

Đề tài:	Xử lý PBMC Mạng lưới Chéo Quy trình Vận hành Chuẩn phiên bản 7.0		
Ngày xuất Bản gốc:	01/4/2009	Tổng số Trang:	41
Ngày có Hiệu lực:	19/8/2024	Số SOP:	HANC-LAB-P0001 v7.0
Người biên soạn:	Nhóm Làm việc SOP PBMC Mạng lưới Chéo	Thay thế SOP Ngày:	26/4/2018

	Mạng lưới	Tên, Chức vụ	Chữ ký	Ngày
Người phê duyệt (Mạng lưới):	ACTG	Bác sĩ Grace Aldrovandi Nhà nghiên cứu Chính Phòng thí nghiệm Mạng lưới ACTG	DocuSigned by: <i>Grace Aldrovandi</i> 6BE9A0BACDFE4FA...	26/07/2024
	HPTN	Estelle Piwowar-Manning, MT (ASCP) SI Phó Giám đốc Phòng thí nghiệm Mạng lưới HPTN	Signed by: <i>Estelle Piwowar</i> 0E0BC1A7D726416...	27/07/2024
	HVTN	Kathryn Dougherty, MT (ASCP) Phó Giám đốc HVTN về Chất lượng và Tuân thủ của Phòng thí nghiệm	DocuSigned by: <i>Kathryn Dougherty</i> 7DCF2BEE1F91407...	26/07/2024

Lịch sử Sửa đổi	Để biết lịch sử sửa đổi đầy đủ, hãy xem Phụ lục H .
------------------------	---

	Tên, Chức vụ	Chữ ký	Ngày
Người kiểm tra (Phòng thí nghiệm):			

Mục Lục

Mục đích.....	3
Phạm vi áp dụng	3
Thông tin cơ bản	3
Quyền hạn và Trách nhiệm	3
Báo cáo Kết quả.....	3
Mẫu	5
Trang thiết bị	6
Vật dụng dùng một lần.....	7
Trang thiết bị Bảo hộ Cá nhân	8
Các Thuốc thử	8
Chuẩn bị Thuốc thử	10
Giới thiệu và Hướng dẫn Xử lý PBMC	13
Tách Tế bào và Pha loãng Máu bằng Ống nghiệm Tách tế bào có Màng ngăn Frit có Thay thế Huyết tương	14
Tách Tế bào bằng cách Xếp trên hoặc Xếp dưới (Thủ công) Môi trường Gradient Tỷ trọng và Pha loãng Máu bằng cách Tách Tế bào (Thủ công) Gradient Tỷ trọng có Thay thế Huyết tương	18
Rửa, Đếm, Tái nhũ tương, Cô đặc và Đông lạnh có Kiểm soát Tốc độ Qua đêm	21
Kiểm tra Chất lượng	25
Bảo quản PBMC (Tạm thời hoặc Tại chỗ)	26
Hoàn tất Tài liệu Xử lý	27
Các Định nghĩa và Từ viết tắt	28
Tài liệu tham khảo.....	29
Phụ lục	29
Phụ lục A: Bảng quy trình Xử lý PBMC.....	30
Phụ lục B: Mẫu Sổ ghi Thay đổi Nalgene® Mr. Frosty™ Isopropanol.....	32
Phụ lục C: Khắc phục sự cố: Phục hồi PBMC khi Không có Băng (Lớp) PBMC Xác định sau khi Ly tâm Gradient Tỷ trọng	33
Phụ lục D: Gộp các Lớp Trung gian để Cô lập PBMC Môi trường Gradient Tỷ trọng	35
Phụ lục E: Các Thuốc thử và Tiếp liệu Mẫu	36
<i>Phụ lục F: Hướng dẫn Nhanh PBMC SOP—CSTFB</i>	37
<i>Phụ lục G: Hướng dẫn Nhanh PBMC SOP – Xếp trên Thủ công</i>	39
<i>Phụ lục H: Lịch sử Sửa đổi từ Phiên bản 6.0 đến 7.0</i>	40

*Phụ lục A cũng có sẵn dưới dạng tải xuống và có thể chỉnh sửa trên trang web công khai HANC tại <http://www.hanc.info/labs/labresources/procedures/Pages/pbmcSop.aspx>.

1. Mục đích

- 1.1. Quy trình Vận hành Chuẩn (SOP) này trình bày quy trình cô lập và bảo quản lạnh những Tế bào Bạch cầu Đơn nhân Máu Ngoại biên (PBMC) từ máu toàn phần.

2. Phạm vi áp dụng

- 2.1. Đây là quy trình xử lý mẫu máu để cô lập, bảo quản lạnh và bảo quản các mẫu PBMC.
- 2.2. Ưu tiên sử dụng hướng dẫn cụ thể theo giao thức xử lý của mạng lưới thay cho các quy trình trong SOP này.

3. Thông tin cơ bản

- 3.1. PBMC mới thu thập và đông lạnh sẽ được sử dụng để đánh giá các đối tượng nghiên cứu. Những nghiệm pháp này yêu cầu PBMC phải được cô lập và đông lạnh dưới những điều kiện xác định và nghiêm ngặt để đảm bảo khả năng khôi phục, khả năng sống và chức năng cơ bản tối ưu. Tốt nhất là máu được xử lý và đông lạnh trong vòng 8 giờ kể từ lúc lấy máu để duy trì tối đa chức năng của các tế bào trong các nghiệm pháp kiểm tra miễn dịch.

4. Quyền hạn và Trách nhiệm

- 4.1. Các Giám đốc Trung tâm Phòng thí nghiệm của Mạng lưới/Nhà nghiên cứu Chính (hoặc người được phân công) có quyền thiết lập, kiểm tra và cập nhật quy trình này.
- 4.2. Văn phòng Điều phối HIV/AIDS Mạng lưới (HANC) chịu trách nhiệm duy trì và kiểm soát tài liệu SOP.
- 4.3. Giám đốc Phòng thí nghiệm Xử lý chịu trách nhiệm duy trì và kiểm soát HANC SOP này và bảo đảm tất cả nhân viên thích hợp đều đã được tập huấn.
- 4.4. Tất cả nhân viên của địa điểm và phòng thí nghiệm liên quan đến việc thu thập, xử lý và/hoặc quản lý PBMC đều phải đọc và hiểu SOP này trước khi thực hiện những quy trình được mô tả.
- 4.5. HANC PBMC SOP hiện hành phải được tất cả các phòng thí nghiệm sử dụng như đã nêu để lấy PBMC cho các Giao thức xử lý của Mạng lưới.

5. Báo cáo Kết quả

- 5.1. Phải sử dụng Bảng quy trình Xử lý PBMC và Hệ thống Quản lý Dữ liệu Phòng thí nghiệm (LDMS) cho toàn bộ mạng lưới để theo dõi những chi tiết xử lý then chốt, bao gồm thời gian xử lý, phép tính toán và lập hồ sơ những vấn đề nảy sinh trong quá trình xử lý.
- 5.2. Phải sử dụng toàn bộ Bảng quy trình Xử lý PBMC cụ thể theo giao thức xử lý, trừ khi có quy định khác trong Hướng dẫn Phòng thí nghiệm Xử lý Mẫu (SPLI) theo giao thức xử lý, Biểu đồ Xử lý Phòng thí nghiệm (LPC) hoặc Sổ tay Phòng thí nghiệm (LM). Trong những trường hợp (hiếm khi xảy ra) không bắt buộc sử dụng Bảng quy trình PBMC cụ thể theo giao thức xử lý thì có thể sử dụng bảng quy trình gốc trong [Phụ lục A](#) và trên trang web <http://www.hanc.info/labs/labresources/procedures/Pages/pbmcSop.aspx>.
- 5.3. Phải sử dụng LDMS để biết rõ thông tin người tham gia và thông tin xử lý, phát sinh những yếu tố nhận diện duy nhất, dán nhãn ống đông lạnh tế bào, vị trí bảo quản và lập danh sách gửi hàng.

5.4. Những yếu tố chính cần thiết để theo dõi quy trình xử lý PBMC gồm:

Bảng Yếu tố Chính	
Những yếu tố chính để theo dõi quy trình xử lý PBMC gồm	Nơi ghi nhận
Phòng thí nghiệm Xử lý Mẫu	W L
ID Người tham gia	W L
Số buổi Khám	W L
Giao thức xử lý	W L
ID Mẫu Toàn cầu LDMS	Tự động tạo bởi LDMS
Ngày/Giờ Bắt đầu Xử lý	W L
Tên viết tắt của Nhân viên Xử lý (KTV)	W L
Phương pháp Đếm (tên thiết bị hoặc đếm thủ công)	W
Đếm thể tích tái nhũ tương WDR (V)	W
Nồng độ trung bình số tế bào (C)	W
Tổng số tế bào (T) = C x V	W L
Tính toán thể tích tái nhũ tương CPS cuối cùng (V _f)	W
Ngày và Giờ Đông lạnh	W L
Nhận xét và Sai số cho Giao thức xử lý, bao gồm nhưng không giới hạn: <ul style="list-style-type: none"> Các tình trạng mẫu ngoài dự kiến Cục máu đông (số ống nghiệm có cục máu đông, tổng số ống nghiệm từ mẻ PTID và những chi tiết xử lý) Hiệu suất tế bào dưới giới hạn dự kiến Các bất thường khi xử lý Những bước xử lý sự cố đã thực hiện Ghi chú nếu Tổng Thời gian >8 giờ Thời gian Xử lý >4 giờ 	W
Ngày/Giờ Thu thập	W L
Thuốc thử (Nhà sản xuất, Số Lô và Ngày Hết hạn cho DMSO, FBS, WDR, CSTFB, môi trường gradient tỷ trọng)	W
CPS (Thể tích của DMSO và FBS)	W
Loại ống nghiệm mẫu (HEP/ACD/EDTA/Khác)	W L
Tình trạng máu (ví dụ: SAT/HEM/CLT)	W L
Thể tích máu có thể sử dụng đã đo được	W L
Số Tế bào	W
Số tế bào thực tế / ống	W L
Số ống nghiệm đã được đông lạnh	W L
Thông tin bảo quản tủ đông lạnh (Bộ phận Lưu trữ LDMS)	O L
Xác nhận kiểm tra thuốc thử bằng cảm quan (KTV)	O
Hiệu suất tế bào/mL máu toàn phần	W
Thể tích tái nhũ tương CPS ước tính (V ₁)	W
Xác nhận Kiểm tra Chất lượng Nhãn LDMS về hàm lượng/mã vạch (KTV)	W
Xác nhận chuyển giao ống đông lạnh tế bào đến những vị trí hộp bảo quản được chỉ định theo LDMS (KTV)	W
Ngày/giờ ống đông lạnh được chuyển giao từ phòng đông lạnh điều tốc đến hộp bảo quản.	W
Kiểm tra Lần cuối, Người kiểm tra/Ngày	W

W = Phải theo dõi trên Bảng quy trình PBMC

L = Phải nhập/theo dõi trên LDMS

O = Có thể theo dõi trên bảng quy trình hoặc tài liệu theo dõi bổ sung

6. Mẫu

6.1. Máu tươi toàn phần chống đông được thu thập theo các yêu cầu của giao thức xử lý.

6.2. Điều kiện Xử lý

6.2.1. Bảo quản mẫu ở nhiệt độ phòng (15°C-25°C hoặc tối đa đến 30°C, tùy theo điều kiện khí hậu) từ lúc thu thập cho đến lúc giao cho phòng thí nghiệm xử lý.

6.2.2. Nên giao mẫu cho phòng thí nghiệm xử lý sớm nhất có thể (theo phương pháp thực hành tốt nhất thì nên giao trong vòng 30 phút đến 4 giờ kể từ khi lấy mẫu) để phòng thí nghiệm xử lý có đủ thời gian để hoàn tất quy trình bảo quản lạnh. Bệnh viện nên thảo luận các yêu cầu cụ thể với phòng thí nghiệm xử lý trước khi đăng ký giao thức xử lý.

6.2.3. Phòng thí nghiệm nên xử lý các mẫu sớm nhất có thể kể từ lúc nhận (theo phương pháp thực hành tốt nhất thì nên bắt đầu xử lý trong vòng 30 phút kể từ khi nhận mẫu):

- Thời gian Xử lý (thời gian bắt đầu xử lý) là thời gian kể từ lúc ống nghiệm được mở lần đầu hoặc đặt vào máy ly tâm, tùy theo điều kiện nào đến trước.
- Thời gian Đông lạnh được định nghĩa là lúc:
 - Agilent Technologies StrataCooler®, Nalgene® Mr. Frosty™ hoặc Corning® CoolCell® được cho vào tủ đông lạnh ở - 80°C. Xem SPLI/LPC/LM để biết phạm vi nhiệt độ được chấp nhận nhằm tính toán nhiệt độ dao động thông thường trong tủ đông lạnh.
 - Chương trình làm lạnh của tủ đông lạnh điều tốc, như CryoMed® đã khởi động.
Lưu ý: Không được dùng tủ đông lạnh điều tốc cho các mẫu HVTN.
- Tổng Thời gian được tính từ Lúc Lấy Mẫu và Thời gian Đông lạnh; lý tưởng nhất là ≤8 giờ, nhưng nên xử lý tất cả các mẫu bất kể Tổng Thời gian.
- Tổng Thời gian Xử lý được tính gồm Thời gian Xử lý và Thời gian Đông lạnh; tốt nhất là dưới 3 giờ nhưng nên dưới 4 giờ.

6.2.4. Không để máu toàn phần trong tủ lạnh hoặc làm đông lạnh. Không cho máu tiếp xúc trực tiếp với gói lạnh nếu quý vị đang sử dụng máu trong điều kiện rất nóng.

6.3. Các Mẫu Biên tế

6.3.1. Các Mẫu vón cục

6.3.1.1. Nên xử lý tất cả máu bất kể bị vón cục, trừ khi có chỉ dẫn khác trong giao thức xử lý.

6.3.1.2. Bỏ (những) cục máu đông và xử lý như bình thường.

6.3.1.3. Đánh dấu điều kiện là CLT trên bảng quy trình và trong LDMS. Ghi các chi tiết trong mục nhận xét của bảng quy trình xử lý.

6.3.2. Các mẫu tán huyết

6.3.2.1. Sự tán huyết có thể ảnh hưởng đến chất lượng của PBMC.

6.3.2.2. Xử lý như bình thường.

6.3.2.3. Đánh dấu điều kiện là HEM trên bảng quy trình và trong LDMS. Ghi các chi tiết trong mục nhận xét của bảng quy trình xử lý.

6.3.3. Hiệu suất tế bào thấp

6.3.3.1. Nếu hiệu suất tế bào không đủ đạt yêu cầu theo giao thức xử lý thì liên lạc với bệnh viện để lấy mẫu có thể thay thế. Nếu hiệu suất tế bào $\leq 0,4 \times 10^6$ tế bào/mL thì hãy liên lạc với bệnh viện để lấy mẫu có thể thay thế và thông báo cho trung tâm phòng thí nghiệm của mạng lưới (HVTN, HPTN) hoặc nhóm phụ trách giao thức xử lý (ACTG).

6.3.3.2. Nắm rõ các bước xử lý sự cố hoặc xác minh dữ liệu đã dùng trong mục nhận xét của bảng quy trình xử lý.

6.4. Những mẫu Không đạt tiêu chuẩn

- 6.4.1. Những mẫu không dán nhãn hoặc mất nhãn sẽ bị bỏ đi.
- 6.4.2. Tuân theo hướng dẫn của mạng lưới về việc loại bỏ mẫu chậm.
- 6.4.3. Những mẫu bị rò rỉ: Thông báo cho bệnh viện bất kỳ mẫu nào bị rò rỉ và xác định xem các mẫu này có sử dụng được không. Cần chú trọng đến tính vô trùng của mẫu và an toàn của nhân viên phòng thí nghiệm thao tác trên mẫu.

7. Trang thiết bị

7.1. Chuẩn bị & Xử lý

- 7.1.1. Buồng an toàn sinh học Loại II (BSC) mức 2 trở lên
- 7.1.2. Ly tâm, tốc độ thấp (khả năng 200-1000 x g), có rôto quay góc nghiêng tự do, ưu tiên loại có khả năng làm lạnh, có thể hoạt động ở nhiệt độ môi trường. Ống ly tâm phải có nắp/nút.
- 7.1.3. Micropipette, trong dãy 20, 200, 1000 μ L
- 7.1.4. Trọ hút Pipet (ưu tiên loại không dây) để sử dụng cho huyết thanh, dùng một lần
- 7.1.5. Tủ lạnh 2°C-8°C
- 7.1.6. Tủ đông lạnh -20°C (trở xuống) không giải đông tự động (để bảo quản FBS)
- 7.1.7. Tủ đông lạnh -80°C (-65°C đến -95°C cho ACTG, -70°C đến -95°C cho HVTN và HPTN); để bảo quản PBMC ngắn hạn.
- 7.1.8. Nồi cách thủy 37°C đến 56°C (để làm nóng FBS bất hoạt, nếu cần) (Lưu ý cho HVTN: Không bắt buộc cho các giao thức xử lý HVTN; FBS được HVTN phê duyệt được các mạng lưới cung cấp cho các phòng thí nghiệm dưới dạng bất hoạt bằng nhiệt).
- 7.1.9. Chai hoặc cốc đo cho thuốc tẩy hoặc các chất khử trùng khác
- 7.1.10. Giá đựng ống thích hợp để giữ các ống lấy máu, các ống hình nón 15mL và 50mL đứng thẳng trong toàn bộ các bước xử lý và vận chuyển
- 7.1.11. Giá treo ống đông lạnh tế bào cho phép mở/đóng ống bằng một tay trong các bước chia đều mẫu (ưu tiên giá treo ống nhãn hiệu Nunc chuyên dụng)

7.2. Các thiết bị cần LDMS. (Tham khảo trang web LDMS và các yêu cầu cụ thể của mạng lưới để biết chi tiết).

- 7.2.1. Máy tính đạt tiêu chuẩn theo xác định của Frontier Science cho Web LDMS
- 7.2.2. Máy in để in nhãn LDMS
- 7.2.3. Máy quét mã 2D
- 7.2.4. Nhãn tương hợp LN₂ với diện tích in 1x1 inch
- 7.2.5. Băng mực in tương hợp LN₂, chuyên dùng cho máy in, chống ma sát và hóa chất

7.3. Thiết bị Ni-tơ Lỏng (LN₂) (nếu cần theo yêu cầu của mạng lưới)

- 7.3.1. Bồn trữ LN₂ (\leq -140°C)
- 7.3.2. Bình đựng khô được LN₂ IATA phê duyệt

7.4. Đếm Tế bào:

Lưu ý: Các phương pháp đếm có thể cần được mạng lưới phê duyệt. Tuân theo những quy trình định chuẩn của nhà sản xuất hiện hành nếu sử dụng máy đếm tế bào tự động.

