



กระบวนการปฏิบัติงานมาตรฐานเกี่ยวกับการทำกระบวนการกับ PBMC ข้ามเครือข่าย

ชื่อเรื่อง:	SOP เกี่ยวกับการทำกระบวนการกับ PBMC ข้ามเครือข่าย เวอร์ชัน 8.0		
วันที่จัดทำ:	01 เมษายน 2009	จำนวนหน้าทั้งหมด:	43
วันที่มีผล:	14 มิถุนายน 2026	หมายเลข SOP:	HANC-LAB-P0001 เวอร์ชัน 8.0
เขียนโดย:	คณะทำงานด้าน SOP เกี่ยวกับการทำกระบวนการกับ PBMC ข้ามเครือข่าย	ใช้แทน SOP ที่ลงวันที่:	19 สิงหาคม 2024

อนุมัติโดย (เครือข่าย):	เครือข่าย	ชื่อและตำแหน่ง	ลายมือชื่อ	วันที่
	ACTG	Grace Aldrovandi MD ห้องปฏิบัติการเครือข่าย ACTG ผู้วิจัยหลัก	ลงชื่อเอกสารโดย: <i>Grace Aldrovandi</i> 6BE9A0BACDFE4FA...	DS <i>GA</i>
	HPTN	Estelle Piwowar-Manning, MT (ASCP) SI ห้องปฏิบัติการเครือข่าย HPTN รองผู้อำนวยการ	ลงชื่อเอกสารโดย: <i>Estelle Piwowar-Manning</i> 731B45B052A74D8...	DS <i>EPM</i>
	HVTN	Kathryn Dougherty, MT (ASCP) รองผู้อำนวยการ HVTN คุณภาพและการปฏิบัติตามมาตรฐานห้องปฏิบัติการ	ลงชื่อโดย: <i>Katy Dougherty</i> 7DCF2BEE1F91407...	ชื่อย่อ <i>KD</i>

ประวัติการแก้ไข	สำหรับประวัติการแก้ไขฉบับสมบูรณ์ โปรดดูภาคผนวก I
-----------------	--

ทบทวนโดย (ห้องปฏิบัติการ):	ชื่อและตำแหน่ง	ลายมือชื่อ	วันที่



กระบวนการปฏิบัติงานมาตรฐานเกี่ยวกับการทำกระบวนการกับ PBMC ข้ามเครือข่าย

สารบัญ

1.	จุดประสงค์	3
2.	ขอบเขต	3
3.	ที่มา.....	3
4.	อำนาจและความรับผิดชอบ.....	3
5.	การรายงานผล.....	3
6.	สิ่งส่งตรวจ.....	4
7.	อุปกรณ์.....	5
8.	วัสดุใช้แล้วทิ้ง.....	7
9.	อุปกรณ์ป้องกันส่วนบุคคล.....	7
10.	รีเอเจนต์.....	8
11.	การเตรียมรีเอเจนต์.....	10
12.	บทบาทและแนวทางเกี่ยวกับการทำกระบวนการกับ PBMC.....	13
13.	การแยกเซลล์และการเจือจางเลือดด้วยหลอดแยกเซลล์ที่มีตัวกันแบบฟริด (CSTFB) โดยมีการเปลี่ยนพลาสมา	13
14.	การแยกเซลล์ด้วยไอเวอร์เลย์หรือแอนเดอร์เลย์ตัวกลางเกรเดียนต์ของความหนาแน่นด้วยมือและการเจือจางเลือดด้วยการแยกเซลล์แบบเกรเดียนต์ของความหนาแน่นด้วยมือโดยมีการเปลี่ยนพลาสมา.....	16
15.	การล้าง การนับ การแขวนตะกอนใหม่ ความเข้มข้น และการแช่แข็งข้ามคืนแบบควบคุมอัตรา.....	19
16.	การควบคุมคุณภาพ	23
17.	การจัดเก็บ PBMC (ชั่วคราวหรือในสถานที่).....	24
18.	การกรอกเอกสารเกี่ยวกับการทำกระบวนการ	24
19.	คำจำกัดความและคำย่อ	24
20.	เอกสารอ้างอิง	25
21.	ภาคผนวก	26



กระบวนการปฏิบัติงานมาตรฐานเกี่ยวกับการทำกระบวนการกับ PBMC ช้ำมเครือข่าย

1. จุดประสงค์

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

2. ขอบเขต

- 2.1. กระบวนการนี้จะใช้สำหรับการทำกระบวนการตัวอย่างเลือดสำหรับการแยก การเก็บรักษาในสภาวะเย็นชวดิ่ง และการจัดเก็บตัวอย่าง PBMC
- 2.2. คำแนะนำที่จำเพาะต่อ โครงการวิจัยของเครือข่ายจะใช้แทนคำแนะนำใน SOP นี้

3. ที่มา

- 3.1. PBMC ที่เก็บหรือเก็บรักษาในสภาวะเย็นชวดิ่งใหม่ ๆ จะใช้เพื่อประเมินวัตถุประสงค์ของการศึกษา การสอบวิเคราะห์เหล่านี้ต้องมี PBMC ที่ถูกแยกและเก็บรักษาในสภาวะเย็นชวดิ่งภายใต้สภาวะที่กำหนดไว้อย่างเคร่งครัด ซึ่งจะช่วยให้แน่ใจว่าการฟื้นตัว (recovery) ความอยู่รอดได้ (viability) และความสามารถในการทำหน้าที่ (functionality) ที่เหมาะสมที่สุด การทำกระบวนการและแช่แข็งเลือดภายใน 8 ชั่วโมงนับจากเวลาที่เจาะเลือดเพื่อรักษาการทำหน้าที่สูงสุดของเซลล์ในการสอบวิเคราะห์เพื่อตรวจติดตามภูมิคุ้มกันนั้นเหมาะสมที่สุด

4. อำนาจและความรับผิดชอบ

- 4.1. ผู้อำนวยการ/PI (หรือผู้ได้รับการแต่งตั้ง) ของศูนย์ห้องปฏิบัติการของเครือข่ายจะมีอำนาจในการกำหนด ทบทวน และอัปเดตกระบวนการนี้
- 4.2. สำนักงาน HIV/AIDS Network Coordination (HANC) จะเป็นผู้รับผิดชอบในการบำรุงรักษาและควบคุมเอกสาร SOP
- 4.3. ผู้อำนวยการห้องปฏิบัติการที่ทำกระบวนการจะเป็นผู้รับผิดชอบในการดำเนินการ SOP ของ HANC นี้และตรวจสอบให้แน่ใจว่าบุคลากรที่เหมาะสมทั้งหมดได้รับการฝึกอบรม
- 4.4. บุคลากรทั้งหมดของสถานที่และห้องปฏิบัติการที่มีส่วนเกี่ยวข้องในการเก็บ การทำกระบวนการ และ/หรือการจัดการ PBMC จะเป็นผู้รับผิดชอบในการอ่านและทำความเข้าใจ SOP นี้ก่อนดำเนินการกระบวนการที่อธิบายไว้
- 4.5. ห้องปฏิบัติการทั้งหมดต้องใช้ SOP เกี่ยวกับ PBMC ของ HANC ฉบับปัจจุบันตามที่เขียนไว้เพื่อให้ได้ PBMC สำหรับโครงการวิจัยของเครือข่าย

