ชื่อเรื่อง:	SOP เกี่ยวกับการทำกระบวนการกับ PBMC ข้ามเครือข่าย เวอร์ชัน 7.0		
วันที่จัดทำ:	01 เมษายน 2009	**จำนวนหน้าทั้งหมด:**	36
วันที่มีผล:	19 สิงหาคม 2024	**หมายเลข SOP:**	HANC-LAB-P0001 v7.0
เขียนโดย:	คณะทำงานด้าน SOP เกี่ยวกับการทำกระบวนการกับ PBMC ข้ามเครือข่าย	**ใช้แทน SOP ที่ลงวันที่:**	26 เมษายน 2018

	เครือข่าย	**ชื่อและตำแหน่ง**	**ลายมือชื่อ**	**วันที่**
อนุมัติโดย (เครือข่าย):	ACTG	Grace Aldrovandi MD ผู้วิจัยหลักของห้องปฏิบัติการของเครือข่ายของ ACTG	DocuSigned by: Grace Aldrovandi 6BE9A0BACDFE4FA...	26/7/2024
	HPTN	Estelle Piwowar-Manning, MT (ASCP) SI รองผู้อำนวยการห้องปฏิบัติการของเครือข่ายของ HPTN	Signed by: 0E0BC1A7D726416...	27/7/2024
	HVTN	Kathryn Dougherty, MT (ASCP) รองผู้อำนวยการฝ่ายคุณภาพและการปฏิบัติตามของห้องปฏิบัติการของ HVTN	DocuSigned by: Kathryn Dougherty 7DCF2BEE1F91407...	26/7/2024

ประวัติการแก้ไข	สำหรับประวัติการแก้ไขฉบับสมบูรณ์ ดูภาคผนวก H

	ชื่อและตำแหน่ง	**ลายมือชื่อ**	**วันที่**
ทบทวนโดย (ห้องปฏิบัติการ):			

สารบัญ

จุดประสงค์ ... 3
ขอบเขต ... 3
ที่มา ... 3
อำนาจและความรับผิดชอบ ... 3
การรายงานผล ... 3
สิ่งส่งตรวจ ... 5
อุปกรณ์ ... 6
วัสดุใช้แล้วทิ้ง ... 7
อุปกรณ์ป้องกันส่วนบุคคล ... 8
รีเอเจนต์ ... 8
การเตรียมรีเอเจนต์ ... 10
บทนำและแนวทางเกี่ยวกับการทำกระบวนการกับ PBMC ... 13
การแยกเซลล์และการเจือจางเลือดด้วยหลอดแยกเซลล์ที่มีตัวกั้นแบบฟริตโดยมีการเปลี่ยนพลาสมา ... 13
การแยกเซลล์ด้วยโอเวอร์เลย์หรืออันเดอร์เลย์ตัวกลางเกรเดียนต์ของความหนาแน่นด้วยมือและการเจือจางเลือดด้วยการแยกเซลล์แบบเกรเดียนต์ของความหนาแน่นด้วยมือโดยมีการเปลี่ยนพลาสมา ... 17
การล้าง การนับ การแขวนตะกอนใหม่ ความเข้มข้น และการแช่แข็งข้ามคืนแบบควบคุมอัตรา ... 20
การควบคุมคุณภาพ ... 24
การจัดเก็บ PBMC (ชั่วคราวหรือในสถานที่) ... 25
การกรอกเอกสารเกี่ยวกับการทำกระบวนการ ... 26
คำจำกัดความและคำย่อ ... 27
เอกสารอ้างอิง ... 28
ภาคผนวก ... 28
ภาคผนวก A: แผ่นงานการทำกระบวนการกับ PBMC ... 29
ภาคผนวก B: ตัวอย่างบันทึกการเปลี่ยนไอโซโพรพานอล Nalgene® Mr. Frosty™ ... 32
ภาคผนวก C: การแก้ไขปัญหา: การฟื้นตัวของ PBMC เมื่อไม่มีแถบ PBMC ที่กำหนดไว้หลังจากการปั่นเหวี่ยงแบบเกรเดียนต์ของความหนาแน่น ... 33
ภาคผนวก D: การรวมชั้นบัฟฟี่โคตสำหรับการแยก PBMC ด้วยตัวกลางเกรเดียนต์ของความหนาแน่น ... 35
ภาคผนวก E: รีเอเจนต์และวัสดุสิ้นเปลืองตัวอย่าง ... 36
ภาคผนวก F: คู่มือฉบับย่อของ SOP เกี่ยวกับ PBMC—CSTFB ... 37
ภาคผนวก G: คู่มือฉบับย่อของ SOP เกี่ยวกับ PBMC—โอเวอร์เลย์ด้วยมือ ... 39
ภาคผนวก H: ประวัติการแก้ไขจากเวอร์ชัน 6.0 ไปเป็น 7.0 ... 41

*ภาคผนวก A ยังมีให้ในรูปแบบที่สามารถดาวน์โหลดและแก้ไขได้ในเว็บไซต์สาธารณะของ HANC ที่ http://www.hanc.info/labs/labresources/procedures/Pages/pbmcSop.aspx

1. จุดประสงค์

1.1. กระบวนการปฏิบัติงานมาตรฐาน (Standard Operating Procedure, SOP) นี้อธิบายกระบวนการสำหรับการแยกและการเก็บรักษาในสภาวะเย็นยวดยิ่ง (cryopreservation) สำหรับเซลล์เม็ดเลือดชนิดนิวเคลียสเดียวจากเลือดส่วนปลาย (PBMC) จากเลือดครบ

2. ขอบเขต

2.1. กระบวนการนี้จะใช้สำหรับการทำกระบวนการตัวอย่างเลือดสำหรับการแยก การเก็บรักษาในสภาวะเย็นยวดยิ่ง และการจัดเก็บตัวอย่าง PBMC

2.2. คำแนะนำที่จำเพาะต่อโครงการวิจัยของเครือข่ายจะใช้แทนคำแนะนำใน SOP นี้

3. ที่มา

3.1. PBMC ที่เก็บหรือเก็บรักษาในสภาวะเย็นยวดยิ่งใหม่ ๆ จะใช้เพื่อประเมินวัตถุประสงค์ของการศึกษา การสอบวิเคราะห์เหล่านี้ต้องมี PBMC ที่ถูกแยกและเก็บรักษาในสภาวะเย็นยวดยิ่งภายใต้สภาวะที่กำหนดไว้อย่างเคร่งครัด ซึ่งจะทำให้แน่ใจว่ามีการฟื้นตัว (recovery) ความอยู่รอดได้ (viability) และความสามารถในการทำหน้าที่ (functionality) ที่เหมาะสมที่สุด การทำกระบวนการและแช่แข็งเลือดภายใน 8 ชั่วโมงนับจากเวลาที่เจาะเลือดเพื่อรักษาการทำหน้าที่สูงสุดของเซลล์ในการสอบวิเคราะห์เพื่อตรวจติดตามภูมิคุ้มกันนั้นเหมาะสมที่สุด

4. อำนาจและความรับผิดชอบ

4.1. ผู้อำนวยการ/PI (หรือผู้ได้รับการแต่งตั้ง) ของศูนย์ห้องปฏิบัติการของเครือข่ายจะมีอำนาจในการกำหนด ทบทวน และอัปเดตกระบวนการนี้

4.2. สำนักงาน HIV/AIDS Network Coordination (HANC) จะเป็นผู้รับผิดชอบในการบำรุงรักษาและควบคุมเอกสาร SOP

4.3. ผู้อำนวยการห้องปฏิบัติการที่ทำกระบวนการจะเป็นผู้รับผิดชอบในการดำเนินการ SOP ของ HANC นี้และตรวจสอบให้แน่ใจว่าบุคลากรที่เหมาะสมทั้งหมดได้รับการฝึกอบรม

4.4. บุคลากรทั้งหมดของสถานที่และห้องปฏิบัติการที่มีส่วนเกี่ยวข้องในการเก็บ การทำกระบวนการ และ/หรือการจัดการ PBMC จะเป็นผู้รับผิดชอบในการอ่านและทำความเข้าใจ SOP นี้ก่อนดำเนินกระบวนการที่อธิบายไว้

4.5. ห้องปฏิบัติการทั้งหมดต้องใช้ SOP เกี่ยวกับ PBMC ของ HANC ฉบับปัจจุบันตามที่เขียนไว้เพื่อให้ได้ PBMC สำหรับโครงการวิจัยของเครือข่าย

5. การรายงานผล

5.1. เครือข่ายทั้งหมดต้องใช้แผ่นงานการทำกระบวนการกับ PBMC และระบบการจัดการข้อมูลห้องปฏิบัติการ (LDMS) เพื่อติดตามรายละเอียดการทำกระบวนการหลัก รวมถึงเวลาในการทำกระบวนการ การคำนวณ และการจัดทำเอกสารเกี่ยวกับปัญหาที่เกิดขึ้นในระหว่างการทำกระบวนการ

5.2. ต้องใช้แผ่นงานการทำกระบวนการกับ PBMC ที่จำเพาะต่อโครงการวิจัยโดยทั้งหมด เว้นแต่จะหมายเหตุไว้เป็นอย่างอื่นในคำแนะนำห้องปฏิบัติการที่ทำกระบวนการกับสิ่งส่งตรวจ (Processing Laboratory Instruction, SPLI) แผนภูมิการทำกระบวนการของห้องปฏิบัติการ (Laboratory Processing Chart, LPC) หรือคู่มือห้องปฏิบัติการ (Laboratory Manual, LM) ของโครงการวิจัย ในกรณีที่ไม่ต้องใช้แผ่นงาน PBMC ที่จำเพาะต่อโครงการวิจัย ซึ่งพบได้น้อย อาจใช้แผ่นงานทั่วไปในภาคผนวก A และที่ http://www.hanc.info/labs/labresources/procedures/Pages/pbmcSop.aspx

5.3. ต้องใช้ LDMS เพื่อบันทึกข้อมูลผู้เข้าร่วมและการทำกระบวนการ สร้างตัวระบุที่ไม่ซ้ำกัน สร้างฉลากไครโอไวแอล (cryovial) บันทึกสถานที่จัดเก็บ และสร้างรายการการขนส่ง

5.4. องค์ประกอบหลักที่จำเป็นสำหรับการติดตามการทำกระบวนการกับ PBMC ได้แก่:

ตารางองค์ประกอบหลัก	
องค์ประกอบหลักสำหรับการติดตามการทำกระบวนการกับ PBMC	**สถานที่บันทึก**
ห้องปฏิบัติการที่ทำกระบวนการกับสิ่งส่งตรวจ	W L
ID ของผู้เข้าร่วม	W L
หมายเลขนัดหมาย	W L
โครงการวิจัย	W L
ID ของสิ่งส่งตรวจทั่วโลกของ LDMS	สร้างโดยอัตโนมัติด้วย LDMS
วันที่/เวลาที่เริ่มทำกระบวนการ	W L
ชื่อย่อของเจ้าหน้าที่เทคนิคที่ทำกระบวนการ (เจ้าหน้าที่เทคนิค)	W L
วิธีการนับ (ชื่อเครื่องมือหรือการนับด้วยมือ)	W
WDR ในปริมาตรของการแขวนตะกอนใหม่สำหรับการนับ (V)	W
ความเข้มข้นเฉลี่ยของจำนวนเซลล์จากการนับ (C)	W
จำนวนเซลล์ทั้งหมด (T) = C x V	W L
คำนวณปริมาตรของการแขวนตะกอนใหม่ขั้นสุดท้ายของ CPS (V_f)	W
วันที่และเวลาที่ถูกแช่แข็ง	W L
ความคิดเห็นและการเบี่ยงเบนจากโครงการวิจัย รวมถึง แต่ไม่จำกัดเพียง: • สภาวะของสิ่งส่งตรวจที่ไม่คาดคิดทั้งหมด • เลือดที่จับตัวเป็นลิ่ม (จำนวนหลอดที่มีลิ่มเลือด จำนวนหลอดทั้งหมดจากชุดการผลิต (batch) ของ PTID และรายละเอียดการทำกระบวนการที่) • เซลล์ที่ได้ที่ต่ำกว่าช่วงที่คาดไว้ • ความผิดปกติในการทำกระบวนการ • ขั้นตอนการแก้ไขปัญหาที่ดำเนินการ • หมายเหตุ หากเวลาทั้งหมด >8 ชั่วโมง • เวลาทำกระบวนการ >4 ชั่วโมง	W
วันที่/เวลาที่เก็บ	W L
รีเอเจนต์ (ผู้ผลิต หมายเลขรุ่นที่ผลิต และวันหมดอายุสำหรับ DMSO, FBS, WDR, CSTFB, ตัวกลางเกรเดียนต์ของความหนาแน่น)	W
CPS (ปริมาตรของ DMSO และ FBS)	W
ประเภทหลอดตัวอย่าง (HEP/ACD/EDTA/อื่น ๆ)	W L
สภาวะของเลือด (เช่น SAT/HEM/CLT)	W L
ปริมาตรของเลือดครบที่สามารถใช้ได้ที่วัดได้	W L
จำนวนเซลล์จากการนับ	W
จำนวนเซลล์จริงต่อไวแอล	W L
จำนวนไครโอไวแอลที่ถูกแช่แข็ง	W L
ข้อมูลการจัดเก็บในตู้แช่แข็ง (มอดูลการจัดเก็บของ LDMS)	O L
การยืนยันการควบคุมคุณภาพรีเอเจนต์ด้วยสายตา (เจ้าหน้าที่เทคนิค)	O
เซลล์ที่ได้/มิลลิลิตรของเลือดครบ	W
ปริมาตรของการแขวนตะกอนใหม่ของ CPS ที่ประมาณไว้ (V1)	W
การยืนยันการควบคุมคุณภาพฉลาก LDMS สำหรับเนื้อหา/บาร์โค้ด (เจ้าหน้าที่เทคนิค)	W
การยืนยันการขนถ่ายไครโอไวแอลไปยังสถานที่เก็บกล่องจัดเก็บที่กำหนดโดย LDMS (เจ้าหน้าที่เทคนิค)	W
วันที่/เวลาที่ขนถ่ายไครโอไวแอลจากหน่วยแช่แข็งแบบควบคุมอัตราไปยังกล่องจัดเก็บ	W
การทบทวนขั้นสุดท้าย ผู้ทบทวน/วันที่	W

W= ต้องทำการติดตามในแผ่นงาน PBMC

L = ต้องทำการป้อนข้อมูล/ติดตามใน LDMS

O = เลือกได้ว่าจะทำการติดตามในแผ่นงานหรือสื่อเสริมเกี่ยวกับการติดตามหรือไม่

6. สิ่งส่งตรวจ

6.1. เลือดครบที่ใส่สารกันเลือดเป็นลิ่มใหม่ ๆ ที่เก็บตามข้อกำหนดของโครงการวิจัย

6.2. สภาวะในการจัดการ

6.2.1. ควรเก็บสิ่งส่งตรวจไว้ที่อุณหภูมิห้อง (15 ถึง 25°ซ หรือสูงถึง 30°ซ โดยขึ้นอยู่กับสภาพภูมิอากาศ) ตั้งแต่เวลาเก็บจนถึงเมื่อนำส่งไปยังห้องปฏิบัติการที่ทำกระบวนการ

6.2.2. ควรนำส่งสิ่งส่งตรวจไปยังห้องปฏิบัติการที่ทำกระบวนการโดยเร็วที่สุด (แนวปฏิบัติที่ดีที่สุดจะอยู่ภายใน 30 นาทีถึง 4 ชั่วโมงหลังจากการเก็บ) เพื่อให้ห้องปฏิบัติการที่ทำกระบวนการมีเวลาเพียงพอในการดำเนินกระบวนการเก็บรักษาในสภาวะเย็นยวดยิ่งให้เสร็จสิ้น คลินิกควรพูดคุยเกี่ยวกับข้อกำหนดจำเพาะกับห้องปฏิบัติการที่ทำกระบวนการก่อนการรับเข้าโครงการวิจัย

6.2.3. ห้องปฏิบัติการที่ทำกระบวนการควรทำกระบวนการกับสิ่งส่งตรวจ โดยเร็วที่สุดเมื่อได้รับ (แนวปฏิบัติที่ดีที่สุดจะเป็นเริ่มทำกระบวนการภายใน 30 นาทีหลังจากได้รับตัวอย่าง):

- เวลาทำกระบวนการ (เวลาที่เริ่มทำกระบวนการ) คือเวลาที่หลอดถูกเปิดหรือใส่ในเครื่องปั่นเหวี่ยงเป็นครั้งแรก แล้วแต่ว่าเหตุการณ์ใดเกิดขึ้นก่อน
- เวลาที่ถูกแช่แข็งหมายถึงเวลาเมื่อ:
  - ใส่ StrataCooler® ของ Agilent Technologies, Nalgene® Mr. Frosty™ หรือ Corning® CoolCell® ไว้ในตู้แช่แข็งที่ตั้งไว้ที่ -80°ซ ดู SPLI/LPC/LM สำหรับช่วงอุณหภูมิที่ยอมรับได้ โดยคำนึงถึงความผันผวนของอุณหภูมิตู้แช่แข็งที่เกิดขึ้นเป็นประจำ
  - โปรแกรมทำความเย็นของตู้แช่แข็งแบบควบคุมอัตรา เช่น CryoMed® เริ่มทำงานแล้ว
    <u>หมายเหตุ</u>: ไม่อนุญาตให้ใช้ตู้แช่แข็งแบบควบคุมอัตราสำหรับตัวอย่างของ HVTN
- เวลาทั้งหมดคำนวณจากเวลาเก็บสิ่งส่งตรวจและเวลาที่ถูกแช่แข็ง โดยในอุดมคติ เวลานี้คือ 8 ชั่วโมงหรือน้อยกว่า แต่ควรทำกระบวนการกับสิ่งส่งตรวจทั้งหมดโดยไม่คำนึงถึงเวลาทั้งหมด
- เวลาทำกระบวนการทั้งหมดคำนวณจากเวลาทำกระบวนการและเวลาที่ถูกแช่แข็ง แนะนำให้น้อยกว่าสี่ชั่วโมง โดยน้อยกว่า 3 ชั่วโมงเป็นเวลาในอุดมคติ

6.2.4. ห้ามแช่เย็นหรือแช่แข็งเลือดครบ ห้ามวางเลือดให้สัมผัสกับถุงประคบเย็นโดยตรง หากคุณใช้ถุงประคบเย็นในสภาวะที่ร้อนจัด

6.3. สิ่งส่งตรวจรอง

6.3.1. สิ่งส่งตรวจที่จับตัวเป็นลิ่ม

6.3.1.1. ควรทำกระบวนการกับเลือดทั้งหมดโดยไม่คำนึงถึงว่าเลือดจับตัวเป็นลิ่มหรือไม่ เว้นแต่โครงการวิจัยจะมีคำสั่งไว้เป็นอย่างอื่น

6.3.1.2. นำลิ่มเลือดออกและทำกระบวนการตามปกติ

6.3.1.3. ทำเครื่องหมายสภาวะเป็น CLT ในแผ่นงานและใน LDMS ระบุรายละเอียดในหัวข้อความคิดเห็นของแผ่นงานการทำกระบวนการ

6.3.2. สิ่งส่งตรวจที่มีเม็ดเลือดแดงแตก

6.3.2.1. การแตกของเม็ดเลือดแดง (hemolysis) อาจส่งผลต่อคุณภาพของ PBMC

6.3.2.2. ทำกระบวนการตามปกติ

6.3.2.3. ทำเครื่องหมายสภาวะเป็น HEM ในแผ่นงานและใน LDMS ระบุรายละเอียดในหัวข้อความคิดเห็นของแผ่นงานการทำกระบวนการ

6.3.3. เซลล์ที่ได้ต่ำ

6.3.3.1. หากเซลล์ที่ได้ไม่เพียงพอต่อความต้องการของโครงการวิจัย โปรดติดต่อคลินิกเพื่อขอสิ่งส่งตรวจทดแทนที่เป็นไปได้ หากเซลล์ที่ได้ $\leq 0.4 \times 10^6$ เซลล์/มิลลิลิตร โปรดติดต่อคลินิกเพื่อขอตัวอย่างทดแทนที่เป็นไปได้และแจ้งให้ศูนย์ห้องปฏิบัติการของเครือข่าย (HVTN, HPTN) หรือทีมโครงการวิจัย (ACTG) ทราบ

6.3.3.2. บันทึกขั้นตอนการแก้ไขปัญหาหรือการทวนสอบข้อมูลที่ดำเนินการในหัวข้อความคิดเห็นของแผ่นงานการทำกระบวนการ

6.4. สิ่งส่งตรวจที่ยอมรับไม่ได้

6.4.1. สิ่งส่งตรวจที่ไม่ติดฉลากหรือติดฉลากไม่ถูกต้องจะถูกปฏิเสธ

6.4.2. ปฏิบัติตามคำแนะนำของเครือข่ายสำหรับการปฏิเสธสิ่งส่งตรวจที่ล่าช้า

6.4.3. ตัวอย่างที่รั่ว: แจ้งให้คลินิกทราบหากตัวอย่างใด ๆ รั่วและตัดสินว่าตัวอย่างดังกล่าวสามารถใช้ได้หรือไม่ ความปราศจากเชื้อของตัวอย่างและความปลอดภัยของบุคลากรห้องปฏิบัติการที่จัดการตัวอย่างเป็นสิ่งสำคัญอย่างยิ่ง

7. อุปกรณ์

7.1. การเตรียมและการทำกระบวนการ

7.1.1. ตู้ชีวนิรภัย (biosafety cabinet, BSC) คลาส II ระดับที่ 2 หรือสูงกว่า

7.1.2. เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วต่ำ (สามารถปั่นเหวี่ยงที่ 200 ถึง 1000 x แรงโน้มถ่วง) ที่มีโรเตอร์ที่มีถ้วยใส่หลอดแบบเหวี่ยงไปมา (swinging bucket rotor) ควรเป็นแบบแช่เย็น แต่อุณหภูมิโดยรอบก็ยอมรับได้ ต้องมีถ้วยใส่หลอด (bucket) ที่มีฝาครอบ/ฝาปิด

7.1.3. ไมโครปิเปตในช่วง 20, 200, 1000 ไมโครลิตร

7.1.4. อุปกรณ์ช่วยปิเปต (Pipet-Aid) (ควรเป็นแบบไร้สาย) สำหรับใช้กับปิเปตทางชีรัมวิทยาแบบใช้แล้วทิ้ง

7.1.5. ตู้แช่เย็น 2 ถึง 8°ซ

7.1.6. ตู้แช่แข็ง -20°ซ (หรือต่ำกว่า) ที่ไม่มีระบบละลายน้ำแข็งอัตโนมัติ (สำหรับการจัดเก็บ FBS)

7.1.7. ตู้แช่แข็ง -80°ซ (-65 ถึง -95°ซ สำหรับ ACTG, -70 ถึง -95°ซ สำหรับ HVTN และ HPTN) สำหรับการจัดเก็บ PBMC ระยะสั้น

7.1.8. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 37 ถึง 56°ซ (สำหรับการลดฤทธิ์ FBS ด้วยความร้อน หากจำเป็น) (หมายเหตุสำหรับ HVTN: ไม่จำเป็นสำหรับโครงการวิจัยของ HVTN เครือข่ายเป็นผู้จัดเตรียม FBS ที่ได้รับอนุมัติจาก HVTN ให้ห้องปฏิบัติการในลักษณะที่ถูกลดฤทธิ์ด้วยความร้อนแล้ว (heat inactivated))

7.1.9. ถ้วยหรือบีกเกอร์สำหรับสารฟอกขาวหรือสารฆ่าเชื้ออื่น ๆ

7.1.10. แท่นวาง (rack) ที่เหมาะสำหรับวางหลอดเก็บเลือด (blood collection tube) ขนาด 15 มิลลิลิตร และหลอดแบบก้นแหลมขนาด 50 มิลลิลิตร แบบตั้งขึ้นในระหว่างขั้นตอนการทำกระบวนการและการขนส่ง

7.1.11. แท่นวางไครโอไวแอลเพื่อให้สามารถเปิด/ปิดไครโอไวแอลด้วยมือเดียวในระหว่างขั้นตอนการแอลิควอต (aliquoting) (ควรใช้แท่นวางที่จำเพาะต่อ Nunc)

7.2. อุปกรณ์ที่ LDMS ต้องใช้ (ดูข้อกำหนดในเว็บไซต์ LDMS และข้อกำหนดที่จำเพาะต่อเครือข่ายสำหรับรายละเอียด)

7.2.1. คอมพิวเตอร์ที่เป็นไปตามข้อมูลจำเพาะที่ Frontier Science กำหนดไว้สำหรับ LDMS บนเว็บไซต์

7.2.2. เครื่องพิมพ์สำหรับฉลากที่สร้างด้วย LDMS

7.2.3. เครื่องสแกนบาร์โค้ด 2 มิติ

7.2.4. ฉลากที่เข้ากันได้กับ LN_2 ที่มีพื้นที่พิมพ์ 1x1 นิ้ว

7.2.5. ผ้าหมึกที่เข้ากันได้กับ LN_2 ที่จำเพาะต่อเครื่องพิมพ์ ทนต่อรอยขีดข่วนและสารเคมี

7.3. อุปกรณ์ไนโตรเจนเหลว (LN_2) (หากเครือข่ายต้องการ)

7.3.1. ถังจัดเก็บ LN_2 ($\leq$ -140°ซ)

7.3.2. ถังเก็บ LN_2 สำหรับขนส่งแบบแห้งที่ได้รับอนุมัติจาก IATA

7.4. การนับเซลล์:

หมายเหตุ: วิธีการนับอาจต้องได้รับอนุมัติจากเครือข่าย ปฏิบัติตามกระบวนการเทียบมาตรฐาน (calibration procedure) ของผู้ผลิตที่เกี่ยวข้องหากใช้เครื่องนับเซลล์อัตโนมัติ

7.4.1. เครื่องนับเซลล์อัตโนมัติที่สามารถนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (Beckman-Coulter Vi-Cell, Muse® หรือสิ่งที่เทียบเท่า) โดยปกติ HVTN ไม่อนุมัติเครื่องนับเซลล์คลาสนี้สำหรับตัวอย่างใหม่ ๆ