- 7.4.1. Máy đếm tế bào tự động có khả năng đếm các tế bào còn sống (Beckman-Coulter Vi-Cell, Muse® hoặc tương đương). HVTN thường không phê duyệt loại máy đếm tế bào này cho các mẫu tươi.

7.4.2. Máy đếm tế bào tự động không có khả năng phân biệt các tế bào còn sống (Coulter Counter, Abbott Cell-Dyn®, Sysmex® hoặc tương đương).

Lưu ý: Có thể sử dụng máy đếm tế bào tự động không có khả năng nhận diện các tế bào còn sống để thu tổng số tế bào mà không cần phân biệt các tế bào còn sống. Tuy nhiên, các mẫu đang được chuẩn bị cho Chương trình Kiểm tra Độ Thành thạo Bảo quản lạnh IQA PBMC (IQA PBMC Cryopreservation Proficiency Testing Program) phải bao gồm cả số tế bào còn sống.

Lưu ý cho HVTN: Nếu chuẩn bị sử dụng máy đếm tế bào tự động cho mục đích lập giao thức xử lý thì mạng lưới ưu tiên loại máy đếm này. Các phương pháp đếm phải được HVTN kiểm tra và phê duyệt trước.

7.4.3. Phòng đếm tế bào thủ công (máy đếm tế bào máu) và kính hiển vi trường ánh sáng.

Lưu ý: Nếu sử dụng phòng đếm tế bào thủ công với xanh trypan thì các tế bào sống phải được liệt kê và sử dụng để đếm tế bào. Nếu sử dụng tím tinh thể thì có thể sử dụng tổng số tế bào để tính toán các tế bào.

7.5. Bảo quản lạnh

Lưu ý: Có thể sử dụng một trong những bộ đông lạnh điều tốc sau (CRFU) theo hướng dẫn của nhà sản xuất; ưu tiên Agilent Technologies StrataCooler® và Corning® CoolCell®.

Lưu ý: Nếu không tuân thủ hướng dẫn của nhà sản xuất thì phải hoàn tất một nghiên cứu chuẩn hóa.

7.5.1. Bộ phận Bảo quản Lạnh Agilent Technologies StrataCooler® – 400005

7.5.1.1. StrataCooler® phải ở từ 2°C-8°C trước khi bắt đầu làm mát những ống đông lạnh này. Không cho ống đông lạnh vào StrataCooler® dưới nhiệt độ khởi động 2°C.

7.5.2. Corning® (trước đây là BioCision®) CoolCell®

7.5.2.1. Bảo đảm tất cả các bộ phận của CoolCell®, bao gồm vòng trung tâm được đưa về nhiệt độ phòng (15°C-25°C hoặc đến 30°C, tùy theo điều kiện khí hậu) giữa các lần sử dụng.

7.5.3. Bình chứa đông lạnh Nalgene® Mr. Frosty™, 1°C/phút

7.5.3.1. Cần bảo quản Mr. Frosty™ ở nhiệt độ phòng (15°C-25°C hoặc đến 30°C, tùy theo điều kiện khí hậu) giữa những lần sử dụng.

7.5.3.2. Hàm lượng isopropanol phải chính xác và phải thay thế hoàn toàn isopropanol sau đợt đông lạnh-giải đông lần thứ năm. Phải có một sổ ghi chép để theo dõi các đợt đông lạnh-giải đông và thay thuốc thử. Xem [Phụ lục B](#).

7.5.4. Tủ đông lạnh điều tốc, như Tủ Đông lạnh CryoMed® (Gordinier). (Lưu ý cho HVTN: Không được dùng tủ đông lạnh điều tốc cho các mẫu HVTN).

8. Vật dụng dùng một lần

8.1. Nhựa

8.1.1. Các pipet huyết thanh, dùng một lần, 1, 5, 10, 25, 50mL, vô trùng

8.1.2. Đầu micropipette, 20, 100, 200, 1000µL, vô trùng

8.1.3. Các ống ly tâm dùng một lần, 15mL và 50mL, vô trùng, đáy hình nón, có vạch chia, bằng polypropylene.

8.1.4. Các ống tách tế bào 50 mL có màng ngăn frit (CSTFB), khô (không mua dưới dạng nạp sẵn môi trường tách tế bào).

8.1.4.1. Bắt buộc để xử lý HVTN. Kiểm tra LPC/SPLI/LM về những yêu cầu cụ thể theo giao thức xử lý cho tất cả các mạng lưới.

8.1.5. Các ống trữ lạnh có ren bên trong, 1,8mL - 2mL, có nắp vặn vòng chữ “O”, vô trùng, chỉ bằng polypropylene, tự đứng, có vạch chia, chống rò, định dạng bảo quản LN₂ pha hơi (khoảng -140°C). Xác nhận khả năng chấp nhận bất kỳ vật thay thế nào cho các ống đông lạnh với (các) mạng lưới trước khi mua ([Xem Phụ lục E](#)).

Lưu ý: Không được sử dụng các ống có nắp bấm. Ngoài ra, không được làm đầy các ống đông lạnh quá mức dung tích đã ghi rõ bởi nhà sản xuất hoặc đến miệng ống.

8.1.6. Tùy chọn: Các chai/bình hình nón vô trùng, dùng một lần, cổ 45mm, 250 - 500 mL để đựng thể tích máu lớn rút trước khi tách PBMC.

8.1.7. Tùy chọn: Các pipet chuyển có bao nhựa riêng, 5mL vô trùng

8.1.8. Tùy chọn: Các ống tách tế bào 50mL nạp sẵn có màng ngăn frit (CSTFB).

Lưu ý cho HVTN: Không dùng cho các nghiên cứu HVTN và yêu cầu các phòng thí nghiệm mua CSTFB “khô” (tức là, không mua dạng đã chứa sẵn); sử dụng CSTFB khác phải được Trung tâm Phòng thí nghiệm HVTN phê duyệt trước).

8.2. Bút lông

Lưu ý: Bút lông để viết trên các ống và lọ xử lý phải có đầu nhọn và chứa mực nhanh khô, không thể xóa.

8.3. Nhãn

Lưu ý: Các nhãn đông lạnh và mực phải thích hợp với nhiệt độ bảo quản pha hơi LN₂ hoặc -80°C.

9. Trang thiết bị Bảo hộ Cá nhân

Lưu ý: Bắt buộc phải sử dụng trang thiết bị bảo hộ cá nhân thích hợp cho các tác nhân gây bệnh trong máu. Tuân thủ hướng dẫn và thực hành phòng thí nghiệm của địa phương về xử lý các sản phẩm máu.

9.1. Áo khoác phòng thí nghiệm

9.2. Bảo vệ mắt

9.3. Găng tay không bột, nitrile hoặc chất tương tự

9.4. Găng chịu lạnh

9.5. Mặt nạ (có nắp bao cầm nếu muốn hoặc bắt buộc theo các quy định an toàn sinh học của địa phương), bắt buộc khi làm việc với LN₂.

10. Các Thuốc thử

10.1. Bắt buộc phải mua những thuốc thử vô trùng và sử dụng kỹ thuật vô trùng.

10.1.1. Bảo quản các chai đã mở ở nhiệt độ theo khuyến cáo của nhà sản xuất cho đến khi hết hạn, được hướng dẫn thải bỏ dưới đây hoặc cho đến khi hết hạn dùng của nhà sản xuất tùy theo điều kiện nào đến trước.

10.1.2. [Xem Phụ lục E](#) cho các sản phẩm khuyến cáo.

10.1.3. Bỏ đi nếu có dấu hiệu nhiễm bẩn, như xuất hiện vẩn đục.

10.2. Các chất Pha loãng Rửa (WDR)

10.2.1. 1X Dung dịch Muối Cân bằng Hanks (HBSS), không có calci và magiê, pha sẵn

10.2.2. 1X Dung dịch Muối Đệm Phosphate (PBS), không có calci và magiê, pha sẵn.

10.3. Môi trường Gradient Tỷ trọng (tỷ trọng 1,077 g/mL)

10.3.1. Môi trường vô trùng pha sẵn để cô lập số lượng lớn lym pho bào người từ máu ngoại biên

10.3.2. [Xem Phụ lục E](#) cho các sản phẩm khuyến cáo

10.4. Ống Tách Tế bào có Màng ngăn Frit (CSTFB, nếu sử dụng). Bắt buộc cho HVTN trừ khi có ghi chú khác về SPLI/LPC/LM cụ thể theo giao thức xử lý.

10.4.1. Hệ thống CSTFB không nạp sẵn (kết hợp CSTFB khô với môi trường gradient tỷ trọng 1,077)

10.4.1.1. Đưa môi trường gradient tỷ trọng (DGM) về nhiệt độ phòng (15°C-25°C hoặc đến 30°C, tùy theo điều kiện khí hậu). Bảo vệ tránh ánh sáng.

10.4.1.2. Làm việc với BSC theo kỹ thuật vô trùng

10.4.1.3. Ghi lại thông tin CSTFB và DGM liên quan trực tiếp từ bao bì hoặc chai sử dụng trên bảng quy trình PBMC. CSTFB chuẩn bị trước phải có nhãn bao gồm tất cả các thông tin bắt buộc, ngày chuẩn bị và tên tắt của người chuẩn bị các ống nghiệm này.

10.4.1.4. Chuẩn bị các ống nghiệm bằng cách dùng pipet hút thể tích DGM thích hợp cho ống nghiệm CSTFB được sử dụng (như được ghi chú dưới đây).

Dung tích ống nghiệm (mL)	Thể tích môi trường gradient tỷ trọng (mL)
50mL	15mL

10.4.1.5. Đậy nắp CSTFB có thêm DGM và ly tâm ở tốc độ 800 x g trong 30 giây (hoặc đặt thời gian ít nhất trên 30 giây) ở nhiệt độ phòng (15°C-25°C hoặc đến 30°C, tùy theo điều kiện khí hậu).

10.4.1.6. DGM phải nằm dưới màng ngăn frit. Kiểm tra các ống xem có khoảng hở hoặc bóng khí lớn giữa lớp DGM và màng ngăn frit hoặc DGM còn lại trên frit hay không.

10.4.1.7. Nếu có những khoảng hở hoặc bóng lớn dưới frit, thì thêm môi trường, ly tâm CSTFB lại ở tốc độ 800-1000 x g trong 30 giây đến 1 phút (chọn cài đặt ly tâm nhỏ nhất) và kiểm tra lại.

10.4.1.8. Nếu có chất lỏng (DGM) trên frit thì ly tâm CSTFB lại ở tốc độ 800-1000 x g trong 30 giây đến 1 phút (chọn cài đặt ly tâm nhỏ nhất). Nếu có bất kỳ dung dịch gradient tỷ trọng nào còn lại trên frit sau khi ly tâm lại thì hãy bỏ đi theo kỹ thuật vô trùng.

10.4.1.9. Tuân theo khuyến cáo bảo quản môi trường gradient tỷ trọng của nhà sản xuất.

10.4.2. CSTFB nạp sẵn (môi trường gradient tỷ trọng 1,077)

Lưu ý: Dung tích ống bắt buộc sẽ tùy thuộc vào thể tích máu toàn phần. Bảo quản trong tủ lạnh (2°C-8°C).

Lưu ý cho HVTN: Không được mua CSTFB dưới dạng nạp sẵn.

- Bảo vệ tránh ánh sáng.
- Nhìn từ bên ngoài thấy có vẩn đục tức là sản phẩm đã bị suy giảm chất lượng. Hãy hủy bỏ nếu thấy dấu hiệu nhiễm bẩn.
- Để CSTFB nạp sẵn về nhiệt độ phòng (15°C-25°C hoặc đến 30°C, tùy theo điều kiện khí hậu) trước khi sử dụng.

10.5. Đông lạnh Thuốc thử

10.5.1. Cần làm bất hoạt bằng nhiệt huyết thanh Bào thai Bò (FBS). (Xem Mục 11.1 FBS Làm bất hoạt bằng nhiệt để biết chi tiết xử lý và quản lý).

Lưu ý cho HVTN và những nghiên cứu chung với HVTN: FBS được HVTN phê duyệt được mạng lưới cung cấp cho các phòng thí nghiệm; không có nơi bán và nhiều FBS được HVTN phê duyệt không có để mua ngoài chuỗi/quy trình cung ứng HVTN.

- 10.5.1.1. Tham vấn (các) mạng lưới hiện hành để biết những nơi bán ưu tiên.
- 10.5.1.2. Nhận phiếu kiểm nghiệm từ nơi bán để lưu hồ sơ kiểm soát chất lượng của phòng thí nghiệm địa phương.
Lưu ý: Có thể phải có bản phiếu kiểm nghiệm FBS để xuất khẩu (hoặc nhập khẩu) mẫu phân tích PBMC giữa các quốc gia.
- 10.5.1.3. Có thể sử dụng FBS được đông lạnh để bảo quản ($\leq -20^{\circ}\text{C}$ /theo khuyến cáo của nhà sản xuất) cho đến ngày hết hạn của nhà sản xuất.
- 10.5.1.4. FBS được giải đông và bảo quản ở 2°C - 8°C sẽ ổn định trong 1 tháng.
- 10.5.2. Dimethylsulfoxide (DMSO), độ nuôi cấy tế bào
 - 10.5.2.1. Sử dụng DMSO độ nuôi cấy tế bào.
 - 10.5.2.2. Bảo quản chai chưa mở ở nhiệt độ phòng (15°C - 25°C hoặc đến 30°C , tùy theo điều kiện khí hậu). Kiểm tra hạn dùng trên chai và bỏ đi nếu đã hết hạn.
 - 10.5.2.3. DMSO sau khi mở, chưa pha loãng, trong điều kiện không tiếp xúc với ánh sáng và độ ẩm, sẽ ổn định ở nhiệt độ phòng (15°C - 25°C hoặc đến 30°C , tùy theo điều kiện khí hậu) trong 6 tháng (hoặc đến hạn dùng của nhà sản xuất nếu hạn dùng này là < 6 tháng kể từ ngày mở). Chỉnh sửa nhãn trên chai để nêu rõ hạn dùng mới.
 - 10.5.2.4. Sử dụng kỹ thuật vô trùng khi lấy DMSO từ chai ra để tránh bị nhiễm bẩn.
 - 10.5.2.5. Bỏ chất trong chai đã mở nếu thấy dấu hiệu bị nhiễm bẩn.
 - 10.5.2.6. Có thể chia đều thuốc thử thành những lượng nhỏ để giúp duy trì trạng thái vô trùng. Dán nhãn những lượng chia đều này bằng “DMSO”, tên nhà sản xuất, số lọ, ngày mở/chia nhỏ, hạn dùng (6 tháng kể từ lúc mở hoặc ngày hết hạn từ chai gốc, tùy theo thời hạn nào đến trước) và tên viết tắt của kỹ thuật viên. Tránh để các lượng chia đều tiếp xúc với ánh sáng.
- 10.5.3. Chất diệt trùng
 - 10.5.3.1. Chất diệt trùng ethanol 70% v/v, chai xịt
 - 10.5.3.2. Thuốc tẩy 10% v/v, xô hoặc cốc có mở và chai xịt (phải làm mỗi ngày)
 - 10.5.3.3. Chất diệt trùng khác như được ghi rõ trong chính sách về phòng thí nghiệm địa phương
- 10.6. Các Thuốc thử Đếm Tế bào
Lưu ý: Yêu cầu cho thuốc thử đếm tế bào sẽ khác nhau tùy theo phương pháp được sử dụng. Tham khảo SOP/hướng dẫn sử dụng được mạng lưới phê duyệt để biết phương pháp đang được sử dụng. Không được sử dụng acid acetic băng để đếm thử công HVTN.
 - 10.6.1. Dung dịch xanh Trypan 0,4%
 - 10.6.2. Tùy chọn: Có thể sử dụng dung dịch tím tinh thể 0,05% để nhuộm nhân tế bào nhằm nhận diện các tế bào đơn nhân và đếm bằng cách dùng máy đếm tế bào. Nếu cần đếm tế bào còn sống thì hãy đếm bằng cách thủ công lần 2 bằng cách dùng xanh trypan. Dung dịch Tím Tinh thể 0,05% chứa: 0,05 g tím tinh thể, 2mL acid acetic băng, 98mL nước cất hoặc nước khử ion (H_2O).

11. Chuẩn bị Thuốc thử

11.1. FBS làm Bất hoạt bằng Nhiệt (HI-FBS)

Lưu ý: HI-FBS có thể được đặt hàng từ nhà sản xuất hoặc FBS có thể được đặt hàng từ nhà sản xuất và làm bất hoạt bằng nhiệt tại phòng thí nghiệm. Tuân theo những hướng dẫn này để giải đông, chia nhỏ và sử dụng.

Lưu ý cho HVTN: FBS được HVTN phê duyệt được mạng lưới cung cấp cho các phòng thí nghiệm ở dạng được bất hoạt bằng nhiệt; không có nơi bán và nhiều FBS được HVTN phê duyệt để mua ngoài chuỗi/quy trình cung ứng HVTN.

11.1.1. Lấy FBS ra khỏi tủ đông lạnh.

11.1.2. Ưu tiên giải đông trong tủ lạnh (2°C-8°C) hoặc trong vài giờ ở nhiệt độ phòng (15°C-25°C hoặc đến 30°C, tùy theo điều kiện khí hậu). Không để FBS ở nhiệt độ phòng lâu hơn mức cần thiết để hoàn tất quá trình giải đông.