5. การรายงานผล

- 5.1. เครือข่ายทั้งหมดต้องใช้แผนงานการทำกระบวนการกับ PBMC และระบบการจัดการข้อมูลห้องปฏิบัติการ (LDMS) เพื่อติดตามรายละเอียดการทำกระบวนการหลัก รวมถึงเวลาในการทำกระบวนการ การคำนวณ และการจัดทำเอกสารเกี่ยวกับปัญหาที่เกิดขึ้นในระหว่างการทำกระบวนการ
 - 5.1.1. สำหรับ HPTN และ HVTN ต้องใช้แผนงานการทำกระบวนการกับ PBMC ที่จำเพาะต่อ โครงการวิจัยโดยทั้งหมด เว้นแต่จะหมายเหตุไว้เป็นอย่างอื่นในคำแนะนำห้องปฏิบัติการที่ทำกระบวนการกับสิ่งส่งตรวจ (Processing Laboratory Instruction, SPLI) หรือคู่มือห้องปฏิบัติการ (Laboratory Manual, LM) ของโครงการวิจัย ในกรณีที่ไม่มีต้องใช้แผนงาน PBMC ที่จำเพาะต่อโครงการวิจัย ซึ่งพบได้น้อย อาจใช้แผนงานทั่วไปในภาคผนวก A และที่ <http://www.hanc.info/labs/labresources/procedures/Pages/pbmcSop.aspx>
 - 5.1.2. สำหรับโครงการวิจัยของ ACTG ต้องบันทึกส่วนประกอบทั้งหมดที่บ่งชี้ไว้ในแผนงานการทำกระบวนการกับ PBMC ของ ACTG ในภาคผนวก B
- 5.2. ต้องใช้ LDMS เพื่อบันทึกข้อมูลผู้เข้าร่วมและการทำกระบวนการ สร้างตัวระบุที่ไม่ซ้ำกัน สร้างฉลากโคร โอไอแอล (cryovial) บันทึกสถานที่จัดเก็บ และสร้างรายการการขนส่ง
- 5.3. องค์ประกอบหลักที่จำเป็นสำหรับการติดตามการทำกระบวนการกับ PBMC ได้แก่:

ตารางองค์ประกอบหลัก	
องค์ประกอบหลักสำหรับ การติดตามการทำกระบวนการกับ PBMC	สถานที่บันทึก
ห้องปฏิบัติการที่ทำกระบวนการกับสิ่งส่งตรวจ	W L
ID ของผู้เข้าร่วม	W L
หมายเลขนัดหมาย	W L
โครงการวิจัย	W L
ID ของสิ่งส่งตรวจทั่วโลกของ LDMS	สร้างโดยอัตโนมัติโดย LDMS
วันที่เวลาที่เริ่มทำกระบวนการ	W L



กระบวนการปฏิบัติงานมาตรฐานเกี่ยวกับการทำกระบวนการกับ PBMC ข้ามเครือข่าย

ชื่อของเจ้าหน้าที่เทคนิคที่ทำกระบวนการ (เจ้าหน้าที่เทคนิค)	W L
วิธีการนับ (ชื่อเครื่องมือหรือการนับด้วยมือ)	W
WDR ในปริมาตรของการแขวนตะกอนใหม่สำหรับการนับ (V)	W
ความเข้มข้นเฉลี่ยของจำนวนเซลล์จากการนับ (C)	W
จำนวนเซลล์เป้าหมายต่อไอแอล (N1)	W
จำนวนเซลล์ทั้งหมด (T) = C x V	W L
คำนวณปริมาตรสุดท้ายของการแขวนตะกอนใหม่ของ CPS (V _p)	W
วันที่และเวลาที่ถูกแช่แข็ง	W L
ความคิดเห็นและการเขียนจาก โครงการวิจัย รวมถึง แต่ไม่จำกัดเพียง: • สภาพของสิ่งส่งตรวจที่ไม่คาดคิดทั้งหมด • เลือดที่จับตัวเป็นลิ่ม (จำนวนหลอดที่มีลิ่มเลือด จำนวนหลอดทั้งหมดจากชุดการผลิต (batch) ของ PTID และรายละเอียดการทำกระบวนการ) • เซลล์ที่ได้ที่ต่ำกว่าช่วงที่คาดไว้ • ความผิดปกติในการทำกระบวนการ • ขั้นตอนการแก้ไขปัญหาที่ดำเนินการ • หมายเหตุ หากเวลาทั้งหมด >8 ชั่วโมง • เวลาทำกระบวนการ >4 ชั่วโมง	W
วันที่/เวลาที่เก็บ	W L
รีเอเจนต์ (ผู้ผลิต หมายเลขรุ่นที่ผลิต และวันหมดอายุสำหรับ DMSO, FBS, WDR, CSTFB, ตัวกลางเกรเดียนต์ของความหนาแน่น)	W
เฉพาะ ACTG เท่านั้น: FBS (ผู้ผลิต หมายเลขรุ่นที่ผลิต และวันหมดอายุ)	L
CPS (ปริมาตรของ DMSO และ FBS)	W
ประเภทหลอดตัวอย่าง (HEP/ACD/EDTA/อื่น ๆ)	W L
สภาพของเลือด (เช่น SAT/HEM/CLT)	W L
ปริมาตรของเลือดครบที่สามารถใช้ได้ที่วัดได้	W L
จำนวนเซลล์จากการนับ	W
จำนวนเซลล์จริงต่อไอแอล (N2)	W L
จำนวนโครไอแอลที่ถูกแช่แข็ง	W L
ข้อมูลการจัดเก็บในตู้แช่แข็ง (มอดูลการจัดเก็บของ LDMS)	O L
การยืนยันการควบคุมคุณภาพรีเอเจนต์ด้วยสายตา (เจ้าหน้าที่เทคนิค)	O
เซลล์ที่ได้/มิลลิลิตรของเลือดครบ	W
ปริมาตรของการแขวนตะกอนใหม่ของ CPS ที่ประมาณไว้ (V1)	W
การยืนยันการควบคุมคุณภาพหลอด LDMS สำหรับเนื้อหา/บาร์โค้ด (เจ้าหน้าที่เทคนิค)	W
การยืนยันการขนถ่ายโครไอแอลไปยังสถานที่เก็บกล่องจัดเก็บที่กำหนดโดย LDMS (เจ้าหน้าที่เทคนิค)	W
วันที่/เวลาที่ขนถ่ายโครไอแอลจากหน่วยแช่แข็งแบบควบคุมอัตราไปยังกล่องจัดเก็บ	W
การทบทวนขั้นสุดท้าย ผู้ทบทวน/วันที่	W