7.4.2. เครื่องนับเซลล์อัตโนมัติที่ไม่สามารถแยกแยะเซลล์ที่มีชีวิต (Coulter Counter, Abbott Cell-Dyn®, Sysmex® หรือสิ่งที่เทียบเท่า)

หมายเหตุ: อาจใช้เครื่องนับเซลล์อัตโนมัติที่ไม่สามารถระบุเซลล์ที่มีชีวิตเพื่อให้ได้จำนวนเซลล์ทั้งหมดจากการนับโดยไม่แยกแยะเซลล์ที่มีชีวิต อย่างไรก็ตาม หากกำลังเตรียมสิ่งส่งตรวจสำหรับการทดสอบความชำนาญ (Proficiency Testing Program) ในการเก็บรักษาในสภาวะเย็นยวดยิ่งสำหรับ PBMC ของ IQA ต้องมีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตจากการนับ

หมายเหตุสำหรับ HVTN: หากกำลังจะใช้เครื่องนับอัตโนมัติเพื่อจุดประสงค์ของโครงการวิจัย เครือข่ายแนะนำอย่างยิ่งให้ใช้เครื่องนับคลาสนี้ วิธีการนับต้องได้รับการทบทวนและได้รับอนุมัติล่วงหน้าจาก HVTN

7.4.3. สไลด์นับเซลล์ด้วยมือ (ฮีมาไซโตมิเตอร์) และกล้องจุลทรรศน์ชนิดไลต์ฟิลด์ (light-field microscope)

หมายเหตุ: หากใช้สไลด์นับเซลล์ด้วยมือกับสีทริแพนบลู ต้องนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตและนำมาใช้สำหรับการคำนวณเซลล์ หากใช้สีคริสตัลไวโอเล็ต สามารถใช้จำนวนเซลล์ทั้งหมดจากการนับสำหรับการคำนวณเซลล์

7.5. การเก็บรักษาในสภาวะเย็นยวดยิ่ง

หมายเหตุ: อาจใช้หนึ่งในหน่วยแช่แข็งแบบควบคุมอัตรา (CRFU) ต่อไปนี้ตามคำแนะนำของผู้ผลิต ควรใช้ StrataCooler® ของ Agilent Technologies และ Corning®

CoolCell®

หมายเหตุ: หากไม่ปฏิบัติตามคำแนะนำของผู้ผลิต ต้องดำเนินการศึกษาเพื่อตรวจสอบความเที่ยงตรง (validation study)

7.5.1. มอดูลการเก็บรักษาในสภาวะเย็นยวดยิ่ง StrataCooler® ของ Agilent Technologies – 400005

7.5.1.1. StrataCooler® ต้องมีอุณหภูมิ 2 ถึง 8°ซ ก่อนเริ่มทำให้ไครโอไวแอลเย็นลง ห้ามใส่ไครโอไวแอลใน StrataCooler® ที่มีอุณหภูมิต่ำกว่าอุณหภูมิเริ่มต้นที่ 2°ซ

7.5.2. Corning® (เดิมชื่อ BioCision®) CoolCell®

7.5.2.1. ต้องแน่ใจว่าชิ้นส่วนทั้งหมดของ CoolCell® รวมถึงแหวนกลาง (central ring) กลับสู่อุณหภูมิห้อง (15 ถึง 25°ซ หรือสูงถึง 30°ซ โดยขึ้นอยู่กับสภาพภูมิอากาศ) ระหว่างการใช้งานแต่ละครั้ง

7.5.3. ภาชนะบรรจุสำหรับการแช่แข็งแบบไครโอ Nalgene® Mr. Frosty™ 1°ซ/นาที

7.5.3.1. ควรเก็บ Mr. Frosty™ ไว้ที่อุณหภูมิโดยรอบ (15 ถึง 25°ซ หรือสูงถึง 30°ซ โดยขึ้นอยู่กับสภาพภูมิอากาศ) ระหว่างการใช้งานแต่ละครั้ง

7.5.3.2. ระดับไอโซโพรพานอลต้องถูกต้อง และต้องเปลี่ยนไอโซโพรพานอลทั้งหมดหลังจากรอบการแช่แข็ง-การละลายรอบที่ห้า ต้องใช้บันทึก (log) เพื่อติดตามรอบการแช่แข็ง/การละลายและการเปลี่ยนแปลงของรีเอเจนต์ ดูภาคผนวก B

7.5.4. ตู้แช่แข็งแบบควบคุมอัตรา เช่น ห้องแช่แข็ง CryoMed® (Gordinier) (หมายเหตุสำหรับ HVTN: ไม่อนุญาตให้ใช้ตู้แช่แข็งแบบควบคุมอัตราสำหรับตัวอย่างของ HVTN)

8. วัสดุใช้แล้วทิ้ง

8.1. พลาสติก

8.1.1. ปิเปตทางซีรัมวิทยาแบบใช้แล้วทิ้งขนาด 1, 5, 10, 25, 50 มิลลิลิตร ปราศจากเชื้อ

8.1.2. ปลายไมโครปิเปต 20, 100, 200, 1000 ไมโครลิตร ปราศจากเชื้อ

8.1.3. หลอดปั่นเหวี่ยงแบบใช้แล้วทิ้งแบบก้นแหลม มีขีดบอกปริมาตร ทำจากพอลิโพรพิลีน ปราศจากเชื้อขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร

8.1.4. หลอดแยกเซลล์ที่มีตัวกั้นแบบฟริต (CSTFB) ขนาด 50 มิลลิลิตร แห้ง (ไม่ได้จัดซื้อในรูปแบบเติมตัวกลางสำหรับการแยกเซลล์ไว้ล่วงหน้า)

8.1.4.1. จำเป็นสำหรับการทำกระบวนการของ HVTN ทบทวน LPC/SPLI/LM สำหรับข้อกำหนดที่จำเพาะต่อโครงการวิจัยสำหรับเครือข่ายทั้งหมด

8.1.5. ไวแอลแบบไครโอเจนิก (ไครโอไวแอล) ที่มีเกลียวในขนาด 1.8 มิลลิลิตร ถึง 2 มิลลิลิตร และฝาเกลียวที่มีแหวนรูปตัวโอ ปราศจากเชื้อ ทำจากพอลิโพรพิลีนเท่านั้น ตั้งได้เอง มีขีดบอกปริมาตร กันรั่วได้ ซึ่งผลิตขึ้นสำหรับการเก็บรักษา LN_2 ในเฟสไอ (ประมาณ -140°ซ) ยืนยันการยอมรับ (acceptability) การใช้สิ่งใด ๆ แทนที่ไวแอลแบบไครโอเจนิกกับเครือข่ายก่อนทำการจัดซื้อ (ดูภาคผนวก E)

หมายเหตุ: *ต้องไม่*ใช้หลอดที่มีฝาสแน็ป นอกจากนี้ ต้องไม่เติมสารในไครโอไวแอลเกินความจุที่ผู้ผลิตระบุไว้หรือจนถึงด้านบนสุดของหลอด

8.1.6. เลือกได้: ขวด/ขวดรูปชมพู่แบบใช้แล้วทิ้งปราศจากเชื้อ คอ 45 มิลลิเมตร ขนาด 250 ถึง 500 มิลลิลิตร สำหรับการรวมเลือดครบในปริมาตรมากที่เจาะมาก่อนการแยก PBMC

8.1.7. เลือกได้: ปิเปตสำหรับถ่ายสาร (transfer pipet) ที่ทำจากพลาสติกปราศจากเชื้อขนาด 5 มิลลิลิตร ที่บรรจุในซองแยก

8.1.8. เลือกได้: หลอดแยกเซลล์ที่มีตัวกั้นแบบฟริต (CSTFB) ขนาด 50 มิลลิลิตร ที่เติมสารไว้ล่วงหน้า

หมายเหตุสำหรับ HVTN: ไม่ใช่สิ่งที่เลือกได้สำหรับการศึกษาของ HVTN HVTN กำหนดว่าห้องปฏิบัติการต้องจัดซื้อ CSTFB "แห้ง" (นั่นคือ ไม่ได้จัดซื้อในรูปแบบเติมสารไว้ล่วงหน้า) การใช้ CSTFB อื่น ๆ ต้องได้รับอนุมัติล่วงหน้าจากศูนย์ห้องปฏิบัติการของ HVTN)

8.2. ปากกามาร์กเกอร์

หมายเหตุ: ปากกามาร์กเกอร์สำหรับเขียนบนหลอดและไวแอลควรมีปลายแหลม และหมึกแห้งเร็วไม่ลบเลือน

8.3. ฉลาก

หมายเหตุ: ฉลากและหมึกแบบไครโอเจนิกต้องเหมาะสำหรับ -80°ซ หรืออุณหภูมิในการจัดเก็บ LN_2 ในเฟสไอ

9. อุปกรณ์ป้องกันส่วนบุคคล

หมายเหตุ: ต้องมีอุปกรณ์ป้องกันส่วนบุคคลที่เหมาะสำหรับใช้กับจุลชีพก่อโรคทางเลือด ปฏิบัติตามแนวทางและแนวปฏิบัติสำหรับการจัดการผลิตภัณฑ์เลือดของห้องปฏิบัติการในท้องถิ่น

9.1. เสื้อคลุมหรือชุดคลุมสำหรับใส่ในห้องปฏิบัติการ

9.2. อุปกรณ์ป้องกันดวงตา

9.3. ถุงมือไนไตรล์ชนิดไม่มีแป้งหรือสิ่งที่เทียบเท่า

9.4. ถุงมือไครโอ

9.5. กระบังป้องกันใบหน้า (ที่มีแผ่นปิดคาง หากข้อบังคับด้านชีวนิรภัยในท้องถิ่นแนะนำว่าควรมีหรือกำหนดไว้) ซึ่งจำเป็นเมื่อทำงานกับ LN_2

10. รีเอเจนต์

10.1. ต้องจัดซื้อรีเอเจนต์ปราศจากเชื้อและใช้เทคนิคปลอดเชื้อ (aseptic technique)

10.1.1. เก็บขวดที่เปิดแล้วไว้ที่อุณหภูมิที่ผู้ผลิตแนะนำจนกว่าจะใช้หมด จนกว่าจะได้รับคำแนะนำให้ทิ้งด้านล่าง หรือจนกว่าจะถึงวันหมดอายุของผู้ผลิต แล้วแต่ว่าเหตุการณ์ใดเกิดขึ้นก่อน

10.1.2. ดูภาคผนวก E สำหรับผลิตภัณฑ์ที่แนะนำ

10.1.3. ทิ้งหากมีร่องรอยการปนเปื้อนที่สามารถมองเห็นได้ เช่น มีลักษณะขุ่น

10.2. รีเอเจนต์สำหรับการล้างและการเจือจาง (WDR)

10.2.1. 1X สารละลายเกลือสมดุลของแฮงก์ส (Hanks' Balanced Salt Solution, HBSS) ที่ไม่มีแคลเซียมหรือแมกนีเซียมแบบพร้อมใช้งาน

10.2.2. 1X น้ำเกลือที่บัฟเฟอร์ด้วยฟอสเฟต (Phosphate-Buffered Saline, PBS) ที่ไม่มีแคลเซียมหรือแมกนีเซียมแบบพร้อมใช้งาน

10.3. ตัวกลางเกรเดียนต์ของความหนาแน่น (ความหนาแน่น 1.077 กรัม/มิลลิลิตร)

10.3.1. ตัวกลางปราศจากเชื้อแบบพร้อมใช้งานสำหรับการแยกลิมโฟไซต์ของมนุษย์จากเลือดส่วนปลาย ซึ่งได้ลิมโฟไซต์ในปริมาณมาก

10.3.2. ดูภาคผนวก E สำหรับผลิตภัณฑ์ที่แนะนำ

10.4. หลอดแยกเซลล์ที่มีตัวกั้นแบบฟริต (CSTFB หากใช้) จำเป็นสำหรับ HVTN เว้นแต่จะมีหมายเหตุทางเลือกไว้ใน SPLI/LPC/LM ที่จำเพาะต่อโครงการวิจัย

10.4.1. ระบบ CSTFB ที่ไม่เติมสาร (รวม CSTFB แห้งกับตัวกลางเกรเดียนต์ของความหนาแน่น 1.077)

10.4.1.1. ปล่อยให้ตัวกลางเกรเดียนต์ของความหนาแน่น (DGM) อยู่ที่อุณหภูมิห้อง (15 ถึง 25°ซ หรือสูงถึง 30°ซ โดยขึ้นอยู่กับสภาพภูมิอากาศ) ปกป้องให้พ้นแสง

10.4.1.2. ทำงานใน BSC โดยปฏิบัติตามเทคนิคปลอดเชื้อ

10.4.1.3. บันทึกข้อมูล CSTFB และ DGM ที่เกี่ยวข้องโดยตรงจากบรรจุภัณฑ์หรือขวดที่ใช้ลงในแผ่นงาน PBMC CSTFB ที่เตรียมไว้ล่วงหน้าต้องมีฉลากที่มีข้อมูลที่จำเป็นทั้งหมด วันที่เตรียม และชื่อย่อของบุคคลที่เตรียมหลอด

10.4.1.4. เตรียมหลอดโดยการปิเปตปริมาตรของ DGM ที่เหมาะสำหรับขนาดของหลอด CSTFB ที่ใช้ (ตามหมายเหตุด้านล่าง)

ความจุของหลอด (มิลลิลิตร)	ปริมาตรของตัวกลางเกรเดียนต์ของความหนาแน่น (มิลลิลิตร)
50 มิลลิลิตร	15 มิลลิลิตร

10.4.1.5. ปิดฝา CSTFB พร้อมกับเติม DGM และปั่นเหวี่ยงที่ 800 x แรงโน้มถ่วง เป็นเวลา 30 วินาที (หรือตั้งเวลาต่ำสุดมากกว่า 30 วินาที) ที่อุณหภูมิห้อง (15 ถึง 25°ซ หรือสูงถึง 30°ซ โดยขึ้นอยู่กับสภาพภูมิอากาศ)

10.4.1.6. ตอนนี้ DGM ควรอยู่ใต้ตัวกั้นแบบฟริต ตรวจสอบหลอดเพื่อหาช่องว่างหรือฟองอากาศขนาดใหญ่ระหว่างชั้น DGM และตัวกั้นแบบฟริต หรือเพื่อหา DGM ที่ยังคงอยู่เหนือฟริต

10.4.1.7. หากมีช่องว่างหรือฟองอากาศขนาดใหญ่ใต้ฟริต ให้เติมตัวกลางเพิ่มเติม ปั่นเหวี่ยง CSTFB อีกครั้งที่ 800-1000 x แรงโน้มถ่วง เป็นเวลา 30 วินาทีถึง 1 นาที (เลือกการตั้งค่าเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ต่ำสุด) และตรวจสอบซ้ำ

10.4.1.8. หากมีของเหลว (DGM) เหนือฟริต ให้ปั่นเหวี่ยง CSTFB อีกครั้งที่ 800-1000 x แรงโน้มถ่วง เป็นเวลา 30 วินาทีถึง 1 นาที (เลือกการตั้งค่าเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ต่ำสุด) หากสารละลายเกรเดียนต์ของความหนาแน่นใด ๆ ยังคงอยู่เหนือฟริตหลังจากการปั่นเหวี่ยงซ้ำ ให้นำออกโดยการปฏิบัติตามเทคนิคปลอดเชื้อ

10.4.1.9. ปฏิบัติตามคำแนะนำในการจัดเก็บตัวกลางเกรเดียนต์ของความหนาแน่นของผู้ผลิต

10.4.2. CSTFB ที่เติมสารไว้ล่วงหน้า (ตัวกลางเกรเดียนต์ของความหนาแน่น 1.077)

หมายเหตุ: ความจุของหลอดที่จำเป็นจะขึ้นอยู่กับปริมาตรของเลือดครบที่เก็บในตู้แช่เย็น (2 ถึง 8°ซ)

หมายเหตุสำหรับ HVTN: ไม่อนุญาตให้ใช้ CSTFB ที่จัดซื้อในรูปแบบเติมสารไว้ล่วงหน้า

- ปกป้องให้พ้นแสง
- ลักษณะขุ่นบ่งชี้ถึงการเสื่อมสภาพของผลิตภัณฑ์ ทิ้งหากสังเกตเห็นร่องรอยการปนเปื้อนที่สามารถมองเห็นได้

- ปล่อยให้ CSTFB ที่เติมสารไว้ล่วงหน้าอยู่ที่อุณหภูมิห้อง (15 ถึง 25°ซ หรือสูงถึง 30°ซ โดยขึ้นอยู่กับสภาพภูมิอากาศ) ก่อนใช้งาน

10.5. รีเอเจนต์สำหรับการแช่แข็ง

10.5.1. ต้องมีซีรัมจากตัวอ่อนวัว (Fetal Bovine Serum, FBS) ที่ถูกลดฤทธิ์ด้วยความร้อน (ดูหัวข้อ 11.1 FBS ที่ถูกลดฤทธิ์ด้วยความร้อนสำหรับรายละเอียดการจัดการและการบริหารจัดการ)

หมายเหตุสำหรับ HVTN และการศึกษาร่วมกับ HVTN: เครือข่ายเป็นผู้จัดเตรียม FBS ที่ได้รับอนุมัติจาก HVTN ให้ห้องปฏิบัติการ ผู้จำหน่ายและรุ่นที่ผลิตของ FBS ที่ได้รับอนุมัติจาก HVTN จะไม่สามารถจัดซื้อนอกห่วงโซ่อุปทาน/กระบวนการของ HVTN ได้

10.5.1.1. ตรวจสอบรายชื่อผู้จำหน่ายที่ควรเลือกกับเครือข่ายที่เกี่ยวข้อง

10.5.1.2. ขอใบรับรองผลการวิเคราะห์ (certificate of analysis) จากผู้จำหน่ายเก็บไว้เป็นบันทึกเกี่ยวกับการควบคุมคุณภาพของห้องปฏิบัติการในท้องถิ่น

หมายเหตุ: อาจต้องใช้สำเนาใบรับรองผลการวิเคราะห์ FBS ในการส่งออก (หรือนำเข้า) แอลิควอตของ PBMC ระหว่างประเทศ

10.5.1.3. FBS ที่เก็บแบบแช่แข็ง (≤ -20°ซ/ตามคำแนะนำของผู้ผลิต) สามารถใช้ได้จนถึงวันหมดอายุของผู้ผลิต

10.5.1.4. FBS ที่ละลายแล้วและเก็บไว้ที่ 2 ถึง 8°ซ จะมีความคงตัวเป็นเวลาหนึ่งเดือนปฏิทิน

10.5.2. ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) เกรดสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์

10.5.2.1. ใช้ DMSO เกรดสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์

10.5.2.2. เก็บขวดที่เปิดแล้วไว้ที่อุณหภูมิห้อง (15 ถึง 25°ซ หรือสูงถึง 30°ซ โดยขึ้นอยู่กับสภาพภูมิอากาศ) ตรวจสอบขวดเพื่อดูวันหมดอายุและทิ้งหากหมดอายุ

10.5.2.3. เมื่อเปิดแล้ว DMSO ที่ยังไม่เจือจาง เมื่อปกป้องให้พ้นแสงและความชื้น จะมีความคงตัวที่อุณหภูมิห้อง (15 ถึง 25°ซ หรือสูงถึง 30°ซ โดยขึ้นอยู่กับสภาพภูมิอากาศ) เป็นเวลา 6 เดือน (หรือจนถึงวันหมดอายุของผู้ผลิต หากวันดังกล่าว < 6 เดือนนับจากวันที่เปิด) แก้ไขฉลากบนขวดให้ตรงกับวันหมดอายุใหม่

10.5.2.4. ใช้เทคนิคปลอดเชื้อเมื่อนำ DMSO ออกจากขวดเพื่อหลีกเลี่ยงการปนเปื้อนที่อาจเกิดขึ้นได้

10.5.2.5. ทิ้งสิ่งที่อยู่ในขวดที่เปิดแล้วหากสังเกตเห็นร่องรอยการปนเปื้อนที่สามารถมองเห็นได้

10.5.2.6. อาจแอลิควอตรีเอเจนต์ในปริมาณเล็กน้อยเพื่อช่วยรักษาความปราศจากเชื้อ ติดฉลากแอลิควอตด้วย “DMSO” ชื่อผู้ผลิต หมายเลขรุ่นที่ผลิต วันที่เปิด/แอลิควอต วันหมดอายุ (หกเดือนนับจากวันที่เปิดหรือวันหมดอายุจากขวดดั้งเดิม แล้วแต่ว่าวันใดจะถึงก่อน) และชื่อย่อของเจ้าหน้าที่เทคนิค ปกป้องแอลิควอตให้พ้นแสง

10.5.3. สารฆ่าเชื้อ

10.5.3.1. ขวดสเปรย์สารฆ่าเชื้อเอทานอล 70% โดยปริมาตร/ปริมาตร

10.5.3.2. ถ้วยหรือบีกเกอร์และขวดสเปรย์สำหรับสารฟอกขาว 10% โดยปริมาตร/ปริมาตร (ต้องทำเป็นรายวัน)

10.5.3.3. สารฆ่าเชื้ออื่น ๆ ตามที่ระบุไว้ในนโยบายของห้องปฏิบัติการในท้องถิ่น

10.6. รีเอเจนต์สำหรับการนับเซลล์

หมายเหตุ: ข้อกำหนดสำหรับรีเอเจนต์สำหรับการนับจะแตกต่างกันได้โดยขึ้นอยู่กับวิธีการที่ใช้ ดู SOP/คำแนะนำที่ได้รับอนุมัติจากเครือข่ายสำหรับวิธีการที่ใช้ ไม่อนุญาตให้ใช้กรดแกลเซียลแอซีติกสำหรับการนับด้วยมือของ HVTN

10.6.1. สารละลายทริแพนบลู 0.4%

10.6.2. เลือกได้: สามารถใช้สารละลายคริสตัลไวโอเล็ต 0.05% ในการย้อมสีนิวเคลียสของเซลล์ เพื่อให้สามารถระบุและนับเซลล์ที่มีนิวเคลียสเดียวโดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ หากต้องการดูความอยู่รอดได้ ต้องดำเนินการนับด้วยมือครั้งที่สองโดยใช้สีทริแพนบลู สารละลายคริสตัลไวโอเล็ต 0.05% มี: สีคริสตัลไวโอเล็ต 0.05 กรัม, กรดแกลเซียลแอซีติก 2 มิลลิลิตร และ H_2O กลั่นหรือปราศจากไอออน 98 มิลลิลิตร

11. การเตรียมรีเอเจนต์

11.1. FBS ที่ถูกลดฤทธิ์ด้วยความร้อน (HI-FBS)

หมายเหตุ: สามารถสั่งซื้อ HI-FBS จากผู้ผลิต หรือสามารถสั่งซื้อ FBS จากผู้ผลิต และลดฤทธิ์ด้วยความร้อนในห้องปฏิบัติการ ปฏิบัติตามคำแนะนำเหล่านี้สำหรับการละลาย การแอลิควอต และการใช้

หมายเหตุสำหรับ HVTN: เครือข่ายเป็นผู้จัดเตรียม FBS ที่ได้รับอนุมัติจาก HVTN ให้ห้องปฏิบัติการในลักษณะที่ถูกลดฤทธิ์ด้วยความร้อนแล้ว ผู้จำหน่ายและรุ่นที่ผลิตของ FBS ที่ได้รับอนุมัติจาก HVTN โดยปกติจะไม่สามารถจัดซื้อนอกห่วงโซ่อุปทาน/กระบวนการของ HVTN ได้

11.1.1. นำ FBS ออกจากตู้แช่แข็ง

11.1.2. ควรละลายในตู้แช่เย็น (2 ถึง 8°ซ) หรือละลายเป็นเวลาหลายชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง (15 ถึง 25°ซ หรือสูงถึง 30°ซ โดยขึ้นอยู่กับสภาพภูมิอากาศ) ห้ามปล่อยให้ FBS อยู่ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาใด ๆ ที่นานกว่าที่จำเป็นในการดำเนินกระบวนการละลายให้เสร็จสิ้น

11.1.3. ค่อย ๆ หมุนหลอดสองหรือสามครั้งตลอดเวลาที่ทำการละลาย

11.1.4. ปฏิบัติตามคำแนะนำเพิ่มเติมหาก FBS ไม่ถูกลดฤทธิ์ด้วยความร้อน หากผู้ผลิตทำการลดฤทธิ์ของ FBS ด้วยความร้อนแล้ว ให้ข้ามไปที่ 11.1.5

11.1.4.1. ใส่ FBS ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 56°ซ (55 ถึง 57°ซ) ตรวจติดตามอุณหภูมิของอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิอย่างระมัดระวัง อุณหภูมิที่สูงกว่านี้สามารถทำให้ส่วนประกอบของ FBS เสื่อมสภาพได้

หมายเหตุ: ระดับน้ำในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิควรเลยระดับของ FBS ในขวด แต่ไม่ควรถึงฝาขวด การทำเช่นนี้จะช่วยให้แน่ใจว่ามีการให้ความร้อน FBS เท่า ๆ กันและหลีกเลี่ยงการปนเปื้อน

11.1.4.2. เมื่ออุณหภูมิของอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิกลับมาที่ 56°ซ (55 ถึง 57°ซ) ให้ความร้อน FBS เป็นเวลา 30 นาที โดยทำการผสมทุก 5 ถึง 10 นาที การให้ความร้อนเป็นเวลานานกว่านี้สามารถทำให้ส่วนประกอบของ FBS เสื่อมสภาพได้

หมายเหตุ: ทำความสะอาดขวดด้วยเอทานอล 70% โดยปริมาตร/ปริมาตร ก่อนเปิด

11.1.5. ค่อย ๆ ผสม HI-FBS แต่ทั่วถึงโดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อ

11.1.6. แอลิควอตลงในหลอดปั่นเหวี่ยงแบบก้นแหลม มีขีดบอกปริมาตร ทำจากพอลิโพรพิลีน ปราศจากเชื้อขนาด 50 มิลลิลิตร ที่ติดฉลากแล้ว หรือแอลิควอตขนาดอื่น ๆ ที่เหมาะสำหรับปริมาณงานที่คาดไว้