11.1.3. Lắc nhẹ 2 hoặc 3 lần trong lúc giải đông.

11.1.4. Tuân theo những hướng dẫn bổ sung này trong trường hợp FBS không được bất hoạt bằng nhiệt. Nếu FBS được nhà sản xuất bất hoạt bằng nhiệt thì chuyển tới mục 11.1.5.

11.1.4.1. Cho FBS vào nồi cách thủy 56°C (55°C đến 57°C). Giám sát kỹ nhiệt độ nồi cách thủy. Nhiệt độ cao hơn có thể làm phân hủy các thành phần của FBS.

Lưu ý: Cần để mực nước trong nồi cách thủy đến mực FBS trong chai, nhưng không chạm nắp của chai. Việc này giúp bảo đảm nóng đều FBS và tránh bị nhiễm bẩn.

11.1.4.2. Sau khi nồi cách thủy trở về 56°C (55°C-57°C) thì đun nóng FBS trong 30 phút, khuấy trộn 5-10 phút một lần. Đun nóng lâu hơn mức này có thể làm phân hủy các thành phần của FBS.

Lưu ý: Lau sạch chai bằng ethanol 70% v/v trước khi mở.

11.1.5. Trộn HI-FBS nhẹ nhàng và đều bằng kỹ thuật vô trùng.

11.1.6. Chia đều vào các ống ly tâm bằng polypropylene, có vạch chia, đáy hình nón, vô trùng, 50mL, có dán nhãn hoặc các dụng cụ chia đều khác có kích thước phù hợp với khối lượng công việc dự kiến.

Lưu ý: Nhãn phải ghi rõ những ống này là “HI-FBS” và bao gồm tên nhà sản xuất, số lô, ngày chia, điều kiện bảo quản, ngày hết hạn của nhà sản xuất gốc và tên viết tắt của kỹ thuật viên. FBS ổn định trong 1 tháng (nếu thời gian 1 tháng không vượt quá ngày hết hạn gốc của nhà sản xuất) ở 2°C-8°C hoặc cho đến hạn dùng của nhà sản xuất gốc nếu giữ ở nhiệt độ -20°C. Nhớ cập nhật hạn dùng và điều kiện bảo quản ở các phần chia nhỏ/chai lấy từ tủ bảo quản -20°C để sử dụng.

11.1.7. Cho số ống chia nhỏ cần cho công việc dự kiến vào tủ lạnh (2°C-8°C). Trộn kỹ trước khi dùng. Nên giữ đông lạnh và ổn định các ống chia nhỏ chưa cần dùng ngay cho đến hạn dùng gốc.

Lưu ý: Các đợt làm đông/giải đông lặp lại sẽ ảnh hưởng bất lợi đến chất lượng của FBS. Không làm đông lạnh lại những phần chia nhỏ đã bảo quản ở nhiệt độ tủ lạnh.

11.1.7.1. Để sử dụng những phần chia nhỏ, ưu tiên giải đông qua đêm trước trong tủ lạnh hoặc ở nhiệt độ phòng (15°C-25°C hoặc đến 30°C, tùy theo điều kiện khí hậu) trong vài giờ. Không để FBS ở nhiệt độ phòng lâu hơn mức cần thiết để hoàn tất quá trình giải đông.

11.1.7.2. Sau khi giải đông, FBS sẽ ổn định trong 1 tháng ở 2°C-8°C hoặc theo hạn dùng trên chai gốc, tùy theo thời hạn nào đến trước. Nhớ cập nhật hạn dùng và điều kiện bảo quản trên những phần chia nhỏ/chai trong tủ bảo quản -20°C để sử dụng. Trộn kỹ trước khi dùng.

11.2. Dung dịch Bảo quản lạnh Tươi (CPS)

11.2.1. Các Thành phần CPS

Các thành phần	Phần trăm (v/v)
DMSO	10%
FBS (bất hoạt bằng nhiệt)	90%

11.2.2. Chuẩn bị CPS

11.2.2.1. Sử dụng (các) ống ly tâm hình nón, 15ml hoặc 50mL, dùng một lần, có dán nhãn, vô trùng để giữ CPS đã chuẩn bị.

Lưu ý: Việc trộn DMSO và FBS là một phản ứng tỏa nhiệt.

11.2.2.2. CPS phải được chuẩn bị trước và làm lạnh trong tủ lạnh (2°C-8°C) trong ít nhất 30 phút hoặc trong một nồi đá lạnh trong ít nhất 15 phút trước khi dùng.

Lưu ý: Có thể bảo quản CPS ở (2°C-8°C) trong 1 ngày làm việc (<18 tiếng).

11.2.3. Sử dụng công thức dưới đây để ước tính thể tích của CPS cần chuẩn bị để tái nhũ tương PBMC cuối cùng. Tài liệu này cũng có trình bày các ví dụ.

$$\text{Máu Toàn phần Khả dụng (mL)} \times \text{Hiệu suất Tế bào (tế bào/mL)} \times \text{Nồng độ Đông lạnh (mL/tế bào)} = \text{CPS Ước tính (mL)}$$

Làm tròn số này đến số nguyên mL gần nhất.

Lưu ý: Thể tích máu toàn phần khả dụng (UWBV) là tổng thể tích máu được xử lý. (Thể tích máu toàn phần khả dụng có thể không bằng dung tích ống).

Lưu ý: Khi xử lý máu được thu thập trong các ống ACD, thì hãy bao gồm cả dung tích rút và chất chống đông máu lỏng khi tính thể tích, các số đo tối đa và tính toán hiệu suất tế bào.

- Ví dụ: một ống ACD 8,5mL chứa 1,5mL chất chống đông máu và sẽ rút một thể tích máu tối đa 8,5mL. Khi ước tính và đo các ống ACD thì dung tích tối đa sẽ là 10mL/8,5mL ống rút (8,5mL máu + 1,5mL chất chống đông máu lỏng =10mL).

Lưu ý: Phải tính các lô CPS trước khi lấy thể tích máu khả dụng đo được. Để làm việc này, hãy thực hiện các phép tính toán ở trên bằng cách sử dụng thể tích máu toàn phần khả dụng dự kiến tối đa (tức là dung tích của ống thu, bao gồm cả chất chống đông máu, nhân với số ống dự kiến thu thập ở buổi khám). Khi chuẩn bị CPS, phòng thí nghiệm nên cân nhắc hiệu suất trung bình đạt được với nhóm người tham gia phòng thí nghiệm đó. Bắt đầu bằng hiệu suất tế bào trung bình $1,5 \times 10^6$ tế bào/1,0mL cho tính toán đầu tiên. Giám sát việc sử dụng CPS hàng ngày để tối đa hóa hiệu quả và giảm thiểu chất thừa.

- Ví dụ: nếu thường phải bỏ đi một lượng lớn CPS lúc cuối ngày, thì hãy điều chỉnh hiệu suất tế bào xuống để thể hiện nhóm người tham gia chính xác hơn nữa. Nếu phép tính toán cho ra thể tích CPS không đủ, tức là phải làm ra nhiều lô, làm tăng hiệu suất tế bào trong phép tính toán này hoặc cân nhắc gia tăng thể tích cuối cùng bằng tỷ lệ phần trăm cố định như là 20%.

Ví dụ: Máu Người trưởng thành – Lô CPS mỗi ngày – nhiều buổi khám được lên lịch:

- Cô đặc bằng Kết đông Mục tiêu (mL/tế bào) cho tất cả là (1,0mL/15 x 10⁶ tế bào) hoặc 15 triệu tế bào được đông lạnh trong 1mL (V2) của CPS.
- Tính toán tổng thể tích dự kiến:

Lưu ý: Nhớ bao gồm chất chống đông máu lỏng khi tính tổng thể tích dự kiến từ các ống ACD. Các ống NaHep và EDTA không có chất chống đông máu lỏng nên thể tích ống được ghi theo tiêu chuẩn yêu cầu của phòng thí nghiệm là thể tích tối đa có thể.

- Buổi khám lên lịch đầu tiên bao gồm 18 x 8,5mL ống ACD để xử lý PBMC
- Buổi khám lên lịch thứ hai bao gồm 8 x 8,5mL ống ACD để xử lý PBMC

- Buổi khám lên lịch thứ ba bao gồm 8 x 10mL ống NaHep để xử lý PBMC
- Tổng các ống dự kiến (18+8+8) = 34, 34 ống x 10mL = 340mL thể tích dự kiến tối đa

Máu Toàn phần Khả dụng x	Hiệu suất Tế bào x	Cô đặc bằng Kết đông =	CPS Ước tính để Pha chế
(340mL) x	(1,5 x 10 ⁶ tế bào/1mL) x	(1,0mL/15 x 10 ⁶ tế bào) =	34,0mL

Ví dụ: Máu Người trưởng thành – Thu thập Thể tích Máu Lớn. Cô đặc bằng Kết đông Mục tiêu (mL/tế bào) cho tất cả là (1mL/15 x 10⁶ tế bào) hoặc 15 triệu tế bào được đông lạnh trong 1mL (V2) của CPS. Lô CPS tạo ra sau khi đo UWBV.

Máu Toàn phần Khả dụng x	Hiệu suất Tế bào x	Cô đặc bằng Kết đông =	CPS Ước tính để Pha chế
(135mL) x	(1,5 x 10 ⁶ tế bào/1mL) x	(1,0mL/15 x 10 ⁶ tế bào) =	14,0mL

Ví dụ: Máu Người trưởng thành – Thu thập Máu 8 x 10mL NaHep. Cô đặc bằng Kết đông Mục tiêu (mL/tế bào) cho tất cả là (1mL/10 x 10⁶ tế bào) hoặc 10 triệu tế bào được đông lạnh trong 1mL (V2) của CPS. Lô CPS tạo ra sau khi đo UWBV.

Máu Toàn phần Khả dụng x	Hiệu suất Tế bào x	Cô đặc bằng Kết đông =	CPS Ước tính để Pha chế
(80mL) x	(1,5 x 10 ⁶ tế bào/1mL) x	(1,0mL/10 x 10 ⁶ tế bào) =	12,0mL

11.2.4. Sử dụng công thức sau để tính toán lượng DMSO và FBS cần dùng.

$$CPS = 1 \text{ phần DMSO} + 9 \text{ phần FBS}$$

Ví dụ:

Thể tích CPS Ước tính	Thể tích DMSO = (.1)(Thể tích CPS)	Thể tích HI-FBS = Thể tích CPS – Thể tích DMSO	Tổng Thể tích CPS = Thể tích DMSO + Thể tích FBS
10,0mL	1,0mL	9,0mL	10,0mL
5,0mL	0,5mL	4,5mL	5,0mL

11.2.5. Ghi lại các thể tích CPS, DMSO và FBS trên bảng quy trình PBMC. Nếu tạo ra các lô chung thì phải ghi lại thời gian tạo và tên viết tắt của người tạo ra lô này.

12. Giới thiệu và Hướng dẫn Xử lý PBMC

Có nguyên tắc và các bước tiêu chuẩn chung cho tất cả quy trình xử lý PBMC. Việc chọn kỹ thuật tách (CSTFB so với xếp lớp thủ công), việc xử lý máu (pha loãng có hoặc không có thay thế huyết tương so với lấy huyết tương trực tiếp), nồng độ tế bào cuối cùng và đông lạnh/bảo quản khác nhau có thể cho ra các kết quả khác nhau. Chọn các mục thủ thuật thích hợp để tách tế bào và xử lý máu, đông lạnh và bảo quản dựa trên các yêu cầu của giao thức xử lý và mạng lưới.

13. Tách Tế bào và Pha loãng Máu bằng Ống tách Tế bào có Màng ngăn Frit (CSTFB) có Thay thế Huyết tương

Mục 13 có thể được sử dụng cho toàn mạng lưới; kiểm tra các yêu cầu về giao thức xử lý và vật liệu sẵn có. Sử dụng Mục 13 hoặc Mục 14 cho tất cả các mẫu, nhưng không dùng cả hai.

- 13.1. Tách lym pho bào từ máu ngoại biên sử dụng các ống tách CSTFB ở nhiệt độ phòng (15°C-25°C hoặc đến 30°C, tùy theo điều kiện khí hậu) có thêm môi trường gradient tỷ trọng (DGM).
- 13.1.1. Thực hiện tất cả các thao tác hút và trộn trong buồng an toàn sinh học (BSC) Loại II mức 2 trở lên.
- 13.1.2. Xịt tất cả các bề mặt, giá treo và chai thuốc thử bằng ethanol 70% v/v hoặc chất khử trùng tương đương mỗi lần trước khi vào phòng và sử dụng BSC.
- 13.1.3. Phải tiến hành thủ thuật này ở nhiệt độ phòng (15°C-25°C hoặc đến 30°C, tùy theo điều kiện khí hậu), trừ khi có quy định khác.
- 13.1.4. Sử dụng một pipet mới cho mỗi số nhận diện người tham gia (PTID) và cộng thêm.
- 13.2. Chuẩn bị mẫu máu toàn phần, thuốc thử và tiếp liệu.
- 13.2.1. Chuẩn bị và làm lạnh CPS (xem Mục 11 Chuẩn bị Thuốc thử) trước khi xử lý hoặc trước lúc trộn PBMC nếu cần thêm CPS.
Lưu ý: Phải chuẩn bị các lô CPS trước khi bắt đầu các bước xử lý mẫu. Phải kiểm tra thể tích lô và tạo các lô bổ sung (khi cần), theo toàn bộ chi tiết trong bảng quy trình PBMC.
- 13.2.2. Chuẩn bị đủ các ống CSTFB để quản lý lượng tối đa máu dự kiến.
- 13.2.2.1. Đối với các ống CSTFB 50mL, lập kế hoạch cho thể tích tối đa 20mL hoặc cho một CSTFB với mỗi 2 ống đựng máu 8,5-10mL. Lưu ý: Chia tổng số ống đựng máu 8,5-10mL cần dùng cho 2. Nếu kết quả là một phân số, (một số lẻ ống đựng máu), thì hãy làm tròn đến số nguyên gần nhất (tức là thêm 1 ống CSTFB).
- 13.2.2.2. Ví dụ:
- Buổi khám 1 có 3 x 10,0mL ống NaHep. Chuẩn bị 2 ống CSTFB.
 - Buổi khám 10 có 10 x 8,5mL ống ACD. Chuẩn bị 5 ống CSTFB
- 13.2.3. Bảo đảm các ống CSTFB đã chuẩn bị chứa DGM ở nhiệt độ phòng (15°C-25°C hoặc đến 30°C, tùy theo điều kiện khí hậu) trước khi bắt đầu các bước xử lý.
- 13.2.4. Kiểm tra bằng mắt những ống CSTFB đã đổ đầy để xác nhận không có bong bóng lớn, khoảng hở tồn tại giữa DGM và màng ngăn frit và không có DGM trên frit trước khi thêm WDR hoặc máu vào những ống này. (Xem hướng dẫn chuẩn bị CSTFB trong mục 10.4 để biết hướng dẫn về việc quản lý những vấn đề về thể tích DGM khi nhận thấy).
- 13.2.5. Thu thập cùng một số ống ly tâm mới bằng polypropylene, có vạch chia, đáy hình nón, vô trùng, 50mL khi chuẩn bị CSTFB (xem Mục 13.2.2). Những ống “rửa” này sẽ được sử dụng cho các tế bào đã lấy và các bước rửa sau đó.
- | Kích cỡ CSTFB (mL) | Kích cỡ Ống Ly tâm Hình nón (mL) |
|--------------------|----------------------------------|
| 50 | 50 |
- 13.2.6. Nếu cần thay huyết tương, thì hãy thu thập các ống ly tâm bằng polypropylene, có vạch chia, đáy hình nón, vô trùng, 15mL hoặc 50mL thích hợp với thể tích huyết tương cần lấy. Dán nhãn PTID, chất chống đông máu và dẫn xuất.

- 13.2.7. Nếu sờ vào ống chứa mẫu này mà thấy lạnh (do những điều kiện môi trường lạnh như vận chuyển trong những tháng lạnh) thì hãy để những ống này về nhiệt độ phòng (15°C-25°C hoặc đến 30°C, tùy theo điều kiện khí hậu) trước khi bắt đầu xử lý
- 13.2.8. Kiểm tra cẩn thận PTID trên tất cả các ống máu đã nhận. Sắp xếp các ống chính để không có khả năng xảy ra tình trạng trộn lẫn các ống giữa PTID/PID hoặc những chất chống đông máu.
Đề xuất: Đặt tất cả các ống cho từng PTID/chất chống đông máu vào một giá treo. Có thể sử dụng các giá đựng ống khác nhau để tách riêng các PTID hoặc các loại ống và sử dụng bút lông khác màu cho từng PTID để tránh nhầm lẫn.

13.3. Thay thế Huyết tương

Lưu ý: Chỉ thực hiện bước thay huyết tương này khi bắt buộc phải chia nhỏ các phần huyết tương từ các ống thu thập PBMC theo giao thức xử lý hoặc SPLI/LPC/LM; tiến hành bước 13.4 nếu không bắt buộc phải chia nhỏ các phần huyết tương.

- 13.3.1. Các ống lấy máu từ cùng một PTID và cùng một chất chống đông máu phải được xử lý riêng (không được gộp chung trong các ống ly tâm hình nón 50mL) trừ khi được nêu trong SPLI/LPC/LM cụ thể theo giao thức xử lý.
- 13.3.2. Đánh dấu thể tích máu toàn phần trên mỗi ống lấy máu ở mặt khum.
- 13.3.3. Ly tâm máu toàn phần ở 200-400 x g trong 10 phút. Ghi lại thời gian bắt đầu xử lý trên bảng quy trình xử lý PBMC.
- 13.3.4. Chuyển huyết tương vào ống ly tâm hình nón 15mL hoặc 50mL có dán nhãn cho ly tâm lần thứ hai để loại bỏ cặn tế bào.
- 13.3.5. Thêm một lượng WDR đủ để máu trở về thể tích máu toàn phần ban đầu, khuấy nhẹ và tiếp tục xử lý PBMC ở bước 13.4.
- 13.3.6. Hoàn tất xử lý huyết tương bằng cách ly tâm huyết tương đã thu thập ở 800-1200 x g trong 10 phút để thu các phần chia nhỏ PL2 hoặc theo giao thức xử lý hoặc SPLI/LPC/LM. Có thể thực hiện bước này sau nếu máy ly tâm không sử dụng để xử lý PBMC.
- 13.3.7. Chia nhỏ huyết tương đã ly tâm hai lần vào các ống chia nhỏ có dán nhãn như đã ghi rõ bởi SPLI/LPC/LM cụ thể theo giao thức xử lý và loại bỏ cặn tế bào còn lại.