W= ต้องทำการติดตามในแผนงาน PBMC

L = ต้องทำการป้อนข้อมูล/ติดตามใน LDMS

O = เลือกได้ว่า จะทำการติดตามในแผนงานหรือสื่อเสริมเกี่ยวกับการติดตามหรือไม่

6. สิ่งส่งตรวจ

6.1. เลือดครบที่ได้สารกันเลือดเป็นลิ่มใหม่ ๆ ที่เก็บตามข้อกำหนดของ โครงการวิจัย

6.2. สภาพะในการจัดการ

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

ตั้งแต่วิธีเก็บจนถึงเมื่อนำส่งไปยังห้องปฏิบัติการที่ทำกระบวนการ

- 6.2.2. ควรนำส่งสิ่งส่งตรวจไปยังห้องปฏิบัติการที่ทำกระบวนการโดยเร็วที่สุด (แนวปฏิบัติที่ดีที่สุดจะอยู่ภายใน 30 นาทีถึง 4 ชั่วโมงหลังจากการเก็บ) เพื่อให้ห้องปฏิบัติการที่ทำกระบวนการมีเวลาเพียงพอในการดำเนินการกระบวนการเก็บรักษาในสถานะเย็นชดชั่งให้เสร็จสิ้น
- คลินิกควรพูดคุยเกี่ยวกับข้อกำหนดจำเพาะกับห้องปฏิบัติการที่ทำกระบวนการก่อนการรับเข้าโครงการวิจัย
- 6.2.3. ห้องปฏิบัติการที่ทำกระบวนการควรทำกระบวนการกับสิ่งส่งตรวจโดยเร็วที่สุดเมื่อได้รับ (แนวปฏิบัติที่ดีที่สุดจะเป็นเริ่มทำกระบวนการภายใน 30 นาทีหลังจากได้รับตัวอย่าง):
- เวลาทำกระบวนการ (เวลาที่เริ่มทำกระบวนการ) คือเวลาที่หลอดถูกเปิดหรือใส่ในเครื่องปั่นเหวี่ยงเป็นครั้งแรก แล้วแต่ว่าเหตุการณ์ใดเกิดขึ้นก่อน
 - เวลาที่ถูกแช่แข็งหมายถึงเวลาเมื่อ:
 - ใส่ StrataCooler[®] ของ Agilent Technologies, Nalgene[®] Mr. Frosty[™] หรือ Corning[®] CoolCell[®] ไว้ในตู้แช่แข็งที่ตั้งไว้ที่ -80°C ดู SPL/LPC/LM สำหรับช่วงอุณหภูมิที่ยอมรับได้ โดยคำนึงถึงความผันผวนของอุณหภูมิตู้แช่แข็งที่เกิดขึ้นเป็นประจำ
 - โปรแกรมทำความเย็นของตู้แช่แข็งแบบควบคุมอัตรา เช่น CryoMed[®] เริ่มทำงานแล้ว
- หมายเหตุ:** ไม่อนุญาตให้ใช้ตู้แช่แข็งแบบควบคุมอัตราสำหรับตัวอย่างของ HVTN
- เวลาทั้งหมดคำนวณจากเวลาเก็บสิ่งส่งตรวจและเวลาที่ถูกแช่แข็ง โดยในอุดมคติ เวลานี้คือ 8 ชั่วโมงหรือน้อยกว่า
 - แต่ควรทำกระบวนการกับสิ่งส่งตรวจทั้งหมดโดยไม่คำนึงถึงเวลาทั้งหมด
 - เวลาทำกระบวนการทั้งหมดคำนวณจากเวลาทำกระบวนการและเวลาที่ถูกแช่แข็ง แนะนำให้น้อยกว่าสี่ชั่วโมง และการทำกระบวนการน้อยกว่า 3 ชั่วโมงเป็นเวลาในอุดมคติ
- 6.2.4. ห้ามแช่เย็นหรือแช่แข็งเลือดครบ ห้ามวางเลือดให้สัมผัสกับอุณหภูมิลดลงโดยตรง หากท่านใช้ถุงประคบเย็นในสถานะที่ร้อนจัด
- 6.3. สิ่งส่งตรวจจริง
- 6.3.1. สิ่งส่งตรวจที่จับตัวเป็นลิ่ม
- 6.3.1.1. ควรทำกระบวนการกับเลือดทั้งหมดโดยไม่คำนึงถึงว่าเลือดจับตัวเป็นลิ่มหรือไม่ เว้นแต่โครงการวิจัยจะมีคำสั่งไว้เป็นอย่างอื่น
- 6.3.1.2. นำลิ่มเลือดออกและทำกระบวนการต่อตามปกติ
- 6.3.1.3. ทำเครื่องหมายสถานะเป็น CLT ในแผ่นงานและใน LDMS ระบุรายละเอียดในหัวข้อความคิดเห็นของแผ่นงานการทำกระบวนการ
- 6.3.2. สิ่งส่งตรวจที่มีเม็ดเลือดแดงแตก
- 6.3.2.1. การแตกของเม็ดเลือดแดง (hemolysis) อาจส่งผลกระทบต่อคุณภาพของ PBMC
- 6.3.2.2. ทำกระบวนการตามปกติ
- 6.3.2.3. ทำเครื่องหมายสถานะเป็น HEM ในแผ่นงานและใน LDMS ระบุรายละเอียดในหัวข้อความคิดเห็นของแผ่นงานการทำกระบวนการ
- 6.3.3. เซลล์ที่ได้ต่ำ
- 6.3.3.1. หากหลังจากดำเนินการนับเซลล์แล้ว เซลล์ที่ได้ไม่เพียงพอต่อความต้องการของโครงการวิจัย
- โปรดติดต่อคลินิกเพื่อขอสิ่งส่งตรวจทดแทนที่เป็นไปได้ หากเซลล์ที่ได้ $\leq 0.4 \times 10^6$ เซลล์/มิลลิลิตร
- โปรดติดต่อคลินิกเพื่อขอตัวอย่างทดแทนที่เป็นไปได้และแจ้งให้ศูนย์ห้องปฏิบัติการของเครือข่าย (HVTN, HPTN) หรือทีมโครงการวิจัย (ACTG) ทราบ
- 6.3.3.2. บันทึกขั้นตอนการแก้ไขปัญหาหรือการทวนสอบข้อมูลที่ดำเนินการในหัวข้อความคิดเห็นของแผ่นงานการทำกระบวนการ
- 6.4. สิ่งส่งตรวจที่ขอมรับไม่ได้
- 6.4.1. สิ่งส่งตรวจที่ไม่ติดฉลากหรือติดฉลากไม่ถูกต้องจะถูกปฏิเสธ
- 6.4.2. ปฏิบัติตามคำแนะนำของเครือข่ายสำหรับการปฏิเสธสิ่งส่งตรวจที่ล่าช้า
- 6.4.3. ตัวอย่างที่รั่ว: แจ้งให้คลินิกทราบหากตัวอย่างใด ๆ รั่วและตัดสินใจว่าตัวอย่างดังกล่าวสามารถใช้ได้หรือไม่
- ความปราศจากเชื้อของตัวอย่างและความปลอดภัยของบุคลากรห้องปฏิบัติการที่จัดการตัวอย่างเป็นสิ่งสำคัญอย่างยิ่ง

