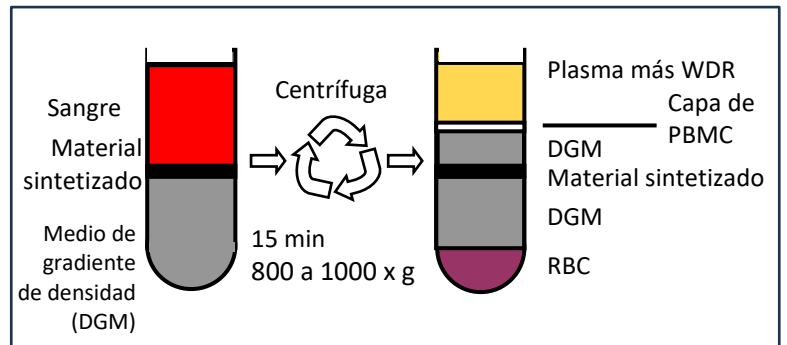
- 13.4.10. Tape el CSTFB con cuidado.

13.5. Centrifugado y obtención de densidad de CSTFB.

- 13.5.1. Sostenga los tubos en posición vertical y colóquelos en una gradilla y transfíralos a la centrífuga.
- 13.5.2. Centrifugue a entre 800 y 1000 x g durante 15 minutos a una temperatura de entre 15 y 25 °C (o hasta 30 °C, según las condiciones climáticas) con el freno DESACTIVADO/configurado a cero.
- Nota:** Si el freno está activado, afectará las capas.
- 13.5.3. Mientras los tubos CSTFB están girando, deseche todos los tubos de extracción vacíos siguiendo las prácticas de laboratorio, limpie la superficie de BSC y organícese para los siguientes pasos.
- 13.5.4. Confirme que está lista la cantidad correcta de tubos para centrífuga cónicos, estériles, etiquetados y prellenados con WDR (tubos “de lavado”) en el BSC para los pasos de obtención/lavado.
- 13.5.5. Cuando la centrífuga se detenga por completo, retire con cuidado cada CSTFB de la centrífuga para no alterar las capas. Utilice una gradilla para sostener los tubos y transfíralos con cuidado al BSC.

13.5.6. La centrifugación tiene como resultado que los contenidos del tubo se dividan en seis capas distintas, incluido el material sintetizado. Desde la parte superior del tubo, las capas son las siguientes:

- Plasma más WDR
- Capa de PBMC
- Medio de gradiente de densidad (DGM)
- Material sintetizado
- Medio de gradiente de densidad (DGM)
- Concentrado de eritrocitos (*red blood cells*, RBC) y granulocitos



13.5.7. Inspeccione los tubos para detectar los siguientes problemas posibles. Registre las observaciones y cualquier medida de seguimiento tomada según los requisitos de la red y del laboratorio.

- Hemólisis en la capa de plasma más WDR.
- Coágulos visibles en el material sintetizado después del centrifugado.
- Capa deficiente de PBMC debido a errores en el centrifugado, como tiempo de velocidad o frenado. La capa de PBMC parecerá pequeña y poco definida mientras que la capa de plasma más WDR puede estar ligeramente turbia. Consulte el [Apéndice C](#) para la solución de problemas.
- Capa de PBMC formada en el material sintetizado debido a un recuento de RBC o volumen de hematocrito bajos.
- Capa de RBC inmediatamente debajo de la capa de PBMC y en contacto con esta.

13.5.8. Con una pipeta serológica nueva y estéril para cada PTID, retire la fracción amarillenta de plasma con WDR que se encuentra en la parte superior hasta llegar a, aproximadamente, 1 a 2 cm de la banda blanca turbia de PBMC ubicada en la interfaz entre la fracción de plasma con WDR (amarillenta) y la solución de medio de separación transparente. Tenga cuidado de no alterar la capa celular durante este proceso. Deseche la fracción de plasma con WDR según la política del laboratorio.

Nota: Como alternativa, inserte con cuidado la pipeta a través de la capa superior de plasma con WDR para retirar la banda blanca turbia de PBMC.

13.5.9. Con una pipeta serológica estéril, extraiga todas las células en la interfaz blanca turbia que se encuentra encima del material sintetizado. Tenga cuidado de no aspirar más medio de gradiente de densidad del necesario.

13.5.9.1. Transfiera las células obtenidas de un CSTFB a un único tubo “de lavado” para centrífuga cónico, estéril, previamente etiquetado correspondiente (preparado como se establece en la Sección 13.4). Los tubos están prellenados con WDR para ahorrar tiempo.

13.5.10. Vuelva a tapar el CSTFB que contiene los glóbulos rojos restantes y el medio de separación. Deseche el CSTFB como desperdicio de riesgo biológico, siguiendo la política del laboratorio.

13.6. Asegúrese de que todos los elementos clave estén registrados según los requisitos de la red y del laboratorio. Continúe con la sección 15.

14. Separación celular por método manual de colocación por encima o por debajo del medio de gradiente de densidad y dilución de sangre con reemplazo de plasma mediante separación celular manual con gradiente de densidad

La Sección 14 puede utilizarse para todas las redes. Revise los requisitos del protocolo y los materiales disponibles. Para cualquier muestra, utilice la Sección 13 o 14, pero no ambas.

Nota para HVTN: HVTN no recomienda el uso del método de colocación por debajo del medio de gradiente de densidad. Debe obtenerse la aprobación previa para utilizar el método de colocación por debajo del medio de gradiente de densidad por parte del centro de laboratorio de HVTN antes de utilizarlo en muestras del protocolo.

14.1. Separación de linfocitos de la sangre periférica mediante el método manual de colocación por encima del medio de gradiente de densidad.

- 14.1.1. Realice todo el trabajo con pipeta y mezcle en un gabinete de bioseguridad de clase II (BSC) de nivel 2 en adelante.
- 14.1.2. Rocíe todas las superficies, gradillas y frascos de reactivos con etanol al 70 % v/v cada vez antes de ingresar y utilizar el BSC.
- 14.1.3. A menos que se indique lo contrario, el procedimiento se realiza a temperatura ambiente (de 15 a 25 °C o hasta 30 °C, según las condiciones climáticas).
- 14.1.4. Utilice una pipeta nueva para cada número de identificación del participante (PTID) y aditivo.

14.2. Prepare las muestras de sangre completa, los reactivos y los suministros.

14.2.1. Prepare y enfríe la CPS (consulte la Sección 11, Preparación de reactivos) antes de procesar o con suficiente antelación antes de mezclar con PBMC, si se necesita más CPS.

Nota: Los lotes de CPS deben prepararse antes de comenzar con los pasos de procesamiento de muestras. Se deben controlar los volúmenes de lotes y, cuando sea necesario, se debe capturar la creación de lotes adicionales con todos los detalles en la hoja de trabajo de PBMC.

- 14.2.2. Permita que el medio de gradiente de densidad llegue a temperatura ambiente (de 15 a 25 °C o hasta 30 °C, según las condiciones climáticas). Consulte la Sección 10 Reactivos para obtener más información.
- 14.2.3. Reúna suficientes tubos para centrífuga cónicos, de 50 ml, estériles, graduados, de polipropileno para todos los pasos de dilución, lavado y métodos de colocación por encima y por debajo del medio de gradiente de densidad.
- 14.2.4. Si se requiere reemplazar el plasma, reúna un tubo para centrífuga cónico, de 15 o 50 ml, estéril, graduado, de polipropileno adecuado para el volumen requerido de plasma que se obtendrá. Etiquételo con PTID, anticoagulante y derivado.
- 14.2.5. Si los tubos de muestra están fríos al tacto (debido a condiciones ambientales frías, como traslado en meses fríos), permita que los tubos alcancen la temperatura ambiente (de 15 a 25 °C o hasta 30 °C, según las condiciones climáticas) antes de procesarlos.
- 14.2.6. Revise cuidadosamente el PTID de todos los tubos de sangre recibidos. Organice los tubos primarios de forma que no haya posibilidad de mezclar tubos entre PTID o anticoagulantes dentro de la extracción de PTID.
Sugerencia: Coloque todos los tubos para cada PTID/anticoagulante en una gradilla. Se pueden utilizar distintas gradillas para separar los PTID o tipos de tubo y utilizar marcadores de colores distintos para cada PTID para evitar confusiones.
- 14.2.7. Determine y registre una medición precisa del volumen de sangre completa utilizable dentro de 0.1 ml con una pipeta serológica de 10 ml (u otro método aprobado por la red). Como recordatorio, el volumen de sangre completa utilizable no necesariamente equivale al tamaño del tubo.

Nota para HVTN: No se permite el uso de tubos de referencia o tubos cónicos con fines de medición.

14.3. Reemplazo de plasma.

Nota: Realice este paso de reemplazo de plasma únicamente si se requieren alícuotas de plasma de los tubos de extracción de PBMC de acuerdo con el protocolo o los SPLI/LPC/LM. Continúe con el paso 14.4 si no se requieren alícuotas de plasma.