13.4. Pha loãng Máu để tách CSTFB

Lưu ý: Tỷ lệ tối đa của máu trên WDR phải là khoảng 2:1. Sử dụng một ống 50mL cho mỗi 12-20mL máu toàn phần. Sử dụng nhiều ống CSTFB như yêu cầu để phân phối toàn bộ máu cho từng PID/PTID.

Lưu ý: Môi trường gradient tỷ trọng là môi trường độc với tế bào; hãy làm việc nhanh và hiệu quả trong các bước phân tách này.

- 13.4.1. Dán nhãn từng CSTFB và các ống "rửa" ly tâm hình nón, vô trùng tương ứng bằng PTID (và chất chống đông máu, nếu thích hợp)
- 13.4.2. Sử dụng pipet huyết thanh vô trùng, thêm WDR vào từng CSTFB đã chuẩn bị, dán nhãn:

Kích cỡ CSTFB (mL)	Thể tích Gần đúng của WDR (mL)
50	5

- 13.4.3. Sử dụng pipet huyết thanh vô trùng, thêm WDR vào từng ống "rửa" ly tâm hình nón, vô trùng, đã dán nhãn:

Kích cỡ CSTFB (mL)	Kích cỡ Ống Ly tâm Hình nón (mL)	Thể tích Nạp trước WDR (mL)
50	50	25

- 13.4.4. Mở nắp các ống máu đã chống đông. Nếu không bắt buộc/tiến hành các bước thay thế huyết tương thì ghi lại thời gian tháo nắp là thời gian bắt đầu xử lý trên bảng quy trình xử lý PBMC.
- 13.4.5. Nếu máu trong ống lấy máu bị vón cục hoặc tán huyết rõ ràng thì xem Mục 6.3.
- 13.4.6. Sử dụng pipet huyết thanh vô trùng để trộn nhẹ nhàng máu toàn phần rồi chuyển máu này vào CSTFB đã dán nhãn.

Lưu ý: Phải chuyển máu bằng cách sử dụng pipet huyết thanh vô trùng, với liều lượng được đo là 10mL cho đến khi còn ít hơn 10mL. Phân phối máu này vào các ống CSTFB với liều lượng cố định để bảo đảm theo dõi chính xác các thể tích để đo UWBV suốt thời gian phân phối máu toàn phần.

- 13.4.7. Mục tiêu chuyển 15mL–20mL tổng lượng máu vào từng CSTFB đã dán nhãn. (Chỉ được phép sử dụng phạm vi mở rộng sau đây trong trường hợp không thể dùng phạm vi mục tiêu cụ thể). Không bắt đầu đổ một CSTFB 50mL mới trừ khi sẵn có/còn lại tối thiểu 12mL máu.

Kích cỡ CSTFB (mL)	Thể tích Máu Gần đúng (mL)*
50	15-20 (chấp nhận 12 - 22 trong những trường hợp cụ thể)

*Các thể tích máu nhỏ hơn, nhất là khi có hematocrit thấp, có thể làm lớp trung gian hạ xuống tới/trên mức frit, gây khó khăn khi lấy. Các thể tích máu lớn hơn có thể góp phần làm tăng đáy/cặn trong các mẫu. Tham khảo hướng dẫn cụ thể theo giao thức xử lý cho các thể tích máu nhỏ hơn.

- 13.4.8. Xác định và ghi lại số đo chính xác của thể tích máu toàn phần khả dụng trong vòng 0,1mL.

Lưu ý: thể tích máu toàn phần khả dụng không nhất thiết phải bằng kích thước ống.

- 13.4.9. Sử dụng pipet vô trùng, rửa sạch từng ống máu có chất chống đông gốc bằng WDR và thêm lượng chất rửa vào CSTFB để bảo đảm không vượt quá giới hạn tổng thể tích ống (WDR + Máu Toàn phần).

Kích cỡ CSTFB (mL)	Giới hạn Tổng Thể tích Ống (WDR + Máu Toàn phần) (mL)
50	30

- 13.4.10. Đậy kín nắp CSTFB.

13.5. Ly tâm tỷ trọng và thu thập CSTFB

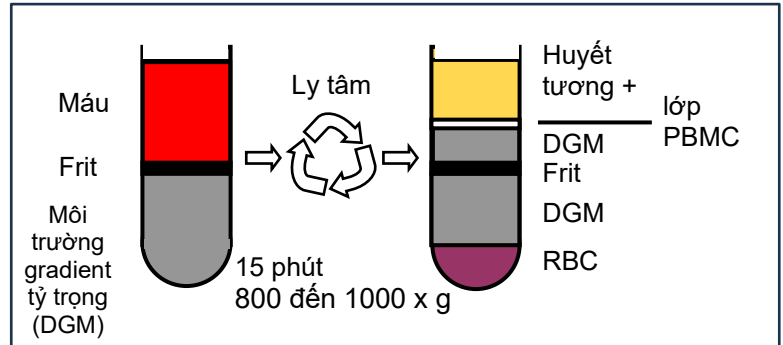
- 13.5.1. Giữ các ống ở tư thế thẳng đứng, cho vào giá đỡ rồi chuyển vào máy ly tâm.
- 13.5.2. Ly tâm với tốc độ 800-1000 x g trong 15 phút ở 15°C-25°C (hoặc đến 30°C, tùy theo điều kiện khí hậu) với cài đặt **KHÔNG HĂM**/đặt về 0.

Lưu ý: Nếu chốt hãm bị mở thì sẽ làm vỡ các lớp.

- 13.5.3. Trong khi các ống CSTFB đang quay, hãy thả bỏ tất cả các ống thu rỗng theo thực hành phòng thí nghiệm, lau chùi sạch bề mặt BSC và sắp xếp cho các bước tiếp theo.
- 13.5.4. Xác nhận đúng số các ống ly tâm hình nón, vô trùng, dán nhãn, nắp sẵn WDR (các ống “rửa”) sẵn sàng trong BSC cho các bước lấy/rửa.
- 13.5.5. Sau khi máy ly tâm ngừng hoàn toàn, hãy tháo nhẹ nhàng từng CSTFB khỏi máy ly tâm và không làm xáo trộn các lớp. Sử dụng giá treo để đỡ các ống và chuyển cẩn thận vào BSC.

13.5.6. Ly tâm dẫn đến hàm lượng trong ống được chia thành 6 lớp rõ ràng, kể cả frit. Tính từ trên đầu ống, những lớp này là:

- Huyết tương + WDR
- Lớp PBMC
- Môi trường gradient tỷ trọng (DGM)
- Frit
- Môi trường gradient tỷ trọng (DGM)
- Tế bào hồng cầu (RBC) và bạch cầu hạt kết tụ



13.5.7. Kiểm tra các ống tìm các vấn đề tiềm ẩn sau đây. Ghi lại những quan sát và hoạt động theo dõi đã thực hiện theo yêu cầu của mạng lưới và phòng thí nghiệm.

- Sự Tán huyết trong lớp Huyết tương + WDR
- Những cục máu đông thấy được trên frit sau khi ly tâm.
- Lớp PBMC kém do lỗi trong quá trình ly tâm như thời gian tốc độ hoặc hãm. Lớp PBMC sẽ biểu hiện ít và không rõ trong khi lớp Huyết tương + WDR có thể hơi vẩn đục. Tham khảo [Phụ lục C](#) để xử lý sự cố.
- Lớp PBMC tạo ra trên frit do số lượng RBC hoặc thể tích hematocrit thấp.
- Lớp RBC ngay bên dưới và chạm vào lớp PBMC.

13.5.8. Sử dụng một pipet huyết thanh vô trùng mới cho mỗi PTID, bỏ đi phần huyết tương-WDR phía trên màu vàng xuống 1-2 cm bằng PBMC màu trắng đục nằm tiếp giáp giữa phần huyết tương-WDR (màu vàng) và dung dịch môi trường tách trong suốt. Cần thận không làm xáo trộn lớp tế bào trong quy trình này. Bỏ phần huyết tương-WDR theo quy định của phòng thí nghiệm.
Lưu ý: Cách khác nữa là, băng PBMC màu trắng đục được bỏ đi bằng cách đưa cẩn thận pipet xuyên qua lớp huyết tương-WDR phía trên.

13.5.9. Sử dụng một pipet huyết thanh vô trùng, lấy tất cả các tế bào ở phần tiếp giáp màu trắng đục trên frit. Cần thận không hút môi trường gradient tỷ trọng nhiều hơn cần thiết.

13.5.9.1. Chuyển các tế bào đã lấy từ một CSTFB vào một ống “rửa” ly tâm hình nón, vô trùng, dán nhãn trước tương ứng (chuẩn bị như nội dung trong Mục 13.4). Các ống được nạp WDR trước là để tiết kiệm thời gian.

13.5.10. Đậy nắp CSTFB chứa tế bào hồng cầu và môi trường tách còn lại. Thái bỏ CSTFB giống như rác nguy hiểm sinh học theo quy định của phòng thí nghiệm.

13.6. Bảo đảm phải ghi lại tất cả những yếu tố chính theo yêu cầu của mạng lưới và phòng thí nghiệm. Chuyển qua Mục 15.

14. Tách Tế bào bằng cách Xếp trên hoặc Xếp dưới (Thủ công) Môi trường Gradient Tỷ trọng và Pha loãng Máu bằng cách Tách Tế bào (Thủ công) Gradient Tỷ trọng có Thay thế Huyết tương

Mục 14 có thể được sử dụng cho toàn mạng lưới; kiểm tra các yêu cầu về giao thức xử lý và vật liệu sẵn có. Sử dụng Mục 13 hoặc Mục 14 cho tất cả các mẫu, nhưng không dùng cả hai.

Lưu ý cho HVTN: HVTN không khuyến cáo sử dụng phương pháp xếp dưới. Phương pháp xếp dưới phải được phê duyệt trước từ Phòng thí nghiệm Trung tâm HVTN trước khi sử dụng cho các mẫu theo giao thức xử lý.

14.1. Tách lym pho bào từ máu ngoại biên sử dụng Phương pháp Xếp trên (Thủ công) Môi trường Gradient Tỷ trọng

- 14.1.1. Thực hiện tất cả các thao tác hút và trộn trong buồng an toàn sinh học (BSC) Loại II mức 2 trở lên.
- 14.1.2. Xịt trên tất cả bề mặt, giá treo và chai thuốc thử bằng ethanol 70% v/v mỗi lần trước khi vào phòng và sử dụng BSC.
- 14.1.3. Trừ khi có quy định khác, quy trình này được tiến hành ở nhiệt độ phòng (15°C-25°C hoặc đến 30°C, tùy theo điều kiện khí hậu).
- 14.1.4. Sử dụng một pipet mới cho mỗi số nhận diện người tham gia (PTID) và cộng thêm.

14.2. Chuẩn bị mẫu máu toàn phần, thuốc thử và tiếp liệu

- 14.2.1. Chuẩn bị và làm lạnh CPS (xem Mục 11 Chuẩn bị Thuốc thử) trước khi xử lý hoặc trước lúc trộn PBMC nếu cần thêm CPS.
Lưu ý: Phải chuẩn bị các lô CPS trước khi bắt đầu các bước xử lý mẫu. Phải kiểm tra thể tích lô và tạo các lô bổ sung (khi cần), theo toàn bộ chi tiết trong bảng quy trình PBMC.
- 14.2.2. Để môi trường gradient tỷ trọng về nhiệt độ phòng (15°C-25°C hoặc đến 30°C, tùy theo điều kiện khí hậu). Xem Mục 10 Các thuốc thử để biết thêm thông tin.
- 14.2.3. Thu thập đủ các ống ly tâm bằng polypropylene, có vạch chia, đáy hình nón, vô trùng, 50mL để quản lý tất cả các bước pha loãng, xếp trên/xếp dưới và rửa.
- 14.2.4. Nếu cần thay huyết tương, thì hãy thu thập các ống ly tâm bằng polypropylene, có vạch chia, đáy hình nón, vô trùng, 15mL hoặc 50mL thích hợp với thể tích huyết tương cần lấy. Dán nhãn PTID, chất chống đông máu và dẫn xuất.
- 14.2.5. Nếu sờ vào ống chứa mẫu này mà thấy lạnh (do những điều kiện môi trường lạnh như vận chuyển trong những tháng lạnh) thì hãy để những ống này về nhiệt độ phòng (15°C-25°C hoặc đến 30°C, tùy theo điều kiện khí hậu) trước khi bắt đầu xử lý.
- 14.2.6. Kiểm tra cẩn thận PTID trên tất cả các ống máu đã nhận. Sắp xếp các ống chính để không có khả năng xảy ra tình trạng trộn lẫn các ống giữa PTID hoặc những chất chống đông máu.
Đề xuất: Đặt tất cả các ống cho từng PTID/chất chống đông máu vào một giá treo. Có thể sử dụng các giá đựng ống khác nhau để tách riêng các PTID hoặc các loại ống và sử dụng bút lông khác màu cho từng PTID để tránh bị nhầm lẫn.
- 14.2.7. Xác định và ghi lại số đo chính xác của thể tích máu khả dụng trong vòng 0,1mL bằng pipet huyết thanh 10mL (hoặc những phương pháp khác được mạng lưới phê duyệt). Lưu ý là thể tích máu toàn phần khả dụng không nhất thiết phải bằng kích thước ống.
Lưu ý cho HVTN: Không sử dụng các ống tham khảo hoặc ống hình nón để đo.

14.3. Thay thế Huyết tương

Lưu ý: Chỉ thực hiện bước thay huyết tương này khi bắt buộc phải chia nhỏ các phần huyết tương từ các ống thu thập PBMC theo giao thức xử lý hoặc SPLI/LPC/LM; tiến hành bước 14.4 nếu không bắt buộc phải chia nhỏ các phần huyết tương.

- 14.3.1. Những ống lấy máu từ cùng một PTID và chất chống đông máu có thể được xử lý riêng hoặc gộp chung trong các ống ly tâm hình nón 50mL (không được gộp cho HVTN).
- 14.3.2. Đánh dấu thể tích máu toàn phần trên mỗi ống lấy máu ở mặt khum.
- 14.3.3. Ly tâm máu toàn phần ở 200-400 x g trong 10 phút. Ghi lại thời gian bắt đầu xử lý trên bảng quy trình xử lý PBMC.
- 14.3.4. Chuyển huyết tương vào ống ly tâm hình nón 15mL hoặc 50mL có dán nhãn cho ly tâm lần thứ hai để loại bỏ cặn tế bào.
- 14.3.5. Thêm một lượng WDR đủ để máu trở về thể tích máu toàn phần ban đầu, khuấy nhẹ và tiếp tục xử lý PBMC ở bước 14.4.
- 14.3.6. Hoàn tất xử lý huyết tương bằng cách ly tâm huyết tương đã lấy ở 800-1200 x g trong 10 phút để thu các phần chia nhỏ PL2 hoặc theo SPLI/LPC/LM cụ thể theo giao thức xử lý. Có thể thực hiện bước này sau nếu máy ly tâm không sử dụng để xử lý PBMC.
- 14.3.7. Chia nhỏ huyết tương đã ly tâm hai lần vào các ống chia nhỏ có dán nhãn như đã ghi rõ bởi SPLI/LPC/LM cụ thể theo giao thức xử lý và loại bỏ cặn tế bào còn lại.

14.4. Pha loãng Máu để Tách (Thu công) Tế bào Gradient Tỷ trọng

- 14.4.1. Mở nắp các ống máu đã chống đông. Nếu không bắt buộc/tiến hành các bước thay thế huyết tương thì ghi lại thời gian tháo nắp là thời gian bắt đầu xử lý trên bảng quy trình xử lý PBMC.
- 14.4.2. Nếu ống bị vón cục hoặc tán huyết rõ ràng thì hãy xem Mục 6.3.

Lưu ý: Gộp các lớp trung gian được phép theo hướng dẫn trong [Phụ lục D](#): Gộp các Lớp Trung gian để Cô lập PBMC Môi trường Gradient Tỷ trọng. Để gộp các lớp trung gian, thì thay thế các bước 14.4.3 và 14.4.4 bằng các hướng dẫn trong [Phụ lục D](#).

- 14.4.3. Dán nhãn từng ống ly tâm hình nón bằng PTID và chất chống đông máu.

Kích cỡ Ống Ly tâm Hình nón (mL)	Thể tích Máu gần đúng (mL)
50	12-22
15	4-5

- 14.4.4. Chuyển máu này vào một ống ly tâm hình nón, 15mL hoặc 50mL, có dán nhãn, vô trùng và thêm đủ thể tích WDR để pha loãng máu theo hướng dẫn sử dụng môi trường gradient tỷ trọng (tỷ số tối đa máu/chất pha loãng là 2:1).

14.5. Tách Tế bào Gradient Tỷ trọng:

Lưu ý: Sử dụng Phương pháp Xếp trên (Mục 14.5.1) hoặc Phương pháp Xếp dưới (Mục 14.5.2), nhưng không dùng cả hai.

14.5.1. Phương pháp Xếp trên:

- 14.5.1.1. Chuẩn bị ống ly tâm hình nón vô trùng, có dán nhãn cho mỗi ống chứa máu pha loãng.
- 14.5.1.2. Thêm một thể tích môi trường gradient tỷ trọng thích hợp vào các ống ly tâm hình nón vô trùng rỗng.

Lưu ý: Thể tích môi trường gradient tỷ trọng sẽ phụ thuộc vào tỷ số của môi trường gradient tỷ trọng và máu pha loãng theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

14.5.1.3. Hút cẩn thận và chậm rãi máu được pha loãng trên môi trường gradient tỷ trọng.

Đề xuất: Nhẹ nhàng để hỗn hợp WDR-máu pha loãng chảy xuống thành ống và tụ trên mặt của bề mặt môi trường gradient tỷ trọng mà không phá vỡ mặt phẳng bề mặt.