7. อุปกรณ์

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

- 7.1.2. เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วต่ำ (สามารถปั่นเหวี่ยงที่ 200 ถึง 1000 x แรงโน้มถ่วง) ที่มีโรเตอร์ที่มีถ้วยใส่หลอดแบบเหวี่ยงไปมา (swinging bucket rotor) ควรเป็นแบบแช่เย็น แต่อุณหภูมิโดยรอบก็ยอมรับได้ ต้องมีถ้วยใส่หลอด (bucket) ที่มีฝาครอบ/ฝาปิด
- 7.1.3. ไมโครปิเปตในช่วง 20, 200, 1000 ไมโครลิตร
- 7.1.4. อุปกรณ์ช่วยปีเปต (Pipet-Aid) (ควรเป็นแบบไร้สาย) สำหรับใช้กับปิเปตทางชีววิทยาแบบใช้แล้วทิ้ง
- 7.1.5. ตู้แช่เย็น 2 ถึง 8°C
- 7.1.6. ตู้แช่แข็ง -20°C (หรือต่ำกว่า) ที่ไม่มีระบบละลายน้ำแข็งอัตโนมัติ (สำหรับการจัดเก็บ FBS)
- 7.1.7. ตู้แช่แข็ง -80°C (-65 ถึง -95°C สำหรับ ACTG, -70 ถึง -95°C สำหรับ HVTN และ HPTN) สำหรับการจัดเก็บ PBMC ระยะสั้น
- 7.1.8. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 37 ถึง 56°C (สำหรับการลดฤทธิ์ FBS ด้วยความร้อน หากจำเป็น) (หมายเหตุสำหรับ HVTN: ไม่จำเป็นสำหรับโครงการวิจัยของ HVTN เครือข่ายเป็นผู้จัดเตรียม FBS ที่ได้รับอนุมัติจาก HVTN ให้ห้องปฏิบัติการในลักษณะที่ถูกลดฤทธิ์ด้วยความร้อนแล้ว (heat inactivated))
- 7.1.9. ถ้วยหรือบีกเกอร์สำหรับสารฟอกขาวหรือสารฆ่าเชื้ออื่น ๆ
- 7.1.10. แท่นวาง (rack) ที่เหมาะสำหรับวางหลอดเก็บเลือด (blood collection tube) ขนาด 15 มิลลิเมตร และหลอดแบบกันแหลมขนาด 50 มิลลิเมตร แบบตั้งขึ้นในระหว่างขั้นตอนการทำกระบวนการและการขนส่ง
- 7.1.11. แท่นวางไครโอไอแอลเพื่อให้สามารถเปิด/ปิด ไครโอไอแอลด้วยมือเดียวในระหว่างขั้นตอนการแอลิควอต (aliquoting) (ควรใช้แท่นวางที่จำเพาะต่อ Nunc)
- 7.2. อุปกรณ์ที่ LDMS ต้องใช้ (ดูข้อกำหนดในเว็บไซต์ LDMS และข้อกำหนดที่จำเพาะต่อเครือข่ายสำหรับรายละเอียด)
- 7.2.1. คอมพิวเตอร์ที่เป็นไปตามข้อมูลจำเพาะที่ Frontier Science กำหนดไว้สำหรับ LDMS บนเว็บไซต์
- 7.2.2. เครื่องพิมพ์สำหรับฉลากที่สร้างด้วย LDMS
- 7.2.3. เครื่องสแกนบาร์โค้ด 2 มิติ
- 7.2.4. ฉลากที่เข้ากันได้กับ LN2 ที่มีพื้นที่พิมพ์ 1x1 นิ้ว
- 7.2.5. ผ้าห่มที่เข้ากันได้กับ LN2 ที่จำเพาะต่อเครื่องพิมพ์ ทนต่อรอยขีดข่วนและสารเคมี
- 7.3. อุปกรณ์ในโตรเจนเหลว (LN2) (หากเครือข่ายต้องการ)
- 7.3.1. ถังจัดเก็บ LN2 ($\leq -140^{\circ}\text{C}$)
- 7.3.2. ถังเก็บ LN2 สำหรับขนส่งแบบแห้งที่ได้รับอนุมัติจาก IATA
- 7.4. การนับเซลล์:
- หมายเหตุ:** วิธีการนับอาจต้องได้รับอนุมัติจากเครือข่าย ปฏิบัติตามกระบวนการเทียบมาตรฐาน (calibration procedure) ของผู้ผลิตที่เกี่ยวข้องหากใช้เครื่องนับเซลล์อัตโนมัติ
- 7.4.1. เครื่องนับเซลล์อัตโนมัติที่สามารถนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (Beckman-Coulter Vi-Cell, Muse[®] หรือสิ่งที่เทียบเท่า) โดยปกติ HVTN ไม่อนุมัติเครื่องนับเซลล์คลาสสิกสำหรับตัวอย่างใหม่ ๆ
- 7.4.2. เครื่องนับเซลล์อัตโนมัติที่ไม่สามารถแยกแยะเซลล์ที่มีชีวิต (Coulter Counter, Abbott Cell-Dyn[®], Sysmex[®] หรือสิ่งที่เทียบเท่า)
- หมายเหตุ:** อาจใช้เครื่องนับเซลล์อัตโนมัติที่ไม่สามารถระบุเซลล์ที่มีชีวิตเพื่อให้ได้จำนวนเซลล์ทั้งหมดจากการนับโดยไม่แยกแยะเซลล์ที่มีชีวิต อย่างไรก็ตาม หากกำลังเตรียมส่งตรวจสำหรับการทดสอบความชำนาญ (Proficiency Testing Program) ในการเก็บรักษาในสภาวะเย็นชวยิ่งสำหรับ PBMC ของ IQA ต้องมีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตจากการนับ
- หมายเหตุสำหรับ HVTN:** หากกำลังจะใช้เครื่องนับอัตโนมัติเพื่อจุดประสงค์ของโครงการวิจัย เครือข่ายแนะนำอย่างยิ่งให้ใช้เครื่องนับคลาสิกนี้ วิธีการนับต้องได้รับการทบทวนและได้รับอนุมัติล่วงหน้าจาก HVTN
- 7.4.3. สไลด์นับเซลล์ด้วยมือ (ซีมาไซโตมิเตอร์) และกล้องจุลทรรศน์ชนิดฟิลด์ (light-field microscope)
- หมายเหตุ:** หากใช้สไลด์นับเซลล์ด้วยมือกับสรีรแบบลู ต้องนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตและนำมาใช้สำหรับการคำนวณเซลล์ หากใช้สรีรสดัวไวโอเลต สามารถใช้จำนวนเซลล์ทั้งหมดจากการนับสำหรับการคำนวณเซลล์
- 7.5. การเก็บรักษาในสภาวะเย็นชวยิ่ง
- หมายเหตุ:** อาจใช้หนึ่งในหน่วยแช่แข็งแบบควบคุมอัตรา (CRFU) ต่อไปนี้ตามคำแนะนำของผู้ผลิต ควรใช้ StrataCooler[®] ของ Agilent Technologies และ Corning[®] CoolCell[®]

หมายเหตุ: หากไม่ปฏิบัติตามคำแนะนำของผู้ผลิต ต้องดำเนินการศึกษาเพื่อตรวจสอบความเที่ยงตรง (validation study)

- 7.5.1. มอดูลการเก็บรักษาในสภาวะเย็นขจัดยิ่ง StrataCooler® ของ Agilent Technologies - 400005
 - 7.5.1.1. StrataCooler® ต้องมีอุณหภูมิ 2 ถึง 8°C ก่อนเริ่มทำให้ไครโอไวแอลเย็นลง ห้ามใส่ไครโอไวแอลใน StrataCooler® ที่มีอุณหภูมิต่ำกว่าอุณหภูมิเริ่มต้นที่ 2°C
- 7.5.2. Corning® (เดิมชื่อ BioCision®) CoolCell®
 - 7.5.2.1. ต้องแน่ใจว่าชิ้นส่วนทั้งหมดของ CoolCell® รวมถึงแหวนกลาง (central ring) กลับสู่อุณหภูมิห้อง (15 ถึง 25°C หรือสูงถึง 30°C โดยขึ้นอยู่กับสภาพภูมิอากาศ) ระหว่างการใช้งานแต่ละครั้ง
- 7.5.3. ภาชนะบรรจุสำหรับการแช่แข็งแบบไครโอ Nalgene® Mr. Frosty™ 1°C/นาทีย
 - 7.5.3.1. ควรเก็บ Mr. Frosty™ ไว้ที่อุณหภูมิโดยรอบ (15 ถึง 25°C หรือสูงถึง 30°C โดยขึ้นอยู่กับสภาพภูมิอากาศ) ระหว่างการใช้งานแต่ละครั้ง
 - 7.5.3.2. ระดับไอโซโพรพานอลต้องถูกต้อง และต้องเปลี่ยนไอโซโพรพานอลทั้งหมดหลังจากรอบการแช่แข็ง-การละลายรอบที่ห้า ต้องใช้บันทึก (log) เพื่อติดตามรอบการแช่แข็ง/การละลายและการเปลี่ยนแปลงของริเอเจนต์ ดูภาคผนวก C
- 7.5.4. ตู้แช่แข็งแบบควบคุมอัตรา เช่น ห้องแช่แข็ง CryoMed® (Gordinier) (หมายเหตุสำหรับ HVTN: ไม่อนุญาตให้ใช้ตู้แช่แข็งแบบควบคุมอัตราสำหรับตัวอย่างของ HVTN)

8. วัสดุใช้แล้วทิ้ง

- 8.1. พลาสติก
 - 8.1.1. ปิเปตทางชีววิทยาแบบใช้แล้วทิ้งขนาด 1, 5, 10, 25, 50 มิลลิลิตร ปราศจากเชื้อ
 - 8.1.2. ปลายไมโครปิเปต 20, 100, 200, 1000 ไมโครลิตร ปราศจากเชื้อ
 - 8.1.3. หลอดปั่นเหวี่ยงแบบใช้แล้วทิ้งแบบกันแหลม มีขีดบอกปริมาตร ทำจากพอลิโพรพิลีน ปราศจากเชื้อขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร
 - 8.1.4. หลอดแยกเซลล์ที่มีตัวกั้นแบบฟรีด (CSTFB) ขนาด 50 มิลลิลิตร แท่ง (ไม่ได้จัดซื้อในรูปแบบเดิมตัวกลางสำหรับการแยกเซลล์ไว้ล่วงหน้า)
 - 8.1.4.1. จำเป็นสำหรับการทำกระบวนการของ HVTN ทบทวน LPC/SPL/LM สำหรับข้อกำหนดที่เฉพาะต่อโครงการวิจัยสำหรับเครือข่ายทั้งหมด
 - 8.1.5. ไวแอลแบบไครโอเจนิค (ไครโอไวแอล) ที่มีเกลียวในขนาด 1.8 มิลลิลิตร ถึง 2 มิลลิลิตร และฝาเกลียวที่มีแหวนรูปตัวโอ ปราศจากเชื้อ ทำจากพอลิโพรพิลีนเท่านั้น ตั้งได้เอง มีขีดบอกปริมาตร กันรั่วได้ ซึ่งผลิตขึ้นสำหรับการเก็บรักษา LN2 ในเฟสไอ (ประมาณ -140°C) ยืนยันการยอมรับ (acceptability) การใช้สิ่งใด ๆ แทนที่ไวแอลแบบไครโอเจนิคกับเครือข่ายก่อนทำการจัดซื้อ (ดูภาคผนวก F)