- 14.3.1. Los tubos de extracción de sangre del mismo PTID y el mismo anticoagulante pueden procesarse de manera individual o mezclarse en tubos para centrifuga cónicos de 50 ml (no se permite que se mezclen para HVTN).
 - 14.3.2. Marque el volumen de sangre completa en cada tubo de extracción en el menisco.
 - 14.3.3. Centrifugue la sangre completa a entre 200 y 400 x g durante 10 minutos. Registre la hora de inicio del procesamiento en la hoja de trabajo de PBMC.
 - 14.3.4. Transfiera el plasma a un tubo para centrifuga cónico, de 15 o 50 ml, etiquetado para realizar un segundo centrifugado que elimine cualquier residuo de células.
 - 14.3.5. Agregue una cantidad suficiente de WDR para llevar la sangre nuevamente a su volumen original de sangre completa, mezcle suavemente y continúe el procesamiento de PBMC en el paso 14.4.
 - 14.3.6. Complete el procesamiento de plasma centrifugando el plasma obtenido entre 800 y 1200 x g durante 10 minutos para obtener alícuotas de PL2 o según los SPLI/LPC/LM específicos para el protocolo. Este paso puede realizarse después, cuando la centrifuga no se esté utilizando para el procesamiento de PBMC.
 - 14.3.7. Divida el plasma doblemente centrifugado en alícuotas y colóquelas en tubos de alícuotas etiquetados como se especifica en los SPLI/LPC/LM específicos para el protocolo y deseche el residuo de células.
- 14.4. Dilución de sangre para la separación celular manual con medio de gradiente de densidad.
- 14.4.1. Destape los tubos de sangre con anticoagulante. Si no se requirieron/realizaron los pasos para el reemplazo de plasma, registre la hora en la que retira la tapa como la hora de inicio del procesamiento en la hoja de trabajo de PBMC.
 - 14.4.2. Si un tubo está muy coagulado o hemolizado, consulte la Sección 6.3.

Nota: Se permite que se mezclen capas leucoplaquetarias de acuerdo con las pautas en el [Apéndice D](#): Combinación de capas leucoplaquetarias para el aislamiento de PBMC en medios de gradiente de densidad. Para mezclar las capas leucoplaquetarias, reemplace los pasos 14.4.3 y 14.4.4 con las instrucciones que aparecen en el [Apéndice D](#).

- 14.4.3. Etiquete cada tubo para centrifuga cónico con el PTID y anticoagulante.

Tamaño del tubo para centrifuga cónico (ml)	Volumen aproximado de sangre (ml)
50	De 12 a 22
15	De 4 a 5

- 14.4.4. Transfiera la sangre a un tubo para centrifuga cónico, de 15 o 50 ml, estéril y etiquetado y agregue un volumen suficiente de WDR para diluir la sangre de acuerdo con el prospecto del medio de gradiente de densidad (la relación máxima entre la sangre y el diluyente debe ser 2:1).
- 14.5. Para la separación celular con gradiente de densidad:

Nota: Utilice el método de colocación por encima del medio de gradiente de densidad (Sección 14.5.1) o el método de colocación por debajo del medio de gradiente de densidad (Sección 14.5.2), pero no ambos.

- 14.5.1. Método de colocación por encima del medio de gradiente de densidad:

- 14.5.1.1. Prepare un tubo para centrifuga cónico, estéril y etiquetado para cada tubo que contenga sangre diluida.
- 14.5.1.2. Agregue el volumen apropiado de medio de gradiente de densidad a los tubos para centrifuga cónicos vacíos y estériles.

Nota: El volumen del medio de gradiente de densidad dependerá de la proporción del medio de gradiente de densidad con la sangre diluida que recomienda el fabricante.

- 14.5.1.3. Con una pipeta, coloque la sangre diluida sobre el medio de gradiente de densidad de manera cuidadosa y lenta.

Sugerencia: Con cuidado, permita que la mezcla de sangre diluida con WDR baje por el costado del tubo y se acumule por encima de la superficie del medio de gradiente de densidad sin romper el plano de la superficie.

14.5.1.4. Tape los tubos con cuidado. Continúe con la Sección 14.6.

14.5.2. Método de colocación por debajo del medio de gradiente de densidad:

14.5.2.1. Mezcle bien y con cuidado para reducir la aglutinación de las células durante la separación.

Opcional: Agregue otro volumen de WDR igual al volumen total de sangre a la sangre completa o a la mezcla de sangre con WDR.

14.5.2.2. Según el volumen de sangre diluida con WDR, determine el volumen de medio de gradiente de densidad que se requiere para cada tubo.

Nota: El volumen del medio de gradiente de densidad dependerá de la proporción del medio de gradiente de densidad con la sangre diluida que recomienda el fabricante.

14.5.2.3. De manera cuidadosa y lenta, coloque con una pipeta la solución de medio de gradiente de densidad DEBAJO de la mezcla de sangre y WDR.

14.5.2.4. Tape los tubos con cuidado. Continúe con la Sección 14.6.

14.6. Centrifugado y obtención de densidad de linfocitos:

14.6.1. Sostenga los tubos en posición vertical y colóquelos en una gradilla y transfíralos con cuidado a la centrífuga.

14.6.2. Centrifugue a 400 x g durante 30 minutos a una temperatura de entre 15 y 25 °C (o hasta 30 °C, según las condiciones climáticas) con el freno DESACTIVADO/configurado a cero o según se indique en el prospecto que acompaña al medio de gradiente.

Nota: Si el freno está activado, afectará las capas. El freno de la centrífuga debe estar APAGADO para que la separación sea limpia y para aumentar al máximo la recuperación de las PBMC.

14.6.3. Mientras los tubos cónicos están girando, deseche todos los tubos de extracción vacíos siguiendo las prácticas de laboratorio, limpie la superficie de BSC y organícese para los siguientes pasos.

14.6.4. Etiquete (con el PTID/anticoagulante) la misma cantidad y tamaño de tubos nuevos para centrífuga cónicos y estériles como tubos para centrífuga cónicos que se utilizan en el paso de centrifugado de separación. Utilice estos tubos nuevos para los siguientes pasos de obtención de células y lavado.

14.6.5. Con una pipeta estéril, agregue WDR a cada tubo “de lavado” para centrífuga cónico, estéril, previamente etiquetado:

Tamaño del tubo para centrífuga cónico (ml)	Volumen de prellenado de WDR (ml)
50	25
15	5

14.6.6. Cuando la centrífuga se detenga por completo, retire con cuidado cada tubo cónico de la centrífuga para no alterar las capas. Utilice una gradilla para sostener los tubos y transfíralos con cuidado al BSC.

14.6.7. Si la capa celular no es visible, confirme que la centrífuga funcione de manera adecuada. Corrija cualquier problema que encuentre. Vuelva a centrifugar el tubo. Registre el problema y las medidas tomadas según los requisitos de la red y del laboratorio.

14.6.8. Documente la hemólisis o los coágulos pequeños visibles en la interfaz celular.

Nota: Después de centrifugar, busque signos de hemólisis o coágulos. Califique la hemólisis de +1 a +4 con base en la descripción incluida en el glosario. Registre sus observaciones.

14.6.9. Con una pipeta estéril nueva (serológica o de transferencia) para cada PTID, retire la fracción amarillenta de plasma con WDR que se encuentra en la parte superior hasta llegar a, aproximadamente, 1 a 2 cm de la banda blanca turbia de PBMC ubicada en la interfaz entre la fracción de plasma con WDR (amarillenta) y la solución de medio de separación transparente. Tenga cuidado de no alterar la capa celular durante este proceso. Deseche la fracción de plasma con WDR según la política del laboratorio.

Nota: Como alternativa, inserte con cuidado la pipeta a través de la capa superior de plasma con WDR para retirar la banda blanca turbia de PBMC.

- 14.6.10. Con una pipeta serológica o de transferencia estéril, extraiga todas las células en la interfaz blanca turbia. Tenga cuidado de no aspirar más solución del medio de separación del necesario.
- 14.6.11. Transfiera las células obtenidas de un tubo para centrifuga cónico a un solo tubo para centrifuga cónico, estéril, previamente etiquetado correspondiente. Los tubos pueden llenarse previamente con WDR para ahorrar tiempo (Sección 14.6. 5).
- 14.6.12. Vuelva a cerrar el tubo para centrifuga cónico que contiene los glóbulos rojos/medio de separación sobrantes y deseche el tubo como desecho de riesgo biológico siguiendo la política del laboratorio.
- 14.7. Asegúrese de que todos los elementos clave estén registrados según los requisitos de la red y del laboratorio. Continúe con la Sección 15.

15. Lavado, recuento, nueva suspensión, concentración y congelamiento a una temperatura controlada durante la noche

15.1. Lavado 1:

- 15.1.1. Agregue WDR en QS (aumente el volumen de la fracción de PBMC) para obtener aproximadamente 45 ml (para tubos para centrifuga cónicos de 50 ml) o 10 ml (para tubos para centrifuga cónicos de 15 ml). Mezcle con cuidado.
- 15.1.2. Vuelva a cerrar todos los tubos cónicos que ahora contienen las células obtenidas diluidas en WDR.
- 15.1.3. Centrifugue las células diluidas a entre 200 y 400 x g durante 10 minutos a una temperatura de entre 15 y 25 °C (o hasta 30 °C, según las condiciones climáticas). El nivel de freno bajo es opcional.
- 15.1.4. Retire los tubos de la centrifuga y revise la presencia de sedimento celular.
 - 15.1.4.1. Si no hay sedimento celular visible, confirme que la centrifuga funcione de manera adecuada y corrija la configuración empleada. Corrija cualquier problema que encuentre. Vuelva a centrifugar los tubos. Registre el problema y las medidas tomadas según los requisitos de la red y del laboratorio. Si todavía no se encuentra visible el sedimento celular después de volver a centrifugar el tubo, siga con los pasos de procesamiento y documente los detalles en la hoja de trabajo de procesamiento.
- 15.1.5. Retire y deseche el sobrenadante de WDR con cuidado sin alterar el sedimento celular; para ello, decante rápidamente en el contenedor para desechos líquidos designado en el BSC. Se pueden utilizar métodos alternativos, como eliminación con pipeta serológica o aspiración, para los sedimentos celulares que están sueltos o que contienen grandes cantidades de glóbulos rojos.

15.2. Lavado 2:

- 15.2.1. Vuelva a suspender cada sedimento en un volumen pequeño de WDR. Mezcle bien y con cuidado hasta obtener una suspensión celular homogénea.