หมายเหตุ: ฉลากควรระบุว่าหลอดเหล่านี้เป็น “HI-FBS” และระบุชื่อผู้ผลิต หมายเลขรุ่นที่ผลิต วันที่แอลิควอต สภาวะในการจัดเก็บ วันหมดอายุดั้งเดิมของผู้ผลิต และชื่อย่อของเจ้าหน้าที่เทคนิค FBS มีความคงตัวเป็นเวลา 1 เดือน (หากช่วงเวลา 1 เดือนไม่เกินวันหมดอายุดั้งเดิมของผู้ผลิต) ที่ 2 ถึง 8°ซ หรือจนถึงวันหมดอายุดั้งเดิมของผู้ผลิตหากเก็บไว้ที่ -20°ซ
อย่าลืมอัปเดตวันหมดอายุและสภาวะในการจัดเก็บบนแอลิควอต/ขวดที่นำออกจากการจัดเก็บ -20°ซ เพื่อใช้งาน

11.1.7. แช่เย็น (2 ถึง 8°ซ) หลอดแอลิควอตในจำนวนที่จำเป็นสำหรับปริมาณงานที่คาดไว้ ผสมให้เข้ากันดีก่อนใช้งาน ควรแช่แข็งหลอดแอลิควอตที่ไม่ต้องใช้ทันที และหลอดแอลิควอตจะมีความคงตัวจนถึงวันหมดอายุดั้งเดิมของผู้ผลิต

หมายเหตุ: รอบการแช่แข็ง/การละลายซ้ำ ๆ จะมีผลไม่พึงประสงค์ต่อคุณภาพของ FBS ห้ามแช่แข็งแอลิควอตที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิแช่เย็นซ้ำอีก

11.1.7.1. ในการใช้แอลิควอตที่ถูกแช่แข็ง ควรละลายล่วงหน้าในตู้แช่เย็นข้ามคืน หรือละลายที่อุณหภูมิห้อง (15 ถึง 25°ซ หรือสูงถึง 30°ซ โดยขึ้นอยู่กับสภาพภูมิอากาศ) เป็นเวลาหลายชั่วโมง ห้ามปล่อยให้ FBS อยู่ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาใด ๆ ที่นานกว่าที่จำเป็นในการดำเนินกระบวนการละลายให้เสร็จสิ้น

11.1.7.2. เมื่อละลายแล้ว FBS จะมีความคงตัวเป็นเวลา 1 เดือนที่ 2 ถึง 8°ซ หรือวันหมดอายุจากขวดดั้งเดิม แล้วแต่ว่าวันใดจะถึงก่อน อย่าลืมอัปเดตวันหมดอายุและสภาวะในการจัดเก็บบนแอลิควอต/ขวดที่นำออกจากการจัดเก็บ -20°ซ เพื่อใช้งาน ผสมให้เข้ากันดีก่อนใช้งาน

11.2. สารละลายสำหรับการเก็บรักษาในสภาวะเย็นยวดยิ่ง (CPS) ใหม่ ๆ

11.2.1. ส่วนประกอบของ CPS

ส่วนประกอบ	ร้อยละ (โดยปริมาตร/ปริมาตร)
DMSO	10%
FBS (ที่ถูกลดฤทธิ์ด้วยความร้อน)	90%

11.2.2. การเตรียม CPS

11.2.2.1. ใช้หลอดปั่นเหวี่ยงแบบก้นแหลมขนาด 15 มิลลิลิตร หรือ 50 มิลลิลิตร แบบใช้แล้วทิ้ง ปราศจากเชื้อ และติดฉลากแล้วเพื่อบรรจุ CPS ที่เตรียมไว้

หมายเหตุ: การผสม DMSO และ FBS เป็นปฏิกิริยาแบบคายความร้อน (exothermic reaction)

11.2.2.2. ต้องเตรียม CPS ล่วงหน้าและทำให้เย็นในตู้แช่เย็น (2 ถึง 8°ซ) เป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาทีหรือในอ่างน้ำแข็งควบคุมอุณหภูมิเป็นเวลาอย่างน้อย 15 นาทีก่อนใช้งาน

หมายเหตุ: สามารถเก็บ CPS ไว้ที่ 2 ถึง 8°ซ เป็นเวลา 1 วันทำการ (<18 ชั่วโมง)

11.2.3. ใช้สูตรด้านล่างเพื่อประมาณปริมาตรของ CPS ในการเตรียมการแขวนตะกอนใหม่ขั้นสุดท้ายของ PBMC นอกจากนี้ยังแสดงตัวอย่างไว้ด้วย

เลือดครบที่สามารถใช้ได้ (มิลลิลิตร) x เซลล์ที่ได้ (เซลล์/มิลลิลิตร) x ความเข้มข้นของการแช่แข็งจนแข็ง (มิลลิลิตร/เซลล์) = CPS ที่ประมาณไว้ (มิลลิลิตร)

ปัดเศษผลลัพธ์นี้ขึ้นให้เป็นค่ามิลลิลิตรเต็มที่ใกล้ที่สุด

หมายเหตุ: ปริมาตรของเลือดครบที่สามารถใช้ได้ (UWBV) คือปริมาตรทั้งหมดของเลือดครบที่ถูกทำกระบวนการ (ปริมาตรของเลือดครบที่สามารถใช้ได้อาจไม่เท่ากับความจุของหลอด)

หมายเหตุ: เมื่อทำกระบวนการเลือดที่เก็บในหลอด ACD จะรวมถึงทั้งความจุจากการเจาะและสารกันเลือดเป็นลิ่มชนิดของเหลวเมื่อพิจารณาปริมาตรสูงสุด การวัด และการคำนวณเซลล์ที่ได้

- ตัวอย่างเช่น หลอด ACD ขนาด 8.5 มิลลิลิตร มีสารกันเลือดเป็นลิ่ม 1.5 มิลลิลิตร และจะเจาะเลือดปริมาตรสูงสุดที่ 8.5 มิลลิลิตร เมื่อประมาณและวัดหลอด ACD ความจุสูงสุดจะอยู่ที่ 10.0 มิลลิลิตรต่อหลอดเจาะเลือดขนาด 8.5 มิลลิลิตร (เลือดครบ 8.5 มิลลิลิตร + สารกันเลือดเป็นลิ่มชนิดของเหลว 1.5 มิลลิลิตร =10.0 มิลลิลิตร)

หมายเหตุ: ควรทำชุดการผลิตของ CPS ล่วงหน้าก่อนที่จะได้ปริมาตรของเลือดครบที่สามารถใช้ได้ที่วัดได้ หากต้องการทำเช่นนี้ ให้ดำเนินการคำนวณข้างต้นโดยใช้ปริมาตรของเลือดครบสูงสุดที่คาดไว้ (นั่นคือ ความจุของหลอดเก็บที่มีสารกันเลือดเป็นลิ่มคูณด้วยจำนวนหลอดที่คาดไว้ที่จะเก็บในนัดหมาย) เมื่อเตรียม CPS ห้องปฏิบัติการควรพิจารณาผลที่ได้โดยเฉลี่ยที่ได้มาด้วยประชากรผู้เข้าร่วม เริ่มด้วยเซลล์ที่ได้เฉลี่ย 1.5 x 10^6 เซลล์/1.0 มิลลิลิตร สำหรับการคำนวณครั้งแรก ตรวจติดตามการใช้ CPS รายวันเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพให้สูงที่สุดและลดของเสียให้ต่ำที่สุด

- ตัวอย่างเช่น หากทิ้ง CPS ปริมาณมากเป็นประจำในตอนท้ายวัน ให้ปรับเซลล์ที่ได้ลงเพื่อให้สะท้อนถึงประชากรผู้เข้าร่วมได้แม่นยำยิ่งขึ้น หากการคำนวณทำให้ได้ปริมาตรของ CPS ที่ไม่เพียงพอ นั่นคือ ต้องทำชุดการผลิตหลายชุด เพิ่มเซลล์ที่ได้ในการคำนวณ หรือพิจารณาเพิ่มปริมาตรสุดท้ายเป็นอัตราร้อยละที่คงที่ เช่น 20%

ตัวอย่าง: เลือดของผู้ใหญ่—ชุดการผลิตรายวันของ CPS - นัดหมายตามตารางเวลาหลายครั้ง:

- ความเข้มข้นเป้าหมายของการแช่แข็งจนแข็ง (มิลลิลิตร/เซลล์) สำหรับทั้งหมดคือ (1.0 มิลลิลิตร/15 x 10^6 เซลล์) หรือ 15 ล้านเซลล์ที่ถูกแช่แข็งใน CPS 1 มิลลิลิตร (V2)
- คำนวณปริมาตรทั้งหมดที่คาดไว้:
  หมายเหตุ: อย่าลืมรวมสารกันเลือดเป็นลิ่มชนิดของเหลวเมื่อคำนวณปริมาตรทั้งหมดที่คาดไว้จากหลอด ACD หลอด NaHep และ EDTA ไม่มีสารกันเลือดเป็นลิ่มชนิดของเหลว ดังนั้น ปริมาตรของหลอดตามที่บันทึกไว้ในคำขอของห้องปฏิบัติการจึงเป็นปริมาตรสูงสุดที่เป็นไปได้
  - นัดหมายตามตารางเวลาครั้งแรกรวมถึงหลอด ACD 18 x 8.5 มิลลิลิตร สำหรับการทำกระบวนการกับ PBMC
  - นัดหมายตามตารางเวลาครั้งที่สองรวมถึงหลอด ACD 8 x 8.5 มิลลิลิตร ACD สำหรับการทำกระบวนการกับ PBMC
  - นัดหมายตามตารางเวลาครั้งที่สามรวมถึงหลอด NaHep 8 x 10.0 มิลลิลิตร สำหรับการทำกระบวนการกับ PBMC
  - หลอดทั้งหมดที่คาดไว้ (18+8+8) = 34, 34 หลอด x 10.0 มิลลิลิตร = ปริมาตรสูงสุดที่คาดไว้ 340.0 มิลลิลิตร

เลือดครบที่สามารถใช้ได้ x	**เซลล์ที่ได้ x**	**ความเข้มข้นของ การแช่แข็งจนแข็ง =**	**CPS ที่ประมาณไว้ที่จะเตรียม**
(340.0 มิลลิลิตร) x	(1.5 x 10^6 เซลล์/ 1 มิลลิลิตร) x	(1.0 มิลลิลิตร/15 x 10^6 เซลล์) =	34.0 มิลลิลิตร

ตัวอย่าง: เลือดของผู้ใหญ่—การเก็บเลือดในปริมาตรมาก ความเข้มข้นเป้าหมายของการแช่แข็งจนแข็ง (มิลลิลิตร/เซลล์) คือ (1.0 มิลลิลิตร/15 x 10^6 เซลล์) หรือ 15 ล้านเซลล์ที่ถูกแช่แข็งใน CPS 1 มิลลิลิตร (V2) ชุดการผลิตของ CPS ที่สร้างขึ้นหลังจากวัด UWBV

เลือดครบที่สามารถใช้ได้ x	**เซลล์ที่ได้ x**	**ความเข้มข้นของการแช่แข็งจนแข็ง =**	**CPS ที่ประมาณไว้ที่จะเตรียม**
(135.0 มิลลิลิตร) x	(1.5 x 10^6 เซลล์/ 1 มิลลิลิตร) x	(1.0 มิลลิลิตร/15 x 10^6 เซลล์) =	14.0 มิลลิลิตร

ตัวอย่าง: เลือดของผู้ใหญ่—การเก็บเลือด NaHep 8 x 10.0 มิลลิลิตร ความเข้มข้นเป้าหมายของการแช่แข็งจนแข็ง (มิลลิลิตร/เซลล์) คือ (1.0 มิลลิลิตร/10 x 10^6 เซลล์) หรือ 10 ล้านเซลล์ที่ถูกแช่แข็งใน CPS 1 มิลลิลิตร (V2) ชุดการผลิตของ CPS ที่สร้างขึ้นหลังจากวัด UWBV

เลือดครบที่สามารถใช้ได้ x	เซลล์ที่ได้ x	ความเข้มข้นของการแช่แข็งจนแข็ง =	CPS ที่ประมาณไว้ที่จะเตรียม
(80.0 มิลลิลิตร) x	(1.5 x 10^6 เซลล์/ 1 มิลลิลิตร) x	(1.0 มิลลิลิตร/10 x 10^6 เซลล์) =	12.0 มิลลิลิตร

11.2.4. ใช้สูตรต่อไปนี้ในการคำนวณปริมาณ DMSO และ FBS ที่จำเป็น

CPS = DMSO 1 ส่วน + FBS 9 ส่วน

ตัวอย่าง:

ปริมาตรของ CPS ที่ประมาณไว้	ปริมาตรของ DMSO = (.1)(ปริมาตรของ CPS)	ปริมาตรของ HI-FBS = ปริมาตรของ CPS – ปริมาตรของ DMSO	ปริมาตรสุดท้ายของ CPS = ปริมาตรของ DMSO + ปริมาตรของ FBS
10.0 มิลลิลิตร	1.0 มิลลิลิตร	9.0 มิลลิลิตร	10.0 มิลลิลิตร
5.0 มิลลิลิตร	0.5 มิลลิลิตร	4.5 มิลลิลิตร	5.0 มิลลิลิตร

11.2.5. บันทึกปริมาตรของ CPS, DMSO และ FBS ในแผ่นงาน PBMC หากสร้างชุดการผลิตที่ใช้ร่วมกัน แนะนำให้บันทึกเวลาที่สร้างและชื่อย่อของบุคคลที่สร้างชุดการผลิตดังกล่าวด้วยเช่นกัน

12. บทนำและแนวทางเกี่ยวกับการทำกระบวนการกับ PBMC

มีหลักการและขั้นตอนมาตรฐานที่ใช้กันทั่วไปในกระบวนการทำกระบวนการกับ PBMC ทั้งหมด การแปรผันจะเกิดขึ้นจากตัวเลือกเทคนิคการแยก (CSTFB เทียบกับโอเวอร์เลย์ด้วยมือ) การดำเนินการกับเลือด (การเจือจางโดยมีหรือไม่มีการเปลี่ยนพลาสมาเทียบกับการเก็บพลาสมาโดยตรง) ความเข้มข้นสุดท้ายของเซลล์ และการแช่แข็ง/การจัดเก็บ เลือกหัวข้อกระบวนการที่เหมาะสมสำหรับการแยกเซลล์และการดำเนินการกับเลือด และการแช่แข็งและการจัดเก็บตามข้อกำหนดของเครือข่ายและโครงการวิจัย

13. การแยกเซลล์และการเจือจางเลือดด้วยหลอดแยกเซลล์ที่มีตัวกั้นแบบฟริต (CSTFB) โดยมีการเปลี่ยนพลาสมา

<u>หัวข้อ 13 สามารถใช้ได้สำหรับเครือข่ายทั้งหมด ตรวจสอบข้อกำหนดของโครงการวิจัยและสื่อที่มี ใช้หัวข้อ 13 หรือหัวข้อ 14 สำหรับตัวอย่างที่กำหนดให้ใด ๆ แต่ไม่ใช่ทั้งสองหัวข้อ</u>

13.1. การแยกลิมโฟไซต์จากเลือดส่วนปลายโดยใช้หลอดแยก CSTFB ที่มีการเติมตัวกลางเกรเดียนต์ของความหนาแน่น (DGM) ที่อุณหภูมิห้อง (15 ถึง 25°ซ หรือสูงถึง 30°ซ โดยขึ้นอยู่กับสภาพภูมิอากาศ)

13.1.1. ดำเนินการปิเปตและการผสมทั้งหมดในตู้ชีวนิรภัย (BSC) คลาส II ระดับที่ 2 หรือสูงกว่า

13.1.2. สเปรย์บนพื้นผิว แท่นวาง และขวดรีเอเจนต์ทั้งหมดด้วยเอทานอล 70% โดยปริมาตร/ปริมาตรหรือสารฆ่าเชื้อที่เทียบเท่าทุกครั้งก่อนเข้าและใช้ BSC

13.1.3. ดำเนินกระบวนการที่อุณหภูมิห้อง (15 ถึง 25°ซ หรือสูงถึง 30°ซ โดยขึ้นอยู่กับสภาพภูมิอากาศ) เว้นแต่จะหมายเหตุไว้เป็นอย่างอื่น

13.1.4. ใช้ปิเปตใหม่สำหรับหมายเลขประจำตัวผู้เข้าร่วม (participant identification number, PTID) แต่ละหมายเลขและสารเติมแต่ง

13.2. เตรียมตัวอย่างเลือดครบ รีเอเจนต์ และวัสดุสิ้นเปลือง

13.2.1. เตรียมและทำให้ CPS เย็น (ดูหัวข้อ 11 การเตรียมรีเอเจนต์) ก่อนทำกระบวนการหรืออย่างเพียงพอล่วงหน้าก่อนผสมกับ PBMC หากจำเป็นต้องใช้ CPS เพิ่มเติม

<u>หมายเหตุ:</u> ควรเตรียมชุดการผลิตของ CPS ล่วงหน้าก่อนเริ่มขั้นตอนการทำกระบวนการกับสิ่งส่งตรวจ ต้องตรวจติดตามปริมาตรของชุดการผลิต และบันทึกรายละเอียดทั้งหมดของการสร้างชุดการผลิตเพิ่มเติม (เมื่อจำเป็น) ในแผ่นงาน PBMC

13.2.2. เตรียมหลอด CSTFB ให้เพียงพอสำหรับจัดการปริมาณเลือดสูงสุดที่คาดไว้

13.2.2.1. สำหรับหลอด CSTFB 50 มิลลิลิตร ให้วางแผนสำหรับปริมาตรสูงสุดที่ 20 มิลลิลิตร หรือ CSTFB หนึ่งหลอดสำหรับหลอดเก็บเลือดขนาด 8.5-10.0 มิลลิลิตร ทุกสองหลอด เคล็ดลับ: หารจำนวนหลอดเก็บขนาด 8.5-10.0 มิลลิลิตร ทั้งหมดที่จะได้รับด้วย 2 หากผลลัพธ์เป็นเศษส่วน (จำนวนหลอดเก็บเลือดที่เป็นเลขคี่) ให้ปัดเศษขึ้นให้เป็นจำนวนเต็มที่ใกล้ที่สุด (นั่นคือ เพิ่มหลอด CSTFB อีกหนึ่งหลอด)

13.2.2.2. ตัวอย่าง:

- นัดหมายที่ 1 มีหลอด NaHep 3 x 10.0 มิลลิลิตร เตรียมหลอด CSTFB 2 หลอด

- นัดหมายที่ 10 มีหลอด ACD 10 x 8.5 มิลลิลิตร เตรียมหลอด CSTFB 5 หลอด

13.2.3. ต้องแน่ใจว่าหลอด CSTFB ที่มี DGM ที่เตรียมไว้มีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง (15 ถึง 25°ซ หรือสูงถึง 30°ซ โดยขึ้นอยู่กับสภาพภูมิอากาศ) ก่อนเริ่มขั้นตอนการทำกระบวนการ

13.2.4. ตรวจสอบหลอด CSTFB ที่เติมสารแล้วด้วยสายตาเพื่อยืนยันว่าไม่มีฟองอากาศขนาดใหญ่และช่องว่างอยู่ระหว่าง DGM และตัวกั้นแบบฟริต และไม่มี DGM อยู่เหนือฟริตก่อนเติม WDR หรือเลือดลงในหลอด (ดูคำแนะนำในการเตรียม CSTFB ในหัวข้อ 10.4 สำหรับคำแนะนำเกี่ยวกับการจัดการกับปัญหาปริมาตรของ DGM เมื่อมีหมายเหตุไว้)

13.2.5. รวบรวมหลอดปั่นเหวี่ยงแบบก้นแหลม มีขีดบอกปริมาตร ทำจากพอลิโพรพิลีน ปราศจากเชื้อขนาด 50 มิลลิลิตร หลอดใหม่ในจำนวนเท่ากับ CSTFB ที่เตรียมไว้ (ดูหัวข้อ 13.2.2) สำหรับใช้งาน หลอด "ล้าง" เหล่านี้จะใช้สำหรับเซลล์ที่เก็บมาและขั้นตอนการล้างที่ตามมา

ขนาดของ CSTFB (มิลลิลิตร)	ขนาดของหลอดปั่นเหวี่ยงแบบก้นแหลม (มิลลิลิตร)
50	50

13.2.6. หากต้องมีการเปลี่ยนพลาสมา รวบรวมหลอดปั่นเหวี่ยงแบบก้นแหลม มีขีดบอกปริมาตร ทำจากพอลิโพรพิลีน ปราศจากเชื้อขนาด 15 หรือ 50 มิลลิลิตร ที่เหมาะสำหรับปริมาตรที่จำเป็นของพลาสมาที่จะเก็บ ติดฉลากด้วย PTID สารกันเลือดเป็นลิ่ม และอนุพันธ์ (derivative)

13.2.7. หากหลอดสิ่งส่งตรวจเย็นเมื่อสัมผัส (เนื่องจากสภาวะโดยรอบที่เย็น เช่น การขนส่งในช่วงเดือนที่มีอากาศเย็นกว่า) ให้ปล่อยให้หลอดมีอุณหภูมิถึงอุณหภูมิห้อง (15 ถึง 25°ซ หรือสูงถึง 30°ซ โดยขึ้นอยู่กับสภาพภูมิอากาศ) ก่อนทำกระบวนการ

13.2.8. ตรวจสอบ PTID บนหลอดเลือดทั้งหมดที่ได้รับอย่างระมัดระวัง จัดระเบียบหลอดปฐมภูมิเพื่อไม่ให้มีโอกาสที่หลอดจะผสมปะปนกันระหว่าง PTID/PID หรือสารกันเลือดเป็นลิ่ม

<u>ข้อเสนอแนะ</u>: วางหลอดทั้งหมดสำหรับ PTID แต่ละหมายเลข/สารกันเลือดเป็นลิ่มแต่ละชนิดในแท่นวางหนึ่งแท่น สามารถใช้แท่นวางคนละแท่นเพื่อแยก PTID หรือประเภทหลอด และใช้ปากกามาร์กเกอร์ที่มีสีต่างกันสำหรับ PTID แต่ละหมายเลขเพื่อหลีกเลี่ยงความสับสน

13.3. การเปลี่ยนพลาสมา

<u>หมายเหตุ:</u> ดำเนินขั้นตอนการเปลี่ยนพลาสมานี้เฉพาะในกรณีที่ต้องการแอลิควอตของพลาสมาจากหลอดเก็บ PBMC ตามโครงการวิจัยหรือ SPLI/LPC/LM เท่านั้น ไปที่ขั้นตอนที่ 13.4 หากไม่ต้องการแอลิควอตของพลาสมา

13.3.1. ต้องทำกระบวนการกับหลอดเก็บเลือดจาก PTID เดียวกันและสารกันเลือดเป็นลิ่มเดียวกันแยกกัน (ไม่รวมในหลอดปั่นเหวี่ยงแบบก้นแหลม 50 มิลลิลิตร) เว้นแต่จะบ่งชี้ไว้เป็นอย่างอื่นใน SPLI/LPC/LM ที่จำเพาะต่อโครงการวิจัย

13.3.2. ทำเครื่องหมายปริมาตรของเลือดครบบนหลอดเก็บแต่ละหลอดที่เมนิสคัส (meniscus)

13.3.3. ปั่นเหวี่ยงเลือดครบที่ 200 ถึง 400 x แรงโน้มถ่วง เป็นเวลา 10 นาที บันทึกเวลาที่เริ่มทำกระบวนการในแผ่นงาน PBMC

13.3.4. ถ่ายพลาสมาไปยังหลอดปั่นเหวี่ยงแบบก้นแหลม 15 หรือ 50 มิลลิลิตร ที่ติดฉลากแล้วสำหรับการปั่นเหวี่ยงครั้งที่สองเพื่อนำเศษชิ้นส่วนเซลล์ใด ๆ ออก

13.3.5. เติม WDR ในปริมาณที่เพียงพอเพื่อทำให้เลือดกลับมามีเลือดครบในปริมาตรดั้งเดิม ค่อย ๆ ผสม และทำกระบวนการกับ PBMC ต่อในขั้นตอนที่ 13.4

13.3.6. ทำกระบวนการกับพลาสมาให้เสร็จสิ้นด้วยการปั่นเหวี่ยงพลาสมาที่เก็บมาที่ 800 ถึง 1200 x แรงโน้มถ่วง เป็นเวลา 10 นาทีเพื่อให้ได้แอลิควอต PL2 หรือตามโครงการวิจัยหรือ SPLI/LPC/LM ขั้นตอนนี้อาจเกิดขึ้นในภายหลังเมื่อไม่ได้ใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงสำหรับการทำกระบวนการกับ PBMC

13.3.7. แอลิควอตพลาสมาที่ถูกปั่นคู่ (double spun) ลงในหลอดแอลิควอตที่ติดฉลากแล้วตามที่ SPLI/LPC/LM ที่จำเพาะต่อโครงการวิจัยระบุไว้ และทิ้งเศษชิ้นส่วนเซลล์ที่เหลือ

13.4. การเจือจางเลือดสำหรับการแยก CSTFB

<u>หมายเหตุ:</u> อัตราส่วนสูงสุดของเลือดต่อ WDR ควรอยู่ที่ประมาณ 2:1 ใช้หลอด 50 มิลลิลิตร หนึ่งหลอดสำหรับเลือดครบแต่ละ 12 ถึง 20 มิลลิลิตร ใช้หลอด CSTFB มากเท่าที่จำเป็นเพื่อกระจายเลือดทั้งหมดสำหรับ PID/PTID แต่ละหมายเลข

<u>หมายเหตุ:</u> ตัวกลางเกรเดียนต์ของความหนาแน่นเป็นพิษต่อเซลล์ ควรทำงานอย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพในระหว่างขั้นตอนการแยก