หมายเหตุ: ต้องไม่ใช่หลอดที่มีฝาแน่น นอกจากนั้น ต้องไม่เติมสารในไครโอไวแอลเกินความจุที่ผู้ผลิตระบุไว้หรือจนถึงด้านบนสุดของหลอด
 - 8.1.6. เลือกได้: ขวด/ขวดรูปหม้อแบบใช้แล้วทิ้งปราศจากเชื้อ คอ 45 มิลลิเมตร ขนาด 250 ถึง 500 มิลลิลิตร สำหรับการรวมเลือดครบในปริมาณมากที่เจมา ก่อนการแยก PBMC
 - 8.1.7. เลือกได้: ปิเปตสำหรับถ่ายสาร (transfer pipet) ที่ทำจากพลาสติกปราศจากเชื้อขนาด 5 มิลลิลิตร ที่บรรจุในซองแยก
 - 8.1.8. เลือกได้: หลอดแยกเซลล์ที่มีตัวกั้นแบบฟรีด (CSTFB) ขนาด 50 มิลลิลิตร ที่เติมสารไว้ล่วงหน้า

หมายเหตุสำหรับ HVTN: ไม่ใช่สิ่งที่เลือกได้สำหรับการศึกษาของ HVTN กำหนดว่าห้องปฏิบัติการต้องจัดซื้อ CSTFB “แท่ง” (นั่นคือ ไม่ได้จัดซื้อในรูปแบบเดิมเติมสารไว้ล่วงหน้า) การใช้ CSTFB อื่น ๆ ต้องได้รับอนุมัติล่วงหน้าจากศูนย์ห้องปฏิบัติการของ HVTN)

8.2. ปากกามาร์กเกอร์

หมายเหตุ: ปากกามาร์กเกอร์สำหรับเขียนบนหลอดและไวแอลควรมีปลายแหลม และหมึกแห้งเร็วไม่ลบเลือน

8.3. ฉลาก

หมายเหตุ: ฉลากและหมึกแบบไครโอเจนิคต้องเหมาะสำหรับ -80°C หรืออุณหภูมิในการจัดเก็บ LN2 ในเฟสไอ

9. อุปกรณ์ป้องกันส่วนบุคคล

หมายเหตุ: ต้องมีอุปกรณ์ป้องกันส่วนบุคคลที่เหมาะสมสำหรับใช้กับจุลชีพก่อโรคทางเลือด ปฏิบัติตามแนวทางและแนวปฏิบัติสำหรับการจัดการผลิตภัณฑ์เลือดของห้องปฏิบัติการในท้องถิ่น

- 9.1. เสื้อคลุมหรือชุดคลุมสำหรับใส่ในห้องปฏิบัติการ



กระบวนการปฏิบัติงานมาตรฐานเกี่ยวกับการทำกระบวนการกับ PBMC ข้ามเครือข่าย

- 9.2. อุปกรณ์ป้องกันดวงตา
- 9.3. ถุงมือไนไตรล์ชนิดไม่มีแป้งหรือสิ่งที่เทียบเท่า
- 9.4. ถุงมือไครโอ
- 9.5. กระบังป้องกันใบหน้า (ที่มีแผ่นปิดคาง หากข้อบังกับด้านชีวนิรภัยในห้องเย็นแนะนำว่าควรมีหรือกำหนดไว้) ซึ่งจำเป็นเมื่อทำงานกับ LN2

10. รีเอเจนต์

- 10.1. ต้องจัดซื้อรีเอเจนต์ปราศจากเชื้อและใช้เทคนิคปลอดเชื้อ (aseptic technique)
 - 10.1.1. เก็บขวดที่เปิดแล้วไว้ที่อุณหภูมิที่ผู้ผลิตแนะนำจนกว่าจะใช้หมด จนกว่าจะได้รับคำแนะนำให้ทิ้งด้านล่าง หรือจนกว่าจะถึงวันหมดอายุของผู้ผลิต แล้วแต่ว่าเหตุการณ์ใดเกิดขึ้นก่อน
 - 10.1.2. ดูภาคผนวก F สำหรับผลิตภัณฑ์ที่แนะนำ
 - 10.1.3. ทิ้งหากมีร่องรอยการปนเปื้อนที่สามารถมองเห็นได้ เช่น มีลักษณะขุ่น
- 10.2. รีเอเจนต์สำหรับการล้างและการเจือจาง (WDR)
 - 10.2.1. 1X สารละลายเกลือสมดุลของแฮงก์ส (Hanks' Balanced Salt Solution, HBSS) ที่ไม่มีแคลเซียมหรือแมกนีเซียมแบบพร้อมใช้งาน
 - 10.2.2. 1X น้ำเกลือที่บัฟเฟอร์ด้วยฟอสเฟต (Phosphate-Buffered Saline, PBS) ที่ไม่มีแคลเซียมหรือแมกนีเซียมแบบพร้อมใช้งาน
- 10.3. ตัวกลางเกรเดียนต์ของความหนาแน่น (ความหนาแน่น 1.077 กรัม/มิลลิลิตร)
 - 10.3.1. ตัวกลางปราศจากเชื้อแบบพร้อมใช้งานสำหรับการแยกลิ้มโพไซต์ของมนุษย์จากเลือดส่วนปลาย ซึ่งได้ลิ้มโพไซต์ในปริมาณมาก
 - 10.3.2. ดูภาคผนวก F สำหรับผลิตภัณฑ์ที่แนะนำ
- 10.4. หลอดแยกเซลล์ที่มีตัวกั้นแบบฟริด (CSTFB หากใช้) จำเป็นสำหรับ HVTN เว้นแต่จะมีหมายเหตุทางเลือกไว้ใน SPL/LPC/LM ที่จำเพาะต่อโครงการวิจัย

- 10.4.1. ระบบ CSTFB ที่ไม่เคมิสตร (รวม CSTFB แห่งกับตัวกลางเกรเดียนต์ของความหนาแน่น 1.077)
 - 10.4.1.1. ปลอ่ยให้ตัวกลางเกรเดียนต์ของความหนาแน่น (DGM) อยู่ที่อุณหภูมิห้อง (15 ถึง 25°C หรือสูงถึง 30°C โดยขึ้นอยู่กับสภาพภูมิอากาศ) ปกป้องให้พ้นแสง
 - 10.4.1.2. ทำงานใน BSC โดยปฏิบัติตามเทคนิคปลอดเชื้อ
 - 10.4.1.3. บันทึกข้อมูล CSTFB และ DGM ที่เกี่ยวข้องโดยตรงจากบรรจุภัณฑ์หรือขวดที่ใช้ลงในแผ่นงาน PBMC CSTFB ที่เตรียมไว้ล่วงหน้าต้องมียกเลิกที่มีข้อมูลที่เป็นทั้งหมด วันที่เตรียม และชื่อของบุคคลที่เตรียมหลอด
 - 10.4.1.4. เตรียมหลอดโดยการเปิดปริมาตรของ DGM ที่เหมาะสำหรับขนาดของหลอด CSTFB ที่ใช้ (ตามหมายเหตุด้านล่าง)