Tamaño del tubo (ml)	Volumen de la nueva suspensión con WDR (ml)
50	≤ 5
15	≤ 3

- 15.2.2. Combine las suspensiones de sedimento del mismo PTID/anticoagulante. Este es el tubo de células obtenidas.

Tamaño del tubo (ml)	Cantidad de suspensiones de sedimento a combinar	Volumen total (ml)
50	≤ 4	≤ 20
15	≤ 2	≤ 6

- 15.2.3. Utilice un volumen pequeño de WDR para enjuagar los tubos desde el que se transfirieron los sedimentos. Obtenga el enjuague de WDR en el tubo de células obtenidas.

- 15.2.4. Agregue WDR en QS a la fracción de PBMC y mezcle con cuidado.

Tamaño del tubo (ml)	Volumen de QS (ml)
50	≤ 45
15	≤ 10

- 15.2.5. Vuelva a cerrar los tubos y colóquelos en la centrífuga.
- 15.2.6. Centrifugue las células diluidas a entre 200 y 400 x g durante 10 minutos a una temperatura de entre 15 y 25 °C (o hasta 30 °C, según las condiciones climáticas). El nivel de freno bajo es opcional.
- 15.2.7. Retire los tubos de la centrífuga y revise la presencia de sedimento celular.

Nota: Si el sedimento celular no es visible, confirme que la centrífuga funcione de manera adecuada. Corrija cualquier problema y vuelva a centrifugar el tubo. Registre el problema y las medidas tomadas según los requisitos de la red y del laboratorio. Si todavía no se encuentra visible el sedimento celular después de volver a centrifugar el tubo, siga con los pasos de procesamiento y documente los detalles en la hoja de trabajo de procesamiento.

- 15.2.8. Retire y deseche el sobrenadante de WDR con cuidado sin alterar el sedimento celular; para ello, decante rápidamente en el contenedor para desechos líquidos designado en el BSC. Se pueden utilizar métodos alternativos, como eliminación con pipeta serológica o aspiración, para los sedimentos celulares que están sueltos o que contienen grandes cantidades de glóbulos rojos.

15.3. Recuento de células PBMC.

- 15.3.1. Determine y registre el volumen (V) de la nueva suspensión para el recuento de WDR exacto dentro de 0.1 ml. El volumen es importante porque en este se basa el recuento de células.

Nota: En casi todos los casos, el volumen (V) de la nueva suspensión para el recuento es del 20 % del volumen medido de sangre completa utilizable redondeado al mililitro entero más próximo (registrado X.0).

Ejemplo: El volumen medido de sangre completa utilizable es registrado como 78.6 ml. El volumen de la nueva suspensión para el recuento sería de 16.0 ml ($78.6 \times 20\% = 15.72$. Se redondea 15.72 al número entero más cercano que es 16.0 ml).

Ejemplos de escenarios en donde se puede modificar V:

- El V calculado excede ligeramente la capacidad del tubo cónico. El UWBV se mide y registra como 255.2 ml. El 20 % redondeado al número entero más cercano es 51.0 ml. En este escenario, se puede reducir V a 45.0 ml para permitir mezclar de manera segura y posteriormente centrifugar en un tubo cónico de 50 ml.
- La muestra del participante tiene como resultado bandas celulares muy tenues y, por consiguiente, sedimentos celulares considerablemente pequeños. En este escenario, se puede reducir V para evitar recuentos de células fuera de rango.

- 15.3.2. Si hay más de un sedimento del mismo PTID/anticoagulante, utilice una cantidad pequeña medida/rastreada de WDR para volver a suspender con cuidado y combinar los sedimentos celulares en un tubo. Con el volumen de la nueva suspensión sobrante, enjuague los tubos de donde se transfirieron las células. Agregue el enjuague al tubo que contiene la suspensión de células.

- 15.3.3. Mezcle las células bien y con cuidado, inmediatamente antes de obtener las muestras para el recuento de células.

- 15.3.4. Transfiera un volumen pequeño de la nueva suspensión a un tubo pequeño para el recuento. Siga la guía del SOP para instrumentos o recuentos para los volúmenes adecuados.

Nota: Si es necesario repetir los recuentos, reduzca el volumen de muestra necesario.

- 15.3.5. Siga el SOP para el método de recuento de células aprobado en el laboratorio de procesamiento para determinar la concentración celular x 10^6 por ml.

Nota: Células a $10^3/\mu\text{l} = \text{células a } 10^6/\text{ml}$.

Nota: Los recuentos automáticos pueden realizarse una vez. Los recuentos manuales deben contar al menos los cuatro cuadrados grandes de las esquinas (1 mm^2).

- 15.3.6. Calcule la cantidad total de células con la siguiente fórmula:

$$T = C \times V$$

T = Cantidad total de células

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

V= Volumen de la nueva suspensión para el recuento de WDR en ml

- 15.3.7. Calcule el rendimiento celular en células/ml de sangre completa utilizable mediante la siguiente fórmula.

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

Nota: Calcule el rendimiento celular con fines de calidad. Consulte la Sección 16 Control de calidad para obtener el rango previsto de rendimientos celulares y consejos de solución de problemas.

15.4. Cálculo del volumen final de la nueva suspensión

- 15.4.1. Calcule el volumen de la nueva suspensión congelada en CPS requerido. Para ello, realice los pasos a continuación para obtener la concentración final de células objetivo.

Nota: La concentración final de células objetivo varía según la red y el protocolo. Consulte el protocolo o los SPLI/LPC/LM específicos para el protocolo con el fin de obtener información sobre la concentración final de células objetivo.

- 15.4.2. Calcule el volumen (V1) de la nueva suspensión congelada en CPS estimado requerido. Para ello, obtenga la concentración final de células objetivo.

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

T = Cantidad total de células

N1 = Concentración final de células objetivo

V2 = Volumen final de la alícuota en ml

Redondee el V1 al mililitro entero más cercano (1.0) para determinar V_f .

- 15.4.3. Calcule la cantidad real de células por vial (N2) utilizando el volumen congelado en CPS real (V_f) determinado en el cálculo anterior.

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

N2 = Cantidad real de células por vial

T = Cantidad total de células

V2 = Volumen final de la alícuota en ml (1.0 ml a menos que se indique lo contrario en la documentación específica del protocolo).

15.5. Etiquetado.

- 15.5.1. Complete la impresión, el control de calidad y el etiquetado de los crioviales ANTES de la centrifugación final.

Nota: Es importante reducir al mínimo el tiempo que las células permanecen en un sedimento.

- 15.5.2. Genere las etiquetas de crioviales mediante el LDMS.

15.5.2.1. Siga las prácticas de laboratorio de la red para llenar el ingreso de datos.

15.5.2.2. ANTES de etiquetar el criovial, verifique que cada tipo derivado de etiqueta de criovial no tenga errores de ingreso de datos. Para ello, compárelas con la solicitud de laboratorio y con la hoja de trabajo de procesamiento.

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

15.5.2.4. Corrija cualquier error de ingreso de datos en el LDMS y vuelva a imprimir las etiquetas según sea necesario.

- 15.5.3. Coloque las etiquetas en los crioviales de forma que el contenido del tubo sea visible.

15.5.4. Escanee los crioviales vacíos y etiquetados en orden secuencial de GSID en el módulo de almacenamiento del LDMS para asegurarse de que el código de barras puede escanearse. En este paso, se combina la verificación de la capacidad para escanear y la asignación de las ubicaciones de almacenamiento.

Nota: Se recomienda ampliamente el uso de gradillas Nunc para permitir abrir/cerrar los viales con una mano. No coloque las tapas de los crioviales en ninguna superficie.

15.6. Centrifugado final.

Nota: Si se congelan las células como sedimentos de PBMC no viables (PEL) y como células viables, retire el volumen de PBMC necesario para crear sedimentos celulares no viables antes del paso de centrifugación final y complete el procesamiento de los sedimentos celulares no viables y siga las instrucciones específicas del protocolo para los sedimentos de PBMC no viables.

- 15.6.1. Agregue WDR en QS (aumente el volumen de la suspensión celular) para obtener 45 ml y coloque los tubos cónicos que contienen las células obtenidas y diluidas en la centrífuga.
- 15.6.2. Centrifugue las células diluidas a entre 200 y 400 x g durante 10 minutos a una temperatura de entre 15 y 25 °C (o hasta 30 °C, según las condiciones climáticas). El freno es opcional.
- 15.6.3. Verifique que todos los crioviales estén etiquetados y sean de fácil acceso.
- 15.6.4. Seleccione el equipo de congelamiento a temperatura controlada: StrataCooler®, Mr. Frosty™, CoolCell®. Etiquete los equipos de congelamiento de manera adecuada para permitir que el personal del laboratorio determine su contenido. Asegúrese de que el equipo se encuentra a la temperatura correcta para su uso en el momento de crear viales y que sea de fácil acceso justo antes de retirar los sedimentos celulares finales de la centrífuga. Consulte la Sección 7.5 para obtener información sobre el almacenamiento y el mantenimiento.

15.7. División en alícuotas para la crioconservación.

Nota: Los siguientes pasos deben realizarse de manera rápida para conservar la integridad de las células.

- 15.7.1. Retire y deseche el sobrenadante de WDR con cuidado sin alterar el sedimento celular; para ello, decante rápidamente en el contenedor para desechos líquidos designado en el BSC. Se pueden utilizar métodos alternativos, como eliminación con pipetas serológicas o aspiración, para los sedimentos celulares que están sueltos o que contienen grandes cantidades de glóbulos rojos.

- 15.7.2. Vuelva a suspender los sedimentos usando el volumen de CPS frío (V_f) que se determinó en la Sección 15.4.