14.5.1.4. Đậy nắp ống cẩn thận. Chuyển qua Mục 14.6.

14.5.2. Phương pháp Xếp dưới:

14.5.2.1. Trộn nhẹ nhàng và kỹ lưỡng để giảm vón cục các tế bào trong khi tách.

Tùy chọn: Với máu toàn phần hoặc máu-WDR, thêm vào một thể tích WDR khác tương đương với tổng thể tích máu.

14.5.2.2. Dựa trên thể tích WDR-máu pha loãng này, xác định thể tích môi trường gradient tỷ trọng cần có cho mỗi ống.

Lưu ý: Thể tích môi trường gradient tỷ trọng sẽ phụ thuộc vào tỷ số của môi trường gradient tỷ trọng và máu pha loãng theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

14.5.2.3. Dùng pipet hút chậm và cẩn thận dung dịch môi trường gradient tỷ trọng DƯỚI máu-DWR.

14.5.2.4. Đậy nắp ống cẩn thận. Chuyển qua Mục 14.6.

14.6. Ly tâm và lấy tỷ trọng lym pho bào:

14.6.1. Giữ các ống ở vị trí thẳng đứng, cho vào giá đỡ và chuyển nhẹ nhàng vào máy ly tâm.

14.6.2. Ly tâm ở 400 x g trong 30 phút ở 15°C-25°C (hoặc đến 30°C, tùy theo điều kiện khí hậu) bằng cài đặt **KHÔNG HÃM/đặt về 0** hoặc như đã nêu trong tờ hướng dẫn sử dụng đính kèm theo môi trường gradient.

Lưu ý: Nếu chốt hãm bị mở thì sẽ làm vỡ các lớp. Hãm ly tâm phải TẮT để tách sạch và tối đa hóa việc thu lại PBMC.

14.6.3. Trong khi các ống hình nón đang quay, hãy tháo bỏ tất cả các ống thu rỗng theo thực hành phòng thí nghiệm, lau chùi sạch bề mặt BSC và sắp xếp cho các bước tiếp theo.

14.6.4. Dán nhãn (bằng PTID/chất chống đông máu) cùng một số và kích thước của các ống ly tâm hình nón mới, vô trùng như ống ly tâm hình nón được sử dụng trong bước ly tâm tách lớp. Sử dụng các ống mới này cho các bước lấy và rửa tế bào sau đây.

14.6.5. Sử dụng pipet vô trùng, thêm WDR vào từng ống “rửa” hình nón, vô trùng, có dán nhãn trước:

Kích cỡ Ống Ly tâm Hình nón (mL)	Thể tích Nạp trước WDR (mL)
50	25
15	5

14.6.6. Sau khi máy ly tâm ngừng hoàn toàn, thì nhẹ nhàng tháo ống hình nón khỏi máy ly tâm sao cho không xáo trộn các lớp. Sử dụng giá treo để đỡ các ống và chuyển cẩn thận vào BSC.

14.6.7. Nếu không thấy lớp tế bào này, thì hãy kiểm tra xem máy ly tâm có vận hành bình thường không. Sửa vấn đề gặp phải. Ly tâm lại ống này. Ghi lại vấn đề và hành động đã làm theo yêu cầu của mạng lưới và phòng thí nghiệm.

14.6.8. Ghi lại sự tán huyết hoặc cục máu nhỏ thấy được ở phần tiếp giáp tế bào.

Lưu ý: Tìm tán huyết hoặc cục máu đông sau khi ly tâm. Đánh giá tán huyết +1 đến +4 dựa trên điểm mô tả trong bảng chú giải. Ghi lại thông tin đã quan sát.

14.6.9. Sử dụng một pipet vô trùng mới (pipet huyết thanh hoặc chuyển) cho mỗi PTID, bỏ đi phần huyết tương-WDR phía trên màu vàng xuống 1-2 cm bằng PBMC màu trắng đục nằm tiếp giáp giữa phần huyết tương-WDR (màu vàng) và dung dịch môi trường tách trong suốt. Cần thận không làm xáo trộn lớp tế bào trong quy trình này. Bỏ phần huyết tương-WDR theo quy định của phòng thí nghiệm.

Lưu ý: Cách khác nữa là, băng PBMC màu trắng đục được bỏ đi bằng cách đưa cẩn thận pipet xuyên qua lớp huyết tương-WDR phía trên.

14.6.10. Sử dụng một pipet huyết thanh hoặc chuyển vô trùng, lấy tất cả các tế bào ở phần tiếp giáp màu trắng đục. Cần thận không hút dung dịch môi trường gradient tỷ trọng nhiều hơn cần thiết.

14.6.11. Chuyển các tế bào đã lấy từ một ống ly tâm hình nón vào một ống ly tâm hình nón, vô trùng, đã dán nhãn trước tương ứng. Có thể nạp trước các ống bằng WDR để tiết kiệm thời gian (Mục 14.6.5).

14.6.12. Đậy lại nắp ống ly tâm hình nón chứa các tế bào hồng cầu và/môi trường phân tách còn lại và thải bỏ ống giống như rác nguy hiểm sinh học theo quy định của phòng thí nghiệm.

14.7. Bảo đảm phải ghi lại tất cả những yếu tố chính theo yêu cầu của mạng lưới và phòng thí nghiệm. Chuyển qua mục 15.

15. Rửa, Đếm, Tái nhũ tương, Cô đặc và Đông lạnh có Kiểm soát Tốc độ Qua đêm

15.1. Rửa 1:

15.1.1. QS (tăng thể tích phần PBMC lên) đến gần 45mL (với ống ly tâm hình nón 50mL) hoặc 10mL (với ống ly tâm hình nón 15mL) bằng cách thêm WDR. Trộn nhẹ nhàng.

15.1.2. Đậy lại nắp tất cả các ống hình nón này, hiện đang chứa các tế bào đã lấy và pha loãng trong WDR.

15.1.3. Ly tâm các tế bào pha loãng ở 200-400 x g trong 10 phút ở 15°C-25°C (hoặc đến 30°C, tùy theo điều kiện khí hậu) hãm nhẹ tùy chọn.

15.1.4. Lấy ống ra khỏi máy ly tâm và kiểm tra hạt tế bào.

15.1.4.1. Nếu không nhìn thấy hạt tế bào, thì xác nhận máy ly tâm đã vận hành bình thường và chỉnh sửa cài đặt đã sử dụng. Sửa vấn đề gặp phải. Ly tâm lại các ống này. Ghi lại vấn đề và hành động đã làm theo yêu cầu của mạng lưới và phòng thí nghiệm. Nếu vẫn không nhìn thấy hạt tế bào sau khi ống được ly tâm lại, thì tiếp tục các bước xử lý và ghi lại chi tiết trên bảng quy trình xử lý.

15.1.5. Lấy ra và loại bỏ chất phía trên WDR một cách cẩn thận mà không làm xáo trộn các hạt tế bào bằng cách rót nhanh vào các thùng chứa chất thải lỏng quy định trong BSC. Có thể sử dụng các phương pháp khác như thải bỏ bằng pipet huyết thanh hoặc bằng cách hút cho các hạt lỏng lẻo hoặc chứa một lượng lớn hồng cầu.

15.2. Rửa 2:

15.2.1. Tái nhũ tương mỗi hạt với thể tích nhỏ WDR bằng cách trộn nhẹ nhàng nhưng hoàn toàn vào nhũ tương tế bào đồng nhất.

Kích thước Ống (mL)	Thể tích Tái nhũ tương WDR (mL)
50	≤ 5
15	≤ 3

15.2.2. Kết hợp nhũ tương hạt từ cùng một PTID/chất chống đông máu. Đây là ống tế bào đã lấy.

Kích thước Ống (mL)	Số Nhũ tương Hạt cần Kết hợp	Tổng Thể tích (mL)
50	≤ 4	≤ 20
15	≤ 2	≤ 6

15.2.3. Sử dụng một lượng nhỏ WDR để rửa sạch ống chứa các hạt đã chuyển. Thu thập nước rửa WDR trong ống tế bào đã lấy.

15.2.4. QS phần PBMC bằng cách thêm WDR vào rồi trộn nhẹ.

Kích thước Ống (mL)	Thể tích QS (mL)
50	≤ 45
15	≤ 10

15.2.5. Đậy lại nắp các ống và cho vào máy ly tâm.

15.2.6. Ly tâm các tế bào pha loãng ở 200-400 x g trong 10 phút ở 15°C-25°C (hoặc đến 30°C, tùy theo điều kiện khí hậu) hãm nhẹ tùy chọn.

15.2.7. Lấy ống ra khỏi máy ly tâm và kiểm tra hạt tế bào.

Lưu ý: Nếu không thấy hạt tế bào này, thì hãy kiểm tra xem máy ly tâm có vận hành bình thường không. Sửa vấn đề gặp phải và ly tâm lại ống này. Ghi lại vấn đề và hành động đã làm theo yêu cầu của mạng lưới và phòng thí nghiệm. Nếu vẫn không nhìn thấy hạt tế bào sau khi ống được ly tâm lại, thì tiếp tục các bước xử lý và ghi lại chi tiết trên bảng quy trình xử lý.

15.2.8. Lấy ra và loại bỏ chất phía trên WDR một cách cẩn thận mà không làm xáo trộn các hạt tế bào bằng cách rót nhanh vào các thùng chứa chất thải lỏng quy định trong BSC. Có thể sử dụng các phương pháp khác như thải bỏ bằng pipet huyết thanh hoặc bằng cách hút cho các hạt lỏng lẻo hoặc chứa một lượng lớn hồng cầu.

15.3. Đếm Tế bào PBMC

15.3.1. Xác định và ghi lại thể tích tái nhũ tương đếm WDR (V) chính xác đến 0,1mL. V quan trọng vì dựa vào thể tích này mà có thể đếm tế bào.

Lưu ý: Thể tích tái nhũ tương đếm WDR (V) là 20% thể tích máu toàn phần khả dụng đo được, làm tròn đến số nguyên mL gần nhất (ghi là X,0) trong hầu hết các trường hợp.

Ví dụ: Thể tích máu toàn phần khả dụng đã đo được ghi là 78,6mL. Thể tích tái nhũ tương đếm phải là 16mL ($78,6 \times 20\% = 15,72$. Làm tròn 15,72 đến số nguyên mL gần nhất là 16mL)

Các ví dụ về trường hợp có thể thay đổi mức V:

- V đã tính toán lớn hơn dung tích của ống hình nón một chút. UWBV được đo và ghi là 255,2mL. Nhân với 20% và làm tròn đến số nguyên gần nhất là 51,0mL. Trong trường hợp này, V có thể giảm xuống 45,0mL để trộn an toàn và sau đó ly tâm trong ống hình nón 50mL.
- Mẫu của người tham gia cho kết quả về băng tế bào rất ít và các hạt tế bào rất nhỏ ở các lần phân tích tiếp theo. Trong trường hợp này, có thể giảm V xuống để tránh nằm ngoài giới hạn đếm tế bào.

15.3.2. Nếu có hơn 1 hạt từ cùng một PTID/chất chống đông máu, thì sử dụng một lượng WDR đo được/theo dấu nhỏ để tái nhũ tương và kết hợp những hạt tế bào vào một ống. Sử dụng thể tích tái nhũ tương còn lại rửa các ống chứa tế bào đã chuyển. Thêm dịch rửa này vào ống chứa nhũ tương tế bào.

15.3.3. Trộn tế bào một cách nhẹ nhàng và kỹ lưỡng ngay trước khi lấy mẫu đếm tế bào.

15.3.4. Chuyển một thể tích nhỏ tái nhũ tương vào ống nhỏ để đếm. Xem hướng dẫn cho thiết bị hoặc SOP đếm để biết thể tích thích hợp.

Lưu ý: Nếu cần đếm lại thì hãy giảm thể tích lấy mẫu cần thiết.

- 15.3.5. Tuân theo SOP cho phương pháp đếm tế bào được phê duyệt ở phòng thí nghiệm xử lý để xác định nồng độ tế bào $\times 10^6/\text{mL}$.

Lưu ý: Các tế bào ở $10^3/\mu\text{L}$ = các tế bào ở $10^6/\text{mL}$.

Lưu ý: Có thể chạy đếm tự động 1 lần. Nếu đếm thủ công thì phải đếm ít nhất bốn góc vuông lớn (1mm^2).

- 15.3.6. Tính tổng số tế bào theo công thức sau:

$$T = C \times V$$

T = Tổng số tế bào

C = Nồng độ ($10^6/\text{mL}$) được xác định trong phương pháp đếm

V = Thể tích tái nhũ tương để đếm của WDR theo mL

- 15.3.7. Tính hiệu suất tế bào trong các tế bào/mL máu toàn phần khả dụng theo công thức dưới đây.

$$\text{Hiệu suất Tế bào } (10^6/\text{mL}) = T / \text{Thể tích Máu Toàn phần Khả dụng}$$

Lưu ý: Tính hiệu suất tế bào vì mục đích chất lượng. Tham khảo Mục 16 Kiểm tra chất lượng cho giới hạn dự kiến của hiệu suất tế bào và cách xử lý lỗi.

15.4. Tính thể tích tái nhũ tương cuối cùng

- 15.4.1. Tính thể tích tái nhũ tương CPS đông lạnh bắt buộc bằng cách hoàn tất những bước dưới đây cho nồng độ tế bào cuối cùng theo mục tiêu.

Lưu ý: Nồng độ tế bào cuối cùng theo mục tiêu khác nhau tùy theo mạng lưới và giao thức xử lý. Tham khảo giao thức xử lý hoặc SPLI/LPC/LM cụ thể theo giao thức xử lý để biết thông tin về nồng độ tế bào cuối cùng mục tiêu.

- 15.4.2. Tính thể tích tái nhũ tương CPS đông lạnh ước tính (V_1) bắt buộc bằng cách dùng nồng độ tế bào cuối cùng theo mục tiêu.

$$V_1 = (T/N_1) \times V_2$$

T = Tổng số tế bào

N_1 = Nồng độ tế bào cuối cùng mục tiêu

V_2 = thể tích phần chia cuối cùng theo mL

Làm tròn V_1 xuống số nguyên gần nhất (1) mL để xác định V_f .

- 15.4.3. Tính số tế bào thực tế/ống (N_2) bằng cách sử dụng thể tích tái nhũ tương CPS đông lạnh (V_f) thực tế được xác định trong tính toán trước đó.

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

N_2 = Số tế bào thực tế/ống

T = Tổng số tế bào

V_2 = thể tích phần chia cuối cùng theo mL (1mL trừ khi có quy định khác trong tài liệu cụ thể theo giao thức).

15.5. Dán nhãn

- 15.5.1. Hoàn tất in ấn, kiểm tra chất lượng và dán nhãn ống giữ lạnh trước khi ly tâm lần cuối.

Lưu ý: Điều quan trọng là phải giảm thiểu thời gian tế bào nằm trong hạt.

- 15.5.2. Tạo nhãn cho ống đông lạnh tế bào bằng LDMS.

15.5.2.1. Tuân theo thực hành phòng thí nghiệm của mạng lưới để hoàn tất việc nhập dữ liệu.

15.5.2.2. Chứng thực từng loại nhãn ống đông lạnh tế bào để biết sai số nhập dữ liệu so với yêu cầu của phòng thí nghiệm và bảng quy trình xử lý TRƯỚC khi dán nhãn ống đông lạnh.

15.5.2.3. Dùng mắt thường kiểm tra bố cục và chất lượng in của mã vạch trên nhãn và khu vực in.

15.5.2.4. Điều chỉnh nếu nhập sai dữ liệu trong LDMS và in lại nhãn nếu cần.

15.5.3. Dán nhãn lên ống sao cho thấy được hàm lượng trong ống.

15.5.4. Quét các ống đông lạnh đã dán nhãn, rồi theo thứ tự GSID liên tiếp vào mô đun lưu trữ LDMS để bảo đảm mã vạch có thể quét được; việc xác minh khả năng quét và chỉ định vị trí lưu trữ được kết hợp ở bước này.

Lưu ý: Nên sử dụng giá đựng ống nhãn hiệu Nunc đóng/mở ống bằng một tay. Không được đặt nắp ống đông lạnh trên bất kỳ bề mặt nào.

15.6. Ly tâm Làn cuối

Lưu ý: Nếu các tế bào được đông lạnh dưới dạng Hạt PBMC không sống được (PEL) và dạng các tế bào sống được, thì loại bỏ thể tích PBMC cần để tạo ra các hạt tế bào không sống được trước bước ly tâm cuối cùng và hoàn tất xử lý các hạt tế bào không sống được rồi làm theo hướng dẫn cụ thể theo giao thức xử lý cho các hạt PBMC không sống được.

15.6.1. QS (tăng thể tích nhũ tương tế bào lên) đến 45mL bằng WDR và cho (các) ống hình nón chứa các tế bào đã lấy và pha loãng trong máy ly tâm.

15.6.2. Ly tâm các tế bào pha loãng ở 200-400 x g trong 10 phút ở 15°C-25°C (hoặc đến 30°C, tùy theo điều kiện khí hậu) tùy chọn hãm.

15.6.3. Xác minh các ống đông lạnh đã được dán nhãn và tiếp cận dễ dàng.

15.6.4. Chọn ngăn đông lạnh điều tốc: StrataCooler®, Mr. Frosty™, CoolCell®. Dán nhãn (các) ngăn đông lạnh thích hợp để nhân viên phòng thí nghiệm xác định hàm lượng. Bảo đảm ngăn này ở đúng nhiệt độ để sử dụng tại thời điểm đặt ống và tiếp cận dễ dàng ngay trước khi lấy ra những hạt tế bào cuối cùng khỏi máy ly tâm. Xem mục 7.5 để biết thông tin về lưu trữ và bảo quản.

15.7. Chia nhỏ để bảo quản lạnh

Lưu ý: Phải thực hiện nhanh các bước sau để đảm bảo tính toàn vẹn của tế bào.