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

- 10.4.1.5. ปิดฝา CSTFB พร้อมกับเติม DGM และปั่นเหวี่ยงที่ 800 x แรงโน้มถ่วง เป็นเวลา 30 วินาที (หรือตั้งเวลาต่ำสุดมากกว่า 30 วินาที) ที่อุณหภูมิห้อง (15 ถึง 25°C หรือสูงถึง 30°C โดยขึ้นอยู่กับสภาพภูมิอากาศ)
- 10.4.1.6. ตอนนี้ DGM ควรอยู่ที่ตัวกั้นแบบฟริด ตรวจสอบหลอดเพื่อหาช่องว่างหรือฟองอากาศขนาดใหญ่ระหว่างชั้น DGM และตัวกั้นแบบฟริด หรือเพื่อหา DGM ที่ยังคงอยู่เหนือฟริด
- 10.4.1.7. หากมีช่องว่างหรือฟองอากาศขนาดใหญ่ได้ฟริด ให้เติมตัวกลางเพิ่มเติม ปั่นเหวี่ยง CSTFB อีกครั้งที่ 800-1000 x แรงโน้มถ่วง เป็นเวลา 30 วินาทีถึง 1 นาที (เลือกการตั้งค่าเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ต่ำสุด) และตรวจสอบซ้ำ
- 10.4.1.8. หากมีช่องว่าง (DGM) เหนือฟริด ให้ปั่นเหวี่ยง CSTFB อีกครั้งที่ 800-1000 x แรงโน้มถ่วง เป็นเวลา 30 วินาทีถึง 1 นาที (เลือกการตั้งค่าเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ต่ำสุด) หากสารละลายเกรเดียนต์ของความหนาแน่นใด ๆ ยังคงอยู่เหนือฟริดหลังจากการปั่นเหวี่ยงซ้ำ ให้นำออกโดยปฏิบัติตามเทคนิคปลอดเชื้อ
- 10.4.1.9. ปฏิบัติตามคำแนะนำในการจัดเก็บตัวกลางเกรเดียนต์ของความหนาแน่นของผู้ผลิต
- 10.4.2. CSTFB ที่เคมิสตรไว้ล่วงหน้า (ตัวกลางเกรเดียนต์ของความหนาแน่น 1.077)

หมายเหตุ: ความจุของหลอดที่จำเป็นจะขึ้นอยู่กับปริมาณของเลือดครบ เก็บในตู้แช่เย็น (2 ถึง 8°C)

หมายเหตุสำหรับ HVTN: ไม่อนุญาตให้ใช้ CSTFB ที่จัดซื้อในรูปแบบเดิมสารไว้ล่วงหน้า

- ปกป้องให้พ้นแสง
- ลักษณะขุ่นบ่งชี้ถึงการเสื่อมสภาพของผลิตภัณฑ์ หากสังเกตเห็นร่องรอยการปนเปื้อนที่สามารถมองเห็นได้
- ปลอ่ยให้ CSTFB ที่เดิมสารไว้ล่วงหน้าอยู่ที่อุณหภูมิห้อง (15 ถึง 25°C หรือสูงถึง 30°C โดยขึ้นอยู่กับสภาพภูมิอากาศ) ก่อนใช้งาน

10.5. รีเอเจนต์สำหรับการแช่แข็ง

- 10.5.1. ต้องมีซีรัมจากตัวอ่อนวัว (Fetal Bovine Serum, FBS) ที่ถูกกลดฤทธิ์ด้วยความร้อน (ดูหัวข้อ 11.1 FBS ที่ถูกกลดฤทธิ์ด้วยความร้อนสำหรับรายละเอียดการจัดการและการบริหารจัดการ)

หมายเหตุสำหรับ HVTN และการศึกษาร่วมของ HVTN-HPTN: เครือข่ายเป็นผู้จัดเตรียม FBS ที่ได้รับอนุมัติจาก HVTN ให้ห้องปฏิบัติการ และห้ามจัดซื้อนอกห้องใช้อุปทาน/กระบวนการของ HVTN

หมายเหตุสำหรับการศึกษาร่วมของ HVTN-ACTG: เรื่องนี้จะพิจารณาเป็นรายโครงการวิจัย

หมายเหตุสำหรับการศึกษาของ ACTG: มีรุ่นที่ผลิตของ FBS ที่ได้รับอนุมัติจำนวนจำกัด โปรดดูที่ <https://www.actg-impact-lc.org> ภายใต้อาไร resources > documents สำหรับข้อมูลการสั่งซื้อ FBS ในปัจจุบันและรายการรุ่นที่ผลิตที่ได้รับอนุมัติ โปรดตรวจสอบให้แน่ใจว่าได้ป้อนชื่อผู้ผลิต หมายเลขรุ่นที่ผลิต และวันหมดอายุของ FBS ใน LDMS แล้ว

- 10.5.1.1. ตรวจสอบรายชื่อผู้จำหน่ายที่ควรเลือกกับเครือข่ายที่เกี่ยวข้อง
- 10.5.1.2. ขอใบรับรองผลการวิเคราะห์ (certificate of analysis) จากผู้จำหน่ายเก็บไว้เป็นบันทึกเกี่ยวกับการควบคุมคุณภาพของห้องปฏิบัติการในห้องเย็น
- หมายเหตุ: อาจต้องใช้สำเนาใบรับรองผลการวิเคราะห์ FBS ในการส่งออก (หรือนำเข้า) แอลกอฮอล์ของ PBMC ระหว่างประเทศ
- 10.5.1.3. FBS ที่เก็บแบบแช่แข็ง ($\leq -20^{\circ}\text{C}$ /ตามคำแนะนำของผู้ผลิต) สามารถใช้ได้จนถึงวันหมดอายุของผู้ผลิต
- 10.5.1.4. FBS ที่ละลายแล้วและเก็บไว้ที่ 2 ถึง 8°C จะมีความคงตัวเป็นเวลาหนึ่งเดือนปฏิทิน

10.5.2. ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) เกรดสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์

- 10.5.2.1. ใช้ DMSO เกรดสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์
- 10.5.2.2. เก็บขวดที่ยังไม่ได้เปิดไว้ที่อุณหภูมิห้อง (15 ถึง 25°C หรือสูงถึง 30°C โดยขึ้นอยู่กับสภาพภูมิอากาศ) ตรวจสอบขวดเพื่อดูวันหมดอายุและทั้งหากหมดอายุ
- 10.5.2.3. เมื่อเปิดแล้ว DMSO ที่ยังไม่เจือจาง เมื่อปกป้องให้พ้นแสงและความชื้น จะมีความคงตัวที่อุณหภูมิห้อง (15 ถึง 25°C หรือสูงถึง 30°C โดยขึ้นอยู่กับสภาพภูมิอากาศ) เป็นเวลา 6 เดือน (หรือจนถึงวันหมดอายุของผู้ผลิต หากวันดังกล่าว < 6 เดือนนับจากวันที่เปิด) แก้วหลอดขวดให้ตรงกับวันหมดอายุใหม่
- 10.5.2.4. ใช้เทคนิคปลอดเชื้อเมื่อนำ DMSO ออกจากขวดเพื่อหลีกเลี่ยงการปนเปื้อนที่อาจเกิดขึ้นได้
- 10.5.2.5. หึ่งสิ่งที่อยู่ในขวดที่เปิดแล้วหากสังเกตเห็นร่องรอยการปนเปื้อนที่สามารถมองเห็นได้
- 10.5.2.6. อาจแอลกอฮอล์รีเอเจนต์ในปริมาณเล็กน้อยเพื่อช่วยรักษาความปราศจากเชื้อ คัดลอกแอลกอฮอล์ด้วย “DMSO” ชื่อผู้ผลิต หมายเลขรุ่นที่ผลิต วันที่เปิด/แอลกอฮอล์ วันหมดอายุ (หากเดือนนับจากวันที่เปิดหรือวันหมดอายุจากขวดดั้งเดิม แล้วแต่ว่าวันใดจะถึงก่อน) และชื่อของเจ้าหน้าที่เทคนิค ปกป้องแอลกอฮอล์ให้พ้นแสง