Nota: Está permitido enfriar previamente los viales y/o trabajar en hielo común.

Nota para HVTN: No es preferible enfriar previamente los crioviales ni trabajar en hielo común. El centro de laboratorios de HVTN debe aprobar esto antes de utilizarlo con muestras de la red HVTN.

- 15.7.2.1. Con cuidado, vuelva a suspender los sedimentos celulares antes de agregar la CPS mediante golpecitos en el tubo, agitando la gradilla o usando una pipeta.
- 15.7.2.2. HVTN recomienda volver a suspender el sedimento con el mismo volumen medido/rastreado de CPS empleado en los pasos anteriores para la nueva suspensión del sedimento. Recuerde restar este volumen del volumen final total de CPS que se agregará si el volumen final total de la nueva suspensión de CPS es mayor al volumen utilizado para volver a suspender el sedimento.
- 15.7.2.3. Con cuidado, agregue la CPS a las células suspendidas nuevamente agitando de manera continuo.
- 15.7.3. Trabaje rápidamente cuando se haya agregado la CPS. No permita que las células permanezcan en la solución de congelación durante más de 10 minutos antes de colocarlas en el congelador.
- 15.7.4. Mezcle la suspensión con cuidado pero de manera rápida con una pipeta serológica antes de dividirla en alícuotas. Mantenga la suspensión durante el proceso de creación de viales.
 - 15.7.4.1. Divida en alícuotas de 1.0 ml por criovial, a menos que se indique lo contrario en los SPLI/LPC/LM específicos para el protocolo.

Nota: Distribuya de manera uniforme cualquier excedente de volumen entre todos los crioviales para ese PTID.

15.8. Congelación a temperatura controlada durante la noche.

- 15.8.1. Después del procesamiento y el recuento, realice los pasos requeridos para congelar las células de inmediato.
- 15.8.2. Coloque el equipo de congelamiento a temperatura controlada seleccionada para las transferencias: StrataCooler® de Agilent Technologies, Nalgene® Mr. Frosty™, Corning® CoolCell®. Consulte la Sección 7.5 para obtener información sobre el almacenamiento y el mantenimiento.

15.8.3. Transfiera de inmediato todos los crioviales al equipo de congelación a temperatura controlada en orden secuencial de ID de la muestra global.

Para todos los CRFU, Nalgene® Mr. Frosty™, Corning® CoolCell® y StrataCooler® de Agilent Technologies, cierre el contenedor y colóquelo en un congelador a -80 °C (de -65 a -95 °C para ACTG, de -70 a -95 °C para HVTN y HPTN), en un lugar que no se vea afectado por el acceso repetido al congelador (es decir, lejos de la parte frontal o superior del congelador, cerca de la puerta/tapa de apertura). No los apile. Se recomienda que todos los CRFU permanezcan en el congelador durante toda la noche.

En el caso de CryoMed® u otro equipo de congelación mecánico a temperatura controlada, comience el programa de enfriamiento de acuerdo con el SOP apropiado de la institución. (Nota para HVTN: Los congeladores de temperatura controlada no están permitidos para las muestras de HVTN).

15.8.4. Registre la fecha/hora de congelamiento de inmediato en la hoja de trabajo de PBMC. Ingrese la fecha/hora de congelamiento registrada en la hoja de trabajo en el LDMS.

15.9. Documente todos los elementos clave según los requisitos de la red y del laboratorio.

16. Control de calidad

16.1. Rendimientos celulares.

Es importante estar consciente de la recuperación esperada para la población de participantes para la que se realiza el procesamiento. Los rendimientos celulares pueden servir como marcadores de control de calidad internos para cada ejecución. Los rendimientos que estén fuera de los valores esperados pueden indicar un error en el procedimiento, deterioro del reactivo, error en el recuento celular o en el cálculo.

Nota: Las recomendaciones que se brindan a continuación tienen el objetivo de brindar pautas para ayudar a identificar errores técnicos graves antes de la crioconservación. Estos valores pueden variar según el anticoagulante que se utilice.

16.1.1. Rendimientos celulares esperados para poblaciones adultas:

Población	Rango de rendimientos celulares mononucleares (células/ml)
Adultos	(De 0.8 a 3.2) x 10 ⁶

16.1.2. Rendimientos celulares inesperados.

16.1.2.1. Si los rendimientos celulares están fuera del rango esperado, revise los esquemas de dilución, los cálculos, las técnicas de procesamiento (especialmente que la mezcla de suspensiones para el recuento celular sea adecuada) y el historial de PTID si está disponible para determinar las causas posibles.

16.1.2.2. Los rendimientos celulares de los participantes que viven con VIH pueden ser menores a los que se muestran en la tabla anterior.

16.1.2.3. Si se sospecha que hay errores de recuento o dilución celular, cree una dilución y un recuento nuevos.

16.1.3. Registre todos los resultados y cualquier problema que se presente durante el procesamiento y las medidas según los requisitos de la red y el laboratorio. Consulte la Sección 5 para conocer los detalles.

Nota para HVTN y HPTN: Registre cualquier problema y medida en la hoja de trabajo de procesamiento de PBMC de HVTN específica para el protocolo, las entradas para alícuotas en el LDMS y en la sección de comentarios sobre rendimiento celular del Programa de PBMC de HVTN de Atlas, si corresponde. Si tiene alguna duda, comuníquese con el centro de laboratorios de HVTN.

16.2. Viabilidad celular.

16.2.1. La viabilidad de PBMC recientemente aislado debe ser mayor al 95 %.

16.2.2. Si esta es menor al 95 %, revise los resultados con el supervisor y documente de acuerdo con los requisitos de la red y del laboratorio.

Nota: Si las muestras se preparan para el Programa de Análisis de Desempeño de Crioconservación de PBMC de IQA, se requiere un recuento de células viables.

17. Almacenamiento de PBMC (temporal o en la institución)

17.1. Mantenga la cadena de frío durante todos los pasos de transferencia para evitar dañar las células.

Nota para HVTN: Envíe en hielo seco al banco central de almacenamiento de muestras dentro de 1 semana de la extracción a menos que se indique lo contrario en las SPLI específicas para el protocolo de HVTN (la frecuencia de envío se basa en la región y depende de los requisitos del protocolo). Continúe a 17.2

Nota para HPTN: Siga las instrucciones que se brindan en el Manual de laboratorio específico para el protocolo.

Nota para ACTG: Envíe en hielo seco dentro de 4 semanas de la fecha de congelamiento a menos que se indique lo contrario en el LPC. Continúe a 17.2

17.2. Transfiera las PBMC a un almacenamiento temporal en un congelador a -80 °C.

17.2.1. Transfiera los crioviales del sistema de enfriamiento a temperatura controlada al lugar de almacenamiento designada a una temperatura de -65 a -95 °C para ACTG, de -70 a -95 °C para HVTN y HPTN.

17.2.2. Transfiera los crioviales después de un mínimo de 4 horas para Nalgene® Mr. Frosty™ y Corning® CoolCell® y durante la noche para StrataCooler® (se recomienda el almacenamiento durante la noche para todos los CRFU como práctica estándar para reducir el riesgo para las muestras). Para CryoMed®, transfiera los crioviales cuando finalice el programa al congelador a -80 °C.

Nota: Requisito para HVTN y HPTN, recomendación para ACTG: Se permite el uso de una bandeja de transferencia con hielo seco únicamente para los equipos de congelamiento a temperatura controlada. Se requiere el uso de hieleras previamente enfriadas de costados altos para el congelador de PBMC/cajas de almacenamiento. Consulte las pautas de la cadena de frío entre redes (Sección 7, Procedimientos de transferencia de muestras) para obtener detalles adicionales. Asegúrese de que la caja para el congelador para crioviales y la tapa estén cubiertos en todos los costados con hielo seco. Trabaje de manera rápida y eficiente para reducir al mínimo la exposición de los crioviales a la temperatura ambiente.

Nota: No almacene en nitrógeno líquido (LN₂). Almacene a una temperatura de -65 a -95 °C para ACTG, de -70 a -95 °C para HVTN y HPTN) hasta que se envíe.

Nota: Enfríe previamente el contenedor con hielo seco y utilice una hielera previamente enfriada con costados altos durante los pasos de control de calidad y empaquetado. Asegúrese que el contenedor con hielo seco esté completamente lleno de hielo seco antes de sellarlo.

17.2.3. Comuníquese con el personal del centro de laboratorio de la red si las muestras no pueden llegar a su destino dentro del tiempo de almacenamiento temporal asignado por la red. El centro de laboratorio de la red determinará si es apropiado transferirlas a un almacenamiento con LN₂ y enviarlas en contenedores con LN₂.

17.3. Transfiera las PBMC a un vaso Dewar con LN₂ o a un congelador mecánico a -150 °C.

Nota para HVTN: No se permite el almacenamiento con LN₂ o el uso de vasos Dewar con LN₂ o los congeladores mecánicos a -150 °C para almacenar PBMC de HVTN salvo excepciones muy poco comunes. Los laboratorios no deben transferir las muestras de los congeladores a -80 °C a menos que lo instruya el LC de HVTN.

17.3.1. Transfiera los crioviales en hielo seco al lugar de almacenamiento designado en el vaso Dewar con LN₂ o el sistema de almacenamiento a -150 °C dentro de las 72 horas de haberlos congelado en el sistema de enfriamiento a temperatura controlada.

17.3.2. Las muestras de PBMC congeladas pueden guardarse de manera indefinida en la fase de vapor de LN₂. NO vuelva a transferir las muestras almacenadas en LN₂ o a -150 °C a los congeladores a -80 °C a menos que el equipo de la red o el protocolo lo indiquen.