13.4.1. ติดฉลาก CSTFB และหลอด "ล้าง" สำหรับการปั่นเหวี่ยงแบบก้นแหลมปราศจากเชื้อที่สอดคล้องกันแต่ละหลอดด้วย PTID (และสารกันเลือดเป็นลิ่ม หากเหมาะสม)

13.4.2. เติม WDR ลงใน CSTFB ที่เตรียมไว้และติดฉลากแล้วแต่ละหลอดโดยใช้ปิเปตทางซีรัมวิทยาปราศจากเชื้อ:

ขนาดของ CSTFB (มิลลิลิตร)	ปริมาตรโดยประมาณของ WDR (มิลลิลิตร)
50	5

13.4.3. เติม WDR ลงในหลอด "ล้าง" สำหรับการปั่นเหวี่ยงแบบก้นแหลมปราศจากเชื้อที่ติดฉลากไว้ล่วงหน้าแต่ละหลอดโดยใช้ปิเปตทางซีรัมวิทยาปราศจากเชื้อ:

ขนาดของ CSTFB (มิลลิลิตร)	ขนาดของหลอดปั่นเหวี่ยงแบบก้นแหลม (มิลลิลิตร)	ปริมาตรที่เติมไว้ล่วงหน้าของ WDR (มิลลิลิตร)
50	50	25

13.4.4. เปิดฝาหลอดเลือดที่ใส่สารกันเลือดเป็นลิ่ม หากไม่จำเป็นต้องมีขั้นตอนการเปลี่ยนพลาสมา/ไม่ได้ดำเนินขั้นตอนการเปลี่ยนพลาสมา ให้บันทึกเวลาที่นำฝาออกเป็นเวลาที่เริ่มทำกระบวนการในแผ่นงาน PBMC

13.4.5. หากเลือดในหลอดเก็บจับตัวเป็นลิ่มหรือมีเม็ดเลือดแดงแตกที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า (grossly) ดูหัวข้อ 6.3

13.4.6. ใช้ปิเปตทางซีรัมวิทยาปราศจากเชื้อเพื่อค่อย ๆ ผสมเลือดครบ แล้วถ่ายเลือดลงใน CSTFB ที่ติดฉลากแล้ว

หมายเหตุ: ต้องถ่ายเลือดโดยใช้ปิเปตทางซีรัมวิทยา 10 มิลลิลิตร ในปริมาณที่วัดได้ที่ 10.0 มิลลิลิตร จนกระทั่งเหลือน้อยกว่า 10.0 มิลลิลิตร กระจายเลือดในหลอด CSTFB หลายหลอดโดยมีการเพิ่มขึ้นอย่างคงที่เพื่อให้แน่ใจว่าจะสามารถติดตามปริมาตรได้อย่างแม่นยำสำหรับการวัด UWBV ตลอดการกระจายเลือดครบ

13.4.7. การถ่ายเลือดปริมาณทั้งหมด 15-20 มิลลิลิตร ที่เป็นเป้าหมายลงใน CSTFB ที่ติดฉลากแล้วแต่ละหลอด (ช่วงขยายด้านล่างจะอนุญาตให้ใช้ได้ในบางสถานการณ์ซึ่งช่วงเป้าหมายเป็นไปไม่ได้เท่านั้น) ห้ามเริ่มเติม CSTFB ขนาด 50 มิลลิลิตร หลอดใหม่ เว้นแต่จะมีเลือด/เหลือเลือดอยู่ขั้นต่ำ 12 มิลลิลิตร

ขนาดของ CSTFB (มิลลิลิตร)	ปริมาตรโดยประมาณของเลือด (มิลลิลิตร)*
50	15-20 (12 ถึง 22 จะอนุญาตให้ใช้ได้ในบางสถานการณ์)

*ปริมาตรของเลือดที่ต่ำกว่านี้ โดยเฉพาะเมื่อมีฮีมาโทคริตต่ำ อาจทำให้บัฟฟีโคต (buffy coat) ตกลงมาใกล้กับ/บนฟริต ทำให้เก็บได้ยาก ปริมาตรของเลือดที่สูงกว่านี้อาจส่งผลให้มีส่วนประกอบที่ไม่สำคัญ (background)/เศษชิ้นส่วนในสิ่งส่งตรวจมากขึ้น ดูแนวทางที่จำเพาะต่อโครงการวิจัยสำหรับปริมาตรของการเจาะเลือดที่ต่ำกว่านี้

13.4.8. กำหนดและบันทึกการวัดปริมาตรของเลือดครบที่สามารถใช้ได้อย่างแม่นยำภายใน 0.1 มิลลิลิตร

หมายเหตุ: ปริมาตรของเลือดครบที่สามารถใช้ได้ไม่จำเป็นต้องเท่ากับขนาดของหลอด

13.4.9. กลั้ว (rinse) หลอดเลือดที่ใส่สารกันเลือดเป็นลิ่มดั้งเดิมแต่ละหลอดที่มี WDR โดยใช้ปิเปตปราศจากเชื้อ เติมปริมาตรที่กลั้วลงใน CSTFB โดยต้องแน่ใจว่าไม่เกินขีดจำกัดของปริมาตรทั้งหมดของหลอด (WDR + เลือดครบ)

ขนาดของ CSTFB (มิลลิลิตร)	ขีดจำกัดของปริมาตรทั้งหมดของหลอด (มิลลิลิตร) (เลือดครบ +WDR)
50	30

13.4.10. ปิดฝา CSTFB อย่างระมัดระวัง

13.5. การปั่นเหวี่ยงความหนาแน่นและการเก็บ CSTFB

13.5.1. จับหลอดในลักษณะตั้งขึ้น วางลงในแท่นวาง และขนถ่ายไปยังเครื่องปั่นเหวี่ยง

13.5.2. ปั่นเหวี่ยงที่ 800 ถึง 1000 x แรงโน้มถ่วง เป็นเวลา 15 นาทีที่ 15 ถึง 25°ซ (หรือสูงถึง 30°ซ โดยขึ้นอยู่กับสภาพภูมิอากาศ) โดยปิดเบรก/ตั้งค่าเป็นศูนย์

หมายเหตุ: หากเปิดเบรกไว้ จะทำให้ชั้นแตกได้

13.5.3. ในขณะที่หลอด CSTFB กำลังปั่นอยู่ ให้ทิ้งหลอดเก็บทั้งหมดที่เทสารออกจนว่างเปล่าแล้วโดยปฏิบัติตามแนวปฏิบัติทางห้องปฏิบัติการ ทำความสะอาดพื้นผิวของ BSC และจัดระเบียบสำหรับขั้นตอนถัดไป

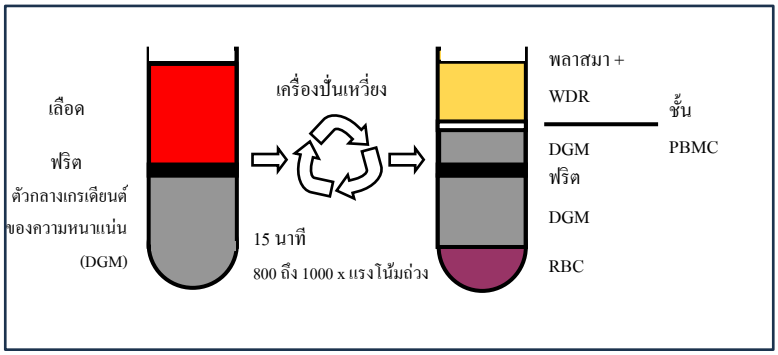
13.5.4. ยืนยันว่ามีหลอดปั่นเหวี่ยงแบบก้นแหลมปราศจากเชื้อที่ติดฉลากแล้วที่เติม WDR ไว้ล่วงหน้า (หลอด "ล้าง") ในจำนวนที่ถูกต้องพร้อมอยู่ใน BSC สำหรับขั้นตอนการเก็บ/การล้าง

13.5.5. เมื่อเครื่องปั่นเหวี่ยงหยุดสนิทแล้ว ค่อย ๆ นำ CSTFB แต่ละหลอดออกจากเครื่องปั่นเหวี่ยงเพื่อไม่ให้รบกวนชั้นต่าง ๆ ใช้แท่นวางเพื่อรองรับหลอดและขนถ่ายไปยัง BSC อย่างระมัดระวัง

13.5.6. การปั่นเหวี่ยงทำให้สิ่งที่อยู่ในหลอดแบ่งตัวเป็นชั้นที่แตกต่างกันหกชั้น ซึ่งรวมถึงฟริตด้วย จากด้านบนของหลอด ชั้นเหล่านี้ได้แก่:

- พลาสมา + WDR
- ชั้น PBMC
- ตัวกลางเกรเดียนต์ของความหนาแน่น (DGM)

- ฟริต
- ตัวกลางเกรเดียนต์ของความหนาแน่น (DGM)
- เซลล์เม็ดเลือดแดง (RBC) ที่อัดแน่นและแกรนูโลไซต์



13.5.7. ตรวจสอบหลอดเพื่อหาปัญหาที่อาจเกิดขึ้นได้ต่อไปนี้ บันทึกการสังเกตและการดำเนินการติดตามผลใด ๆ ที่ดำเนินการตามข้อกำหนดของเครือข่ายและห้องปฏิบัติการ

- การแตกของเม็ดเลือดแดงในชั้นพลาสมา + WDR
- ลิ่มเลือดที่สามารถมองเห็นได้บนฟริตหลังจากการปั่นเหวี่ยง
- ชั้น PBMC ไม่ดีเนื่องจากข้อผิดพลาดในการปั่นเหวี่ยง เช่น เวลาเร่งความเร็วหรือการเบรก ชั้น PBMC จะดูเล็กและไม่ชัดเจน ขณะที่ชั้นพลาสมา + WDR อาจขุ่นเล็กน้อย ดูภาคผนวก C สำหรับการแก้ไขปัญหา
- ชั้น PBMC ที่เกิดขึ้นบนฟริตเนื่องจากจำนวนของ RBC จากการนับหรือปริมาตรของฮีมาโทคริตที่ต่ำ
- ชั้น RBC ที่อยู่ติดกับใต้และสัมผัสกับชั้น PBMC

13.5.8. นำส่วนพลาสมา-WDR สีค่อนข้างเหลืองด้านบนออกจนถึงภายใน 1 ถึง 2 เซนติเมตร ของแถบ PBMC สีขาวขุ่นที่อยู่ตรงรอยต่อ (interface) ระหว่างส่วนพลาสมา-WDR (สีค่อนข้างเหลือง) และสารละลายตัวกลางสำหรับการแยกที่มีลักษณะใสโดยใช้ปิเปตทางซีรัมวิทยาปราศจากเชื้อใหม่ สำหรับ PTID แต่ละหมายเลข ระวังอย่ารบกวนชั้นเซลล์ในระหว่างกระบวนการนี้ ทิ้งส่วนพลาสมา-WDR ตามนโยบายของห้องปฏิบัติการ

หมายเหตุ: ในอีกทางเลือกหนึ่ง อาจนำแถบ PBMC สีขาวขุ่นออกโดยการสอดปิเปตผ่านชั้นพลาสมา-WDR ด้านบนอย่างระมัดระวัง

13.5.9. เก็บเซลล์ทั้งหมดที่รอยต่อสีขาวขุ่นเหนือฟริตโดยใช้ปิเปตทางซีรัมวิทยาปราศจากเชื้อ ใช้ความระมัดระวังไม่ดูดตัวกลางเกรเดียนต์ของความหนาแน่นออกมากเกินกว่าที่จำเป็น

13.5.9.1. ถ่ายเซลล์ที่เก็บมาจาก CSTFB หนึ่งหลอดไปยังหลอด “ล้าง” สำหรับการปั่นเหวี่ยงแบบก้นแหลมปราศจากเชื้อที่ติดฉลากไว้ล่วงหน้าที่สอดคล้องกันหลอดเดียว (ที่เตรียมตามหมายเหตุในหัวข้อ 13.4) เติม WDR ในหลอดไว้ล่วงหน้าเพื่อประหยัดเวลา

13.5.10. ปิดฝา CSTFB ที่มีเซลล์เม็ดเลือดแดงและตัวกลางสำหรับการแยกที่เหลืออีกครั้ง ทิ้ง CSTFB โดยถือเป็นของเสียอันตรายทางชีวภาพโดยปฏิบัติตามนโยบายของห้องปฏิบัติการ

13.6. ต้องแน่ใจว่าบันทึกองค์ประกอบหลักทั้งหมดตามข้อกำหนดของเครือข่ายและห้องปฏิบัติการแล้ว ไปที่หัวข้อ 15

14. การแยกเซลล์ด้วยโอเวอร์เลย์หรืออันเดอร์เลย์ตัวกลางเกรเดียนต์ของความหนาแน่นด้วยมือและการเจือจางเลือดด้วยการแยกเซลล์แบบเกรเดียนต์ของความหนาแน่นด้วยมือโดยมีการเปลี่ยนพลาสมา

<u>หัวข้อ 14 สามารถใช้ได้สำหรับเครือข่ายทั้งหมด ตรวจสอบข้อกำหนดของโครงการวิจัยและสื่อที่มี ใช้หัวข้อ 13 หรือหัวข้อ 14 สำหรับตัวอย่างที่กำหนดให้ใด ๆ แต่ไม่ใช่ทั้งสองหัวข้อ</u>

<u>หมายเหตุสำหรับ HVTN:</u> HVTN ไม่แนะนำให้ใช้วิธีอันเดอร์เลย์ ต้องได้รับอนุมัติวิธีอันเดอร์เลย์ล่วงหน้าจากศูนย์ห้องปฏิบัติการของ HVTN ก่อนใช้สำหรับสิ่งส่งตรวจของโครงการวิจัย

14.1. การแยกลิมโฟไซต์จากเลือดส่วนปลายโดยใช้วิธีโอเวอร์เลย์ตัวกลางเกรเดียนต์ของความหนาแน่นด้วยมือ

14.1.1. ดำเนินการปิเปตและการผสมทั้งหมดในตู้ชีวนิรภัย (BSC) คลาส II ระดับที่ 2 หรือสูงกว่า

14.1.2. สเปรย์บนพื้นผิว แท่นวาง และขวดรีเอเจนต์ทั้งหมดด้วยเอทานอล 70% โดยปริมาตร/ปริมาตรทุกครั้งก่อนเข้าและใช้ BSC

14.1.3. ดำเนินกระบวนการที่อุณหภูมิห้อง (15 ถึง 25°ซ หรือสูงถึง 30°ซ โดยขึ้นอยู่กับสภาพภูมิอากาศ) เว้นแต่จะหมายเหตุไว้เป็นอย่างอื่น

14.1.4. ใช้ปิเปตใหม่สำหรับหมายเลขประจำตัวผู้เข้าร่วม (participant identification number, PTID) แต่ละหมายเลขและสารเติมแต่ง

14.2. เตรียมตัวอย่างเลือดครบ รีเอเจนต์ และวัสดุสิ้นเปลือง

14.2.1. เตรียมและทำให้ CPS เย็น (ดูหัวข้อ 11 การเตรียมรีเอเจนต์) ก่อนทำกระบวนการหรืออย่างเพียงพอล่วงหน้าก่อนผสมกับ PBMC หากจำเป็นต้องใช้ CPS เพิ่มเติม

หมายเหตุ: ควรเตรียมชุดการผลิตของ CPS ล่วงหน้าก่อนเริ่มขั้นตอนการทำกระบวนการกับสิ่งส่งตรวจ ต้องตรวจติดตามปริมาตรของชุดการผลิต และบันทึกรายละเอียดทั้งหมดของการสร้างชุดการผลิตเพิ่มเติม (เมื่อจำเป็น) ในแผ่นงาน PBMC

14.2.2. ปล่อยให้ตัวกลางเกรเดียนต์ของความหนาแน่นอยู่ที่อุณหภูมิห้อง (15 ถึง 25°ซ หรือสูงถึง 30°ซ โดยขึ้นอยู่กับสภาพภูมิอากาศ) ดูหัวข้อ 10 รีเอเจนต์สำหรับข้อมูลเพิ่มเติม

14.2.3. รวบรวมหลอดปั่นเหวี่ยงแบบก้นแหลม มีขีดบอกปริมาตร ทำจากพอลิโพรพิลีน ปราศจากเชื้อขนาด 50 มิลลิลิตร ให้เพียงพอสำหรับจัดการขั้นตอนการเจือจาง โอเวอร์เลย์/อันเดอร์เลย์ และการล้างทั้งหมด

14.2.4. หากต้องมีการเปลี่ยนพลาสมา รวบรวมหลอดปั่นเหวี่ยงแบบก้นแหลม มีขีดบอกปริมาตร ทำจากพอลิโพรพิลีน ปราศจากเชื้อขนาด 15 หรือ 50 มิลลิลิตร ที่เหมาะสำหรับปริมาตรที่จำเป็นของพลาสมาที่จะเก็บ ติดฉลากด้วย PTID สารกันเลือดเป็นลิ่ม และอนุพันธ์ (derivative)

14.2.5. หากหลอดสิ่งส่งตรวจเย็นเมื่อสัมผัส (เนื่องจากสภาวะโดยรอบที่เย็น เช่น การขนส่งในช่วงเดือนที่มีอากาศเย็นกว่า) ให้ปล่อยให้หลอดมีอุณหภูมิถึงอุณหภูมิห้อง (15 ถึง 25°ซ หรือสูงถึง 30°ซ โดยขึ้นอยู่กับสภาพภูมิอากาศ) ก่อนทำกระบวนการ

14.2.6. ตรวจสอบ PTID บนหลอดเลือดทั้งหมดที่ได้รับอย่างระมัดระวัง จัดระเบียบหลอดปฐมภูมิเพื่อไม่ให้มีโอกาสที่หลอดจะผสมปะปนกันระหว่าง PTID หรือสารกันเลือดเป็นลิ่มภายในชุด PTID หนึ่งชุด

ข้อเสนอแนะ: วางหลอดทั้งหมดสำหรับ PTID แต่ละหมายเลข/สารกันเลือดเป็นลิ่มแต่ละชนิดในแท่นวางหนึ่งแท่น สามารถใช้แท่นวางคนละแท่นเพื่อแยก PTID หรือประเภทหลอด และสามารถใช้ปากกามาร์กเกอร์ที่มีสีต่างกันสำหรับ PTID แต่ละหมายเลขเพื่อหลีกเลี่ยงความสับสน

14.2.7. กำหนดและบันทึกการวัดปริมาตรของเลือดครบที่สามารถใช้ได้อย่างแม่นยำภายใน 0.1 มิลลิลิตร โดยใช้ปิเปตทางชีรัมวิทยา 10 มิลลิลิตร (หรือวิธีการอื่น ๆ ที่ได้รับอนุมัติจากเครือข่าย) ย้ำอีกครั้งว่าปริมาตรของเลือดครบที่สามารถใช้ได้ไม่จำเป็นต้องเท่ากับขนาดของหลอด

หมายเหตุสำหรับ HVTN: ไม่อนุญาตให้ใช้หลอดอ้างอิงหรือหลอดแบบก้นแหลมเพื่อจุดประสงค์ในการวัด

14.3. การเปลี่ยนพลาสมา

หมายเหตุ: ดำเนินขั้นตอนการเปลี่ยนพลาสมานี้เฉพาะในกรณีที่ต้องการแอลิควอตของพลาสมาจากหลอดเก็บ PBMC ตามโครงการวิจัยหรือ SPLI/LPC/LM เท่านั้น ไปที่ขั้นตอนที่ 14.4 หากไม่ต้องการแอลิควอตของพลาสมา

14.3.1. อาจทำกระบวนการกับหลอดเก็บเลือดจาก PTID เดียวกันและสารกันเลือดเป็นลิ่มเดียวกันแยกกันหรือรวมในหลอดปั่นเหวี่ยงแบบก้นแหลม 50 มิลลิลิตร (ไม่อนุญาตให้ทำการรวมสำหรับ HVTN)

14.3.2. ทำเครื่องหมายปริมาตรของเลือดครบบนหลอดเก็บแต่ละหลอดที่เมนิสคัส (meniscus)

14.3.3. ปั่นเหวี่ยงเลือดครบที่ 200 ถึง 400 x แรงโน้มถ่วง เป็นเวลา 10 นาที บันทึกเวลาที่เริ่มทำกระบวนการในแผ่นงาน PBMC

14.3.4. ถ่ายพลาสมาไปยังหลอดปั่นเหวี่ยงแบบก้นแหลม 15 หรือ 50 มิลลิลิตร ที่ติดฉลากแล้วสำหรับการปั่นเหวี่ยงครั้งที่สองเพื่อนำเศษชิ้นส่วนเซลล์ใด ๆ ออก

14.3.5. เติม WDR ในปริมาณที่เพียงพอเพื่อทำให้เลือดกลับมามีเลือดครบในปริมาตรดั้งเดิม ค่อย ๆ ผสม และทำกระบวนการกับ PBMC ต่อในขั้นตอนที่ 14.4

14.3.6. ทำกระบวนการกับพลาสมาให้เสร็จสิ้นด้วยการปั่นเหวี่ยงพลาสมาที่เก็บมาที่ 800 ถึง 1200 x แรงโน้มถ่วง เป็นเวลา 10 นาทีเพื่อให้ได้แอลิควอต PL2 หรือตาม SPLI/LPC/LM ที่จำเพาะต่อโครงการวิจัย ขั้นตอนนี้อาจเกิดขึ้นในภายหลังเมื่อไม่ได้ใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงสำหรับการทำกระบวนการกับ PBMC

14.3.7. แอลิควอตพลาสมาที่ถูกปั่นคู่ลงในหลอดแอลิควอตที่ติดฉลากแล้วตามที่ SPLI/LPC/LM ที่จำเพาะต่อโครงการวิจัยระบุไว้ และทิ้งเศษชิ้นส่วนเซลล์ที่เหลือ

14.4. การเจือจางเลือดสำหรับการแยกเซลล์แบบเกรเดียนต์ของความหนาแน่นด้วยมือ

14.4.1. เปิดฝาหลอดเลือดที่ใส่สารกันเลือดเป็นลิ่ม หากไม่จำเป็นต้องมีขั้นตอนการเปลี่ยนพลาสมา/ไม่ได้ดำเนินขั้นตอนการเปลี่ยนพลาสมา ให้บันทึกเวลาที่นำฝาออกเป็นเวลาที่เริ่มทำกระบวนการในแผ่นงาน PBMC

14.4.2. หากหลอดมีการจับตัวเป็นลิ่มที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่าหรือมีเม็ดเลือดแดงแตกที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ดูหัวข้อ 6.3

หมายเหตุ: อนุญาตให้ทำการรวมบัฟฟีโคตตามแนวทางในภาคผนวก D: การรวมชั้นบัฟฟีโคตสำหรับการแยก PBMC ด้วยตัวกลางเกรเดียนต์ของความหนาแน่น ในการรวมบัฟฟีโคต ให้ปฏิบัติตามคำแนะนำในภาคผนวก D แทนการดำเนินการตามขั้นตอนที่ 14.4.3 และ 14.4.4

14.4.3. ติดฉลากหลอดปั่นเหวี่ยงแบบก้นแหลมแต่ละหลอดด้วย PTID และสารกันเลือดเป็นลิ่ม

ขนาดของหลอดปั่นเหวี่ยงแบบก้นแหลม (มิลลิลิตร)	ปริมาตรของเลือดโดยประมาณ (มิลลิลิตร)
50	12 ถึง 22
15	4 ถึง 5

14.4.4. ถ่ายเลือดไปยังหลอดปั่นเหวี่ยงแบบก้นแหลม 15 หรือ 50 มิลลิลิตร ปราศจากเชื้อที่ติดฉลากแล้ว และเติม WDR ในปริมาตรที่เพียงพอเพื่อเจือจางเลือดตามเอกสารกำกับ (package insert) ของตัวกลางเกรเดียนต์ของความหนาแน่น (อัตราส่วนสูงสุดของเลือดต่อสารทำเจือจางควรอยู่ที่ 2:1)

14.5. สำหรับการแยกเซลล์แบบเกรเดียนต์ของความหนาแน่น:

หมายเหตุ: ใช้วิธีโอเวอร์เลย์ (หัวข้อ 14.5.1) หรือวิธีอันเดอร์เลย์ (หัวข้อ 14.5.2) แต่ไม่ใช่ทั้งสองวิธี

14.5.1. วิธีโอเวอร์เลย์:

14.5.1.1. เตรียมหลอดปั่นเหวี่ยงแบบก้นแหลมปราศจากเชื้อที่ติดฉลากแล้วสำหรับแต่ละหลอดที่มีเลือดที่เจือจางแล้ว

14.5.1.2. เติมตัวกลางเกรเดียนต์ของความหนาแน่นในปริมาตรที่เหมาะสมลงในหลอดปั่นเหวี่ยงแบบก้นแหลมปราศจากเชื้อเปล่า

หมายเหตุ:
ปริมาตรของตัวกลางเกรเดียนต์ของความหนาแน่นจะขึ้นอยู่กับอัตราส่วนของตัวกลางเกรเดียนต์ของความหนาแน่นต่อเลือดที่เจือจางแล้วตามที่ผู้ผลิตแนะนำ

14.5.1.3. ปิเปตเลือดที่เจือจางแล้วบนด้านบนของตัวกลางเกรเดียนต์ของความหนาแน่นอย่างระมัดระวังและช้า ๆ

ข้อเสนอแนะ: ค่อย ๆ ปล่อยให้ของผสมของ WDR-เลือดที่เจือจางแล้วไหลลงด้านข้างของหลอดและรวมที่ด้านบนของพื้นผิวตัวกลางเกรเดียนต์ของความหนาแน่นโดยไม่ทำให้ระนาบของพื้นผิวแตก

14.5.1.4. ปิดฝาหลอดอย่างระมัดระวัง ไปที่หัวข้อ 14.6

14.5.2. วิธีอันเดอร์เลย์:

14.5.2.1. ค่อย ๆ ผสมอย่างทั่วถึงเพื่อลดการเกาะกลุ่ม (clumping) ของเซลล์ในระหว่างการแยก

เลือกได้: เติม WDR อีกปริมาตรหนึ่งที่เท่ากับปริมาตรทั้งหมดของเลือดลงในเลือดครบหรือเลือด-WDR

14.5.2.2. กำหนดปริมาตรของตัวกลางเกรเดียนต์ของความหนาแน่นที่จำเป็นสำหรับแต่ละหลอดโดยอิงตามปริมาตรของ WDR-เลือดที่เจือจางแล้ว

หมายเหตุ:
ปริมาตรของตัวกลางเกรเดียนต์ของความหนาแน่นจะขึ้นอยู่กับอัตราส่วนของตัวกลางเกรเดียนต์ของความหนาแน่นต่อเลือดที่เจือจางแล้วตามที่ผู้ผลิตแนะนำ

14.5.2.3. ปิเปตสารละลายตัวกลางเกรเดียนต์ของความหนาแน่นใต้เลือด-WDR อย่างระมัดระวังและช้า ๆ

14.5.2.4. ปิดฝาหลอดอย่างระมัดระวัง ไปที่หัวข้อ 14.6

14.6. การปั่นเหวี่ยงความหนาแน่นและการเก็บลิมโฟไซต์:

14.6.1. จับหลอดในลักษณะตั้งขึ้น วางลงในแท่นวาง และค่อย ๆ ขนถ่ายไปยังเครื่องปั่นเหวี่ยง

14.6.2. ปั่นเหวี่ยงที่ 400 x แรงโน้มถ่วง เป็นเวลา 30 นาทีที่ 15 ถึง 25°ซ (หรือสูงถึง 30°ซ โดยขึ้นอยู่กับสภาพภูมิอากาศ) โดยปิดเบรก/ตั้งค่าเป็นศูนย์ หรือตามที่ระบุไว้ในเอกสารกำกับที่มาพร้อมกับตัวกลางเกรเดียนต์

หมายเหตุ: หากเปิดเบรกไว้ จะทำให้ชั้นแตกได้ ต้องปิดเบรกของเครื่องปั่นเหวี่ยงเพื่อให้แยกได้อย่างสมบูรณ์และเพื่อดึง PBMC ออกมาให้ได้มากที่สุด

14.6.3. ในขณะที่หลอดแบบก้นแหลมกำลังปั่นอยู่ ให้ทิ้งหลอดเก็บทั้งหมดที่เทสารออกจนว่างเปล่าแล้วโดยปฏิบัติตามแนวปฏิบัติทางห้องปฏิบัติการ ทำความสะอาดพื้นผิวของ BSC และจัดระเบียบสำหรับขั้นตอนถัดไป

14.6.4. ติดฉลาก (ที่มี PTID/สารกันเลือดเป็นลิ่ม)
หลอดปั่นเหวี่ยงแบบก้นแหลมปราศจากเชื้อหลอดใหม่ในจำนวนและขนาดที่เท่ากับหลอดปั่นเหวี่ยงแบบก้นแหลมที่ใช้ในขั้นตอนการปั่นเหวี่ยงสำหรับการแยก ใช้หลอดใหม่เหล่านี้สำหรับขั้นตอนการเก็บและการล้างเซลล์หลังจากนี้

14.6.5. เติม WDR ลงในหลอด "ล้าง" สำหรับการปั่นเหวี่ยงแบบก้นแหลมปราศจากเชื้อที่ติดฉลากไว้ล่วงหน้าแต่ละหลอดโดยใช้ปิเปตปราศจากเชื้อ:

ขนาดของหลอดปั่นเหวี่ยงแบบก้นแหลม (มิลลิลิตร)	ปริมาตรที่เติมไว้ล่วงหน้าของ WDR (มิลลิลิตร)
50	25
15	5

14.6.6. เมื่อเครื่องปั่นเหวี่ยงหยุดสนิทแล้ว ค่อย ๆ นำหลอดแบบก้นแหลมแต่ละหลอดออกจากเครื่องปั่นเหวี่ยงเพื่อไม่ให้รบกวนชั้นต่าง ๆ ใช้แท่นวางเพื่อรองรับหลอดและขนถ่ายไปยัง BSC อย่างระมัดระวัง.