10.5.3. สารฆ่าเชื้อ

- 10.5.3.1. ขวดสเปรย์สารฆ่าเชื้อเอทานอล 70% โดยปริมาตร/ปริมาตร
- 10.5.3.2. ถ้วยหรือปิเกตอร์และขวดสเปรย์สำหรับสารฟอกขาว 10% โดยปริมาตร/ปริมาตร (ต้องทำเป็นรายวัน)
- 10.5.3.3. สารฆ่าเชื้ออื่น ๆ ตามที่ระบุไว้ในนโยบายของห้องปฏิบัติการในห้องเย็น

10.6. รีเอเจนต์สำหรับการนับเซลล์

หมายเหตุ: ข้อกำหนดสำหรับรีเอเจนต์สำหรับการนับจะแตกต่างกันได้โดยขึ้นอยู่กับวิธีการที่ใช้ ดู SOP/คำแนะนำที่ได้รับอนุมัติจากเครือข่ายสำหรับวิธีการที่ใช้ ไม่อนุญาตให้ใช้กรดแคลเซียมแอสซิดสำหรับการนับด้วยมือของ HVTN

- 10.6.1. สารละลายทริแพนบลู 0.4%

- 10.6.2. เลือกได้: สามารถใช้สารละลายคริสตัลไวโอเล็ต 0.05% ในการย้อมสีนิวเคลียสของเซลล์ เพื่อให้สามารถระบุและนับเซลล์ที่มีนิวเคลียสเดียวโดยใช้ไมโครสโคปอัตโนมัติ หากต้องการดูความอยู่รอดได้ ต้องดำเนินการนับด้วยมือครั้งที่สองโดยใช้สัทธิเพนบรู สารละลายคริสตัลไวโอเล็ต 0.05% มี: สัทธิเพนบรู 0.05 กรัม, กรดแกลเชิลแอซิดิก 2 มิลลิกรัม และ H₂O กลับหรือปราศจากไอออน 98 มิลลิกรัม

11. การเตรียมรีเอเจนต์

11.1. FBS ที่ถูกลดฤทธิ์ด้วยความร้อน (HI-FBS)

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

หมายเหตุสำหรับ HVTN: เครือข่ายเป็นผู้เตรียม FBS ที่ได้รับอนุมัติจาก HVTN ให้ห้องปฏิบัติการ ในลักษณะที่ถูกลดฤทธิ์ด้วยความร้อนแล้ว ต้องขอ FBS ที่ได้รับอนุมัติจาก HVTN ผ่านทางห่วงโซ่อุปทาน/กระบวนการเกี่ยวกับ FBS ของ HVTN

- 11.1.1. นำ FBS ออกจากตู้แช่แข็ง
- 11.1.2. ควรละลายในตู้แช่เย็น (2 ถึง 8°C) หรือละลายเป็นเวลาหลายชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง (15 ถึง 25°C หรือสูงถึง 30°C โดยขึ้นอยู่กับสภาพภูมิอากาศ) ห้ามปล่อยให้ FBS อยู่ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาใด ๆ ที่นานกว่าที่จำเป็นในการดำเนินการกระบวนการละลายให้เสร็จสิ้น
- 11.1.3. ค่อย ๆ หมุนหลอดสองหรือสามครั้งตลอดเวลาที่ทำการละลาย
- 11.1.4. ปฏิบัติตามคำแนะนำเพิ่มเติมหาก FBS ไม่ถูกลดฤทธิ์ด้วยความร้อน หากผู้ผลิตทำการลดฤทธิ์ของ FBS ด้วยความร้อนแล้ว ให้ข้ามไปที่ 11.1.5
- 11.1.4.1. ใส่ FBS ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 56°C (55 ถึง 57°C) ตรวจสอบอุณหภูมิของอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิอย่างสม่ำเสมอ อุณหภูมิที่สูงกว่านี้สามารถทำให้ส่วนประกอบของ FBS เสื่อมสภาพได้
- หมายเหตุ:** ระดับน้ำในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิควรระดับของ FBS ในขวด แต่ไม่ควรถึงฝาขวด การทำเช่นนี้จะช่วยให้แน่ใจว่ามีการให้ความร้อน FBS เท่า ๆ กันและหลีกเลี่ยงการปนเปื้อน
- 11.1.4.2. เมื่ออุณหภูมิของอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิลบมาที่ 56°C (55 ถึง 57°C) ให้ความร้อน FBS เป็นเวลา 30 นาที โดยทำการผสมทุก 5 ถึง 10 นาที การให้ความร้อนเป็นเวลานานกว่านี้สามารถทำให้ส่วนประกอบของ FBS เสื่อมสภาพได้
- หมายเหตุ:** ทำความสะอาดขวดด้วยเอทานอล 70% โดยปริมาตร/ปริมาตร ก่อนเปิด
- 11.1.5. ค่อย ๆ ผสม HI-FBS แต่ทั้งนี้โดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อ
- 11.1.6. แอลกอฮอล์ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงแบบกันแหลม มีขีดบอกปริมาตร ทำจากพอลิโพรพิลีน ปราศจากเชื้อขนาด 50 มิลลิกรัม ที่ติดฉลากแล้ว หรือแอลกอฮอล์ชนิดอื่น ๆ ที่เหมาะสมสำหรับปริมาณงานที่คาดไว้
- หมายเหตุ:** ฉลากควรระบุว่าหลอดเหล่านี้เป็น "HI-FBS" และระบุชื่อผู้ผลิต หมายเลขวันที่ผลิต วันที่แอลกอฮอล์ สภาพะในการจัดเก็บ วันหมดอายุดั้งเดิมของผู้ผลิต และชื่อของเจ้าหน้าที่เทคนิค FBS มีความคงตัวเป็นเวลา 1 เดือน (หากช่วงเวลา 1 เดือนไม่เกินวันหมดอายุดั้งเดิมของผู้ผลิต) ที่ 2 ถึง 8°C หรือจนถึงวันหมดอายุดั้งเดิมของผู้ผลิตหากเก็บไว้ที่ -20°C อย่าลืมอัปเดตวันหมดอายุและสถานะในการจัดเก็บบนแอลกอฮอล์/ขวดที่นำออกจากการจัดเก็บ -20°C เพื่อใช้งาน
- 11.1.7. แช่เย็น (2 ถึง 8°C) หลอดแอลกอฮอล์ในจำนวนที่จำเป็นสำหรับปริมาณงานที่คาดไว้ ผสมให้เข้ากันดีก่อนใช้งาน ควรแช่แข็งหลอดแอลกอฮอล์ที่ไม่ต้องใช้ทันที และหลอดแอลกอฮอล์จะมีความคงตัวจนถึงวันหมดอายุดั้งเดิมของผู้ผลิต
- หมายเหตุ:** รอบการแช่แข็ง/การละลายซ้ำ ๆ จะมีผลไม่พึงประสงค์ต่อคุณภาพของ FBS ห้ามแช่แข็งแอลกอฮอล์ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิแช่เย็นซ้ำอีก
- 11.1.7.1. ในการใช้แอลกอฮอล์ที่ถูกแช่แข็ง ควรละลายล่วงหน้าในตู้แช่เย็นข้ามคืน หรือละลายที่อุณหภูมิห้อง (15 ถึง 25°C หรือสูงถึง 30°C โดยขึ้นอยู่กับสภาพภูมิอากาศ) เป็นเวลาหลายชั่วโมง ห้ามปล่อยให้ FBS อยู่ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาใด ๆ ที่นานกว่าที่จำเป็นในการดำเนินการกระบวนการละลายให้เสร็จสิ้น
- 11.1.7.2. เมื่อละลายแล้ว FBS จะมีความคงตัวเป็นเวลา 1 เดือนที่ 2 ถึง 8°C หรือวันหมดอายุจากขวดดั้งเดิม แล้วแต่ว่าวันใดจะถึงก่อน อย่าลืมอัปเดตวันหมดอายุและสถานะในการจัดเก็บบนแอลกอฮอล์/ขวดที่นำออกจากการจัดเก็บ -20°C เพื่อใช้งาน ผสมให้เข้ากันดีก่อนใช้งาน