17.3.3. Cuando las muestras se hayan guardado en LN₂, todas las transferencias o envíos deben mantenerse en LN₂ (a una temperatura menor o igual a -140 °C) y deben enviarse en un contenedor seco con LN₂ aprobado por la IATA.

18. Llenado de los documentos de procesamiento

- 18.1. Asegúrese de que se documente toda la información apropiada, siguiendo las buenas prácticas de documentación, de acuerdo con los requisitos de la red y del laboratorio, y que todos los cálculos sean correctos. Consulte la Sección 5 para conocer los detalles.
- 18.2. Guarde las solicitudes de laboratorio, hojas de trabajo de procesamiento de PBMC y cualquier otro documento de seguimiento de acuerdo con la política del laboratorio.

19. Definiciones y acrónimos

Término	Definición
ACTG	Advancing Clinical Therapeutics Globally
Temperatura de la centrifuga	De 15 a 25 °C o hasta 30 °C, según las condiciones climáticas
Muy coagulado	Más de ¾ de la masa de sangre completa está coagulada
Coágulo pequeño	Se observan coágulos pequeños después de procesar las PBMC en el tubo de sangre completa, pero se observan en el material sintetizado del tubo de separación después del centrifugado
CPS	Solución para crioconservación
CSTFB	Tubo de separación celular con barrera de material sintetizado
DGM	Medio de gradiente de densidad
FBS	Suero bovino fetal
HBSS	Solución salina balanceada de Hanks
Hemólisis	Coloración rosácea a roja del suero o del plasma debido a la lisis de los glóbulos rojos. Grado de hemólisis de acuerdo con la siguiente escala: 1+ Color de rojo a rosa pálido del suero o plasma. Permite leer con claridad un periódico colocado detrás del tubo con sangre 2+ Color de rojo a rosa del suero o plasma. Se puede leer un periódico, pero no tan nítidamente 3+ Color de rojo a rosa oscuro del suero o plasma. Se ve poco claro un periódico 4+ Color rojo caoba oscuro del suero o plasma. No permite leer un periódico <i>Nota:</i> Los glóbulos rojos lisados confieren al suero o plasma un aspecto con color, pero transparente, mientras que la contaminación con glóbulos rojos confiere al suero o plasma un aspecto turbio
HI-FBS	Suero bovino fetal con inactivación térmica
HPTN	Red de Ensayos para la Prevención del VIH
HVTN	Red de Ensayos de Vacunas contra el VIH
Ictérica	Plasma de color verde o naranja, que sugiere la presencia de un aumento en los niveles de bilirrubina
LDMS	Sistema de gestión de datos de laboratorio
LM	Manual del laboratorio (HTPN)
LPC	Diagrama de flujo de procesamiento del laboratorio (ACTG)
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
PBS	Solución salina tamponada con fosfato
PI	Investigadora principal
PTID/PID	Número de identificación del participante
QS	Cantidad suficiente: agregue una cantidad suficiente de líquido para llegar a un volumen específico
Temperatura ambiente (Room Temperature, RT)	De 15 a 25 °C o hasta 30 °C, según las condiciones climáticas
SPLI	Instrucciones para el laboratorio de procesamiento de las muestras (HVTN)
Volumen de sangre completa utilizable (UWBV)	El volumen de sangre completa medido que se procesa en realidad (el volumen de sangre completa utilizable puede no ser igual a la capacidad del tubo)
Almacenamiento en fase de vapor	El almacenamiento en fase de vapor del nitrógeno líquido (LN ₂) es el espacio en el tanque de almacenamiento que está por encima del líquido de LN ₂ en la parte inferior del tanque
WDR	Reactivo de dilución y lavado (HBSS, PBS)

20. Referencias

- 20.1. Bull M., Lee B., Stucky J., Chiu Y.L., Rubin A., Horton H. y 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, versión 5, 3 de noviembre de 2008.
- 20.3. Cox J.H., DeSouza M., Ratto-Kim S., Ferrari G., Weinhold K.J. y Birx B.L. Cellular Immune assays for evaluation of Vaccine efficacy in developing countries. *Manual of Clinical laboratory Immunology*. Rose N.R., Hamilton R.G., Detrick B. Eds. (6th ed.) págs.301 a 315 (2002).
- 20.4. Islam B., Lindbert A. y Christensen B. Peripheral blood cells preparation influences the level of expression of leukocyte cell surface markers as assessed with quantitative multicolor flow cytometry. *Cytometry* 22:128-134 (1995).
- 20.5. Immunovirology Research Network (IVRN) Laboratory Manual: Separation and storage of serum, plasma and PBMCs. IVRN. 12 de diciembre de 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. y Casimiro B.R. Enhanced rates and magnitude of immune responses detected against an HIV vaccine: effect of using an optimized process for isolating PBMC. *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, fechado en 2003-09.
- 20.9. Weinberg A., Betensky R., Zhang L., y Ray G. Effect of shipment, storage, anticoagulant, and cell separation on lymphocyte proliferation assays for human immunodeficiency virus-infected patients. *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 y 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. Apéndices

- 21.1. Apéndice A: Hoja de trabajo de procesamiento de PBMC requerida por HVTN
Nota: El Apéndice A también se proporciona en versión descargable y editable en el sitio web público de HANC en <https://www.hanc.info/resources/sops-guidelines-resources/laboratory/cross-network-pbmc-processing-sop.html>
- 21.2. Apéndice B: Ejemplo de registro de cambios de isopropanol en Nalgene® Mr. Frosty
- 21.3. Apéndice C: Solución de problemas: Recuperación de PBMC ante la ausencia de una banda de PBMC definida después de la centrifugación con gradiente de densidad
- 21.4. Apéndice D: Combinación de capas leucoplaquetarias para el aislamiento de PBMC en medios de gradiente de densidad
- 21.5. Apéndice E: Guía rápida del SOP de PBMC entre redes: CSTFB
- 21.6. Apéndice F: Guía rápida del SOP de PBMC entre redes: Método manual de colocación por encima del medio de gradiente de densidad
- 21.7. Apéndice G: Ejemplo de reactivos
- 21.8. Apéndice H: Historial de cambios

Apéndice A: Hoja de trabajo de procesamiento de PBMC

Nota: Los campos en esta hoja de trabajo deben llenarse a mano, con una pluma.

Laboratorio de procesamiento de la muestra:		Protocolo:	
ID del participante (PTID/PID):		Número de visita:	Tipo de visita:
Fecha de extracción:		Hora de la extracción:	
Fecha de inicio del procesamiento:		Hora de inicio del procesamiento:	Persona que realiza el procesamiento (iniciales):
Reactivos	Fabricante	Número de lote	
DMSO			
FBS			
WDR: HBSS o PBS (encierre en un círculo una opción)			
Tubo de separación celular (material sintetizado)			
Medio de gradiente de densidad			
	Volumen en ml (registre como X.Y)		
CPS	CPS	DMSO	FBS
			1 día hábil (menos de 18 horas)
Datos que se deben capturar durante el procesamiento			Muestra
Tipo de tubo de muestra (encierre en un círculo una opción o registre "otro" tipo de tubo)			ACD/HEP/EDT Otro: _____
Condición de la sangre (encierre en un círculo una o más opciones; agregue comentarios al reverso según sea necesario)			SAT/HEM/CLT
El volumen medido de sangre completa utilizable (al 0.1 ml más cercano)			ml
Indique el método de procesamiento (encierre en un círculo una opción)			CSTFB/métodos de colocación por encima/ debajo del medio de gradiente de densidad
Método de recuento: Nombre del instrumento específico o recuento manual (registre en el campo a la derecha)			
Recuento del volumen de la nueva suspensión de HBSS (u otro WDR) (V) (registre como X.Y)			ml
Concentración promedio del recuento de células (C)			x 10 ⁶ células/ml
Cantidad total de células (T) = C x V			x 10 ⁶ células
Cálculo del rendimiento de células/ml de la sangre completa (Control de QC)= (T/volumen de sangre completa utilizable)			x 10 ⁶ células/ml
Cálculo estimado del volumen de la nueva suspensión en CPS (V1)=(T/15x10⁶ células/ml)(1 ml)			ml
Cálculo del volumen final de la nueva suspensión en CPS (V _f), (V1 redondeado hacia ABAJO al ml completo más cercano [X.0])			ml
Cálculo del número real de células por vial N2 = (T/V_f) x V2; (V2=1 ml)			x 10 ⁶ células/vial
Impresión y control de calidad del contenido de la etiqueta/código de barras del LDMS (iniciales de la persona que realiza el control de calidad)			
Fecha y hora de congelamiento (ddMMMAaaa/HH:MM) (Explicar en la sección de comentarios si no se realiza dentro de las 4 horas de la hora de inicio del procesamiento)			
Cantidad de crioviales congelados realmente Nota: Debe ser igual al volumen final de la nueva suspensión en CPS para las alícuotas de 1 ml (V _f)			
Complete las entradas restantes del LDMS, incluido el recuento total de células y la hora de congelamiento (iniciales)			

Apéndice A: Hoja de trabajo de procesamiento de PBMC Página 2 de 2

Nota: Los campos en esta hoja de trabajo deben llenarse a mano, con una pluma.