15.7.1. Lấy ra và loại bỏ chất phía trên WDR một cách cẩn thận mà không làm xáo trộn các hạt tế bào bằng cách rót nhanh vào các thùng chứa chất thải lỏng quy định trong BSC. Có thể sử dụng các phương pháp khác như thái bỏ bằng pipet huyết thanh hoặc bằng cách hút cho các hạt lỏng lẻo hoặc chứa một lượng lớn hồng cầu.

15.7.2. Tái nhũ tương (các) hạt bằng thể tích CPS lạnh (V_f) đã được xác định trong mục 15.4.

Lưu ý: Làm lạnh trước các ống và/hoặc sử dụng đá lạnh ẩm.

Lưu ý cho HVTN: Không ưu tiên làm lạnh lại các ống đông lạnh và sử dụng đá lạnh ẩm và phải được Trung tâm Phòng thí nghiệm HVTN phê duyệt trước khi sử dụng với các mẫu của mạng lưới HVTN.

15.7.2.1. Tái nhũ tương nhẹ nhàng hạt tế bào trước khi thêm CPS bằng cách gõ nhẹ vào ống, sắp xếp ống hoặc hút pipet.

15.7.2.2. HVTN khuyến cáo tái nhũ tương hạt bằng cùng thể tích đo được/theo dấu được của CPS được dùng trong các bước trước để tái nhũ tương hạt. Đừng quên trừ thể tích này khỏi tổng thể tích CPS cuối cùng cần thêm vào nếu tổng thể tích tái nhũ tương CPS cuối cùng lớn hơn thể tích được sử dụng để tái nhũ tương hạt.

15.7.2.3. Thêm nhẹ nhàng CPS vào các tế bào đã tái nhũ tương bằng cách khuấy liên tục.

15.7.3. Thực hiện nhanh sau khi đã thêm CPS vào. Không để các tế bào trong dung dịch đông lạnh lâu hơn 10 phút trước khi cho vào tủ đông lạnh.

15.7.4. Trộn nhũ tương nhẹ nhàng và nhanh bằng pipet huyết thanh trước khi chia nhỏ. Duy trì nhũ tương này suốt quá trình đặt ống.

15.7.4.1. Chia nhỏ 1mL trên mỗi ống đông lạnh, trừ khi có hướng dẫn khác của SPLI/LPC/LM cụ thể theo giao thức xử lý.

Lưu ý: Phân bổ đều lượng thể tích thừa vào tất cả ống đông lạnh cho PTID đó.

15.8. Đông lạnh có kiểm soát tốc độ qua đêm

15.8.1. Sau khi xử lý và đếm, hãy hoàn tất các bước bắt buộc để đông lạnh tế bào ngay lập tức.

15.8.2. Đặt máy đông lạnh điều tốc đã chọn lọc để chuyển: Agilent Technologies StrataCooler®, Nalgene® Mr. Frosty™, Corning® CoolCell®. Xem Mục 7.5 để biết thông tin về lưu trữ và bảo quản.

15.8.3. Chuyển ngay tất cả các ống đông lạnh theo thứ tự ID mẫu chung theo chuỗi vào máy đông lạnh có kiểm soát tốc độ.

Đối với tất cả CRFU, Nalgene® Mr. Frosty™, Corning® CoolCell® và Agilent Technologies StrataCooler®, hãy đóng bình chứa và cho vào tủ đông lạnh -80°C (-65°C đến -95°C cho ACTG, -70°C đến -95°C cho HVTN và HPTN) ở vị trí không bị xáo trộn do sử dụng tủ đông lạnh nhiều lần (tức là cách xa phía trước hoặc trên đầu tủ đông lạnh gần cửa mở/nấp). Không xếp chồng lên nhau. Nên để tất cả CRFU ở trong tủ đông lạnh qua đêm.

Đối với CryoMed® hoặc các tủ đông lạnh điều tốc cơ học khác, thì bắt đầu chương trình làm lạnh theo SOP tại chỗ thích hợp. (Lưu ý cho HVTN: Không được dùng tủ đông lạnh điều tốc cho các mẫu HVTN).

15.8.4. Ghi lại ngày/giờ làm đông lạnh ngay trên bảng quy trình xử lý PBMC. Nhập ngày/giờ đông lạnh đã ghi trên bảng quy trình xử lý vào LDMS.

15.9. Ghi lại tất cả các yếu tố chính theo yêu cầu của mạng lưới và phòng thí nghiệm.

16. Kiểm tra Chất lượng

16.1. Hiệu suất Tế bào

Điều quan trọng là phải biết sự phục hồi dự kiến cho nhóm người tham gia được tiến hành xử lý. Hiệu suất tế bào có thể là bộ đánh dấu kiểm soát chất lượng nội bộ cho mỗi lần chạy. Hiệu suất ngoài giới hạn dự kiến có thể cho thấy lỗi quy trình, giảm chất lượng thuốc thử, lỗi đếm tế bào hoặc lỗi tính toán.

Lưu ý: Dưới đây là những khuyến cáo nhằm mục đích cung cấp hướng dẫn để giúp nhận diện những lỗi kỹ thuật nặng trước khi bảo quản lạnh. Những giá trị này có thể thay đổi tùy theo chất chống đông máu đã dùng.

16.1.1. Hiệu suất Tế bào Dự kiến cho nhóm người trưởng thành:

Nhóm	Giới hạn Hiệu suất Tế bào Bạch cầu Đơn nhân (tế bào/mL)
Người trưởng thành	$(0,8-3,2) \times 10^6$

16.1.2. Hiệu suất Tế bào Ngoài dự kiến

16.1.2.1. Nếu hiệu suất tế bào nằm ngoài giới hạn dự kiến, thì hãy kiểm tra sơ đồ pha loãng, phép tính toán, kỹ thuật xử lý (trộn đặc biệt để đủ nhũ tương đếm tế bào) và lịch sử PTID nếu sẵn có cho những nguyên nhân có thể.

16.1.2.2. Hiệu suất tế bào từ người tham gia sống chung với HIV có thể thấp hơn những người được trình bày trong bảng trên.

16.1.2.3. Nếu nghi ngờ có lỗi về pha loãng hoặc đếm tế bào thì hãy pha loãng và đếm lại.

16.1.3. Ghi lại tất cả kết quả và vấn đề xảy ra trong khi xử lý và hành động theo yêu cầu của mạng lưới và phòng thí nghiệm. Xem Mục 5 để biết chi tiết.

Lưu ý cho HVTN và HPTN: Ghi lại tất cả vấn đề và cách xử lý vào Bảng quy trình Xử lý HVTN PBMC cụ thể theo giao thức xử lý, các mục LDMS cho phần chia nhỏ và trong mục nhận xét hiệu suất tế bào của Chương trình Atlas HVTN PBMC nếu cần. Liên lạc với Trung tâm Phòng thí nghiệm HVTN nếu có quan ngại.

16.2. Khả năng sống của Tế bào

16.2.1. Khả năng sống của PBMC tươi phải là >95%.

16.2.2. Nếu khả năng sống của PBMC tươi là <95%, thì hãy kiểm tra kết quả với người giám sát và ghi lại theo yêu cầu của mạng lưới và phòng thí nghiệm.

Lưu ý: Nếu các mẫu được chuẩn bị cho Chương trình Kiểm tra Độ Thành thạo Bảo quản lạnh IQA PBMC, thì bắt buộc phải đếm tế bào sống.

17. Bảo quản PBMC (Tạm thời hoặc Tại chỗ)

17.1. Duy trì chuỗi lạnh trong tất cả các bước chuyển để tránh làm hỏng tế bào.

Lưu ý cho HVTN: Gửi mẫu đá lạnh khô đến kho mẫu trung tâm trong vòng 1 tuần từ khi lấy mẫu, trừ khi có hướng dẫn khác của SPLI cụ thể theo giao thức xử lý HVTN (tần suất gửi tùy thuộc yêu cầu địa phương và giao thức xử lý). Tiếp tục đến 17.2

Lưu ý cho HPTN: Tuân theo hướng dẫn được cung cấp theo Sổ tay thực hành Phòng thí nghiệm cụ thể theo giao thức xử lý

Lưu ý cho ACTG: Gửi mẫu đá lạnh khô trong vòng 4 tuần kể từ ngày đông lạnh trừ khi có hướng dẫn khác trong LPC. Tiếp tục đến 17.2

17.2. Chuyển PBMC đến tủ bảo quản tạm thời ở nhiệt độ -80°C.

17.2.1. Chuyển ống đông lạnh từ hệ thống làm lạnh điều tốc đến nơi bảo quản được chỉ định từ -65°C đến -95°C cho ACTG, -70°C đến -95°C cho HVTN và HPTN.

17.2.2. Chuyển ống đông lạnh sau ít nhất 4 giờ đối với Nalgene® Mr. Frosty™ và Corning® CoolCell® và qua đêm đối với StrataCooler® (nên bảo quản qua đêm cho tất cả CRFU theo biện pháp thực hành tiêu chuẩn để giảm thiểu rủi ro với mẫu). Đối với CryoMed®, chuyển những ống đông lạnh khi hoàn tất chương trình này đến tủ đông lạnh -80°C.

Lưu ý: Bắt buộc cho HVTN và HPTN, khuyến cáo cho ACTG: Chỉ sử dụng khay chuyển đá lạnh khô được phép cho tủ đông lạnh điều tốc; phải sử dụng tủ đông lạnh thân cao làm lạnh trước cho các hộp làm lạnh/bảo quản PBMC. Xem Hướng dẫn Chuỗi Lạnh Mạng lưới Chéo (Mục 7, Quy trình Chuyển Mẫu) để biết thêm chi tiết. Bảo đảm phải bao phủ tất cả các mặt của tủ đông lạnh ống giữ lạnh và nắp bằng đá lạnh khô. Thực hiện nhanh và hiệu quả để giảm thiểu phơi nhiễm ống giữ lạnh với nhiệt độ môi trường.

Lưu ý: Không bảo quản trong ni tơ lỏng (LN₂). Bảo quản ở -65°C đến -95°C cho ACTG, -70°C đến -95°C cho HVTN và HPTN cho đến khi gửi.

Lưu ý: Làm lạnh trước bình đựng đá lạnh khô và sử dụng máy làm lạnh thân cao trong các bước QC và đóng gói. Bảo đảm đổ đầy bình đựng đá lạnh khô trước khi niêm phong.

17.2.3. Liên lạc với nhân viên trung tâm phòng thí nghiệm của mạng lưới nếu các mẫu không đến nơi trong thời gian bảo quản tạm thời được mạng lưới phân bổ. Trung tâm phòng thí nghiệm của mạng lưới sẽ xác định xem liệu việc chuyển đi bảo quản và chuyên chở LN₂ trong bình đựng LN₂ có thích hợp hay không.

17.3. Chuyển PBMC vào bình dewar LN₂ hoặc tủ đông lạnh cơ học -150°C.

Lưu ý cho HVTN: Bảo quản LN₂ hoặc sử dụng bình dewar LN₂ hoặc tủ đông lạnh cơ học -150°C là không được phép để bảo quản HVTN PBMC, trừ những trường hợp đặc biệt. Các phòng thí nghiệm không được chuyển mẫu từ tủ đông lạnh -80°C, trừ khi được hướng dẫn theo HVTN LC.

17.3.1. Trong vòng 72 giờ kể từ khi đông lạnh ống đông lạnh trong hệ thống trữ lạnh điều tốc, hãy chuyển đá lạnh khô vào nơi bảo quản được chỉ định trong hệ thống bảo quản LN₂ dewar hoặc -150°C.

17.3.2. Những mẫu PBMC đã đông lạnh còn sống ở pha hơi LN₂ là vô thời hạn. KHÔNG chuyển mẫu từ LN₂ hoặc -150°C trở lại tủ đông lạnh -80°C trừ khi được hướng dẫn bởi nhân viên của mạng lưới hoặc theo giao thức xử lý.

17.3.3. Sau khi đã bảo quản mẫu trong LN₂, tất cả những lần chuyển hoặc gửi đi phải được duy trì ở LN₂ ($\leq -140^\circ\text{C}$) và gửi đi trong bình đựng khô LN₂ được IATA phê duyệt.

18. Hoàn tất Tài liệu Xử lý

18.1. Bảo đảm phải ghi lại tất cả các thông tin thích hợp, theo thực hành tài liệu tốt, theo yêu cầu của mạng lưới và phòng thí nghiệm và bảo đảm tất cả các phép tính toán đều chính xác. Xem Mục 5 để biết chi tiết.

18.2. Bảo quản theo yêu cầu của phòng thí nghiệm, Bảng Quy trình Xử lý PBMC và mọi tài liệu theo dõi theo quy định của phòng thí nghiệm.

19. Các Định nghĩa và Từ viết tắt

Thuật ngữ	Định nghĩa
ACTG	Thúc đẩy Điều trị Lâm sàng Toàn cầu
Nhiệt độ Ly tâm	15°C đến 25°C hoặc đến 30°C, tùy theo điều kiện khí hậu
Vón cục, Rõ ràng	Hơn ¾ khối máu toàn phần bị vón cục.
Vón cục, Nhỏ	Vón cục nhỏ được ghi nhận sau khi xử lý PBMC trong ống máu toàn phần nhưng không thấy trong frit ống tách máu sau khi ly tâm.
CPS	Dung dịch Bảo quản lạnh
CSTFB	Ống tách Tế bào có Màng ngăn Frit
DGM	Môi trường Gradient Tỷ trọng
FBS	Huyết thanh Bào thai Bò
HBSS	Dung dịch Muối Cân bằng Hank
Tán huyết	Huyết tương hoặc huyết thanh đổi từ màu hồng sang đỏ do vỡ hồng cầu. Độ tán huyết theo thang đo sau: 1+ Huyết tương hoặc huyết thanh có màu từ hồng đến đỏ, có thể đọc rõ ràng giấy báo đặt sau ống máu 2+ Huyết tương hoặc huyết thanh có màu từ hồng đến đỏ, có thể đọc giấy báo nhưng không sắc nét 3+ Huyết tương hoặc huyết thanh có màu từ hồng sậm đến đỏ, giấy báo mờ. 4+ Huyết tương hoặc huyết thanh có màu đỏ sậm, không thể đọc giấy báo <u>Lưu ý:</u> Các tế bào hồng cầu vỡ làm huyết tương hoặc huyết thanh có màu nhưng chất lượng trong suốt nơi nhiễm bản hồng cầu làm huyết tương hoặc huyết thanh có chất lượng đục.
HI-FBS	Huyết thanh Bào thai Bò Bất hoạt bằng Nhiệt
HPTN	Mạng lưới Nghiên cứu Phòng ngừa HIV
HVTN	Mạng lưới Nghiên cứu Vắc xin HIV
Vàng da	Một huyết tương nhuộm xanh hoặc cam cho thấy có bilirubin gia tăng.
LDMS	Hệ thống Quản lý Dữ liệu Phòng thí nghiệm
LM	Sổ tay Phòng thí nghiệm (HPTN)
LPC	Sơ đồ Xử lý Phòng thí nghiệm (ACTG)
PBMC	Tế bào Đơn nhân Máu Ngoại biên
PBS	Nước muối đệm phosphate
PI	Nhà nghiên cứu Chính
PTID/PID	Mã số Nhận diện Người tham gia
QS	Đủ Lượng – thêm đủ lượng chất lỏng để đạt thể tích cụ thể
Nhiệt độ Phòng (RT)	15°C đến 25°C hoặc đến 30°C, tùy theo điều kiện khí hậu
SPLI	Hướng dẫn Phòng thí nghiệm Xử lý Mẫu (HVTN)
Thể tích máu toàn phần khả dụng (UWBV)	Thể tích máu toàn phần đo được cần xử lý thực tế (Thể tích máu toàn phần khả dụng có thể không bằng dung tích ống)
Bảo quản ở pha hơi	Bảo quản ở pha hơi ni tơ lỏng (LN ₂) là không gian trong bình bảo quản trên chất lỏng LN ₂ ở đáy bình.
WDR	Thuốc thử Pha loãng Rửa (HBSS, PBS)

20. Tài liệu tham khảo

- 20.1. Bull M., Lee B., Stucky J., Chiu Y.L., Rubin A., Horton H. và McElrath MJ. Định nghĩa các thông số xử lý máu để phát hiện tối ưu phản ứng đặc hiệu kháng nguyên bảo quản lạnh cho thử nghiệm vắc xin HIV. J. Immunol. Các phương pháp 322:57-69 (2007).
- 20.2. CHAVI SOP để Cô lập và Bảo quản lạnh PBMC, CHAVI-A0001, v5, 3/11/2008.
- 20.3. Cox J.H., DeSouza M., Ratto-Kim S., Ferrari G., Weinhold K.J. và Bix B.L. Định lượng Miễn dịch Tế bào để đánh giá hiệu quả Vắc xin ở các quốc gia đang phát triển. Sổ tay Miễn dịch học Phòng thí nghiệm Lâm sàng. Rose N.R., Hamilton R.G., Detrick B. Eds. (Pb. 6) tr.301-315 (2002).
- 20.4. Islam B., Lindbert A. và Christensen B. Chuẩn bị tế bào máu ngoại biên ảnh hưởng đến mức biểu hiện dấu hiệu bề mặt bạch cầu khi được đánh giá bằng máy đếm tế bào đa sắc. Cytometry 22:128-134 (1995).
- 20.5. Sổ tay Phòng thí nghiệm Mạng lưới Nghiên cứu Vi rút học Miễn dịch (IVRN): Tách và bảo quản huyết thanh, huyết tương và PBMC. IVRN. 12/12/2007.
- 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. và Casimiro B.R. Tốc độ gia tăng và cường độ đáp ứng miễn dịch được phát hiện với vắc xin HIV: hiệu quả của việc sử dụng quy trình tối ưu hóa để cô lập 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; Nhóm Nghiên cứu Lâm sàng AIDS ở Trẻ em. Tập hợp lym phô bào ở trẻ khỏe mạnh từ sơ sinh đến 18 tuổi: nghiên cứu P1009 của Nhóm Nghiên cứu Lâm sàng AIDS ở Trẻ em. J Allergy Clin Immunol. 112(5):973-80 (2003).
- 20.8. Sigma-Aldrich Accuspin™ System-Histopaque®-1077, mã số thủ thuật A6929/A7054/A0561, Tháng 09-2003.
- 20.9. Weinberg A., Betensky R., Zhang L. và Ray G. Ảnh hưởng của việc vận chuyển, bảo quản, chất chống đông máu và tách tế bào đến những nghiệm pháp sinh sản lym phô bào cho những bệnh nhân nhiễm HIV. 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 và Tustin NB. Tối ưu hóa việc bảo quản và vận chuyển tế bào đơn nhân máu ngoại biên từ người nhiễm và không nhiễm HIV cho nghiệm pháp ELISPOT. J Immunol Methods. 363(1):42-50 (2010).