14.6.7. หากไม่สามารถมองเห็นชั้นเซลล์ได้ ให้ยืนยันว่าเครื่องปั่นเหวี่ยงกำลังปฏิบัติการอย่างเหมาะสมหรือไม่ แก้ไขปัญหาใด ๆ ที่ท่านพบ ปั่นเหวี่ยงหลอดซ้ำ บันทึกปัญหาและการดำเนินการที่ดำเนินการตามข้อกำหนดของเครือข่ายและห้องปฏิบัติการ

14.6.8. บันทึกการแตกของเม็ดเลือดแดงหรือลิ่มเลือดขนาดเล็กที่สามารถมองเห็นได้ที่รอยต่อของเซลล์

<u>หมายเหตุ:</u> มองหาการแตกของเม็ดเลือดแดงหรือลิ่มเลือดหลังจากการปั่นเหวี่ยง ประเมินเกรดการแตกของเม็ดเลือดแดง +1 ถึง +4 ตามคำอธิบายที่ให้ไว้ในอภิธานศัพท์ บันทึกการสังเกตของท่าน

14.6.9. นำส่วนพลาสมา-WDR สีค่อนข้างเหลืองด้านบนออกจนถึงภายใน 1 ถึง 2 เซนติเมตร ของแถบ PBMC สีขาวขุ่นที่อยู่ตรงรอยต่อระหว่างส่วนพลาสมา-WDR (สีค่อนข้างเหลือง) และสารละลายตัวกลางสำหรับการแยกที่มีลักษณะใส โดยใช้ปิเปตปราศจากเชื้อ (ปิเปตทางซีรัมวิทยาหรือปิเปตสำหรับถ่ายสาร) ใหม่สำหรับ PTID แต่ละหมายเลข ระวังอย่ารบกวนชั้นเซลล์ในระหว่างกระบวนการนี้ ทิ้งส่วนพลาสมา-WDR ตามนโยบายของห้องปฏิบัติการ

<u>หมายเหตุ:</u> ในอีกทางเลือกหนึ่ง อาจนำแถบ PBMC สีขาวขุ่นออกโดยการสอดปิเปตผ่านชั้นพลาสมา-WDR ด้านบนอย่างระมัดระวัง

14.6.10. เก็บเซลล์ทั้งหมดที่รอยต่อสีขาวขุ่นโดยใช้ปิเปตทางซีรัมวิทยาหรือปิเปตสำหรับถ่ายสารปราศจากเชื้อ ใช้ความระมัดระวังไม่ดูดสารละลายตัวกลางสำหรับการแยกออกมากเกินกว่าที่จำเป็น

14.6.11. ถ่ายเซลล์ที่เก็บมาจากหลอดปั่นเหวี่ยงแบบก้นแหลมหนึ่งหลอดไปยังหลอดปั่นเหวี่ยงแบบก้นแหลมปราศจากเชื้อที่ติดฉลากไว้ล่วงหน้าที่สอดคล้องกันหลอดเดียว สามารถเติม WDR ในหลอดไว้ล่วงหน้าเพื่อประหยัดเวลา (หัวข้อ 14.6.5)

14.6.12. ปิดฝาหลอดปั่นเหวี่ยงแบบก้นแหลมที่มีเซลล์เม็ดเลือดแดง/ตัวกลางสำหรับการแยกที่เหลืออีกครั้ง และทิ้งหลอดดังกล่าวโดยถือเป็นของเสียอันตรายทางชีวภาพโดยปฏิบัติตามนโยบายของห้องปฏิบัติการ

14.7. ต้องแน่ใจว่าบันทึกองค์ประกอบหลักทั้งหมดตามข้อกำหนดของเครือข่ายและห้องปฏิบัติการแล้ว ไปที่หัวข้อ 15

15. การล้าง การนับ การแขวนตะกอนใหม่ ความเข้มข้น และการแช่แข็งข้ามคืนแบบควบคุมอัตรา

15.1. การล้างครั้งที่ 1:

15.1.1. QS (เพิ่มปริมาตรของส่วน PBMC ขึ้น) ถึงประมาณ 45 มิลลิลิตร (สำหรับหลอดปั่นเหวี่ยงแบบก้นแหลม 50 มิลลิลิตร) หรือ 10 มิลลิลิตร (สำหรับหลอดปั่นเหวี่ยงแบบก้นแหลม 15 มิลลิลิตร) โดยการเติม WDR ค่อย ๆ ผสม

15.1.2. ปิดฝาหลอดแบบก้นแหลมทั้งหมดที่ตอนนี้มีเซลล์ที่เก็บมาซึ่งเจือจางอยู่ใน WDR อีกครั้ง

15.1.3. ปั่นเหวี่ยงเซลล์ที่เจือจางแล้วที่ 200 ถึง 400 x แรงโน้มถ่วง เป็นเวลา 10 นาทีที่ 15 ถึง 25°ซ (หรือสูงถึง 30°ซ โดยขึ้นอยู่กับสภาพภูมิอากาศ) โดยเลือกใช้เบรกต่ำหรือไม่ก็ได้

15.1.4. นำหลอดออกจากเครื่องปั่นเหวี่ยงและตรวจสอบหาตะกอนเซลล์

15.1.4.1. หากไม่สามารถมองเห็นตะกอนเซลล์ (cell pellet) ได้ ให้ยืนยันว่าเครื่องปั่นเหวี่ยงกำลังปฏิบัติการอย่างเหมาะสมหรือไม่และใช้การตั้งค่าที่ถูกต้องหรือไม่ แก้ไขปัญหาใด ๆ ที่ท่านพบ ปั่นเหวี่ยงหลอดซ้ำ บันทึกปัญหาและการดำเนินการที่ดำเนินการตามข้อกำหนดของเครือข่ายและห้องปฏิบัติการ หากยังไม่สามารถมองเห็นตะกอนเซลล์ได้หลังจากการปั่นเหวี่ยงหลอดซ้ำ ให้ดำเนินขั้นตอนการทำกระบวนการต่อและบันทึกรายละเอียดในแผ่นงานการทำกระบวนการ

15.1.5. นำส่วนเหนือตะกอน (supernatant) ของ WDR ออกและทิ้งอย่างระมัดระวังโดยไม่รบกวนตะกอนเซลล์โดยเทลงในภาชนะบรรจุของเสียที่เป็นของเหลวที่กำหนดไว้ใน BSC อย่างรวดเร็ว อาจใช้วิธีการทางเลือก เช่น การนำออกด้วยปิเปตทางซีรัมวิทยาหรือโดยการดูดออก สำหรับตะกอนที่หลวมหรือมีเซลล์เม็ดเลือดแดงในปริมาณมาก

15.2. การล้างครั้งที่ 2:

15.2.1. ทำการแขวนตะกอนใหม่กับตะกอนแต่ละก้อนใน WDR ปริมาตรเล็กน้อย โดยค่อย ๆ ผสมแต่ทั่วถึงให้กลายเป็นสารแขวนตะกอนของเซลล์ที่เป็นเนื้อเดียวกัน

ขนาดของหลอด (มิลลิลิตร)	ปริมาตรของการแขวนตะกอนใหม่ของ WDR (มิลลิลิตร)

50	≤ 5
15	≤ 3

15.2.2. รวมสารแขวนตะกอนของตะกอนจาก PTID/สารกันเลือดเป็นลิ่มเดียวกัน หลอดนี้เป็นหลอดเซลล์ที่เก็บมา

ขนาดของหลอด (มิลลิลิตร)	จำนวนสารแขวนตะกอนของตะกอนที่จะรวม	ปริมาตรทั้งหมด (มิลลิลิตร)
50	≤ 4	≤ 20
15	≤ 2	≤ 6

15.2.3. ใช้ WDR ในปริมาตรเล็กน้อยเพื่อกลั้วหลอดที่ถ่ายตะกอนมา เก็บปริมาตรที่กลั้วของ WDR ในหลอดเซลล์ที่เก็บมา

15.2.4. QS ส่วน PBMC โดยเติม WDR และค่อย ๆ ผสม

ขนาดของหลอด (มิลลิลิตร)	ปริมาตรของ QS (มิลลิลิตร)
50	≤ 45
15	≤10

15.2.5. ปิดฝาหลอดอีกครั้งและวางหลอดในเครื่องปั่นเหวี่ยง

15.2.6. ปั่นเหวี่ยงเซลล์ที่เจือจางแล้วที่ 200 ถึง 400 x แรงโน้มถ่วง เป็นเวลา 10 นาทีที่ 15 ถึง 25°ซ (หรือสูงถึง 30°ซ โดยขึ้นอยู่กับสภาพภูมิอากาศ) โดยเลือกใช้เบรกต่ำหรือไม่ก็ได้

15.2.7. นำหลอดออกจากเครื่องปั่นเหวี่ยงและตรวจสอบหาตะกอนเซลล์

<u>หมายเหตุ</u>: หากไม่สามารถมองเห็นตะกอนเซลล์ได้ ให้ยืนยันว่าเครื่องปั่นเหวี่ยงกำลังปฏิบัติการอย่างเหมาะสมหรือไม่ แก้ไขปัญหาใด ๆ และปั่นเหวี่ยงหลอดซ้ำ บันทึกปัญหาและการดำเนินการที่ดำเนินการตามข้อกำหนดของเครือข่ายและห้องปฏิบัติการ หากยังไม่สามารถมองเห็นตะกอนเซลล์ได้หลังจากการปั่นเหวี่ยงหลอดซ้ำ ให้ดำเนินขั้นตอนการทำกระบวนการต่อและบันทึกรายละเอียดในแผ่นงานการทำกระบวนการ

15.2.8. นำส่วนเหนือตะกอน (supernatant) ของ WDR ออกและทิ้งอย่างระมัดระวังโดยไม่รบกวนตะกอนเซลล์โดยเทลงในภาชนะบรรจุของเสียที่เป็นของเหลวที่กำหนดไว้ใน BSC อย่างรวดเร็ว อาจใช้วิธีการทางเลือก เช่น การนำออกด้วยปิเปตทางชีรัมวิทยาหรือโดยการดูดออก สำหรับตะกอนที่หลวมหรือมีเซลล์เม็ดเลือดแดงในปริมาณมาก

15.3. จำนวนเซลล์ PBMC จากการนับ

15.3.1. กำหนดและบันทึกปริมาตรของการแขวนตะกอนใหม่สำหรับการนับของ WDR (V) ที่แม่นยำภายใน 0.1 มิลลิลิตร V มีความสำคัญเนื่องจากเป็นปริมาตรที่ใช้อิงในการนับจำนวนเซลล์

<u>หมายเหตุ</u>: ปริมาตรของการแขวนตะกอนใหม่สำหรับการนับ (V) คือ 20% ของปริมาตรของเลือดครบที่สามารถใช้ได้ที่วัดได้ ซึ่งปัดเศษให้เป็นค่ามิลลิลิตรเต็มที่ใกล้ที่สุด (บันทึก X.0) ในเกือบทุกกรณี

<u>ตัวอย่าง</u>: ปริมาตรของเลือดครบที่สามารถใช้ได้ที่วัดได้บันทึกได้เป็น 78.6 มิลลิลิตร ปริมาตรของการแขวนตะกอนใหม่สำหรับการนับจะเป็น 16.0 มิลลิลิตร (78.6 x 20% = 15.72 เมื่อปัดเศษ 15.72 ให้เป็นจำนวนเต็มที่ใกล้ที่สุดจะได้ 16.0 มิลลิลิตร)

<u>ตัวอย่างสถานการณ์ซึ่งอาจมีการแก้ไข V:</u>

- V ที่คำนวณได้มากกว่าความจุของหลอดแบบก้นแหลมเล็กน้อย วัด UWBV และบันทึกได้เป็น 255.2 มิลลิลิตร ปัดเศษ 20% ให้เป็นจำนวนเต็มที่ใกล้ที่สุดจะได้ 51.0 มิลลิลิตร ในสถานการณ์นี้ อาจลด V ลงเหลือ 45.0 มิลลิลิตร เพื่อให้สามารถทำการผสมและการปั่นเหวี่ยงที่ตามมาในหลอดแบบก้นแหลม 50 มิลลิลิตร ได้อย่างปลอดภัย
- ตัวอย่างของผู้เข้าร่วมทำให้ได้แถบเซลล์ที่จางมากและตะกอนเซลล์ที่ตามมาที่มีขนาดเล็กอย่างมีนัยสำคัญ ในสถานการณ์นี้ อาจลด V เพื่อป้องกันจำนวนเซลล์จากการนับที่อยู่นอกช่วง

15.3.2. หากมีตะกอนมากกว่าหนึ่งก้อนจาก PTID/สารกันเลือดเป็นลิ่มเดียวกัน ให้ใช้ปริมาณที่วัดได้/ติดตามได้เพียงเล็กน้อยของ WDR เพื่อค่อย ๆ แขวนตะกอนใหม่และรวมตะกอนเซลล์ลงในหนึ่งหลอด กลั้วหลอดที่ถ่ายเซลล์มาโดยใช้ปริมาตรที่เหลือของการแขวนตะกอนใหม่ เติมปริมาตรที่กลั้วลงในหลอดที่มีสารแขวนตะกอนของเซลล์

15.3.3. ค่อย ๆ ผสมเซลล์ แต่ทั่วถึงทันทีก่อนเก็บตัวอย่างสำหรับจำนวนเซลล์จากการนับ

15.3.4. ถ่ายปริมาตรเล็กน้อยของการแขวนตะกอนใหม่ลงในหลอดขนาดเล็กหนึ่งหลอดสำหรับการนับ ปฏิบัติตามเครื่องมือหรือคำแนะนำใน SOP เกี่ยวกับการนับสำหรับปริมาตรที่เหมาะสม

<u>หมายเหตุ</u>: หากจำเป็นต้องมีการนับซ้ำ ให้ลดปริมาตรของการเก็บตัวอย่างที่จำเป็นให้ต่ำที่สุด

15.3.5. ปฏิบัติตาม SOP สำหรับวิธีการนับเซลล์ที่ได้รับอนุมัติที่ห้องปฏิบัติการที่ทำกระบวนการเพื่อกำหนดความเข้มข้นของเซลล์ x 10^6 ต่อมิลลิลิตร

หมายเหตุ: เซลล์ที่ 10^3/ไมโครลิตร = เซลล์ที่ 10^6/มิลลิลิตร

หมายเหตุ: อาจดำเนินการนับโดยอัตโนมัติหนึ่งครั้ง การนับด้วยมือต้องนับสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาดใหญ่สี่อัน (1 ตารางมิลลิเมตร)

15.3.6. คำนวณจำนวนเซลล์ทั้งหมดโดยใช้สูตรต่อไปนี้

$T = C \times V$

T = จำนวนเซลล์ทั้งหมด

C = ความเข้มข้น (10^6/มิลลิลิตร) ที่กำหนดในวิธีการนับ

V = ปริมาตรของการแขวนตะกอนใหม่สำหรับการนับของ WDR เป็นมิลลิลิตร

15.3.7. คำนวณเซลล์ที่ได้เป็นเซลล์/มิลลิลิตรของเลือดครบที่สามารถใช้ได้โดยใช้สูตรด้านล่าง

เซลล์ที่ได้ (10^6 เซลล์/มิลลิลิตร) = T/ปริมาตรของเลือดครบที่สามารถใช้ได้

หมายเหตุ: คำนวณเซลล์ที่ได้เพื่อจุดประสงค์ด้านคุณภาพ ดูหัวข้อ 16 การควบคุมคุณภาพสำหรับช่วงที่คาดไว้ของเซลล์ที่ได้และเคล็ดลับในการแก้ไขปัญหา

15.4. การคำนวณปริมาตรของการแขวนตะกอนใหม่ขั้นสุดท้าย

15.4.1. คำนวณปริมาตรของการแขวนตะกอนใหม่ที่แช่แข็งจนแข็งของ CPS
ที่จำเป็นโดยการดำเนินขั้นตอนด้านล่างสำหรับความเข้มข้นสุดท้ายของเซลล์ที่เป็นเป้าหมายให้เสร็จสิ้น

หมายเหตุ: ความเข้มข้นสุดท้ายของเซลล์ที่เป็นเป้าหมายจะแตกต่างกันไปตามและโครงการวิจัย ดูโครงการวิจัยหรือ SPLI/LPC/LM
ที่จำเพาะต่อโครงการวิจัยสำหรับข้อมูลความเข้มข้นสุดท้ายของเซลล์ที่เป็นเป้าหมาย

15.4.2. คำนวณปริมาตรของการแขวนตะกอนใหม่ที่แช่แข็งจนแข็งของ CPS ที่ประมาณไว้ (V1) ที่จำเป็นโดยใช้ความเข้มข้นสุดท้ายของเซลล์ที่เป็นเป้าหมาย

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

T = จำนวนเซลล์ทั้งหมด

N1 = ความเข้มข้นสุดท้ายของเซลล์ที่เป็นเป้าหมาย

V2 = ปริมาตรสุดท้ายของแอลิควอตเป็นมิลลิลิตร

ปัดเศษ V1 ลงให้เป็นค่ามิลลิลิตรเต็มที่ใกล้ที่สุด (1.0) เพื่อกำหนด V_f

15.4.3. คำนวณจำนวนเซลล์จริงต่อไวแอล (N2) โดยใช้ปริมาตรจริงของการแช่แข็งจนแข็งของ CPS (V_f) ที่กำหนดในการคำนวณก่อนหน้า

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

N2 = จำนวนเซลล์จริงต่อไวแอล

T = จำนวนเซลล์ทั้งหมด

V2= ปริมาตรสุดท้ายของแอลิควอตเป็นมิลลิลิตร (1.0 มิลลิลิตร เว้นแต่จะมีคำสั่งไว้เป็นอย่างอื่นในเอกสารที่จำเพาะต่อโครงการวิจัย)

15.5. การติดฉลาก

15.5.1. ดำเนินการพิมพ์ การควบคุมคุณภาพ และการติดฉลากไครโอไวแอลให้เสร็จสิ้นก่อนปั่นเหวี่ยงขั้นสุดท้าย

หมายเหตุ: สิ่งสำคัญคือต้องลดเวลาที่เซลล์ยังอยู่ในตะกอนให้ต่ำที่สุด

15.5.2. สร้างฉลากไครโอไวแอลโดยใช้ LDMS

15.5.2.1. ปฏิบัติตามแนวปฏิบัติทางห้องปฏิบัติการของเครือข่ายสำหรับการดำเนินการป้อนข้อมูลให้เสร็จสิ้น

15.5.2.2. ตรวจพิสูจน์ฉลากไครโอไวแอลแต่ละประเภทที่ได้มาสำหรับข้อผิดพลาดในการป้อนข้อมูลโดยเทียบกับคำขอของห้องปฏิบัติการและแผ่นงานการทำกระบวนการก่อนติดฉลากไครโอไวแอล

15.5.2.3. ตรวจสอบบาร์โค้ดบนฉลากและพื้นที่พิมพ์ด้วยสายตาเพื่อดูการปรับแนวและคุณภาพของการพิมพ์

15.5.2.4. แก้ไขข้อผิดพลาดในการป้อนข้อมูลใด ๆ ใน LDMS และพิมพ์ฉลากอีกครั้งตามที่จำเป็น

15.5.3. ติดฉลากบนไครโอไวแอลเพื่อให้สามารถมองเห็นสิ่งที่อยู่ในหลอดได้

15.5.4. สแกนไครโอไวแอลเปล่าที่ติดฉลากแล้วตามลำดับ GSID เข้าไปในมอดูลการจัดเก็บของ LDMS เพื่อให้แน่ใจว่าสามารถสแกนบาร์โค้ดได้
การทวนสอบความสามารถในการสแกนและการกำหนดสถานที่จัดเก็บจะรวมอยู่ในขั้นตอนนี้

หมายเหตุ: แนะนำเป็นอย่างยิ่งให้ใช้แท่นวาง Nunc เพื่อให้สามารถเปิด/ปิดไวแอลด้วยมือเดียว ห้ามวางฝาไครโอไวแอลบนพื้นผิวใด ๆ

15.6. การปั่นเหวี่ยงขั้นสุดท้าย

หมายเหตุ: หากเซลล์จะถูกแช่แข็งในรูปแบบตะกอนของ PBMC (PEL) ที่ไม่มีชีวิตและเซลล์ที่มีชีวิต ให้นำปริมาตรของ PBMC

ที่จำเป็นสำหรับการสร้างตะกอนเซลล์ที่ไม่มีชีวิตออกก่อนขั้นตอนการปั่นเหวี่ยงขั้นสุดท้าย และดำเนินการทำกระบวนการของตะกอนเซลล์ที่ไม่มีชีวิตให้เสร็จสิ้น และปฏิบัติตามคำแนะนำที่จำเพาะต่อโครงการวิจัยสำหรับตะกอนของ PBMC ที่ไม่มีชีวิต

15.6.1. QS (เพิ่มปริมาตรของสารแขวนตะกอนของเซลล์) ถึง 45 มิลลิลิตร ด้วย WDR และวางหลอดแบบก้นแหลมที่มีเซลล์ที่เก็บมาและเจือจางแล้วในเครื่องปั่นเหวี่ยง

15.6.2. ปั่นเหวี่ยงเซลล์ที่เจือจางแล้วที่ 200 ถึง 400 x แรงโน้มถ่วง เป็นเวลา 10 นาทีที่ 15 ถึง 25°ซ (หรือสูงถึง 30°ซ โดยขึ้นอยู่กับสภาพภูมิอากาศ) โดยเลือกใช้เบรกหรือไม่ก็ได้

15.6.3. ทวนสอบว่าไครโอไวแอลทั้งหมดติดฉลากแล้วและสามารถเข้าถึงได้ง่าย

15.6.4. เลือกหน่วยแช่แข็งแบบควบคุมอัตรา: StrataCooler®, Mr. Frosty™, CoolCell®
ติดฉลากหน่วยแช่แข็งอย่างเหมาะสมเพื่อให้เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการสามารถกำหนดสิ่งที่อยู่ภายในได้
ต้องแน่ใจว่าหน่วยมีอุณหภูมิที่ถูกต้องสำหรับการใช้งานในเวลาที่ทำการบรรจุไวแอลและสามารถเข้าถึงได้ทันทีก่อนนำตะกอนเซลล์ขั้นสุดท้ายออกจากเครื่องปั่นเหวี่ยง ดูหัวข้อ 7.5 สำหรับข้อมูลการจัดเก็บและการบำรุงรักษา