Laboratorio de procesamiento de la muestra:

PTID/PID:

Transferencia de crioviales a la caja de almacenamiento en congelador	
Persona que transfirió los crioviales a las ubicaciones en la caja de almacenamiento asignadas por el LDMS	
Fecha (ddMMMAaaa)/hora a la que los crioviales se transfirieron del equipo de congelamiento a temperatura controlada a la caja de almacenamiento (la muestra se debe mantener a una temperatura de -80 °C durante la transferencia)	
Revisión inicial (primaria) (iniciales/fecha)	
Revisión final (secundaria) (iniciales/fecha)	

Recuentos con hemocitómetro	Recuento total	Células viables	Células no viables
Cuadrado n.º 1 (células/mm ²)			
Cuadrado n.º 2 (células/mm ²)			
Cuadrado n.º 3 (células/mm ²)			
Cuadrado n.º 4 (células/mm ²)			
Recuento de células promedio por cuadrado (células/mm ²)			
Factor de dilución de las PBMC (1:FD*)			
Factor del hemocitómetro para células/ml	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴
Concentración del recuento celular (C) = (promedio de células /mm ²) (FD) (10 ⁴); convertir a 10 ⁶ células/ml	No corresponde	x 10 ⁶ células/ml	No corresponde
% de viabilidad = (Células viables en 4 cuadros/células totales en 4 cuadros) (100)	No corresponde		No corresponde

**Nota:* Factor de dilución (*Dilution Factor, FD*) = (porción de células + porción de líquido de disolución)/porción de células

Recuentos automatizados de células (10 ³ /μl = 10 ⁶ /ml)	Recuento n.º 1
Recuento de células (C) como células x 10 ⁶ /ml	
Factor de dilución de las PBMC (1:FD**)	
Concentración de células = (C)(FD)	x 10 ⁶ células/ml
% de viabilidad (si corresponde)	

***Nota:* Las diluciones para contadores automáticos son extremadamente poco comunes. Si se realizan recuentos directos, ingrese un 1 en el recuadro de DF y llene la columna.

Comentarios, desviaciones del protocolo e información adicional que no se capturaron en otro lado dentro de esta hoja de trabajo:

Apéndice C: Solución de problemas: Recuperación de PBMC ante la ausencia de una banda de PBMC definida después de la centrifugación con gradiente de densidad

C.1. Antecedentes: Si se produce algún error durante la centrifugación con gradiente de densidad de la sangre, las capas del medio de gradiente de densidad y de plasma no se separarán claramente y es posible que no se vea la capa de PBMC. No entre en pánico. Las PBMC pueden recuperarse parcialmente siguiendo pasos adicionales.

C.2 Identifique el problema:

C.2.1 Retire los tubos de la centrífuga y transfíeralos a una gradilla.

C.2.2 Intente identificar el motivo por el cual no se separó con claridad la capa de PBMC. Las posibles causas se mencionan a continuación:

- El tubo se cayó o golpeó.
- El freno quedó activado.
- La velocidad de centrifugado fue demasiado alta. Verifique que la configuración de rpm fue la correcta para el procedimiento utilizado (CSTFB o separación celular manual con gradiente de densidad). Para ello, revise la gráfica de RCF/rpm del rotor. Algunas centrífugas requieren que la configuración de la centrífuga corresponda con el tipo de cubeta utilizado. Si la configuración no es correcta, entonces la centrífuga puede calcular mal la velocidad.
- La centrífuga se detuvo debido a una interrupción en el suministro eléctrico.
- Se desprendió el material sintetizado. (A menudo, esto se debe a que la velocidad de centrifugado fue demasiado alta, pero, en ocasiones, hay un tubo defectuoso en el lote).
- La centrífuga estaba desequilibrada.
- El donante tenía un nivel bajo de linfocitos, glóbulos blancos o hematocritos.

C.3 De las causas anteriores, las primeras cinco se pueden arreglar fácilmente. Si la causa se debe a una centrífuga que no está equilibrada, determine el motivo. Revise lo siguiente:

C.3.1 Revise que los tubos estén equilibrados.

C.3.2 Revise que las cubetas de la centrífuga estén equilibradas.

C.3.3 Revise que los brazos y las cubetas de la centrífuga estén engrasados y lubricados de manera adecuada.

Nota: Si tiene duda sobre una centrífuga, utilice otra.

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

C.4.1 Reactivos:

- Medio de gradiente de densidad.
- Tubos para centrífuga cónicos de 50 ml.
- Pipetas.

C.4.2 Método:

Nota: El medio de gradiente de densidad es tóxico para las células, por lo tanto se debe trabajar de manera eficiente.

C.4.2.1 Agregue 15 ml de medio de gradiente de densidad a tubos estériles de 50 ml (no al CSTFB).

C.4.2.2 Permita que el medio de gradiente de densidad se caliente hasta llegar a temperatura ambiente (de 15 a 25 °C o hasta 30 °C, según las condiciones climáticas) mientras trabaja con la muestra.

C.4.2.3 Para cada tubo mezclado, etiquete tubos de 50 ml con el PTID del sujeto. Utilice una pipeta para retirar el contenido de la muestra mezclada de la separación o CSTFB de manera lenta. (Por lo general, el material sintetizado del CSTFB se habrá salido de lugar).

C.4.2.4 Transfiera un máximo de 30 ml de la muestra mezclada al tubo que contiene el medio de gradiente de densidad.

C.4.2.5 Repita esto para todas las muestras mezcladas.

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

C.4.2.7 Centrifugue durante 30 a 40 minutos a 400 x g con el freno DESACTIVADO a temperatura ambiente (de 15 a 25 °C o hasta 30 °C, según las condiciones climáticas).

C.4.2.8 Ahora deberá ser visible una capa de PBMC. (Con frecuencia, se pierden algunas células, por lo que la capa puede ser delgada).

C.4.2.9 Con cuidado, transfiera la capa de PBMC a un tubo para centrífuga cónico de 50 ml etiquetado con el identificador de PTID. Utilice un tubo nuevo para cada tubo de medio de gradiente de densidad.

C.4.2.10 Vuelva a taponar el tubo de medio de gradiente de densidad.

C.4.2.11 Vuelva a la Sección 15 del protocolo principal.

Nota: En la Sección de Comentarios y desviaciones del protocolo de la **hoja de trabajo de procesamiento de PBMC**, registre los detalles de la desviación del SOP (es decir, los pasos del Apéndice C que se tomaron para recuperar las PBMC debido a la ausencia de una banda de PBMC definida después del centrifugado con gradiente de densidad). Además, registre la duración del nuevo centrifugado para brindar un estimado del tiempo que estuvieron las células en el medio de gradiente de densidad.

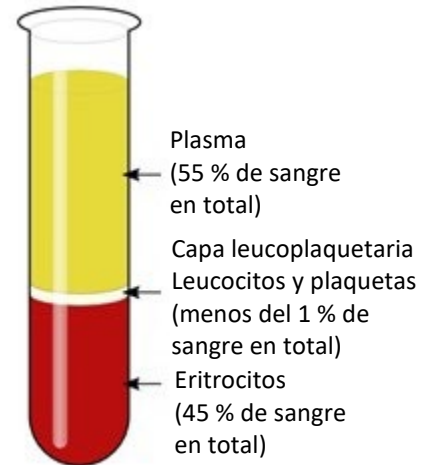
Apéndice D: Combinación de capas leucoplaquetarias para el aislamiento de PBMC en medios de gradiente de densidad

Este procedimiento puede utilizarse cuando se aíslan PBMC de varios tubos de sangre de la misma combinación de PTID y anticoagulante. Este procedimiento permite que se consoliden las capas leucoplaquetarias para reducir el uso de reactivos y elementos consumibles, aumentar la recuperación y disminuir la contaminación.

La capa leucoplaquetaria es la fracción de sangre completa anticoagulada que contiene glóbulos blancos (*white blood cells*, WBC) y plaquetas y se produce después de la centrifugación en la interfaz de las capas de plasma y glóbulos rojos. La mayor parte de los WBC se encuentran en la capa leucoplaquetaria y sólo una fracción muy pequeña (menos de 1 millón en total) permanece en el concentrado de eritrocitos después de la obtención de la capa leucoplaquetaria. La capa leucoplaquetaria se obtiene con una pequeña fracción de plasma y glóbulos rojos (aproximadamente 1.5 ml) y luego se diluye antes de colocarla por encima del medio de gradiente para la separación de linfocitos.

Procedimiento:

- D1. Asegúrese de haber completado los pasos 14.4.1 a 14.4.2.
- D2. Centrifugue la sangre completa a entre 200 y 400 x g durante 10 minutos.
- D3. Obtenga el plasma (y guarde según sea necesario; consulte la Sección 14.3.4 a 14.3.7) de cada tubo hasta aproximadamente 5 mm de la capa leucoplaquetaria (que, en la mayoría de los casos, es visible a menos que el paciente presente neutrocitopenia/linfocitopenia grave).
- D4. Determine la capacidad y la cantidad de tubos para centrífuga cónicos que se necesitarán para cada combinación de PTID y anticoagulante. No mezcle las muestras de distintos PTID y anticoagulantes.
En general:
 - Se pueden combinar capas leucoplaquetarias de dos tubos de extracción de sangre de 10 ml en un tubo para centrífuga cónico de 15 ml.
 - Se pueden combinar capas leucoplaquetarias de hasta seis tubos de extracción de sangre de 10 ml en un tubo para centrífuga cónico de 50 ml.
- D5. Etiquete cada tubo para centrífuga cónico con el PTID.
- D6. Agregue WDR a cada tubo para centrífuga cónico y estéril.



Capacidad del tubo para centrífuga cónico (ml)	Volumen de WDR (ml)
15	3
50	De 10 a 15

- D7. Sostenga el tubo al que se le redujo el plasma (que ahora contiene una cantidad pequeña de plasma residual y concentrado de eritrocitos) a un ángulo de alrededor de 30 °.
- D8. Utilice una pipeta ancha, desechable de polipropileno, estéril, de 2.5 ml para obtener la capa leucoplaquetaria. Avance hacia la parte inferior del tubo para aspirar la capa leucoplaquetaria. Lentamente aspire el plasma seguido de la capa leucoplaquetaria que se “deslizará” por la capa de concentrado de eritrocitos (alrededor de 1.5 ml del aspirado). Transfiera la capa leucoplaquetaria al tubo que contiene WDR y enjuague la pipeta de 2 a 3 veces con WDR/suspensión celular.
- D9. Obtenga y combine las capas leucoplaquetarias de los tubos sobrantes para esa combinación de PTID y anticoagulante.
- D10. Agregue WDR adicional en QS al WDR/suspensión celular para obtener el volumen deseado para realizar la separación celular con gradiente de densidad. Mezcle suavemente la combinación de capa leucoplaquetaria entre 3 y 4 veces con una pipeta.
- D11. Continúe con la separación celular con gradiente de densidad que se encuentra en el paso de la Sección 14.5. En esta sección, “sangre diluida” significa “capa leucoplaquetaria diluida”.