21. Phụ lục

- 21.1. Phụ lục A: Bảng quy trình Xử lý PBMC Bắt buộc của HVTN
Lưu ý: Phụ lục A cũng có sẵn dưới dạng có thể tải về và chỉnh sửa trên website công cộng tại địa chỉ <https://www.hanc.info/resources/sops-guidelines-resources/laboratory/cross-network-pbmc-processing-sop.html>
- 21.2. Phụ lục B: Mẫu Sổ ghi Thay đổi Nalgene® Mr. Frosty Isopropanol
- 21.3. Phụ lục C: Khắc phục sự cố: Phục hồi PBMC khi Không có Băng (Lớp) PBMC Xác định sau khi Ly tâm Gradient Tỷ trọng
- 21.4. Phụ lục D: Gộp các Lớp Trung gian để Cô lập PBMC Môi trường Gradient Tỷ trọng
- 21.5. Phụ lục E: Hướng dẫn Nhanh PBMC SOP Mạng lưới Chéo—CSTFB
- 21.6. Phụ lục F: Hướng dẫn Nhanh PBMC SOP Mạng lưới Chéo—Phương pháp Xếp trên Thủ công
- 21.7. Phụ lục G: Các Thuốc thử Mẫu
- 21.8. Phụ lục H: Lịch sử Sửa đổi

Phụ lục A: Bảng quy trình Xử lý PBMC

Lưu ý: Phải điền các trường trong bảng quy trình xử lý này bằng bút viết thủ công.

Phòng thí nghiệm Xử lý Mẫu:	Giao thức xử lý:
ID người tham gia (PTID/PID):	Số Buổi khám: Loại Buổi khám:
Ngày Thu thập:	Giờ Thu thập:

Ngày Bắt đầu Xử lý:	Giờ Bắt đầu Xử lý:	Người Xử lý (Tên viết tắt):	
Các Thuốc thử	Nhà sản xuất	Lô Số	Ngày Hết hạn
DMSO			
FBS			
WDR: HBSS hoặc PBS (khoanh tròn một)			
Ông Tách Tế bào (frit)			
Môi trường Gradient Tỷ trọng			
	Thể tích tính bằng mL (ghi là X,Y)		Ngày Hết hạn
CPS	CPS	DMSO	FBS
			1 ngày làm việc (<18 giờ)
Dữ liệu cần Thu thập Trong khi Xử lý			Mẫu
Loại ống mẫu (khoanh tròn một hoặc ghi loại ống khác)			ACD / HEP / EDT Khác: _____
Tình trạng máu (khoanh tròn một hoặc nhiều loại; nhận xét ở mặt sau nếu cần)			SAT/ HEM / CLT
Thể tích máu toàn phần khả dụng đo được (đến 0,1mL gần nhất)			mL
Cho biết phương pháp xử lý (khoanh tròn một)			CSTFB / xếp trên / xếp dưới
Phương pháp Đếm: Cho biết tên thiết bị cụ thể hoặc đếm thủ công (ghi vào phần bên phải)			
Đếm thể tích tái nhũ tương HBSS (hoặc WDR khác) (V) (ghi là X,Y)			mL
Nồng độ trung bình số tế bào (C)			x 10 ⁶ tế bào/mL
Tổng số tế bào (T) = C x V			10 ⁶ tế bào
Tính hiệu suất tế bào/mL máu toàn phần (Kiểm tra QC) = (T/Thể tích Máu Toàn phần Khả dụng)			x 10 ⁶ tế bào/mL
Tính thể tích tái nhũ tương CPS ước lượng (V1)=(T/15x10⁶ tế bào/mL)(1mL)			mL
Tính thể tích tái nhũ tương CPS sau cùng (Vf), (V1 được làm tròn xuống (X,0) mL gần nhất)			mL
Tính số tế bào thực tế trên mỗi ống N2 = (T/Vf) x V2; (V2=1 mL).			x 10 ⁶ tế bào/ống
In và dán Nhãn nội dung QC LDMS/mã vạch (tên tắt của (những) người thực hiện QC)			
Ngày và Giờ Đông lạnh (ngày tháng năm/Giờ:Phút) (Giải thích trong phần nhận xét nếu thời gian này không trong vòng 4 giờ kể từ khi bắt đầu xử lý)			
Số Ống đông lạnh thực tế Lưu ý: Phải bằng thể tích tái nhũ tương CPS thực tế cho lượng chia 1mL (Vf).			
Hoàn tất các mục LDMS còn lại bao gồm tổng số tế bào và thời gian đông lạnh (Tên tắt)			

Phụ lục A: Bảng quy trình Xử lý PBMC Trang 2/2

Lưu ý: Phải điền các trường trong bảng quy trình xử lý này bằng bút viết thủ công.

Phòng thí nghiệm Xử lý Mẫu:

PTID/PID:

Chuyển Ống đông lạnh vào Hộp Bảo quản Đông lạnh	
Người chuyển ống đông lạnh vào hộp bảo quản mẫu do LDMS chỉ định	
Ngày (ngày/tháng/năm)/giờ được chuyển từ thiết bị đông lạnh điều tốc qua hộp bảo quản. (Phải duy trì mẫu ở -80°C trong khi chuyển)	
Kiểm tra Lần đầu (Tên viết tắt/Ngày)	
Kiểm tra Lần cuối (Tên viết /Ngày)	

Đếm bằng Hemacytometer	Tổng số Tế bào	Tế bào Sống	Không Sống
Hình vuông #1 (tế bào/mm ²)			
Hình vuông #2 (tế bào/mm ²)			
Hình vuông #3 (tế bào/mm ²)			
Hình vuông #4 (tế bào/mm ²)			
Số tế bào Trung bình theo Hình vuông (tế bào/mm ²)			
Hệ số Pha loãng PBMC (1:DF*)			
Hệ số Hemacytometer cho tế bào/mL	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴
Nồng độ số tế bào (C) = (Tế bào Trung bình/mm ²)(DF)(10 ⁴); đổi qua 10 ⁶ tế bào/mL	Không áp dụng	x 10 ⁶ tế bào/mL	Không áp dụng
% sống = (Tế bào sống 4 ô vuông/tổng tế bào 4 ô vuông) (100)	Không áp dụng		Không áp dụng

**Lưu ý:* Hệ số Pha loãng (DF) = (phần tế bào + phần chất lỏng pha loãng)/phần tế bào

Đếm Tế bào Tự động (10 ³ /ml=10 ⁶ /mL)	Số #1
Số Tế bào (C) là số tế bào x10 ⁶ /mL	
Hệ số Pha loãng PBMC (1:DF**)	
Nồng độ Tế bào = (C)(DF)	x 10 ⁶ tế bào/mL
% sống (nếu có)	

***Lưu ý:* Pha loãng cho máy đếm tự động là cực kỳ hiếm. Nếu tiến hành đếm trực tiếp thì nhập 1 trong ô DF và điền cột này.

Không ghi nhận xét, độ lệch giao thức xử lý và thông tin bổ sung trong bảng quy trình xử lý này:

Phụ lục C: Khắc phục sự cố: Phục hồi PBMC khi Không có Băng (Lớp) PBMC Xác định sau khi Ly tâm Gradient Tỷ trọng

C.1. Thông tin cơ bản: Nếu có sai sót trong quá trình ly tâm gradient tỷ trọng máu, thì do môi trường gradient tỷ trọng và huyết tương không sạch và sẽ không thể nhìn thấy lớp PBMC. Đừng quá lo lắng. Có thể phục hồi PBMC từng phần bằng các bước bổ sung.

C.2 Nhận diện vấn đề:

C.2.1 Tháo các ống khỏi máy ly tâm và chuyển qua giá treo.

C.2.2 Nhận diện xem tại sao không có lớp PBMC trong suốt. Dưới đây là liệt kê những nguyên nhân khả dĩ:

- Ống đã bị rơi hoặc vỡ.
- Chốt hãm đã bị bật lên.
- Tốc độ ly tâm quá cao. Kiểm tra cài đặt số vòng/phút (rpm) đã đúng cho quy trình sử dụng (CSTFB hoặc tách tế bào bằng gradient tỷ trọng thủ công) bằng cách kiểm tra bảng RCF/rpm cho rôto. Một số máy ly tâm cần cài đặt trên máy khớp với loại ống sử dụng. Nếu cài đặt không đúng thì máy ly tâm sẽ tính sai tốc độ.
- Máy ly tâm bị ngừng do điện chập chờn.
- Frit lạc chỗ. (Trường hợp này thường do tốc độ ly tâm quá cao, nhưng đôi khi có ống bị lỗi trong lô này).
- Máy ly tâm không cân bằng.
- Người hiến tặng có lym pho bào, bạch cầu hoặc hematocrit thấp.

C.3 Trong số những nguyên nhân nói trên thì có 5 nguyên nhân ở phần đầu là dễ khắc phục nhất. Nếu nguyên nhân là do máy ly tâm không cân bằng thì xác định nguyên nhân gây không cân bằng. Kiểm tra như sau:

C.3.1 Kiểm tra xem các ống có cân bằng không.

C.3.2 Kiểm tra xem hộp ly tâm có cân bằng không.

C.3.3 Kiểm tra xem tay đòn và hộp ly tâm có được bôi trơn không

Lưu ý: Nếu nghi là do máy ly tâm thì sử dụng máy khác.

C.4 Nếu vấn đề đã được khắc phục thì hãy ly tâm lại mẫu như sau:

C.4.1 Các Thuốc thử:

- Môi trường gradient tỷ trọng
- Ống ly tâm hình nón 50mL
- Pipet

C.4.2 Phương pháp:

Lưu ý: Môi trường gradient tỷ trọng là môi trường độc cho tế bào, nên hãy thực hiện thật hiệu quả

- C.4.2.1 Thêm 15mL môi trường gradient tỷ trọng vào ống 50 mL vô trùng (không phải CSTFB).
- C.4.2.2 Để môi trường gradient tỷ trọng ấm lên đến nhiệt độ phòng (15°C-25°C hoặc đến 30°C, tùy theo điều kiện môi trường) trong khi thực hiện với mẫu này.
- C.4.2.3 Đối với mỗi ống đã trộn, dán nhãn ống 50mL tên PTID. Sử dụng pipet lấy chậm rãi chất trong mẫu đã trộn từ quá trình tách hoặc CSTFB. (CSTFB frit thường lạc chỗ).
- C.4.2.4 Chuyển đến tối đa 30mL mẫu đã trộn vào ống chứa môi trường gradient tỷ trọng.
- C.4.2.5 Lặp lại như vậy cho tất cả mẫu đã trộn.
- C.4.2.6 Cho các ống vào máy ly tâm, kiểm tra ống xem có cân bằng không.
- C.4.2.7 Ly tâm trong 30-40 phút ở 400 x g với chốt hãm TẮT ở nhiệt độ phòng (15°C-25°C hoặc đến 30°C, tùy theo điều kiện khí hậu).
- C.4.2.8 Phải nhìn thấy một lớp PBMC. (Một số tế bào thường bị mất, nên lớp này có thể mỏng).
- C.4.2.9 Chuyển cẩn thận lớp PBMC này vào ống ly tâm hình nón 50mL đã dán nhãn PTID. Sử dụng một ống mới cho mỗi ống môi trường gradient tỷ trọng.
- C.4.2.10 Đóng lại nắp ống môi trường gradient tỷ trọng.
- C.4.2.11 Trở lại Mục 15 giao thức xử lý chính.

Lưu ý: Trong Mục “Nhận xét và Độ lệch Giao thức xử lý” của **Bảng quy trình Xử lý PBMC**, hãy ghi lại chi tiết độ lệch khỏi SOP (tức là các bước từ “Phụ lục C” được dùng để phục hồi PBMC do không có băng PBMC xác định sau khi ly tâm gradient tỷ trọng). Ngoài ra, hãy ghi thời gian ly tâm lại để ước lượng thời gian các tế bào trong môi trường gradient tỷ trọng.

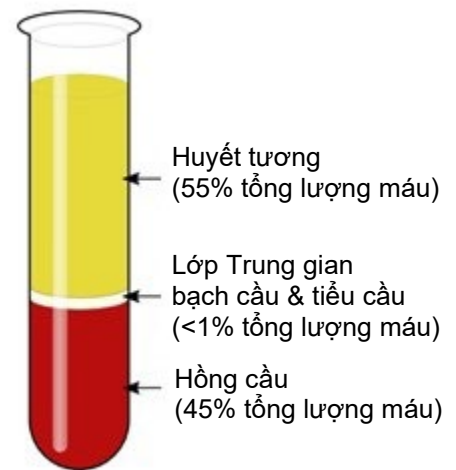
Phụ lục D: Gộp các Lớp Trung gian để Cô lập PBMC Môi trường Gradient Tỷ trọng

Có thể sử dụng quy trình này khi cô lập PBMC từ nhiều ống máu của cùng kết hợp PTID-chất chống đông máu. Cũng có thể sử dụng quy trình này để củng cố các lớp trung gian để giảm sử dụng thuốc thử và vật liệu tiêu hao, tăng hồi phục và giảm nhiễm bẩn.

Lớp trung gian này là một phần của máu chứa bạch cầu (WBC) và tiểu cầu và diễn ra sau khi ly tâm ở lớp tiếp giáp giữa huyết tương và lớp hồng cầu. Phần lớn WBC được tìm thấy trong lớp trung gian này chỉ có một lượng rất nhỏ (tổng số <1 triệu) còn lại trong gói hồng cầu sau khi lấy lớp trung gian. Lớp phủ trung gian này được lấy bằng một phần nhỏ huyết tương và hồng cầu (khoảng 1,5mL), rồi được pha loãng trước khi chồng lên môi trường gradient để tách lym phô bào.

Quy trình:

- D1. Bảo đảm là đã hoàn tất các bước trong các Mục 14.4.1 đến 14.4.2.
- D2. Ly tâm máu ở 200 - 400 x g trong 10 phút.
- D3. Lấy huyết tương (và lưu trữ cho khi cần – xem Mục 14.3.4 -14.3.7) từ mỗi ống trong khoảng 5mm từ lớp trung gian (rõ ràng trong đĩa số trường hợp, trừ những bệnh nhân bị giảm bạch cầu trung tính/lympho bào nặng).
- D4. Xác định dung tích và số ống ly tâm hình nón cần thiết cho mỗi kết hợp PTID-chất chống đông máu. Không gộp mẫu từ PTID-chất chống đông máu khác. Tổng quát:
 - Lớp trung gian từ 2 ống lấy máu 10mL có thể được gộp vào ống ly tâm hình nón 15mL.
 - Các ống trung gian từ khoảng 6 ống lấy máu 10mL có thể được gộp vào ống ly tâm hình nón 50mL.
- D5. Dán nhãn cho mỗi ống ly tâm hình nón bằng PTID.
- D6. Thêm WDR vào mỗi ống ly tâm hình nón vô trùng.



Dung tích Ống Ly tâm Hình nón (mL)	Thể tích WDR (mL)
15	3
50	10-15

- D7. Giữ ống giảm huyết thanh (lúc này có chứa một lượng nhỏ huyết tương thừa và các tế bào kết tụ) ở một góc 30°.
- D8. Sử dụng một pipet bằng polypropylene, dùng một lần, ống rộng, 2,5mL, vô trùng để lấy lớp trung gian. Hút lớp trung gian này bằng cách di chuyển xuống phần dưới của ống. Hút chậm rãi huyết tương sau khi hút lớp trung gian bằng cách “trượt” xuống lớp hồng cầu kết tụ (khoảng 1,5mL chất hút). Chuyển lớp trung gian này vào ống chứa WDR, rửa sạch pipet 2-3 lần bằng WDR/nhũ tương tế bào.
- D9. Lấy và gộp lớp trung gian từ (những) ống còn lại cho kết hợp PTID-chất chống đông máu.
- D10. QS WDR/nhũ tương bằng WDR bổ sung đến thể tích mong muốn bằng cách thực hiện kỹ thuật tách tế bào gradient tỷ trọng. Trộn nhẹ phần gộp lớp trung gian 3-4 lần bằng pipet.
- D11. Tiếp tục tách tế bào gradient tỷ trọng ở bước trong Mục 14.5. Trong phần 14.5, “máu pha loãng” có nghĩa là “lớp trung gian pha loãng”.

Phụ lục E: Các Thuốc thử và Tiếp liệu Mẫu

Lưu ý: Tất cả các thuốc thử phải được mua dưới dạng vô trùng và phải sử dụng kỹ thuật vô trùng.