15.7. การแอลิควอตสำหรับการเก็บรักษาในสภาวะเย็นยวดยิ่ง

<u>หมายเหตุ:</u> ขั้นตอนต่อไปนี้จะต้องดำเนินการอย่างรวดเร็วเพื่อรักษาความสมบูรณ์ของเซลล์

15.7.1. นำส่วนเหนือตะกอน (supernatant) ของ WDR
ออกและทิ้งอย่างระมัดระวังโดยไม่รบกวนตะกอนเซลล์โดยเทลงในภาชนะบรรจุของเสียที่เป็นของเหลวที่กำหนดไว้ใน BSC อย่างรวดเร็ว
อาจใช้วิธีการทางเลือก เช่น การนำออกด้วยปิเปตทางชีรัมวิทยาหรือโดยการดูดออก สำหรับตะกอนที่หลวมหรือมีเซลล์เม็ดเลือดแดงในปริมาณมาก

15.7.2. ทำการแขวนตะกอนใหม่กับตะกอนโดยใช้ปริมาตรของ CPS เย็น (V_f) ที่ท่านกำหนดในหัวข้อ 15.4

<u>หมายเหตุ:</u> อนุญาตให้ทำให้ไวแอลเย็นล่วงหน้าและ/หรือทำงานบนน้ำแข็งเปียก

<u>หมายเหตุสำหรับ HVTN:</u> ไม่ควรทำให้ไครโอไวแอลเย็นล่วงหน้าและทำงานบนน้ำแข็งเปียก และต้องได้รับอนุมัติจากศูนย์ห้องปฏิบัติการของ HVTN ก่อนใช้กับตัวอย่างของเครือข่าย HVTN

15.7.2.1. ค่อย ๆ ทำการแขวนตะกอนใหม่กับตะกอนเซลล์ก่อนเติม CPS โดยการดีด การเขย่า หรือการปิเปต

15.7.2.2. HVTN แนะนำให้ทำการแขวนตะกอนใหม่กับตะกอนด้วยปริมาตรที่วัดได้/ติดตามได้ของ CPS
ปริมาตรเดียวกันกับที่ใช้ในขั้นตอนก่อนหน้าสำหรับการแขวนตะกอนใหม่ อย่าลืมลบปริมาตรนี้ออกจากปริมาตรทั้งหมดของ CPS ขั้นสุดท้ายที่จะบวก หากปริมาตรของการแขวนตะกอนใหม่ขั้นสุดท้ายทั้งหมดของ CPS มากกว่าปริมาตรที่ใช้ในการแขวนตะกอนใหม่

15.7.2.3. ค่อย ๆ เติม CPS ลงในเซลล์ที่แขวนตะกอนใหม่แล้ว พร้อมกับหมุนอย่างต่อเนื่อง

15.7.3. ทำงานอย่างรวดเร็วเมื่อเติม CPS แล้ว ห้ามปล่อยให้เซลล์อยู่ในสารละลายสำหรับการแช่แข็งเป็นเวลานานกว่า 10 นาทีก่อนใส่ในตู้แช่แข็ง

15.7.4. ค่อย ๆ ผสมสารแขวนตะกอน แต่ทำอย่างรวดเร็วด้วยปิเปตทางชีรัมวิทยาก่อนแอลิควอต รักษาสารแขวนตะกอนไว้ตลอดกระบวนการบรรจุไวแอล

15.7.4.1. แอลิควอต 1.0 มิลลิลิตรต่อไครโอไวแอล เว้นแต่ SPLI/LPC/LM ที่จำเพาะต่อโครงการวิจัยจะมีคำสั่งไว้เป็นอย่างอื่น

<u>หมายเหตุ:</u> กระจายส่วนเกินใด ๆ ให้เท่า ๆ กันในไครโอไวแอลทั้งหมดสำหรับ PTID นั้น

15.8. การแช่แข็งข้ามคืนแบบควบคุมอัตรา

15.8.1. หลังจากการทำกระบวนการและการนับ ให้ดำเนินขั้นตอนที่จำเป็นในการแช่แข็งเซลล์ให้เสร็จสิ้นทันที

15.8.2. จัดวางหน่วยแช่แข็งแบบควบคุมอัตราที่เลือกสำหรับการขนถ่าย: StrataCooler® ของ Agilent Technologies, Nalgene® Mr. Frosty™, Corning® CoolCell®
ดูหัวข้อ 7.5 สำหรับข้อมูลการจัดเก็บและการบำรุงรักษา

15.8.3. ขนถ่ายไครโอไวแอลทั้งหมดตามลำดับ ID ของสิ่งส่งตรวจทั่วโลกไปยังหน่วยแช่แข็งแบบควบคุมอัตราทันที

สำหรับ CRFU ทั้งหมด ซึ่งคือ Nalgene® Mr. Frosty™, Corning® CoolCell® และ StrataCooler® ของ Agilent Technologies
ให้ปิดภาชนะบรรจุและวางไว้ในตู้แช่แข็ง -80°ซ (-65 ถึง -95°ซ สำหรับ ACTG, -70 ถึง -95°ซ สำหรับ HVTN และ HPTN)
ในสถานที่ที่ไม่ถูกรบกวนจากการเข้าถึงตู้แช่แข็งซ้ำ ๆ (นั่นคือ ห่างจากด้านหน้าหรือด้านบนของตู้แช่แข็งที่ใกล้กับประตูเปิด/ฝาเปิด) ห้ามวางซ้อนกัน แนะนำให้ CRFU ทั้งหมดอยู่ในตู้แช่แข็งข้ามคืน

สำหรับ CryoMed® หรือตู้แช่แข็งเชิงกลแบบควบคุมอัตราอื่น ๆ ให้เริ่มโปรแกรมทำความเย็นตาม SOP ในสถานที่ที่เหมาะสม (หมายเหตุสำหรับ HVTN: ไม่อนุญาตให้ใช้ตู้แช่แข็งแบบควบคุมอัตราสำหรับตัวอย่างของ HVTN)

15.8.4. บันทึกวันที่/เวลาที่ถูกแช่แข็งทันทีในแผ่นงาน PBMC ป้อนวันที่/เวลาที่ถูกแช่แข็งที่บันทึกในแผ่นงานลงใน LDMS

15.9. บันทึกองค์ประกอบหลักทั้งหมดตามข้อกำหนดของเครือข่ายและห้องปฏิบัติการ

16. การควบคุมคุณภาพ

16.1. เซลล์ที่ได้

สิ่งสำคัญคือต้องรับรู้การฟื้นตัวที่คาดไว้สำหรับประชากรผู้เข้าร่วมซึ่งกำลังทำกระบวนการ เซลล์ที่ได้สามารถทำหน้าที่เป็นเครื่องหมายของการควบคุมคุณภาพภายใน (internal quality control marker) สำหรับการดำเนินการแต่ละรอบ ผลที่ได้นอกช่วงที่คาดไว้อาจบ่งชี้ถึงข้อผิดพลาดในกระบวนการ การเสื่อมสภาพของรีเอเจนต์ ข้อผิดพลาดเกี่ยวกับจำนวนเซลล์จากการนับ หรือข้อผิดพลาดในการคำนวณ

หมายเหตุ: คำแนะนำที่ให้ไว้ด้านล่างมีไว้เพื่อให้แนวทางในการช่วยระบุข้อผิดพลาดทางเทคนิคที่ร้ายแรงก่อนการเก็บรักษาในสภาวะเย็นยวดยิ่ง ค่าเหล่านี้อาจแตกต่างกันไปโดยขึ้นอยู่กับสารกันเลือดเป็นลิ่มที่ใช้

16.1.1. เซลล์ที่ได้ที่คาดไว้สำหรับประชากรผู้ใหญ่:

ประชากร	ช่วงของเซลล์ที่มีนิวเคลียสเดียวที่ได้ (เซลล์/มิลลิลิตร)
ผู้ใหญ่	(0.8 ถึง 3.2) x 10^6

16.1.2. เซลล์ที่ได้ที่ไม่คาดคิด

16.1.2.1. หากเซลล์ที่ได้อยู่นอกช่วงที่คาดไว้ ให้ทบทวนแผนการเจือจาง (dilution schema) การคำนวณ เทคนิคการทำกระบวนการ (โดยเฉพาะการผสมสารแขวนตะกอนสำหรับการนับเซลล์ให้เพียงพอ) และประวัติ PTID หากมี เพื่อหาสาเหตุที่เป็นไปได้

16.1.2.2. เซลล์ที่ได้จากผู้เข้าร่วมที่มีชีวิตอยู่กับเอชไอวีอาจต่ำกว่าที่แสดงในตารางข้างต้น

16.1.2.3. หากสงสัยว่ามีข้อผิดพลาดในการเจือจางเซลล์หรือการนับ ให้ทำการเจือจางใหม่และนับใหม่

16.1.3. บันทึกผลลัพธ์ทั้งหมดและปัญหาใด ๆ ที่เกิดขึ้นในระหว่างการทำกระบวนการและการดำเนินการตามข้อกำหนดของเครือข่ายและห้องปฏิบัติการ ดูหัวข้อ 5 สำหรับรายละเอียด

หมายเหตุสำหรับ HVTN และ HPTN: บันทึกปัญหาและการดำเนินการใด ๆ ในแผ่นงานการทำกระบวนการกับ PBMC ของ HVTN ที่จำเพาะต่อโครงการวิจัยรายการที่ป้อนใน LDMS สำหรับแอลิควอต และในหัวข้อความคิดเห็นเกี่ยวกับเซลล์ที่ได้ของโปรแกรม Atlas HVTN PBMC หากเหมาะสม ติดต่อศูนย์ห้องปฏิบัติการของ HVTN หากมีข้อกังวลใด ๆ

16.2. ความอยู่รอดได้ของเซลล์

16.2.1. ความอยู่รอดได้ของ PBMC ที่แยกใหม่ ๆ ควร >95%

16.2.2. หากความอยู่รอดได้ของ PBMC ใหม่ ๆ <95% ให้ทบทวนผลลัพธ์กับหัวหน้างานและบันทึกตามข้อกำหนดของเครือข่ายและห้องปฏิบัติการ

หมายเหตุ: หากกำลังเตรียมตัวอย่างสำหรับการทดสอบความชำนาญในการเก็บรักษาในสภาวะเย็นยวดยิ่งสำหรับ PBMC ของ IQA ต้องมีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตจากการนับ

17. การจัดเก็บ PBMC (ชั่วคราวหรือในสถานที่)

17.1. รักษาห่วงโซ่ความเย็น (cold chain) ในระหว่างขั้นตอนการขนถ่ายทั้งหมดเพื่อหลีกเลี่ยงความเสียหายที่จะเกิดกับเซลล์

หมายเหตุสำหรับ HVTN: ขนส่งบนน้ำแข็งแห้งไปยังคลังเก็บสิ่งส่งตรวจส่วนกลาง (central specimen repository) ภายใน 1 สัปดาห์นับจากการเก็บ เว้นแต่ SPLI ที่จำเพาะต่อโครงการวิจัยของ HVTN จะมีคำสั่งไว้เป็นอย่างอื่น (ความถี่ในการขนส่งจะเป็นไปตามภูมิภาคและขึ้นอยู่กับข้อกำหนดของโครงการวิจัย) ดำเนินการต่อไปที่ 17.2

หมายเหตุสำหรับ HPTN: ปฏิบัติตามคำแนะนำที่ให้ไว้ในคู่มือห้องปฏิบัติการที่จำเพาะต่อโครงการวิจัย

หมายเหตุสำหรับ ACTG: ขนส่งบนน้ำแข็งแห้งภายใน 4 สัปดาห์นับจากวันที่แช่แข็ง เว้นแต่จะมีการให้คำแนะนำไว้เป็นอย่างอื่นใน LPC ดำเนินการต่อไปที่ 17.2

17.2. ขนถ่าย PBMC ไปยังที่จัดเก็บชั่วคราวในตู้แช่แข็ง -80°ซ

17.2.1. ขนถ่ายไครโอไวแอลจากระบบทำความเย็นแบบควบคุมอัตราไปยังสถานที่จัดเก็บที่กำหนดไว้ที่ -65 ถึง -95°ซ สำหรับ ACTG, -70 ถึง -95°ซ สำหรับ HVTN และ HPTN

17.2.2. ขนถ่ายไครโอไวแอลหลังจากอย่างต่ำ 4 ชั่วโมงสำหรับ Nalgene® Mr. Frosty™ และ Corning® CoolCell® และข้ามคืนสำหรับ StrataCooler® (แนะนำให้ใช้การจัดเก็บข้ามคืนสำหรับ CRFU ทั้งหมดเป็นแนวปฏิบัติมาตรฐานเพื่อลดความเสี่ยงที่จะเกิดกับสิ่งส่งตรวจ) สำหรับ CryoMed® เมื่อเสร็จสิ้นโปรแกรมแล้ว
ให้ขนถ่ายไครโอไวแอลไปยังตู้แช่แข็ง -80°ซ

หมายเหตุ: **จำเป็นสำหรับ HVTN และ HPTN แนะนำสำหรับ ACTG:** อนุญาตให้ใช้ถาดสำหรับขนถ่ายแบบใช้น้ำแข็งแห้ง (dry ice transfer pan)

สำหรับหน่วยแช่แข็งแบบควบคุมอัตราเท่านั้น ต้องใช้กล่องเก็บความเย็นแบบด้านข้างสูง (tall-sided cooler) ที่ทำให้เย็นล่วงหน้าแล้วสำหรับตู้แช่แข็ง/กล่องจัดเก็บ PBMC
ดูแนวทางเกี่ยวกับห่วงโซ่ความเย็นข้ามเครือข่าย (หัวข้อ 7 กระบวนการขนถ่ายสิ่งส่งตรวจ) สำหรับรายละเอียดเพิ่มเติม
ต้องแน่ใจว่าใช้น้ำแข็งแห้งโปะทับกล่องไครโอไวแอลสำหรับตู้แช่แข็งและฝาปิดทุกด้านแล้ว
ทำงานอย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพเพื่อลดการสัมผัสไครโอไวแอลกับอุณหภูมิโดยรอบ

หมายเหตุ: ห้ามเก็บในไนโตรเจนเหลว (LN_2) เก็บไว้ที่ -65 ถึง -95°ซ สำหรับ ACTG, -70 ถึง -95°ซ สำหรับ HVTN และ HPTN จนกว่าจะขนส่ง

หมายเหตุ: ทำให้ถังเก็บสำหรับขนส่งแบบใช้น้ำแข็งแห้งเย็นล่วงหน้าและใช้กล่องเก็บความเย็นแบบด้านข้างสูงที่ทำให้เย็นล่วงหน้าแล้วในระหว่างขั้นตอนการควบคุมคุณภาพและการบรรจุ ต้องแน่ใจว่าใส่น้ำแข็งแห้งเต็มถังเก็บสำหรับขนส่งแบบใช้น้ำแข็งแห้งก่อนปิดผนึก

17.2.3. ติดต่อบุคลากรของศูนย์ห้องปฏิบัติการของเครือข่ายหากตัวอย่างไปไม่ถึงปลายทางภายในเวลาจัดเก็บชั่วคราวที่เครือข่ายกำหนด ศูนย์ห้องปฏิบัติการของเครือข่ายจะตัดสินว่าการขนถ่ายไปยังสถานที่จัดเก็บ LN_2 และการขนส่งในถังเก็บ LN_2 สำหรับขนส่งนั้นเหมาะสมหรือไม่

17.3. ถ่าย PBMC ไปยังถังไนโตรเจนเหลว (LN_2 dewar) หรือตู้แช่แข็งเชิงกล -150°ซ

หมายเหตุสำหรับ HVTN: ไม่อนุญาตให้ทำการจัดเก็บ LN_2 หรือใช้ถัง LN_2 หรือตู้แช่แข็งเชิงกล -150°ซ สำหรับการจัดเก็บ PBMC ของ HVTN โดยมีข้อยกเว้นซึ่งเป็นกรณีที่พบได้น้อย ห้องปฏิบัติการต้องไม่ขนถ่ายตัวอย่างจากตู้แช่แข็ง -80°ซ เว้นแต่ LC ของ HVTN จะมีคำสั่งให้ทำเช่นนั้น

17.3.1. ภายใน 72 ชั่วโมงหลังจากการแช่แข็งไครโอไวแอลในระบบทำความเย็นแบบควบคุมอัตรา ขนถ่ายบนน้ำแข็งแห้งไปยังสถานที่จัดเก็บที่กำหนดไว้ในถัง LN_2 หรือระบบการจัดเก็บ -150°ซ

17.3.2. ตัวอย่าง PBMC ที่ถูกแช่แข็งมีชีวิตในเฟสไอของ LN_2 อย่างไม่มีกำหนด ห้ามขนถ่ายตัวอย่างจาก LN_2 หรือ -150°ซ กลับไปยังตู้แช่แข็ง -80°ซ เว้นแต่เครือข่ายหรือทีมโครงการวิจัยจะมีคำสั่งให้ทำ

17.3.3. เมื่อเก็บตัวอย่างใน LN_2 แล้ว ต้องทำการขนถ่ายหรือการขนส่งทั้งหมดใน LN_2 ($\leq$ -140°ซ) และขนส่งในถังเก็บ LN_2 สำหรับขนส่งแบบแห้งที่ได้รับอนุมัติจาก IATA

18. การกรอกเอกสารเกี่ยวกับการทำกระบวนการ

18.1. ต้องแน่ใจว่าบันทึกข้อมูลที่เหมาะสมทั้งหมดโดยปฏิบัติตามแนวปฏิบัติการจัดทำเอกสารที่ดีตามข้อกำหนดของเครือข่ายและห้องปฏิบัติการ และการคำนวณทั้งหมดถูกต้อง ดูหัวข้อ 5 สำหรับรายละเอียด

18.2. เก็บคำขอของห้องปฏิบัติการ แผ่นงานการทำกระบวนการกับ PBMC และเอกสารติดตามอื่นใดตามนโยบายของห้องปฏิบัติการ

19. คำจำกัดความและคำย่อ

คำศัพท์	คำจำกัดความ
ACTG	Advancing Clinical Therapeutics Globally
อุณหภูมิในการปั่นเหวี่ยง	15 ถึง 25°ซ หรือสูงถึง 30°ซ โดยขึ้นอยู่กับสภาพภูมิอากาศ
จับตัวเป็นลิ่มที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า	มากกว่า ¾ ของมวลเลือดครบจับตัวเป็นลิ่ม
ลิ่มเลือดขนาดเล็ก	ลิ่มเลือดขนาดเล็กที่สังเกตเห็นหลังจากการทำกระบวนการกับ PBMC ในหลอดเลือดครบ แต่สังเกตเห็นบนฟริตของหลอดแยกหลังจากการปั่นเหวี่ยง
CPS	สารละลายสำหรับการเก็บรักษาในสภาวะเย็นยวดยิ่ง
CSTFB	หลอดแยกเซลล์ที่มีตัวกั้นแบบฟริต
DGM	ตัวกลางเกรเดียนต์ของความหนาแน่น
FBS	ซีรัมจากตัวอ่อนวัว
HBSS	สารละลายเกลือสมดุลของแฮงก์ส
การแตกของเม็ดเลือดแดง	การเปลี่ยนสีของซีรัมหรือพลาสมาจากสีชมพูเป็นแดงเนื่องจากเซลล์เม็ดเลือดแดงแตก ประเมินเกรดการแตกของเม็ดเลือดแดงตามสเกลต่อไปนี้: 1+ สีออกชมพู-แดงซีดในซีรัมหรือพลาสมา สามารถอ่านหนังสือพิมพ์ที่วางไว้ด้านหลังหลอดเลือดได้อย่างชัดเจน 2+ สีออกชมพู-แดงในซีรัมหรือพลาสมา สามารถอ่านหนังสือพิมพ์ได้ แต่ไม่คมชัดเท่า 3+ สีออกชมพู-แดงเข้มในซีรัมหรือพลาสมา เห็นหนังสือพิมพ์ได้ไม่ชัด 4+ สีแดงมะฮอกกานีเข้มในซีรัมหรือพลาสมา ไม่สามารถอ่านหนังสือพิมพ์ได้ *หมายเหตุ*: เซลล์เม็ดเลือดแดงแตกจะทำให้ซีรัมหรือพลาสมามีลักษณะที่มีสี แต่ใส ในขณะที่เมื่อมีการปนเปื้อนเซลล์เม็ดเลือดแดงจะทำให้ซีรัมหรือพลาสมามีลักษณะขุ่น
HI-FBS	ซีรัมจากตัวอ่อนวัวที่ถูกลดฤทธิ์ด้วยความร้อน
HPTN	HIV Prevention Trials Network
HVTN	HIV Vaccine Trials Network
มีดีซ่าน (icteric)	พลาสมามีสีเขียวหรือส้มซึ่งบ่งบอกว่ามีบิลิรูบินเพิ่มขึ้น
LDMS	ระบบการจัดการข้อมูลห้องปฏิบัติการ
LM	คู่มือห้องปฏิบัติการ (HPTN)
LPC	แผนภูมิการทำกระบวนการของห้องปฏิบัติการ (ACTG)
PBMC	เซลล์เม็ดเลือดชนิดนิวเคลียสเดียวจากเลือดส่วนปลาย
PBS	น้ำเกลือที่บัฟเฟอร์ด้วยฟอสเฟต
PI	ผู้วิจัยหลัก
PTID/PID	หมายเลขประจำตัวผู้เข้าร่วม
QS	ทำให้มีปริมาณเพียงพอ—เติมปริมาณของเหลวให้เพียงพอเพื่อให้ได้ปริมาตรที่ระบุไว้
อุณหภูมิห้อง (RT)	15 ถึง 25°ซ หรือสูงถึง 30°ซ โดยขึ้นอยู่กับสภาพภูมิอากาศ
SPLI	คำแนะนำห้องปฏิบัติการที่ทำกระบวนการกับสิ่งส่งตรวจ (HVTN)
ปริมาตรของเลือดครบที่สามารถใช้ได้ (UWBV)	ปริมาตรที่วัดได้ของเลือดครบ ซึ่งจะถูกทำกระบวนการจริง (ปริมาตรของเลือดครบที่สามารถใช้ได้อาจไม่เท่ากับความจุของหลอด)
การจัดเก็บในเฟสไอ	การจัดเก็บไนโตรเจนเหลว (LN_2) ในเฟสไอเป็นพื้นที่ใน ถังจัดเก็บที่อยู่เหนือ LN_2 เหลวที่ก้นถัง
WDR	รีเอเจนต์สำหรับการล้างและการเจือจาง (HBSS, PBS)

20. เอกสารอ้างอิง

20.1. Bull M., Lee B., Stucky J., Chiu Y.L., Rubin A., Horton H., and McElrath MJ. Defining blood processing parameters for optimal detection of cryopreserved antigen-specific responses for HIV vaccine trials. J. Immunol. Methods 322:57-69 (2007).

20.2. CHAVI SOP for PBMC Isolation and Cryopreservation, CHAVI-A0001, v5, Nov 3 2008.

20.3. Cox J.H., DeSouza M., Ratto-Kim S., Ferrari G., Weinhold K.J., and Birx B.L. Cellular Immune assays for evaluation of Vaccine efficacy in developing countries. Manual of Clinical laboratory Immunology. Rose N.R., Hamilton R.G., Detrick B. Eds. (6th ed.) p.301-315 (2002).

20.4. Islam B., Lindbert A., and Christensen B. Peripheral blood cells preparation influences the level of expression of leukocyte cell surface markers as assessed with quantitative multicolor flow cytometry. Cytometry 22:128-134 (1995).

20.5. Immunovirology Research Network (IVRN) Laboratory Manual: Separation and storage of serum, plasma and PBMCs. IVRN. Dec 12 2007.

20.6. Kierstead L.S., Dubey S., Meyer B., Tobery T.W., Mogg R., Fernandez V.R., Long R., Guan L., Gaunt C., Collins K., Sykes K.J., Mehrotra B.V., Chirmule N., Shiver J.W., and Casimiro B.R. Enhanced rates and magnitude of immune responses detected against an HIV vaccine: effect of using an optimized process for isolating PBMC. AIDS Res Hum Retroviruses 23:86-92 (2007).

20.7. Shearer WT, Rosenblatt HM, Gelman RS, Oyomopito R, Plaeger S, Stiehm ER, Wara DW, Douglas SD, Luzuriaga K, McFarland EJ, Yogev R, Rathore MH, Levy W, Graham BL, Spector SA; Pediatric AIDS Clinical Trials Group. Lymphocyte subsets in healthy children from birth through 18 years of age: the Pediatric AIDS Clinical Trials Group P1009 study. J Allergy Clin Immunol. 112(5):973-80 (2003).

20.8. Sigma-Aldrich Accuspin™ System-Histopaque®-1077, procedure number A6929/A7054/A0561, Dated 2003-09.

20.9. Weinberg A., Betensky R., Zhang L., and Ray G. Effect of shipment, storage, anticoagulant, and cell separation on lymphocyte proliferation assays for human immunodeficiency virus-infected patients. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 5:804-807 (1998).

20.10. Weinberg A, Song LY, Wilkening CL, Fenton T, Hural J, Louzao R, Ferrari G, Etter PE, Berrong M, Canniff JD, Carter D, Defawe OD, Garcia A, Garrelts TL, Gelman R, Lambrecht LK, Pahwa S, Pilakka-Kanthikeel S, Shugarts DL, and Tustin NB. Optimization of storage and shipment of cryopreserved peripheral blood mononuclear cells from HIV-infected and uninfected individuals for ELISPOT assays. J Immunol Methods. 363(1):42-50 (2010).