Apéndice E: Ejemplo de reactivos y suministros

Nota: Todos los reactivos deben comprarse en estado estéril y se requiere el uso de una técnica aséptica.

Reactivo/suministro	Ejemplos	Opcional/requerido
CSTFB seco	<ul style="list-style-type: none"> • Tubos de separación Accuspin™ • Tubos de separación Leucosep® 	Opcional (Nota para HVTN: Requerido)
Tubos de separación celular prellenados con barreras de material sintetizado (CSTFB) con Medio de gradiente de densidad de 1.077	<ul style="list-style-type: none"> • Accuspin™ System Histopaque®-1077 	Opcional (Nota para HVTN: No se permite sin aprobación de la red)
Medio de gradiente de densidad de 1.077	<ul style="list-style-type: none"> • Ficoll-Paque PLUS y PREMIUM • Lymphoprep™ • Medio de separación de linfocitos: LSM™ 	Opcional
Dimetilsulfóxido (DMSO), grado de cultivo celular	<ul style="list-style-type: none"> • Hybrimax, Sigma-Aldrich n.º de cat. D2650, probado para endotoxinas e hibridomas. • Producto equivalente 	Requerido
Suero bovino fetal (FBS)		ACTG y HPTN: Consulte la información sobre los lotes actuales validados por IQA HVTN (y determinados protocolos entre redes con HVTN): La red proporciona a los laboratorios FBS aprobado por HVTN con inactivación térmica. El proveedor y el lote de FBS aprobado por HVTN no está disponible para su compra fuera de la cadena de suministro/proceso de HVTN
Crioviales	<ul style="list-style-type: none"> • Nunc CryoTubes™, tubos con ranurado interno, de polipropileno (PP) y tapa de rosca n.º 377267 • Criotubos Greiner, con ranurado interno y tapa con rosca natural, de polipropileno (PP), de fondo redondo, con área para escritura, que se sostienen por sí solos, estériles n.º 122263 • Corning®, vial criogénico de polipropileno de 2 ml con ranurado interno, que se sostiene por sí solo con fondo redondo n.º 430488 	Se prefiere Nunc/se requiere el ranurado interno para todas las redes Nota para HVTN: Se requiere el uso de Nunc CryoTubes™ n.º 377267 para los protocolos de la red HVTN. HVTN debe aprobar cualquier sustitución antes de que los laboratorios realicen una compra
Etiquetas criogénicas	<ul style="list-style-type: none"> • Cryo-Tags® y Cryo-Babies® Brady B461 o B490 • Etiquetas para congelador Shamrock 	Opcional
Marcadores	<ul style="list-style-type: none"> • Marcadores Fisherband* n.º 13 a 379 • Marcador/pluma de laboratorio Nalgene® n.º 6310/6311 	Opcional

Apéndice F: Guía rápida del SOP de PBMC: CSTFB

Para todas las redes, se requiere el uso de una **hoja de trabajo de procesamiento de PBMC** y el LDMS (consulte la Sección 5 para conocer los detalles). Antes de utilizar esta guía rápida por primera vez, asegúrese de revisar el SOP completo de PBMC para consultar notas y detalles importantes, así como pautas específicas de la red.

Pasos	Referencia del SOP
1. Prepare y enfríe la CPS.	11.2
2. Prepare las muestras de sangre completa, los reactivos y los suministros.	13.2
3. Si las alícuotas de plasma son un requisito de acuerdo con las instrucciones del protocolo: <ol style="list-style-type: none"> a. Centrifugue la sangre completa a entre 200 y 400 x g durante 10 minutos. b. Marque el volumen total de sangre en el menisco y luego transfiera el plasma a un tubo para centrifuga cónico, etiquetado, de 15 o 50 ml para seguir el proceso (de 800 a 1200 x g durante 10 minutos; el uso de freno es opcional). c. Agregue una cantidad suficiente de WDR para regresar la sangre a su volumen original de sangre completa, mezcle con cuidado y continúe el procesamiento de PBMC. 	13.3
4. Agregue 5 ml de WDR a cada CSTFB etiquetado y 25 ml de WDR a cada tubo de lavado cónico, etiquetado, de 50 ml correspondiente. (Nota: Se puede realizar antes como parte de la preparación [paso 2]). <ol style="list-style-type: none"> 5. Transfiera de 15 a 20 ml (se permite de 12 a 22) de sangre en los CSTFB etiquetados. <ol style="list-style-type: none"> a. Registre los volúmenes medidos con cuidado. Registre el UWBV medido con una precisión al 0.1 ml más cercano. 6. Agregue el enjuague de tubos con WDR y el WDR final al CSTFB hasta 30 ml (WDR más sangre completa). 	13.4
7. Centrifugue a entre 800 y 1000 x g durante 15 minutos a una temperatura de entre 15 y 30 °C con el <u>freno DESACTIVADO/configurado a cero</u> . <ol style="list-style-type: none"> 8. Inspeccione los tubos para detectar problemas posibles. 9. Obtenga cada capa leucoplaquetaria del CSTFB en un solo tubo para centrifuga cónico, etiquetado, de 50 ml, prellenado con 25 ml de WDR correspondiente. 	13.5
10. Agregue WDR en QS a un volumen total de 45 ml y mezcle con cuidado. <ol style="list-style-type: none"> 11. Lavado 1: Centrifugue a entre 200 y 400 x g durante 10 minutos a una temperatura de entre 15 y 30 °C; el uso de freno es opcional. 12. Revise la presencia de sedimentos celulares. Documente cualquier observación inesperada. 13. Retire con cuidado el sobrenadante sin alterar el sedimento celular. 	15.1
14. Vuelva a suspender el sedimento celular en una cantidad pequeña de WDR, creando una suspensión celular homogénea. <ol style="list-style-type: none"> 15. Combine un máximo de 4 suspensiones de sedimentos en un tubo para centrifuga cónico de 50 ml. 16. Agregue el enjuague de tubos con WDR y el WDR final de 45 ml al tubo de células. 17. Lavado 2: Centrifugue a entre 200 y 400 x g durante 10 minutos a una temperatura de entre 15 y 30 °C; el uso de freno es opcional. 18. Revise la presencia de sedimentos celulares. Documente cualquier observación inesperada. 19. Retire con cuidado el sobrenadante sin alterar el sedimento celular. 	15.2
20. Calcule el volumen (V) de la nueva suspensión para recuento de WDR. <ol style="list-style-type: none"> 21. Combine los sedimentos celulares en un tubo con WDR del volumen de la nueva suspensión. Este es el volumen sobre el que se basa el recuento de células. 22. Realice el recuento y calcule la cantidad total de células. 23. Calcule el rendimiento celular en células/ml de sangre completa utilizable. 	15.3
24. Calcule el volumen final de la nueva suspensión en CPS. Revise los cálculos.	15.4
25. Complete la impresión, el etiquetado y el control de calidad de los crioviales ANTES de la centrifugación final.	15.5
26. Centrifugue a entre 200 y 400 x g durante 10 minutos a una temperatura de entre 15 y 30 °C; el uso de freno es opcional.	15.6

Pasos	Referencia del SOP
27. Retire con cuidado el sobrenadante sin alterar el sedimento celular. 28. Vuelva a suspender con cuidado el sedimento en CPS frío (V_f) mientras agita el tubo para obtener una distribución homogénea. Cree con cuidado las alícuotas de células en CPS.	15.7
29. Transfiera de inmediato (<u>en menos de 10 minutos</u> a partir del momento en que se agrega CPS a la muestra) todos los crioviales al equipo de congelamiento a temperatura controlada y colóquelos en el congelador.	15.8
30. Después del período apropiado, transfiera los crioviales al equipo de almacenamiento dentro de la institución y envíe dentro del lapso que designe la red.	17
31. Llene y revise la hoja de trabajo de procesamiento de PBMC y las entradas de datos según las instrucciones de la red.	18.1

Apéndice G: Guía rápida del SOP de PBMC: Método manual de colocación por encima del medio de gradiente de densidad

Para todas las redes, se requiere el uso de una **hoja de trabajo de procesamiento de PBMC** y el LDMS (consulte la Sección 5 para conocer los detalles). Antes de utilizar esta guía rápida por primera vez, asegúrese de revisar el SOP completo de PBMC para consultar notas y detalles importantes, así como pautas específicas de la red.