Thuốc thử/Tiếp liệu	(Các) Ví dụ	Tùy chọn/Bắt buộc
CSTFB khô	<ul style="list-style-type: none"> • Ống tách Accuspin™ • Ống tách Leucosep® 	Tùy chọn (Lưu ý cho HVTN: Bắt buộc)
Ống tách tế bào nạp trước có màng ngăn frit (CSTFB) với Môi trường gradient tỷ trọng 1,077	<ul style="list-style-type: none"> • Accuspin™ System Histopaque®-1077 	Tùy chọn (Lưu ý cho HVTN: Không được dùng khi chưa được mạng lưới phê duyệt)
Môi trường Gradient Tỷ trọng 1,077	<ul style="list-style-type: none"> • Ficoll-Paque PLUS và PREMIUM • Lymphoprep™ • Môi trường Tách Lymphocyte – LSM™ 	Tùy chọn
Dimethyl sulfoxide (DMSO), độ nuôi cấy tế bào	<ul style="list-style-type: none"> • Hybrimax, Sigma-Aldrich cat# D2650, không chứa endotoxin, không chứa hybridoma • Hoặc sản phẩm tương đương 	Bắt buộc
Huyết tương Bào thai Bò (FBS)		<p>ACTG và HPTN: Tham khảo thông tin về các lô được xác nhận IQA hiện hành.</p> <p>HVTN (và giao thức xử lý cụ thể của mạng lưới chéo với HVTN): FBS được HVTN phê duyệt được mạng lưới cung cấp cho các phòng thí nghiệm ở dạng được bất hoạt bằng nhiệt; không có nơi bán và nhiều FBS được HVTN phê duyệt để mua ngoài chuỗi/quy trình cung ứng HVTN.</p>
Ống đông lạnh	<ul style="list-style-type: none"> • Nunc CryoTubes™, có ren bên trong, ống bằng polypropylene (PP) và nắp vặn #377267 • Greiner Cryotubes, có ren bên trong, nắp vặn bằng vật liệu tự nhiên, bằng polypropylene (PP), đáy tròn, chỗ viết ghi chú, để hình sao, vô trùng #122263 • Corning® 2mL, có ren bên trong, bằng polypropylene, ống chịu lạnh, thẳng đứng với đáy tròn #430488 	<p>Ưu tiên nhãn hiệu Nunc/có ren bên trong bắt buộc cho toàn mạng lưới.</p> <p>Lưu ý cho HVTN: Nunc CryoTubes™ #377267 bắt buộc cho các giao thức xử lý của mạng lưới HVTN. Mọi dụng cụ thay thế đều phải được HVTN phê duyệt trước khi phòng thí nghiệm mua.</p>

Nhãn chịu lạnh	<ul style="list-style-type: none"> • Cryo-Tags® và Cryo-Babies® Brady B461 hoặc B490 • Nhãn chịu lạnh Shamrock. 	Tùy chọn
Bút lông	<ul style="list-style-type: none"> • Bút Lông Fisherband* #13-379 • Bút Phòng thí nghiệm/Bút lông Phòng thí nghiệm Nalgene® #6310/#6311 	Tùy chọn

Phụ lục F: Hướng dẫn Nhanh PBMC SOP—CSTFB

Bắt buộc phải sử dụng Bảng quy trình Xử lý PBMC và LDMS cho toàn mạng lưới (xem Mục 5 để biết chi tiết). Trước khi sử dụng hướng dẫn nhanh này, phải bảo đảm là đã kiểm tra đầy đủ PBMC SOP để biết các lưu ý và chi tiết, hướng dẫn cụ thể cho mạng lưới.

Các bước	Tham khảo SOP
1. Chuẩn bị và làm lạnh CPS.	11.2
2. Chuẩn bị mẫu máu toàn phần, thuốc thử và tiếp liệu.	13.2
3. Nếu các phân chia huyết tương phải tuân theo hướng dẫn về giao thức xử lý: <ol style="list-style-type: none"> Ly tâm máu toàn phần ở 200-400 x g trong 10 phút. Đánh dấu tổng thể tích máu ở mặt khum rồi chuyển huyết tương vào ống ly tâm hình nón 15 hoặc 50mL, đã dán nhãn để xử lý thêm (800-1200 x g trong 10 phút, hãm tùy chọn) Thêm vừa đủ lượng WDR vào máu để đưa về thể tích máu toàn phần ban đầu, trộn nhẹ nhàng và tiếp tục xử lý PBMC. 	13.3
4. Thêm 5mL WDR vào mỗi CSTFB đã dán nhãn và 25mL WDR vào mỗi ống rửa hình nón 50mL tương ứng đã dán nhãn. (Lưu ý: Có thể thực hiện sớm hơn với phần cài đặt [bước 2]).	13.4
5. Chuyển 15-20mL (được phép 12-22) máu vào CSTFB đã dán nhãn. <ol style="list-style-type: none"> Theo dõi thể tích đã đo cẩn thận. Ghi lại UWV đo được đến 0,1mL gần nhất. 	
6. Thêm nước rửa ống WDR và WDR sau cùng vào CSTFB đến 30 mL (WDR + Máu Toàn phần).	
7. Ly tâm ở 800-1000 x g trong 15 phút ở 15°C-30°C với cài đặt KHÔNG HÃM /đặt về 0.	13.5
8. Kiểm tra các ống để tìm các vấn đề có thể xảy ra.	
9. Lấy từng lớp trung gian CSTFB vào ống ly tâm hình nón, 50mL, đã dán nhãn tương ứng, nạp trước 25mL WDR.	
10. Thêm WDR vào QS để có tổng thể tích 45mL và trộn nhẹ nhàng.	15.1
11. Rửa #1 – ly tâm ở 200-400 x g trong 10 phút ở 15°C-30°C, hãm tùy chọn.	
12. Kiểm tra hạt tế bào! Ghi lại những quan sát ngoài dự kiến.	
13. Lấy ra nhẹ nhàng lớp trên mà không làm xáo trộn hạt tế bào.	
14. Tái nhũ tương hạt tế bào này trong một lượng nhỏ WDR tạo nhũ tương tế bào đồng nhất.	15.2
15. Kết hợp đến 4 nhũ tương hạt vào một ống ly tâm hình nón 50mL.	
16. Cho nước rửa ống WDR và WDR 45mL cuối cùng vào ống tế bào.	
17. Rửa #2 – Ly tâm ở 200-400 x g trong 10 phút ở 15°C-30°C, hãm tùy chọn.	
18. Kiểm tra hạt tế bào! Ghi lại những quan sát ngoài dự kiến.	
19. Lấy ra nhẹ nhàng lớp trên mà không làm xáo trộn hạt tế bào.	

Các bước	Tham khảo SOP
20. Tính WDR đếm thể tích tái nhũ tương (V). 21. Kết hợp hạt tế bào vào một ống dùng thể tích tái nhũ tương WDR. Đây là thể tích dựa trên số lượng tế bào. 22. Đếm và tính tổng số tế bào 23. Tính hiệu suất tế bào theo tế bào/mL hoặc máu toàn phần khả dụng.	15.3
24. Tính thể tích tái nhũ tương CPS sau cùng. Kiểm tra các số tính toán.	15.4
25. Hoàn tất in ấn, dán nhãn và QC ống chịu lạnh TRƯỚC khi ly tâm lần cuối.	15.5
26. Ly tâm ở 200-400 x g trong 10 phút ở 15°C-30°C, hãm tùy chọn.	15.6
27. Lấy ra nhẹ nhàng lớp trên mà không làm xáo trộn hạt tế bào. 28. Tái nhũ tương hạt nhẹ nhàng trong CPS lạnh (V_f) trong khi xoay ống để phân phối đều. Chia đều tế bào CPS.	15.7
29. Chuyển ngay (≤ 10 phút từ lúc cho CPS vào mẫu) tất cả ống chịu lạnh vào ngăn làm lạnh điều tốc và cho vào tủ đông lạnh.	15.8
30. Sau một thời gian thích hợp, hãy chuyển các ống chịu lạnh vào thiết bị bảo quản tại chỗ và gửi đi theo thời gian mà mạng lưới quy định.	17
31. Hoàn tất kiểm tra Bảng quy trình Xử lý PBMC và nhập dữ liệu theo hướng dẫn của mạng lưới.	18.1

Phụ lục G: Hướng dẫn Nhanh PBMC SOP—Xếp trên Thủ công

Bắt buộc phải sử dụng Bảng quy trình Xử lý PBMC và LDMS cho toàn mạng lưới (xem Mục 5 để biết chi tiết). Trước khi sử dụng hướng dẫn nhanh này, phải bảo đảm là đã kiểm tra đầy đủ PBMC SOP để biết các lưu ý và chi tiết, hướng dẫn cụ thể cho mạng lưới.

	Tham khảo SOP
Các Bước (Số lượng cho mẫu thể tích nhỏ hơn được <i>in nghiêng</i>).	
1. Chuẩn bị và làm lạnh CPS.	11.2
2. Chuẩn bị mẫu máu toàn phần, thuốc thử và tiếp liệu.	14.2
3. Nếu các phần chia huyết tương phải tuân theo hướng dẫn về giao thức xử lý: a. Ly tâm máu toàn phần ở 200-400 x g trong 10 phút. b. Đánh dấu tổng thể tích máu ở mặt khum rồi chuyển huyết tương vào ống ly tâm hình nón 15mL hoặc 50mL để xử lý thêm (800-1200 x g trong 10 phút, hãm tùy chọn). c. Thêm vừa đủ lượng WDR vào máu để đưa về thể tích máu toàn phần ban đầu, trộn nhẹ nhàng và tiếp tục xử lý PBMC.	14.3
4. Chuyển máu toàn phần vào ống ly tâm hình nón 50mL (<i>15mL</i>), vô trùng và pha loãng bằng WDR, nếu cần. 5. Xếp trên cẩn thận và chậm rãi máu trên phần đầu môi trường gradient tỷ trọng. (Phương pháp Xếp dưới là phương pháp thay thế đã được phê duyệt, trừ những giao thức xử lý của HVTN).	14.4
6. Ly tâm ở 400-800 x g trong 15-30 phút, với <u>KHÔNG HÃM</u> /đặt về 0. 7. Kiểm tra ống ly tâm hình nón để tìm vấn đề. 8. Lấy từng lớp trung gian vào ống ly tâm hình nón, 50mL (<i>15mL</i>) tương ứng.	14.5
9. Cho WDR vào QS đến tổng thể tích 45mL (<i>10mL</i>) và trộn đều. 10. Rửa #1 – ly tâm ở 200-400 x g trong 10 phút ở 15°C-30°C, hãm tùy chọn. 11. Kiểm tra hạt tế bào! 12. Lấy ra nhẹ nhàng lớp trên mà không làm xáo trộn hạt tế bào.	15.1
13. Tái nhũ tương hạt tế bào này trong một lượng nhỏ WDR tạo nhũ tương tế bào đồng nhất. 14. Kết hợp đến 4 nhũ tương hạt vào một ống ly tâm hình nón 50mL (2 vào ống <i>15mL</i>). 15. Cho nước rửa ống WDR và WDR sau cùng đến 45mL (<i>10mL</i>) vào ống tế bào. 16. Rửa #2 – Ly tâm ở 200-400 x g trong 10 phút ở 15°C-30°C, hãm tùy chọn. 17. Kiểm tra hạt tế bào! 18. Lấy ra nhẹ nhàng lớp trên mà không làm xáo trộn hạt tế bào.	15.2
19. Tính WDR đếm thể tích tái nhũ tương (V). 20. Kết hợp hạt tế bào vào một ống dùng thể tích tái nhũ tương WDR. Đây là thể tích dựa trên số lượng tế bào. 21. Đếm và tính tổng số tế bào 22. Tính hiệu suất tế bào theo tế bào/mL hoặc máu toàn phần khả dụng.	15.3
23. Tính thể tích tái nhũ tương CPS sau cùng. Kiểm tra các số tính toán.	15.4
24. Hoàn tất in ấn, dán nhãn và QC ống chịu lạnh TRƯỚC khi ly tâm lần cuối.	15.5
25. Ly tâm ở 200-400 x g trong 10 phút ở 15°C-30°C, hãm tùy chọn.	15.6
26. Lấy ra nhẹ nhàng lớp trên mà không làm xáo trộn hạt tế bào. 27. Tái nhũ tương hạt nhẹ nhàng trong CPS lạnh (V_f) trong khi xoay ống để phân phối đều. Nên làm việc với đá lạnh ẩm. 28. Chia đều tế bào CPS.	15.7

	Tham khảo SOP
Các Bước (Số lượng cho mẫu thể tích nhỏ hơn được <i>in nghiêng</i>).	
29. Chuyển ngay (≤ 10 phút từ lúc cho CPS vào mẫu) tất cả ống chịu lạnh vào ngăn làm lạnh điều tốc và cho vào tủ đông lạnh.	15.8
30. Sau một thời gian thích hợp, hãy chuyển các ống chịu lạnh vào thiết bị bảo quản tại chỗ và gửi đi theo thời gian mà mạng lưới quy định.	17
31. Hoàn tất kiểm tra Bảng quy trình Xử lý PBMC và nhập dữ liệu theo hướng dẫn của mạng lưới.	18.1

Phụ lục H: Lịch sử Sửa đổi từ Phiên bản 6.0 đến 7.0

Phiên bản Ngày Hiệu lực (ngày/tháng/năm)	(Các) Mục	Bản sửa đổi
7.0 19/8/2024	Tất cả	Thêm logo HANC mới vào đầu trang
	Tất cả	Lược bỏ phần tham khảo MTN
	Tất cả	Lược bỏ phần tham khảo IMPAACT
	Tất cả	Cập nhật toàn diện tất cả các mục cho phù hợp với hướng dẫn, giao thức xử lý và thực hành hiện hành.
	Chấp thuận	Lược bỏ giấy phép MTN
	Chấp thuận	Lược bỏ giấy phép IMPAACT
	Chấp thuận	Kathryn Dougherty đã thay John Hural cấp phép HVTN
	8.1.5	Yêu cầu về ống chịu lạnh có ren bên trong cho bảo quản PBMC
	15.4	Phương pháp xếp ống theo ACTG, HPTN và HVTN
6.0 26/4/2018	Chấp thuận	Grace Aldrovandi đã thay Bob Coombs cấp phép HVTN. John Hural đã thay Constance Ducar cấp phép HVTN. Edward Livant đã thay Charlene Dezzutti cấp phép MTN.
	8.1.4	Chỉ thêm các yêu cầu bổ sung vào ngày 7/10/2016 cho các phòng thí nghiệm ACTG và IMPAACT. Cũng đã thêm các yêu cầu liên quan đến ống chịu lạnh bổ sung cho toàn mạng lưới.
	18.2.1	Đã bổ sung hướng dẫn bổ sung liên quan đến tủ đông lạnh đã cài nhiệt độ.
	Phụ lục D	“Phần lớn WBC...” được đổi thành “Hầu hết WBC...”
	Phụ lục G	Thông tin bổ sung vào mục Ống chịu lạnh liên quan đến việc sử dụng ống micro SARSTEDT Nắp vụn.
5.2 22/9/2014	5.1.3	“Phòng thí nghiệm có thể sử dụng Bảng quy trình xử lý PBMC HVTN hoặc sửa đổi cho phù hợp với quy trình của phòng thí nghiệm đó.” đổi thành “Phòng thí nghiệm có thể sử dụng Bảng quy trình xử lý PBMC HVTN , được sửa đổi để tuân thủ các yêu cầu tương ứng của mạng lưới và phù hợp với quy trình của phòng thí nghiệm”.
5.1 30/7/2014	5.1.3	Hướng dẫn theo dõi bảng xử lý PBMC: Tổng số tế bào: “(tùy chọn cho HVTN)” được bổ sung bên cạnh N
	16.4.5	Ghi chú được lược bỏ vì không có frit trong các ống hình nón khi xếp trên hoặc xếp dưới bằng cách thủ công
	16.4.6	Tham khảo Phương pháp Xếp trên được đổi thành 16.4.6.1 và Phương pháp Xếp dưới thành 16.4.6.2

	18.1	Hướng dẫn thời gian bảo quản/chuyển bổ sung cho HPTN, IMPAACT và MTN.
	14, 18.1, 18.3, 18.3.1	"Tủ đông lạnh cơ học LN2/-150°C" đổi thành "Tủ đông lạnh cơ học LN2 dewar hoặc -150°C"
	18.3	Ngôn ngữ đơn giản về PBMC được bảo quản trong tủ đông lạnh cơ học LN2 dewar hoặc -150°C và bỏ điều "lâu hơn 4 tuần".
	18.3.1-18.3.2	Hướng dẫn thời gian chuyển bắt buộc từ "ngày làm việc tiếp theo" đổi thành "Trong vòng 72 giờ"
	18.3.1	"LN2/-150°C" đổi thành "LN2 hoặc -150°C"
	22, 24.2	Xóa tùy chọn RPMI
	Phụ lục E, F	Tham khảo Bước 1 SOP đổi từ "11.3" thành "11.2"
	Phụ lục E	Tham khảo Bước 31 SOP đổi từ "18 hoặc 19" thành "18"
	Phụ lục E	Tham khảo Bước 32 SOP đổi từ "19.2" thành "19.1"
	Phụ lục E	Câu Bước 32 đổi thành "Hoàn tất Bảng quy trình Xử PBMC theo hướng dẫn của mạng lưới".
	Phụ lục F	Các bước 9-12: "16.1" đổi thành "17.1"
	Phụ lục F	Các bước 13-18: "16.2" đổi thành "17.2"
	Phụ lục F	Các bước 19-22: "16.3" đổi thành "17.3"
	Phụ lục F	Tham khảo Bước 30 SOP đổi từ "18 hoặc 19" thành "18"
	Phụ lục F	Tham khảo Bước 31 SOP đổi từ "19.2" thành "19.1"
	Phụ lục F	Câu Bước 31 đổi thành "Hoàn tất Bảng quy trình Xử PBMC theo hướng dẫn của mạng lưới".
5.0 01/5/2014	Chấp thuận	Grace Aldrovandi thay Susan Fiscus để Cấp phép IMPAACT
	5.1.3	Hướng dẫn Theo dõi Bảng Xử lý PBMC: Hướng dẫn: "L = Theo dõi trong LDMS là việc bắt buộc theo LDMS" được đổi thành "L= Trường bắt buộc trong LDMS cho các mẫu của mạng lưới"
	5.1.3	Hướng dẫn theo dõi bảng xử lý PBMC: "Số Mẫu LDMS" đổi thành "ID Mẫu Chung LDMS"
	5.1.3	Các ô tô màu Xám (thể hiện thông tin không cần thiết) được đổi thành màu đen.
	7.1.8	Bổ sung HPTN và MTN
	10.2	Lược bỏ biện pháp thay cho việc sử dụng RPMI làm chất thay thế
	14	Định dạng các thay đổi
	18 và 19	Gộp hướng dẫn bảo quản tạm thời và tại chỗ từ hai mục thành một, Mục 18.
	19	Ngôn ngữ hoàn tất tài liệu xử lý lặp lại trong Mục 18 và 19 được tách ra thành các mục riêng.
	Phụ lục H	Xóa các thay đổi về lịch sử Phiên bản khác, chỉ giữ lại những thay đổi về phiên bản hiện hành thích hợp với tài liệu này.