21. ภาคผนวก

21.1. ภาคผนวก A: แผ่นงานการทำกระบวนการกับ PBMC ที่ HVTN กำหนด

หมายเหตุ: ภาคผนวก A ยังมีให้ในรูปแบบที่สามารถดาวน์โหลดและแก้ไขได้ในเว็บไซต์สาธารณะของ HANC ที่ https://www.hanc.info/resources/sops-guidelines-resources/laboratory/cross-network-pbmc-processing-sop.html

21.2. ภาคผนวก B: ตัวอย่างบันทึกการเปลี่ยนไอโซโพรพานอล Nalgene® Mr. Frosty

21.3. ภาคผนวก C: การแก้ไขปัญหา: การฟื้นตัวของ PBMC เมื่อไม่มีแถบ PBMC ที่กำหนดไว้หลังจากการปั่นเหวี่ยงแบบเกรเดียนต์ของความหนาแน่น

21.4. ภาคผนวก D: การรวมชั้นบัฟฟีโคตสำหรับการแยก PBMC ด้วยตัวกลางเกรเดียนต์ของความหนาแน่น

21.5. ภาคผนวก E: คู่มือฉบับย่อของ SOP เกี่ยวกับการทำกระบวนการกับ PBMC ข้ามเครือข่าย—CSTFB

21.6. ภาคผนวก F: คู่มือฉบับย่อของ SOP เกี่ยวกับการทำกระบวนการกับ PBMC ข้ามเครือข่าย—วิธีโอเวอร์เลย์ด้วยมือ

21.7. ภาคผนวก G: รีเอเจนต์ตัวอย่าง

21.8. ภาคผนวก H: ประวัติการแก้ไข

ภาคผนวก A: แผ่นงานการทำกระบวนการกับ PBMC

หมายเหตุ: ต้องกรอกช่องข้อมูลในแผ่นงานนี้ด้วยมือโดยใช้ปากกา

ห้องปฏิบัติการที่ทำกระบวนการกับสิ่งส่งตรวจ: โครงการวิจัย:

ID ของผู้เข้าร่วม (PTID/PID): หมายเลขนัดหมาย: ประเภทนัดหมาย:

วันที่เก็บ: เวลาที่เก็บ:

วันที่เริ่มทำกระบวนการ: เวลาที่เริ่มทำกระบวนการ: ทำกระบวนการโดย (ชื่อย่อ):

รีเอเจนต์	ผู้ผลิต	หมายเลขรุ่นที่ผลิต	วันหมดอายุ
DMSO			
FBS			
WDR: HBSS หรือ PBS (วงกลมเลือกหนึ่งอย่าง)			
หลอดแยกเซลล์ (ฟริต)			
ตัวกลางเกรเดียนต์ของความหนาแน่น			

	ปริมาตรเป็นมิลลิลิตร (บันทึกเป็น X.Y)			วันหมดอายุ
	CPS	DMSO	FBS	
CPS				1 วันทำการ (<18 ชั่วโมง)

ข้อมูลที่จะบันทึกในระหว่างการทำกระบวนการ	ตัวอย่าง
ประเภทหลอดตัวอย่าง (วงกลมเลือกหนึ่งประเภท หรือบันทึกประเภทหลอด “อื่น ๆ”)	ACD / HEP / EDT อื่น ๆ: _____
สภาวะของเลือด (วงกลมเลือกหนึ่งสภาวะหรือมากกว่า เพิ่มความคิดเห็นในหน้าหลังตามที่จำเป็น)	SAT/ HEM / CLT
ปริมาตรของเลือดครบที่สามารถใช้ได้ที่วัดได้ (ให้ใกล้กับ 0.1 มิลลิลิตร มากที่สุด)	มิลลิลิตร
บ่งชี้วิธีการทำกระบวนการ (วงกลมเลือกหนึ่งวิธี)	CSTFB / โอเวอร์เลย์ / อันเดอร์เลย์
วิธีการนับ: ชื่อเครื่องมือจำเพาะหรือการนับด้วยมือ (บันทึกในช่องทางด้านขวา)	
ปริมาตรของการแขวนตะกอนใหม่สำหรับการนับของ HBSS (หรือ WDR อื่น ๆ) (**V**) (บันทึกเป็น X.Y)	มิลลิลิตร
ความเข้มข้นเฉลี่ยของจำนวนเซลล์จากการนับ (**C**)	x 10^6 เซลล์/มิลลิลิตร
จำนวนเซลล์ทั้งหมด (**T**) **= C x V**	x 10^6 เซลล์
คำนวณเซลล์ที่ได้/มิลลิลิตรของเลือดครบ (การตรวจสอบการควบคุมคุณภาพ)= (T/ปริมาตรของเลือดครบที่สามารถใช้ได้)	x 10^6 เซลล์/มิลลิลิตร
คำนวณปริมาตรของการแขวนตะกอนใหม่ของ CPS ที่ประมาณไว้ ***(V1)=(T/15x10^6 เซลล์/มิลลิลิตร)(1 มิลลิลิตร)***	มิลลิลิตร
คำนวณปริมาตรของการแขวนตะกอนใหม่ขั้นสุดท้ายของ CPS (***V_f***), (V1 ซึ่งปัดเศษลงให้เป็นค่ามิลลิลิตรเต็มที่ใกล้ที่สุด (X.0))	มิลลิลิตร
คำนวณจำนวนเซลล์จริงต่อไวแอล ***N2*** = *(T/V_f)* x V2; (V2=1 มิลลิลิตร)	x 10^6 เซลล์/ไวแอล
พิมพ์และควบคุมคุณภาพเนื้อหา/บาร์โค้ดของฉลาก LDMS (ชื่อย่อของบุคคลที่ดำเนินการควบคุมคุณภาพ)	
วันที่และเวลาที่ถูกแช่แข็ง (ววดดดปปปป/ชช:นน) (อธิบายในหัวข้อความคิดเห็น หากไม่อยู่ภายใน **4 ชั่วโมง**ของเวลาที่เริ่มทำกระบวนการ)	
จำนวนไครโอไวแอลที่ถูกแช่แข็งจริง ***หมายเหตุ:*** ควรเท่ากับปริมาตรของการแขวนตะกอนใหม่ขั้นสุดท้ายของ CPS สำหรับแอลิควอต 1 มิลลิลิตร (***V_f***)	
กรอกรายการ LDMS ที่เหลือ รวมถึงจำนวนเซลล์ทั้งหมดจากการนับและเวลาที่ถูกแช่แข็ง (ชื่อย่อ)	

ภาคผนวก A: แผ่นงานการทำกระบวนการกับ PBMC หน้า 2 ของจำนวน 2 หน้า

หมายเหตุ: ต้องกรอกช่องข้อมูลในแผ่นงานนี้ด้วยมือโดยใช้ปากกา

ห้องปฏิบัติการที่ทำกระบวนการกับสิ่งส่งตรวจ:

PTID/PID:

การขนถ่ายไครโอไวแอลไปยังกล่องจัดเก็บสำหรับตู้แช่แข็ง	
บุคคลที่ขนถ่ายไครโอไวแอลไปยังสถานที่เก็บกล่องจัดเก็บที่กำหนดโดย LDMS	
วันที่ (ววดดดปปปป)/เวลาที่ขนถ่ายไครโอไวแอลจากอุปกรณ์แช่แข็งแบบควบคุมอัตราไปยังกล่องจัดเก็บ (ต้องรักษาตัวอย่างไว้ที่ -80°ซ ในระหว่างการขนถ่าย)	
การทบทวนครั้งแรก (ปฐมภูมิ) (ชื่อย่อ/วันที่)	
การทบทวนครั้งสุดท้าย (ทุติยภูมิ) (ชื่อย่อ/วันที่)	

จำนวนฮีมาไซโตมิเตอร์จากการนับ	จำนวนทั้งหมดจากการนับ	เซลล์ที่มีชีวิต	ไม่มีชีวิต
สี่เหลี่ยมจัตุรัส #1 (เซลล์/ตารางมิลลิเมตร)			
สี่เหลี่ยมจัตุรัส #2 (เซลล์/ตารางมิลลิเมตร)			
สี่เหลี่ยมจัตุรัส #3 (เซลล์/ตารางมิลลิเมตร)			
สี่เหลี่ยมจัตุรัส #4 (เซลล์/ตารางมิลลิเมตร)			
จำนวนเซลล์เฉลี่ยจากการนับต่อสี่เหลี่ยมจัตุรัส (เซลล์/ตารางมิลลิเมตร)			
แฟกเตอร์ในการเจือจาง PBMC (1:DF*)			
แฟกเตอร์ของฮีมาไซโตมิเตอร์สำหรับเซลล์/มิลลิลิตร	10^4	10^4	10^4
ความเข้มข้นของจำนวนเซลล์จากการนับ (C) = (เซลล์เฉลี่ย/ตารางมิลลิเมตร)(DF)(10^4); แปลงให้เป็น 10^6 เซลล์/มิลลิลิตร	ไม่เกี่ยวข้อง	x 10^6 เซลล์/มิลลิลิตร	ไม่เกี่ยวข้อง
% ความอยู่รอดได้ = (สี่เหลี่ยมจัตุรัสของเซลล์ที่มีชีวิต 4 อัน/สี่เหลี่ยมจัตุรัสของเซลล์ทั้งหมด 4 อัน) (100)	ไม่เกี่ยวข้อง		ไม่เกี่ยวข้อง

**หมายเหตุ:* แฟกเตอร์ในการเจือจาง (DF) = (ส่วนของเซลล์ + ส่วนของของไหลในการเจือจาง)/ส่วนของเซลล์

จำนวนเซลล์จากการนับโดยอัตโนมัติ (10^3/ไมโครลิตร=10^6/มิลลิลิตร)	การนับ #1
จำนวนเซลล์จากการนับ (C) เป็นเซลล์ x 10^6/มิลลิลิตร	
แฟกเตอร์ในการเจือจาง PBMC (1:DF**)	
ความเข้มข้นของเซลล์ = (C)(DF)	x 10^6 เซลล์/มิลลิลิตร
% ความอยู่รอดได้ (หากเกี่ยวข้อง)	

***หมายเหตุ:* การเจือจางสำหรับเครื่องนับอัตโนมัติเป็นกรณีที่พบได้ยากมาก หากดำเนินการนับโดยตรง ให้ป้อน 1 ในช่อง DF และกรอกในคอลัมน์

ความคิดเห็น การเบี่ยงเบนจากโครงการวิจัย และข้อมูลเพิ่มเติมที่ไม่ได้บันทึกไว้ที่อื่นในแผ่นงานนี้:

ภาคผนวก B: ตัวอย่างบันทึกการเปลี่ยนไอโซโพรพานอล Nalgene® Mr. Frosty™

หมายเหตุ: ต้องเปลี่ยนไอโซโพรพานอลทุกรอบการแช่แข็ง/การละลายรอบที่ห้า

วันที่ใช้	เปลี่ยนไอโซโพรพานอล (ใช่/ไม่)	ชื่อย่อ

ภาคผนวก C: การแก้ไขปัญหา: การฟื้นตัวของ PBMC เมื่อไม่มีแถบ PBMC ที่กำหนดไว้หลังจากการปั่นเหวี่ยงแบบเกรเดียนต์ของความหนาแน่น

C.1. ที่มา: หากมีบางอย่างผิดพลาดในระหว่างการปั่นเหวี่ยงเลือดแบบเกรเดียนต์ของความหนาแน่น ตัวกลางเกรเดียนต์ของความหนาแน่นและชั้นพลาสมาจะไม่แยกกันอย่างสมบูรณ์ และท่านอาจไม่เห็นชั้น PBMC อย่าเพิ่งตกใจ การฟื้นตัวของ PBMC บางส่วนสามารถทำได้ด้วยขั้นตอนเพิ่มเติม

C.2 ระบุปัญหา:

C.2.1 นำหลอดออกจากเครื่องปั่นเหวี่ยงและขนถ่ายไปยังแท่นวาง

C.2.2 พยายามระบุสาเหตุที่ทำให้ไม่มีชั้น PBMC ที่ชัดเจน สาเหตุที่เป็นไปได้มีดังต่อไปนี้:

- หลอดหล่นหรือกระแทก
- เบรกเปิดอยู่
- ความเร็วในการปั่นเหวี่ยงสูงเกินไป ทวนสอบว่าการตั้งค่ารอบต่อนาทีถูกต้องสำหรับกระบวนการที่ใช้ (CSTFB หรือการแยกเซลล์แบบเกรเดียนต์ของความหนาแน่นด้วยมือ) โดยตรวจสอบแผนภูมิ RCF/รอบต่อนาทีสำหรับโรเตอร์ เครื่องปั่นเหวี่ยงบางเครื่องต้องมีการตั้งค่าบนเครื่องปั่นเหวี่ยงตรงกับประเภทของถ้วยใส่หลอดที่ใช้ หากการตั้งค่าไม่ถูกต้อง เครื่องปั่นเหวี่ยงอาจคำนวณความเร็วผิดพลาด
- เครื่องปั่นเหวี่ยงงหยุดทำงานเนื่องจากแหล่งจ่ายไฟจ่ายไฟไม่ต่อเนื่อง
- ฟริตหลุดออกจากที่ (มักเกิดจากความเร็วในการปั่นเหวี่ยงที่สูงเกินไป แต่บางครั้งอาจมีหลอดชำรุดในชุดการผลิต)
- เครื่องปั่นเหวี่ยงไม่สมดุล
- ผู้บริจาคมีจำนวนลิมโฟไซต์ เซลล์เม็ดเลือดขาว หรือฮีมาโทคริตต่ำ

C.3 จากสาเหตุข้างต้น ห้าสาเหตุแรกสามารถแก้ไขได้ง่าย หากสาเหตุเกิดจากเครื่องปั่นเหวี่ยงไม่สมดุล ให้หาว่าเหตุใดเครื่องปั่นเหวี่ยงจึงไม่สมดุล ตรวจสอบดังต่อไปนี้:

C.3.1 ตรวจสอบว่าหลอดสมดุลหรือไม่

C.3.2 ตรวจสอบว่าถ้วยใส่หลอดของเครื่องปั่นเหวี่ยงสมดุลหรือไม่

C.3.3 ตรวจสอบว่าแขนและถ้วยใส่หลอดของเครื่องปั่นเหวี่ยงได้รับการใส่จารบีและน้ำมันอย่างเหมาะสมหรือไม่

<u>หมายเหตุ</u>: หากสงสัยเครื่องปั่นเหวี่ยงเครื่องใดเครื่องหนึ่ง ให้ใช้เครื่องอื่น

C.4 หากปัญหาน่าจะได้รับการแก้ไขแล้ว ให้ปั่นเหวี่ยงตัวอย่างซ้ำดังนี้:

C.4.1 รีเอเจนต์:

- ตัวกลางเกรเดียนต์ของความหนาแน่น
- หลอดปั่นเหวี่ยงแบบก้นแหลมขนาด 50 มิลลิลิตร
- ปิเปต

C.4.2 วิธีการ:

<u>หมายเหตุ</u>: ตัวกลางเกรเดียนต์ของความหนาแน่นเป็นพิษต่อเซลล์ ดังนั้นจึงควรทำงานอย่างมีประสิทธิภาพ

C.4.2.1 เติมตัวกลางเกรเดียนต์ของความหนาแน่น 15 มิลลิลิตร ลงในหลอดขนาด 50 มิลลิลิตร ปราศจากเชื้อ (ไม่ใช่ CSTFB)

C.4.2.2 ปล่อยให้ตัวกลางเกรเดียนต์ของความหนาแน่นอุ่นจนมีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง (15 ถึง 25°ซ หรือสูงถึง 30°ซ โดยขึ้นอยู่กับสภาพภูมิอากาศ) ขณะเดียวกันให้ทำงานกับตัวอย่าง

C.4.2.3 สำหรับหลอดที่ผสมแล้วแต่ละหลอด ให้ติดฉลากหลอดขนาด 50 มิลลิลิตร ด้วย PTID ใช้ปิเปตเพื่อนำสิ่งที่อยู่ในตัวอย่างที่ผสมแล้วออกจากการแยกหรือ CSTFB อย่างช้า ๆ (โดยปกติ ฟริตของ CSTFB จะหลุดออกจากที่)

C.4.2.4 ถ่ายตัวอย่างที่ผสมแล้ว 30 มิลลิลิตร ลงในหลอดที่มีตัวกลางเกรเดียนต์ของความหนาแน่น

C.4.2.5 ทำเช่นนี้ซ้ำสำหรับตัวอย่างที่ผสมแล้วทั้งหมด

C.4.2.6 วางหลอดลงในเครื่องปั่นเหวี่ยง โดยตรวจสอบว่าหลอดสมดุลหรือไม่

C.4.2.7 ปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 30 ถึง 40 นาทีที่ 400 x แรงโน้มถ่วง โดยปิดเบรกที่อุณหภูมิห้อง (15 ถึง 25°ซ หรือสูงถึง 30°ซ โดยขึ้นอยู่กับสภาพภูมิอากาศ)

C.4.2.8 ตอนนี้ควรสามารถมองเห็นชั้น PBMC ได้ (บ่อยครั้งจะสูญเสียบางเซลล์ไป ดังนั้นชั้นจึงอาจบางได้)

C.4.2.9 ถ่ายชั้น PBMC ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงแบบก้นแหลม 50 มิลลิลิตร ที่ติดฉลากด้วยตัวระบุ PTID อย่างระมัดระวัง ใช้หลอดใหม่หนึ่งหลอดสำหรับหลอดตัวกลางเกรเดียนต์ของความหนาแน่นทุกหลอด

C.4.2.10 ปิดฝาหลอดตัวกลางเกรเดียนต์ของความหนาแน่นอีกครั้ง

C.4.2.11 กลับไปที่หัวข้อ 15 ของโครงการวิจัยหลัก

<u>หมายเหตุ</u>: ในหัวข้อ “ความคิดเห็นและการเบี่ยงเบนจากโครงการวิจัย” ของ**แผ่นงานการทำกระบวนการกับ PBMC** ให้บันทึกรายละเอียดของการเบี่ยงเบนจาก SOP (นั่นคือ การดำเนินขั้นตอนจาก “ภาคผนวก C” เพื่อฟื้นตัว PBMC เนื่องจากไม่มีแถบ PBMC ที่กำหนดไว้หลังจากการปั่นเหวี่ยงแบบเกรเดียนต์ของความหนาแน่น) นอกจากนี้ สังเกตว่าการปั่นเหวี่ยงซ้ำใช้เวลานานเท่าไรเพื่อจะประมาณได้ว่าเซลล์อยู่ในตัวกลางเกรเดียนต์ของความหนาแน่นนานเพียงใด

ภาคผนวก D: การรวมชั้นบัฟฟีโคตสำหรับการแยก PBMC ด้วยตัวกลางเกรเดียนต์ของความหนาแน่น

สามารถใช้กระบวนการนี้เมื่อทำการแยก PBMC จากหลอดเลือดหลายหลอดที่มีการรวมกันของ PTID-สารกันเลือดเป็นลิ่มเดียวกัน กระบวนการนี้ช่วยให้สามารถรวมชั้นบัฟฟีโคตเพื่อลดการใช้รีเอเจนต์และวัสดุสิ้นเปลือง เพิ่มการฟื้นตัว และลดการปนเปื้อน

บัฟฟีโคตเป็นส่วนของเลือดครบที่ใส่สารกันเลือดเป็นลิ่มที่มีเซลล์เม็ดเลือดขาว (WBC) และเกล็ดเลือด และเกิดขึ้นหลังจากการปั่นเหวี่ยงที่รอยต่อของชั้นพลาสมาและเซลล์เม็ดเลือดแดง WBC ส่วนใหญ่จะพบในชั้นบัฟฟีโคต โดยมีส่วนเพียงเล็กน้อยมาก (ทั้งหมด <1 ล้าน) ที่ยังคงอยู่ในกลุ่มเซลล์เม็ดเลือดแดงหลังจากเก็บบัฟฟีโคต ชั้นบัฟฟีโคตจะถูกเก็บพร้อมกับส่วนเล็กน้อยของพลาสมาและเซลล์เม็ดเลือดแดง (ประมาณ 1.5 มิลลิลิตร) แล้วถูกเจือจางก่อนการโอเวอร์เลย์บนตัวกลางเกรเดียนต์สำหรับการแยกลิมโฟไซต์

<u>*กระบวนการ:*</u>

D1. ต้องแน่ใจว่าท่านได้ดำเนินขั้นตอนในหัวข้อ 14.4.1 ถึง 14.4.2 เสร็จสิ้นแล้ว

D2. ปั่นเหวี่ยงเลือดครบที่ 200 ถึง 400 x แรงโน้มถ่วง เป็นเวลา 10 นาที

D3. เก็บพลาสมา (และเก็บรักษาไว้ตามที่จำเป็น - ดูหัวข้อ 14.3.4 ถึง 14.3.7) จากแต่ละหลอดจนถึงภายในประมาณ 5 มิลลิเมตร จากชั้นบัฟฟีโคต (ซึ่งเห็นได้ชัดในกรณีส่วนใหญ่ เว้นแต่ผู้ป่วยจะมีภาวะนิวโทรฟิลต่ำ/ลิมโฟไซต์ต่ำอย่างรุนแรง)

D4. กำหนดความจุและจำนวนของหลอดปั่นเหวี่ยงแบบก้นแหลมที่จะจำเป็นสำหรับการรวมกันของ PTID-สารกันเลือดเป็นลิ่มแต่ละชุด ห้ามรวมตัวอย่างจาก PTID/สารกันเลือดเป็นลิ่มที่แตกต่างกัน โดยทั่วไป:

- สามารถรวมบัฟฟีโคตจากหลอดเก็บเลือดขนาด 10 มิลลิลิตร สองหลอดลงในหลอดปั่นเหวี่ยงแบบก้นแหลม 15 มิลลิลิตร หนึ่งหลอด
- สามารถรวมบัฟฟีโคตจากหลอดเก็บเลือดขนาด 10 มิลลิลิตร สูงถึงหกหลอดลงในหลอดปั่นเหวี่ยงแบบก้นแหลม 50 มิลลิลิตร หนึ่งหลอด

D5. ติดฉลากหลอดปั่นเหวี่ยงแบบก้นแหลมแต่ละหลอดด้วย PTID

D6. เติม WDR ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงแบบก้นแหลมปราศจากเชื้อแต่ละหลอด

ความจุของหลอดปั่นเหวี่ยงแบบก้นแหลม (มิลลิลิตร)	ปริมาตรของ WDR (มิลลิลิตร)
15	3
50	10-15

D7. จับหลอดที่พลาสมาหมดไปแล้ว (ซึ่งตอนนี้มีพลาสมาตกค้างในปริมาณเล็กน้อยและเซลล์ที่อัดแน่น) ที่มุมประมาณ 30°

D8. ใช้ปิเปตที่ทำจากพอลิโพรพิลีนแบบใช้แล้วทิ้งที่มีรูกว้าง (wide bore) ขนาด 2.5 มิลลิลิตร ปราศจากเชื้อในการเก็บบัฟฟีโคต ดูดบัฟฟีโคตออกโดยขับปลายด้านล่างของหลอดลงให้ต่ำลง ดูดพลาสมาช้า ๆ ตามด้วยบัฟฟีโคต ซึ่งจะ “เลื่อน” ชั้นเซลล์เม็ดเลือดแดงที่อัดแน่น (การดูดออกประมาณ 1.5 มิลลิลิตร) ลงด้านล่าง ถ่ายบัฟฟีโคตไปยังหลอดที่มี WDR โดยกลั้วปิเปต 2 ถึง 3 ครั้งด้วยสารแขวนตะกอนของ WDR/เซลล์

D9. เก็บและรวมบัฟฟีโคตจากหลอดที่เหลือสำหรับการรวมกันของ PTID-สารกันเลือดเป็นลิ่มดังกล่าว

D10. QS สารแขวนตะกอนของ WDR/เซลล์ด้วย WDR เพิ่มเติมจนได้ปริมาตรที่ต้องการสำหรับการดำเนินการแยกเซลล์แบบเกรเดียนต์ของความหนาแน่น ค่อย ๆ ผสมบัฟฟีโคตที่รวมกัน 3 ถึง 4 ครั้งด้วยปิเปต

D11. ดำเนินการแยกเซลล์แบบเกรเดียนต์ของความหนาแน่นต่อในขั้นตอนในหัวข้อ 14.5 สำหรับ 14.5 “เลือดที่เจือจางแล้ว” หมายถึง “บัฟฟีโคตที่เจือจางแล้ว”

ภาคผนวก E: รีเอเจนต์และวัสดุสิ้นเปลืองตัวอย่าง

หมายเหตุ: ต้องจัดซื้อรีเอเจนต์ทั้งหมดแบบปราศจากเชื้อ และต้องใช้เทคนิคปลอดเชื้อ

รีเอเจนต์/วัสดุสิ้นเปลือง	ตัวอย่าง	เลือกได้/จำเป็น
CSTFB แห้ง	• หลอดแยก Accuspin™ • หลอดแยก Leucosep®	เลือกได้ (***หมายเหตุสำหรับ HVTN:*** จำเป็น)
หลอดแยกเซลล์ที่มีตัวกั้นแบบฟริต (CSTFB) ที่เติมตัวกลางเกรเดียนต์ของความหนาแน่น 1.077 ไว้ล่วงหน้า	• Accuspin™ System Histopaque®-1077	เลือกได้ (***หมายเหตุสำหรับ HVTN:*** ไม่อนุญาต หากไม่ได้รับอนุมัติจากเครือข่าย)
ตัวกลางเกรเดียนต์ของความหนาแน่น 1.077	• Ficoll-Paque PLUS และ PREMIUM • Lymphoprep™ • ตัวกลางสำหรับการแยกลิมโฟไซต์ – LSM ™	เลือกได้
ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) เกรดสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์	• Hybrimax, Sigma-Aldrich แค็ตตาล็อก # D2650, ที่ผ่านการทดสอบชีวพิษภายในตัว (endotoxin) และการทดสอบไฮบริโดมาแล้ว • หรือผลิตภัณฑ์ที่เทียบเท่า	จำเป็น
ซีรัมจากตัวอ่อนวัว (FBS)		*ACTG และ HPTN:* ดูข้อมูลเกี่ยวกับรุ่นที่ผลิตปัจจุบันที่ตรวจสอบความเที่ยงตรงโดย IQA ***HVTN (และโครงการวิจัยข้ามเครือข่ายบางโครงการกับ HVTN):*** เครือข่ายเป็นผู้จัดเตรียม FBS ที่ได้รับอนุมัติจาก HVTN ให้ห้องปฏิบัติการในลักษณะที่ถูกลดฤทธิ์ด้วยความร้อนแล้ว ผู้จำหน่ายและรุ่นที่ผลิตของ FBS ที่ได้รับอนุมัติจาก HVTN จะไม่สามารถจัดซื้อนอกห่วงโซ่อุปทาน/กระบวนการของ HVTN ได้
ไครโอไวแอล	• หลอด Nunc CryoTubes™ ที่ทำจากพอลิโพรพิลีน (PP) มีเกลียวใน และฝาเกลียว #377267 • Greiner Cryotubes แบบมีเกลียวใน ฝาเกลียวธรรมชาติ ทำจากพอลิโพรพิลีน (PP) ก้นกลม มีพื้นที่เขียน ฐานรูปดาว ปราศจากเชื้อ #122263 • ไวแอลแบบไครโอเจนิกที่ทำจากพอลิโพรพิลีน มีเกลียวใน ตั้งได้เอง และมีก้นกลม Corning® ขนาด 2 มิลลิลิตร #430488	ควรใช้ Nunc/ต้องมีเกลียวในสำหรับเครือข่ายทั้งหมด ***หมายเหตุสำหรับ HVTN:*** ต้องใช้ Nunc CryoTubes™ #377267 สำหรับโครงการวิจัยของเครือข่ายของ HVTN การใช้สิ่งใด ๆ แทนที่ต้องได้รับอนุมัติจาก HVTN ก่อนที่ห้องปฏิบัติการจะทำการจัดซื้อ
ฉลากแบบไครโอเจนิก	• Cryo-Tags® และ Cryo-Babies® Brady B461 หรือ B490 • ฉลากสำหรับตู้แช่แข็ง Shamrock	เลือกได้
ปากกาทำเครื่องหมาย	• Fisherband* Marking Pens #13-379 • Nalgene® Lab Pen/Lab Marker #6310/#6311	เลือกได้