Pasos (las cantidades para volúmenes menores de muestra se encuentran en <i>itálicas</i>)	Referencia del SOP
1. Prepare y enfríe la CPS.	11.2
2. Prepare las muestras de sangre completa, los reactivos y los suministros.	14.2
3. Si las alícuotas de plasma son un requisito de acuerdo con las instrucciones del protocolo: <ol style="list-style-type: none"> a. Centrifugue la sangre completa a entre 200 y 400 x g durante 10 minutos. b. Marque el volumen total de sangre en el menisco y luego transfiera el plasma a un tubo para centrifuga cónico, de 15 o 50 ml para seguir el proceso (de 800 a 1200 x g durante 10 minutos; el uso de freno es opcional). c. Agregue una cantidad suficiente de WDR para regresar la sangre a su volumen original de sangre completa, mezcle con cuidado y continúe el procesamiento de PBMC. 	14.3
4. Transfiera la sangre completa a un tubo para centrifuga cónico, estéril, de 50 ml (<i>15 ml</i>) y diluya con WDR, según sea necesario. 5. Con cuidado y de manera lenta, coloque la sangre sobre el medio de gradiente de densidad. (El método de colocación por debajo del medio de gradiente de densidad es una alternativa aprobada, con excepción de los protocolos de HVTN).	14.4
6. Centrifugue a entre 400 y 800 x g durante 15 a 30 minutos con el <u>freno DESACTIVADO/ configurado a cero</u> . 7. Revise cada tubo para centrifuga cónico para detectar posibles problemas. 8. Obtenga cada capa leucoplaquetaria en un solo tubo para centrifuga cónico de 50 ml (<i>15 ml</i>) correspondiente.	14.5
9. Agregue WDR en QS a un volumen total de 45 ml (<i>10 ml</i>) y mezcle con cuidado. 10. Lavado 1: Centrifugue a entre 200 y 400 x g durante 10 minutos a una temperatura de entre 15 y 30 °C; el uso de freno es opcional. 11. Revise la presencia de sedimentos celulares. 12. Retire con cuidado el sobrenadante sin alterar el sedimento celular.	15.1
13. Vuelva a suspender el sedimento celular en una cantidad pequeña de WDR, creando una suspensión celular homogénea. 14. Combine un máximo de 4 suspensiones de sedimentos en un tubo para centrifuga cónico de 50 ml (<i>2 en un tubo de 15 ml</i>). 15. Agregue el enjuague de tubos con WDR y el WDR final hasta 45 ml (<i>10 ml</i>) al tubo de células. 16. Lavado 2: Centrifugue a entre 200 y 400 x g durante 10 minutos a una temperatura de entre 15 y 30 °C; el uso de freno es opcional. 17. Revise la presencia de sedimentos celulares. 18. Retire con cuidado el sobrenadante sin alterar el sedimento celular.	15.2
19. Calcule el volumen (V) de la nueva suspensión para recuento de WDR. 20. Combine los sedimentos celulares en un tubo con WDR del volumen de la nueva suspensión. Este es el volumen sobre el que se basa el recuento de células. 21. Realice el recuento y calcule la cantidad total de células. 22. Calcule el rendimiento celular en células/ml de sangre completa utilizable.	15.3
23. Calcule el volumen final de la nueva suspensión en CPS. Revise los cálculos.	15.4
24. Complete la impresión, el etiquetado y el control de calidad de los crioviales ANTES de la centrifugación final.	15.5
25. Centrifugue a entre 200 y 400 x g durante 10 minutos a una temperatura de entre 15 y 30 °C; el uso de freno es opcional.	15.6

Pasos (las cantidades para volúmenes menores de muestra se encuentran en <i>itálicas</i>)	Referencia del SOP
26. Retire con cuidado el sobrenadante sin alterar el sedimento celular. 27. Vuelva a suspender con cuidado el sedimento en CPS frío (<i>V_f</i>) mientras agita el tubo para obtener una distribución homogénea. Se recomienda trabajar en hielo. 28. Cree con cuidado las alícuotas de células en CPS.	15.7
29. Transfiera de inmediato (<u>en menos de 10 minutos</u> a partir del momento en que se agrega CPS a la muestra) todos los crioviales al equipo de congelamiento a temperatura controlada y colóquelos en el congelador.	15.8
30. Después del período apropiado, transfiera los crioviales al equipo de almacenamiento dentro de la institución y envíe dentro del lapso que designe la red.	17
31. Llene y revise la hoja de trabajo de procesamiento de PBMC y las entradas de datos según las instrucciones de la red.	18.1

APÉNDICE H: Historial de cambios de la versión 6.0 a 7.0

Fecha de entrada en vigor de la versión (dd/mmm/aa)	Secciones	Modificación
7.0 19 de agosto de 2024	Todas	Se modificó el logotipo de HANC y se agregó en el encabezado.
	Todas	Se eliminó la referencia a MTN.
	Todas	Se eliminó la referencia a IMPAACT.
	Todas	Se realizó una actualización integral de todas las secciones para adaptarlas a las pautas, protocolos y prácticas vigentes.
	Aprobaciones	Se eliminó la autorización de MTN.
	Aprobaciones	Se eliminó la autorización de IMPAACT.
	Aprobaciones	Se reemplazó a John Hural por Kathryn Dougherty para la autorización de HVTN.
	8.1.5 15.4	Se requirió el uso de crioviales con ranurado interno para el almacenamiento de PBMC. Se homologó el método de creación de viales entre ACTG, HPTN y HVTN.
6.0 26 de abril de 2018	Aprobaciones	Se reemplazó a Bob Coombs por Grace Aldrovandi para la autorización de ACTG. Se reemplazó a Constance Ducar por John Hural para la autorización de HVTN. Se reemplazó a Charlene Dezzutti por Edward Livant para la autorización de MTN.
	8.1.4	Se registraron requisitos adicionales en la nota del 7 de octubre de 2016 únicamente para los laboratorios de ACTG e IMPAACT. También se agregaron requisitos adicionales relacionados con los crioviales para todas las redes.
	18.2.1	Se agregaron pautas adicionales relacionadas con las temperaturas de punto de ajuste del congelador.
	Apéndice D	Se cambió “la mayoría de los WBC...” a “la mayor parte de los WBC...”
	Apéndice G	Se agregó información adicional a la sección de crioviales relacionada con el uso del microtubo con tapa con rosca SARSTEDT.
5.2 22 de septiembre de 2014	5.1.3	Se cambió la oración “El laboratorio puede utilizar la hoja de trabajo de procesamiento de PBMC de HVTN o modificarla según corresponda para los procedimientos del laboratorio en cuestión.” a “El laboratorio puede utilizar la hoja de trabajo de procesamiento de PBMC de HVTN de forma modificada para seguir los requisitos de la red correspondiente y de manera adecuada para los procedimientos del laboratorio.”
5.1 30 de julio de 2014	5.1.3	Se agregaron las pautas para el rastreo de la gráfica de procesamiento de PBMC: Cantidad total de células: “(opcional para HVTN)” cerca de N.
	16.4.5	Se omitió la nota debido a que no hay material sintetizado en los tubos cónicos cuando se utiliza el método manual de colocación por encima o por debajo del medio de gradiente de densidad.
	16.4.6	Se cambiaron las referencias para el método de colocación por encima del medio de gradiente de densidad a 16.4.6.1 y para el método de colocación por debajo del medio de gradiente de densidad a 16.4.6.2.
	18.1	Se agregaron pautas de tiempo para el almacenamiento/la transferencia para HPTN, IMPAACT y MTN.
	14, 18.1, 18.3, 18.3.1	Se cambió “Ln2/congelador mecánico a -150 °C “ a “vaso Dewar con LN2 o congelador mecánico a -150 °C”.
	18.3	Se simplificó el texto a PBMC almacenadas en un vaso Dewar con LN2 o un congelador mecánico a -150 °C y se eliminó el texto de “más de 4 semanas”.
	De 18.3.1 a 18.3.2	Se cambió la pauta sobre el tiempo de transferencia requerido de al “siguiente día hábil” a “dentro de 72 horas”.

	18.3.1	Se cambió "LN2/-150 °C " a "LN2 o -150 °C".
	22, 24.2	Se eliminó la opción de RPMI.
	Apéndice E, F	Se cambió la referencia del SOP del paso 1 de "11.3" a "11.2".
	Apéndice E	Se cambió la referencia del SOP del paso 31 de "18 o 19" a "18".
	Apéndice E	Se cambió la referencia del SOP del paso 31 de "19.2" a "19.1".
	Apéndice E	Se cambió la oración del paso 32 a "Llene la hoja de trabajo de procesamiento de PBMC según las instrucciones de la red".
	Apéndice F	Pasos 9 a 12: Se cambió "16.1" a "17.1".
	Apéndice F	Pasos 13 a 18: Se cambió "16.2" a "17.2".
	Apéndice F	Pasos 19 a 22: Se cambió "16.3" a "17.3".
	Apéndice F	Se cambió la referencia del SOP del paso 30 de "18 o 19" a "18".
	Apéndice F	Se cambió la referencia del SOP del paso 31 de "19.2" a "19.1".
	Apéndice F	Se cambió la oración del paso 31 a "Llene la hoja de trabajo de procesamiento de PBMC según las instrucciones de la red".
5.0 1 de mayo de 2014	Aprobaciones	Se reemplazó a Susan Fiscus por Grace Aldrovandi para la autorización de IMPAACT.
	5.1.3	En las pautas para el rastreo de la gráfica de procesamiento de PBMC: Instrucciones: Se cambio "L = Se requiere el registro en el LDMS" a "L= Campo requerido en el LDMS para muestras de la red".
	5.1.3	En las pautas para el rastreo de la tabla de procesamiento de PBMC: Se cambió "número de muestra en el LDMS" a "ID de la muestra global en el LDMS".
	5.1.3	Se cambiaron las celdas llenadas con gris para indicar que la información no es necesaria a negro.
	7.1.8	Se agregó HPTN y MTN.
	10.2	Se omitió la alternativa para usar el RMPI como sustituto.
	14	Cambios en el formato.
	18 y 19	Se combinaron las instrucciones de almacenamiento temporal y en la institución de dos secciones a una, Sección 18.
	19	Se separó el texto de llenado de los documentos de procesamiento que se repetía en las Secciones 18 y 19 en su propia sección.
	Apéndice H	Se eliminaron otras modificaciones del historial de versiones. Se mantienen únicamente las modificaciones de la versión actual que corresponden a este documento.