ภาคผนวก F: คู่มือฉบับย่อของ SOP เกี่ยวกับ PBMC—CSTFB

ต้องใช้**แผ่นงานการทำกระบวนการกับ PBMC** และ LDMS ***สำหรับเครือข่ายทั้งหมด*** (ดูหัวข้อ 5 สำหรับรายละเอียด) ก่อนใช้คู่มือฉบับย่อนี้เป็นครั้งแรก ต้องทบทวน SOP เกี่ยวกับ PBMC ฉบับเต็มเพื่อดูหมายเหตุและรายละเอียดที่สำคัญ ตลอดจนแนวทางที่จำเพาะต่อเครือข่าย

ขั้นตอน	การอ้างอิงกับ SOP
1. เตรียมและทำให้ CPS เย็น	11.2
2. เตรียมตัวอย่างเลือดครบ รีเอเจนต์ และวัสดุสิ้นเปลือง	13.2
3. **หากต้อง**ใช้แอลิควอตของพลาสมาตามคำแนะนำของโครงการวิจัย: a. ปั่นเหวี่ยงเลือดครบที่ 200 ถึง 400 x แรงโน้มถ่วง เป็นเวลา 10 นาที b. ทำเครื่องหมายปริมาตรทั้งหมดของเลือดที่เมนิสคัส แล้วถ่ายพลาสมาไปยังหลอดปั่นเหวี่ยงแบบก้นแหลมขนาด 15 หรือ 50 มิลลิลิตร ที่ติดฉลากแล้วสำหรับการทำกระบวนการเพิ่มเติม (800 ถึง 1200 x แรงโน้มถ่วง เป็นเวลา 10 นาที โดยเลือกใช้เบรกหรือไม่ก็ได้) c. เติม WDR ในปริมาณที่เพียงพอเพื่อทำให้เลือดกลับมามีเลือดครบในปริมาตรดั้งเดิม ค่อย ๆ ผสม และทำกระบวนการกับ PBMC ต่อ	13.3
4. เติม WDR 5 มิลลิลิตร ลงใน CSTFB ที่ติดฉลากแล้วแต่ละหลอด และ WDR 25 มิลลิลิตรลงในหลอดล้างแบบก้นแหลมขนาด 50 มิลลิลิตร ที่สอดคล้องกันที่ติดฉลากแล้วแต่ละหลอด (***หมายเหตุ:*** สามารถดำเนินการก่อนหน้านั้นได้โดยเป็นส่วนของการเตรียมการ [ขั้นตอนที่ 2]) 5. ถ่ายเลือด 15 ถึง 20 มิลลิลิตร (12-22 ก็ได้รับอนุญาต) ลงใน CSTFB ที่ติดฉลากแล้ว a. ติดตามปริมาตรที่วัดได้อย่างระมัดระวัง บันทึก UWBV ที่วัดได้ให้แม่นยำให้ใกล้กับ 0.1 มิลลิลิตร มากที่สุด 6. เติมปริมาตรที่กลั้วในหลอด WDR และ WDR ขั้นสุดท้ายลงใน CSTFB สูงถึง 30 มิลลิลิตร (WDR + เลือดครบ)	13.4
7. ปั่นเหวี่ยงที่ 800 ถึง 1000 x แรงโน้มถ่วง เป็นเวลา 15 นาทีที่ 15 ถึง 30°ซ โดย<u>ปิดเบรก/ตั้งค่าเป็นศูนย์</u> 8. ตรวจสอบหลอดเพื่อหาปัญหาที่อาจเกิดขึ้นได้ 9. เก็บบัฟฟีโคตของ CSTFB แต่ละชั้นลงในหลอดปั่นเหวี่ยงแบบก้นแหลมขนาด 50 มิลลิลิตร ที่สอดคล้องกันหลอดเดียวที่ติดฉลากแล้วที่เติม WDR 25 มิลลิลิตร ไว้ล่วงหน้า	13.5
10. เติม WDR เพื่อ QS ให้มีปริมาตรทั้งหมดที่ 45 มิลลิลิตร และค่อย ๆ ผสม 11. การล้าง #1—ปั่นเหวี่ยงที่ 200 ถึง 400 x แรงโน้มถ่วง เป็นเวลา 10 นาทีที่ 15 ถึง 30°ซ โดยเลือกใช้เบรกหรือไม่ก็ได้ 12. ตรวจสอบหาตะกอนเซลล์ บันทึกการสังเกตที่ไม่คาดคิด 13. ค่อย ๆ นำส่วนเหนือตะกอนออกโดยไม่รบกวนตะกอนเซลล์	15.1
14. ทำการแขวนตะกอนใหม่กับตะกอนเซลล์ใน WDR ปริมาณเล็กน้อย ทำให้ได้สารแขวนตะกอนของเซลล์ที่เป็นเนื้อเดียวกัน 15. รวมสารแขวนตะกอนของตะกอนสูงถึง 4 ชนิดลงในหลอดปั่นเหวี่ยงแบบก้นแหลมขนาด 50 มิลลิลิตร หนึ่งหลอด 16. เติมปริมาตรที่กลั้วในหลอด WDR และ WDR ขั้นสุดท้ายที่ 45 มิลลิลิตร ลงในหลอดเซลล์ 17. การล้าง #2—ปั่นเหวี่ยงที่ 200 ถึง 400 x แรงโน้มถ่วง เป็นเวลา 10 นาทีที่ 15 ถึง 30°ซ โดยเลือกใช้เบรกหรือไม่ก็ได้ 18. ตรวจสอบหาตะกอนเซลล์ บันทึกการสังเกตที่ไม่คาดคิด 19. ค่อย ๆ นำส่วนเหนือตะกอนออกโดยไม่รบกวนตะกอนเซลล์	15.2
20. คำนวณปริมาตรของการแขวนตะกอนใหม่สำหรับการนับของ WDR (V) 21. รวมตะกอนเซลล์ลงในหนึ่งหลอดโดยใช้ WDR ในปริมาตรของการแขวนตะกอนใหม่ ปริมาตรนี้เป็นปริมาตรที่ใช้อิงในการนับจำนวนเซลล์ 22. นับและคำนวณจำนวนเซลล์ทั้งหมด 23. คำนวณเซลล์ที่ได้เป็นเซลล์/มิลลิลิตรของเลือดครบที่สามารถใช้ได้	15.3
24. คำนวณปริมาตรของการแขวนตะกอนใหม่ขั้นสุดท้ายของ CPS ตรวจสอบการคำนวณ	15.4
25. ดำเนินการพิมพ์ การติดฉลาก และการควบคุมคุณภาพไครโอไวแอลให้เสร็จสิ้นก่อนปั่นเหวี่ยงขั้นสุดท้าย	15.5
26. ปั่นเหวี่ยงที่ 200 ถึง 400 x แรงโน้มถ่วง เป็นเวลา 10 นาทีที่ 15 ถึง 30°ซ โดยเลือกใช้เบรกหรือไม่ก็ได้	15.6
27. ค่อย ๆ นำส่วนเหนือตะกอนออกโดยไม่รบกวนตะกอนเซลล์ 28. ค่อย ๆ ทำการแขวนตะกอนใหม่กับตะกอนใน CPS **เย็น** (V_f) ขณะเดียวกันให้หมุนหลอดเพื่อให้กระจายเท่า ๆ กัน ค่อย ๆ ทำแอลิควอตของ CPS-เซลล์	15.7
29. ทันที (≤ 10 นาทีหลังจากการเติม CPS ลงในตัวอย่าง) ให้ขนถ่ายไครโอไวแอลทั้งหมดไปยังหน่วยแช่แข็งแบบควบคุมอัตราและวางไว้ในตู้แช่แข็ง	15.8
30. หลังจากช่วงเวลาที่เหมาะสม ให้ขนถ่ายไครโอไวแอลไปยังอุปกรณ์จัดเก็บในสถานที่และขนส่งภายในช่วงเวลาที่เครือข่ายกำหนดไว้	17
31. กรอกและทบทวน**แผ่นงานการทำกระบวนการกับ PBMC** และการป้อนข้อมูลตามที่เครือข่ายมีคำสั่ง	18.1

ภาคผนวก G: คู่มือฉบับย่อของ SOP เกี่ยวกับ PBMC—โอเวอร์เลย์ด้วยมือ

ต้องใช้**แผ่นงานการทำกระบวนการกับ PBMC** และ LDMS ***สำหรับเครือข่ายทั้งหมด*** (ดูหัวข้อ 5 สำหรับรายละเอียด) ก่อนใช้คู่มือฉบับย่อนี้เป็นครั้งแรก ต้องทบทวน SOP เกี่ยวกับ PBMC ฉบับเต็มเพื่อดูหมายเหตุและรายละเอียดที่สำคัญ ตลอดจนแนวทางที่จำเพาะต่อเครือข่าย

ขั้นตอน (ปริมาณสำหรับตัวอย่างที่มีขนาดเล็กกว่าจะเป็น*ตัวเอียง*)	**การอ้างอิงกับ SOP**
1. เตรียมและทำให้ CPS เย็น	11.2
2. เตรียมตัวอย่างเลือดครบ รีเอเจนต์ และวัสดุสิ้นเปลือง	14.2
3. หาก**ต้อง**ใช้แอลิควอตของพลาสมาตามคำแนะนำของโครงการวิจัย: a. ปั่นเหวี่ยงเลือดครบที่ 200 ถึง 400 x แรงโน้มถ่วง เป็นเวลา 10 นาที b. ทำเครื่องหมายปริมาตรทั้งหมดของเลือดที่เมนิสคัส แล้วถ่ายพลาสมาไปยังหลอดปั่นเหวี่ยงแบบก้นแหลมขนาด 15 หรือ 50 มิลลิลิตร สำหรับการทำกระบวนการเพิ่มเติม (800 ถึง 1200 x แรงโน้มถ่วง เป็นเวลา 10 นาที โดยเลือกใช้เบรกหรือไม่ก็ได้) c. เติม WDR ในปริมาณที่เพียงพอเพื่อทำให้เลือดกลับมามีเลือดครบในปริมาตรดั้งเดิม ค่อย ๆ ผสม และทำกระบวนการกับ PBMC ต่อ	14.3
4. ถ่ายเลือดครบลงในหลอดปั่นเหวี่ยงแบบก้นแหลมขนาด 50 มิลลิลิตร (*15 มิลลิลิตร*) ปราศจากเชื้อและเจือจางด้วย WDR ตามที่จำเป็น 5. โอเวอร์เลย์เลือดบนด้านบนของตัวกลางเกรเดียนต์ของความหนาแน่นอย่างระมัดระวังและช้า ๆ (วิธีอันเดอร์เลย์เป็นทางเลือกหนึ่งที่ได้รับอนุมัติ ยกเว้นโครงการวิจัยของ HVTN)	14.4
6. ปั่นเหวี่ยงที่ 400-800 x แรงโน้มถ่วง เป็นเวลา 15-30 นาที โดย<u>ปิดเบรก/ตั้งค่าเป็นศูนย์</u> 7. ตรวจสอบหลอดปั่นเหวี่ยงแบบก้นแหลมแต่ละหลอดเพื่อหาปัญหาที่อาจเกิดขึ้นได้ 8. เก็บบัฟฟีโคตแต่ละชั้นลงในหลอดปั่นเหวี่ยงแบบก้นแหลมขนาด 50 มิลลิลิตร (*15 มิลลิลิตร*) ที่สอดคล้องกันหลอดเดียว	14.5
9. เติม WDR เพื่อ QS ให้มีปริมาตรทั้งหมด 45 มิลลิลิตร (*10 มิลลิลิตร*) และค่อย ๆ ผสม 10. การล้าง #1—ปั่นเหวี่ยงที่ 200 ถึง 400 x แรงโน้มถ่วง เป็นเวลา 10 นาทีที่ 15 ถึง 30°ซ โดยเลือกใช้เบรกหรือไม่ก็ได้ 11. ตรวจสอบหาตะกอนเซลล์ 12. ค่อย ๆ นำส่วนเหนือตะกอนออกโดยไม่รบกวนตะกอนเซลล์	15.1
13. ทำการแขวนตะกอนใหม่กับตะกอนเซลล์ใน WDR ปริมาณเล็กน้อย ทำให้ได้สารแขวนตะกอนของเซลล์ที่เป็นเนื้อเดียวกัน 14. รวมสารแขวนตะกอนของตะกอนสูงถึง 4 ชนิดลงในหลอดปั่นเหวี่ยงแบบก้นแหลมขนาด 50 มิลลิลิตร หนึ่งหลอด (*2 ชนิดลงในหลอดขนาด 15 มิลลิลิตร*) 15. เติมปริมาตรที่กลั้วในหลอด WDR และ WDR ขั้นสุดท้ายสูงถึง 45 มิลลิลิตร (*10 มิลลิลิตร*) ลงในหลอดเซลล์ 16. การล้าง #2—ปั่นเหวี่ยงที่ 200 ถึง 400 x แรงโน้มถ่วง เป็นเวลา 10 นาทีที่ 15 ถึง 30°ซ โดยเลือกใช้เบรกหรือไม่ก็ได้ 17. ตรวจสอบหาตะกอนเซลล์ 18. ค่อย ๆ นำส่วนเหนือตะกอนออกโดยไม่รบกวนตะกอนเซลล์	15.2
19. คำนวณปริมาตรของการแขวนตะกอนใหม่สำหรับการนับของ WDR (V) 20. รวมตะกอนเซลล์ลงในหนึ่งหลอดโดยใช้ WDR ในปริมาตรของการแขวนตะกอนใหม่ ปริมาตรนี้เป็นปริมาตรที่ใช้อิงในการนับจำนวนเซลล์ 21. นับและคำนวณจำนวนเซลล์ทั้งหมด 22. คำนวณเซลล์ที่ได้เป็นเซลล์/มิลลิลิตรของเลือดครบที่สามารถใช้ได้	15.3
23. คำนวณปริมาตรของการแขวนตะกอนใหม่ขั้นสุดท้ายของ CPS ตรวจสอบการคำนวณ	15.4
24. ดำเนินการพิมพ์ การติดฉลาก และการควบคุมคุณภาพไครโอไวแอลให้เสร็จสิ้นก่อนปั่นเหวี่ยงขั้นสุดท้าย	15.5
25. ปั่นเหวี่ยงที่ 200 ถึง 400 x แรงโน้มถ่วง เป็นเวลา 10 นาทีที่ 15 ถึง 30°ซ โดยเลือกใช้เบรกหรือไม่ก็ได้	15.6
26. ค่อย ๆ นำส่วนเหนือตะกอนออกโดยไม่รบกวนตะกอนเซลล์ 27. ค่อย ๆ ทำการแขวนตะกอนใหม่กับตะกอนใน CPS **เย็น** (V_f) ขณะเดียวกันให้หมุนหลอดเพื่อให้กระจายเท่า ๆ กัน แนะนำให้ทำงานบนน้ำแข็งเปียก 28. ค่อย ๆ ทำแอลิควอตของ CPS-เซลล์	15.7
29. ทันที (≤ 10 นาทีหลังจากการเติม CPS ลงในตัวอย่าง) ให้ขนถ่ายไครโอไวแอลทั้งหมดไปยังหน่วยแช่แข็งแบบควบคุมอัตราและวางไว้ในตู้แช่แข็ง	15.8
30. หลังจากช่วงเวลาที่เหมาะสม ให้ขนถ่ายไครโอไวแอลไปยังอุปกรณ์จัดเก็บในสถานที่และขนส่งภายในช่วงเวลาที่เครือข่ายกำหนดไว้	17
31. กรอกและทบทวน**แผ่นงานการทำกระบวนการกับ PBMC** และการป้อนข้อมูลตามที่เครือข่ายมีคำสั่ง	18.1

ภาคผนวก H: ประวัติการแก้ไขจากเวอร์ชัน 6.0 ไปเป็น 7.0

เวอร์ชัน วันที่มีผล (วว/ดด/ปป)	หัวข้อ	การแก้ไข
7.0 19 สิงหาคม 2024	ทั้งหมด	เพิ่มโลโก้ HANC ที่แก้ไขใหม่ในส่วนหัว
	ทั้งหมด	ลบการอ้างอิงถึง MTN
	ทั้งหมด	ลบการอ้างอิงถึง IMPAACT
	ทั้งหมด	อัปเดตหัวข้อทั้งหมดอย่างครอบคลุมให้สอดคล้องกับแนวทาง โครงการวิจัย และแนวปฏิบัติในปัจจุบัน
	การอนุมัติ	ลบการอนุญาตของ MTN
	การอนุมัติ	ลบการอนุญาตของ IMPAACT
	การอนุมัติ	Kathryn Dougherty ทำหน้าที่แทน John Hural สำหรับการอนุญาตของ HVTN
	8.1.5	ข้อกำหนดสำหรับไครโอไวแอลที่มีเกลียวในสำหรับการจัดเก็บ PBMC
	15.4	วิธีการบรรจุไวแอลที่สอดคล้องกันสำหรับ ACTG, HPTN และ HVTN
6.0 26 เมษายน 2018	การอนุมัติ	Grace Aldrovandi ทำหน้าที่แทน Bob Coombs สำหรับการอนุญาตของ ACTG John Hural ทำหน้าที่แทน Constance Ducar สำหรับการอนุญาตของ HVTN Edward Livant ทำหน้าที่แทน Charlene Dezzutti สำหรับการอนุญาตของ MTN
	8.1.4	เพิ่มข้อกำหนดเพิ่มเติมที่บันทึกในบันทึกประจำวันที่ 7 ตุลาคม 2016 สำหรับห้องปฏิบัติการของ ACTG และ IMPAACT เท่านั้น อีกทั้งเพิ่มข้อกำหนดเพิ่มเติมเกี่ยวกับไครโอไวแอลสำหรับเครือข่ายทั้งหมด
	18.2.1	เพิ่มแนวทางเพิ่มเติมที่เกี่ยวข้องกับจุดตั้งอุณหภูมิตู้แช่แข็ง
	ภาคผนวก D	เปลี่ยน “WBC ส่วนมาก…” เป็น “WBC ส่วนใหญ่…”
	ภาคผนวก G	เพิ่มข้อมูลเพิ่มเติมในหัวข้อไครโอไวแอลที่เกี่ยวข้องกับการใช้หลอดไมโครทิวบ์ฝาเกลียว SARSTEDT
5.2 22 กันยายน 2014	5.1.3	เปลี่ยน “ห้องปฏิบัติการอาจใช้**แผ่นงานการทำกระบวนการกับ PBMC ของ HVTN** หรือแก้ไขให้เหมาะสมสำหรับกระบวนการของห้องปฏิบัติการนั้น” เป็น “ห้องปฏิบัติการอาจใช้**แผ่นงานการทำกระบวนการกับ PBMC ของ HVTN** ซึ่งแก้ไขให้เป็นไปตามข้อกำหนดของเครือข่ายที่สอดคล้องกันและเหมาะสำหรับกระบวนการของห้องปฏิบัติการนั้น”
5.1 30 กรกฎาคม 2014	5.1.3	แนวทางสำหรับการติดตามแผนภูมิการทำกระบวนการกับ PBMC-: จำนวนเซลล์ทั้งหมด : เติม “(เลือกได้สำหรับ HVTN)” ถัดจาก N
	16.4.5	ละเว้นหมายเหตุเนื่องจากไม่มีฟริตในหลอดแบบก้นแหลมเมื่อทำโอเวอร์เลย์หรืออันเดอร์เลย์ด้วยมือ
	16.4.6	เปลี่ยนการอ้างอิงสำหรับวิธีโอเวอร์เลย์เป็น 16.4.6.1 และวิธีอันเดอร์เลย์เป็น 16.4.6.2
	18.1	เพิ่มแนวทางเกี่ยวกับเวลาจัดเก็บ/ขนถ่ายสำหรับ HPTN, IMPAACT และ MTN
	14, 18.1, 18.3, 18.3.1	เปลี่ยน “ตู้แช่แข็งเชิงกล LN2/-150°ซ” เป็น “ถัง LN2 หรือตู้แช่แข็งเชิงกล -150°ซ”
	18.3	ปรับภาษาเกี่ยวกับ PBMC ที่เก็บในถัง LN2 หรือตู้แช่แข็งเชิงกล -150°ซ ให้ง่ายขึ้นและไม่รวมข้อระบุว่า “นานกว่า 4 สัปดาห์”
	18.3.1-18.3.2	เปลี่ยนแนวทางเกี่ยวกับเวลาขนถ่ายที่จำเป็นจาก “วันทำการถัดไป” เป็น “ภายใน 72 ชั่วโมง”
	18.3.1	เปลี่ยน “LN2/-150°ซ” เป็น “LN2 หรือ -150°ซ”
	22, 24.2	ลบตัวเลือก RPMI
	ภาคผนวก E, F	เปลี่ยนการอ้างอิงถึง SOP ขั้นตอนที่ 1 จาก “11.3” เป็น “11.2”
	ภาคผนวก E	เปลี่ยนการอ้างอิงถึง SOP ขั้นตอนที่ 31 จาก “18 หรือ 19” เป็น “18”
	ภาคผนวก E	เปลี่ยนการอ้างอิงถึง SOP ขั้นตอนที่ 32 จาก “19.2” เป็น “19.1”
	ภาคผนวก E	เปลี่ยนข้อความของขั้นตอนที่ 32 เป็น “กรอก**แผ่นงานการทำกระบวนการกับ PBMC** ตามที่เครือข่ายมีคำสั่ง”
	ภาคผนวก F	ขั้นตอนที่ 9-12: เปลี่ยน “16.1” เป็น “17.1”
	ภาคผนวก F	ขั้นตอนที่ 13-18: เปลี่ยน “16.2” เป็น “17.2”
	ภาคผนวก F	ขั้นตอนที่ 19-22: เปลี่ยน “16.3” เป็น “17.3”
	ภาคผนวก F	เปลี่ยนการอ้างอิงถึง SOP ขั้นตอนที่ 30 จาก “18 หรือ 19” เป็น “18”
	ภาคผนวก F	เปลี่ยนการอ้างอิงถึง SOP ขั้นตอนที่ 31 จาก “19.2” เป็น “19.1”
	ภาคผนวก F	เปลี่ยนข้อความของขั้นตอนที่ 31 เป็น “กรอก**แผ่นงานการทำกระบวนการกับ PBMC** ตามที่เครือข่ายมีคำสั่ง”
5.0	การอนุมัติ	Grace Aldrovandi ทำหน้าที่แทน Susan Fiscus สำหรับการอนุญาตของ IMPAACT

01 พฤษภาคม 2014	5.1.3	แนวทางสำหรับการติดตามแผนภูมิการทำกระบวนการกับ PBMC : คำแนะนำ: เปลี่ยน “L = LDMS กำหนดให้ต้องทำการติดตามใน LDMS” เป็น “L= ช่องข้อมูลที่จำเป็นใน LDMS สำหรับสิ่งส่งตรวจของเครือข่าย”
	5.1.3	แนวทางสำหรับการติดตามตารางการทำกระบวนการกับ PBMC-: เปลี่ยน “หมายเลขสิ่งส่งตรวจของ LDMS” เป็น “ID ของสิ่งส่งตรวจทั่วโลกของ LDMS”
	5.1.3	เปลี่ยนเซลล์ที่เติมสีเทาเพื่อบ่งชี้ว่าข้อมูลไม่จำเป็นเป็นสีดำ
	7.1.8	เพิ่ม HPTN และ MTN
	10.2	ละเว้นทางเลือกสำหรับการใช้ RMPI เป็นสิ่งแทนที่
	14	การเปลี่ยนแปลงการจัดรูปแบบ
	18 และ 19	รวมคำแนะนำในการจัดเก็บชั่วคราวและในสถานที่จากสองหัวข้อในหัวข้อ 18 หัวข้อเดียว
	19	แยกภาษาที่อธิบายการกรอกเอกสารเกี่ยวกับการทำกระบวนการที่ซ้ำในหัวข้อ 18 และหัวข้อ 19 ออกเป็นหัวข้อของตัวเอง
	ภาคผนวก H	ลบการเปลี่ยนแปลงประวัติเวอร์ชันอื่นโดยเก็บไว้เฉพาะการเปลี่ยนแปลงเวอร์ชันปัจจุบันที่เหมาะสมกับเอกสารนี้เท่านั้น