กระบวนการปฏิบัติงานมาตรฐานเกี่ยวกับการทำกระบวนการกับ PBMC ข้ามเครือข่าย

11.2. สารละลายสำหรับการเก็บรักษาในสภาวะเย็นชดขึ่ง (CPS) ใหม่ ๆ

11.2.1. ส่วนประกอบของ CPS

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

11.2.2. สำหรับการเตรียม CPS ให้ใช้วิธีที่ 1 สำหรับ HVTN และ HPTN และวิธีที่ 2 สำหรับ ACTG

หมายเหตุสำหรับ ACTG: เมื่อใช้วิธีที่ 2 สำหรับ ACTG ให้ข้ามไปที่หัวข้อ 11.2.7

11.2.3. วิธีที่ 1: การเตรียม CPS สำหรับ HVTN/HPTN

หมายเหตุ: นี่คือการดัดแปลงของ HANC/วิธีการในปัจจุบันของ HVTN และ HPTN ในการประมาณปริมาตร CPS ที่จำเป็นล่วงหน้าก่อนทำกระบวนการ ใช้เมื่อกำหนดจำนวนเซลล์เป้าหมายต่อไวแอล (N1) และปริมาตรสุดท้ายของเอลิคอด (V2) แต่จำนวนเอลิคอดแตกต่างกันโดยขึ้นอยู่กับจำนวนเซลล์ทั้งหมดที่เก็บได้

11.2.3.1. ใช้หลอดปั่นเหวี่ยงแบบกันแหลมขนาด 15 มิลลิลิตร หรือ 50 มิลลิลิตร แบบใช้แล้วทิ้ง ปราศจากเชื้อ และติดฉลากแล้วเพื่อบรรจุ CPS ที่เตรียมไว้

11.2.3.2. เตรียม CPS ล่วงหน้า โดยในอุดมคติควรเตรียมก่อนเริ่มทำกระบวนการ และทำให้เย็นในตู้แช่เย็น (2 ถึง 8°C) สามารถเก็บ CPS ไว้ที่ 2 ถึง 8°C เป็นเวลาสูงสุด 1 วันทำการ (<18 ชั่วโมง)

หมายเหตุ: การผสม DMSO และ FBS เป็นปฏิกิริยาแบบคายความร้อน (exothermic reaction) บันทึกเวลาที่วางชุดการผลิตของ CPS ในตู้แช่เย็นและตรวจสอบให้แน่ใจว่าได้ทำให้เย็นอย่างต่ำ 30 นาที ที่ 2 ถึง 8°C ก่อนใช้งาน หากจำเป็นต้องใช้ CPS อย่างเร่งด่วน ให้ทำให้เย็นในอ่างน้ำแข็งควบคุมอุณหภูมิ (น้ำแข็งเปียกและน้ำ) อย่างต่ำ 15 นาที ก่อนใช้งาน

11.2.3.3. ต้องรักษา CPS ไว้ที่ 2 ถึง 8°C เพื่อหลีกเลี่ยงความเสียหายที่จะเกิดกับเซลล์ ห้ามใช้ CPS ที่ไม่เป็นไปตามข้อกำหนดขั้นต่ำสำหรับการทำให้เย็นที่ระบุไว้ข้างต้น

11.2.3.4. ใช้สูตรด้านล่างนี้เพื่อประมาณปริมาตรของ CPS ในการเตรียมการแขวนตะกอนใหม่ขั้นสุดท้ายของ PBMC ล่วงหน้าเมื่อจำนวนเอลิคอดไม่คงที่ ตัวอย่างแสดงอยู่ด้านล่าง

$$\text{ปริมาตรเลือดครบสูงสุด (มิลลิลิตร)} \times \text{เซลล์ที่ได้ (เซลล์/มิลลิลิตร)} \times \text{ความเข้มข้นของ}$$

$$\text{การแช่แข็งจนแข็ง (มิลลิลิตร/เซลล์)} = \text{CPS ที่ประมาณไว้ (มิลลิลิตร)}$$

$$\text{สัดส่วนผลลัพธ์นี้ขึ้นให้เป็นค่ามิลลิลิตรเต็มถัดไป}$$

หมายเหตุ:

สำหรับปริมาตรเลือดครบสูงสุด: ใช้ปริมาตรทั้งหมดของเลือดครบที่เป็นไปได้สูงสุดที่จะทำกระบวนการ คุณจำนวนหลอดตามตารางเวลาสำหรับการเก็บตัวอย่างด้วยความจุของปริมาตรทั้งหมด ซึ่งคือ เลือด + สารกันเลือดเป็นลิ่มชนิดของเหลวของแต่ละหลอดเพื่อให้ได้ปริมาตรทั้งหมดนี้ (นั่นคือ ให้ถือว่าหลอด NaHep ขนาด 10 มิลลิลิตร, หลอด EDTA ขนาด 10 มิลลิลิตร และหลอด ACD ขนาด 8.5 มิลลิลิตร (ความจุของเลือดครบ 8.5 มิลลิลิตร + สารกันเลือดเป็นลิ่มชนิดของเหลว 1.5 มิลลิลิตร) แต่ละหลอดมีความจุของปริมาตร 10 มิลลิลิตร)

สำหรับเซลล์ที่ได้: ใช้ผลที่ได้โดยเฉลี่ยของผู้ใหญ่ที่ 1.5 ล้านเซลล์/มิลลิลิตร เป็นค่าเริ่มต้น อาจมีการยกเว้นในกรณีที่เหมาะสม (นั่นคือ เมื่อทราบว่าผู้เข้าร่วมมีเซลล์ที่สูงกว่า 3.0 ล้านเซลล์/มิลลิลิตร)

สำหรับความเข้มข้นของการแช่แข็งจนแข็ง: ใช้ปริมาตรสุดท้ายของเอลิคอด (V2) และจำนวนเซลล์เป้าหมายต่อเอลิคอด (N1) ที่กำหนดไว้ใน SPL/LPC/LM ที่จำเพาะต่อโครงการวิจัย บันทึกเป็น V2/N1

ตรวจสอบติดตามการใช้ CPS รายวันเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพให้สูงที่สุดและลดของเสียให้ต่ำที่สุด และปรับตามความจำเป็น ตัวอย่างเช่น หากการคำนวณทำให้ได้ปริมาตรของ CPS ที่ไม่เพียงพอเป็นประจำ นั่นคือ ต้องทำการผลิตหลายชุดเพื่อทำกระบวนการให้เสร็จสิ้น ให้พิจารณาเพิ่มปริมาตรสุดท้ายเป็นอัตราร้อยละที่คงที่ เช่น 20% และสัดส่วนขึ้นให้เป็นค่ามิลลิลิตรเต็มถัดไป

ตัวอย่าง: เลือดของผู้ใหญ่—ชุดการผลิตรายวันของ CPS - นัดหมายตามตารางเวลาหลายครั้ง:

- ความเข้มข้นเป้าหมายของการแช่แข็งจนแข็ง (มิลลิลิตร/เซลล์) สำหรับทั้งหมดคือ (1.0 มิลลิลิตร/15 x 10⁶ เซลล์) หรือ 15 ล้านเซลล์ (N1) ที่ถูกแช่แข็งใน CPS 1 มิลลิลิตร (V2)

- คำนวณปริมาตรทั้งหมดของเลือดครบสูงสุดที่คาดไว้:

หมายเหตุ: อย่าลืมหาปริมาณเลือดเป็นลิตรของเหลวเมื่อคำนวณปริมาตรทั้งหมดสูงสุดจากหลอด ACD หลอด NaHep และ EDTA

ไม่มีสารกันเลือดเป็นลิตรของเหลว ดังนั้น ปริมาตรของหลอดตามที่บันทึกไว้ในคำขอของห้องปฏิบัติการจึงเป็นปริมาตรสูงสุดที่เป็นไปได้

- น้ดหมายตามตารางเวลาครั้งแรกรวมถึงหลอด ACD 18 x 8.5 มิลลิตร สำหรับการทำกระบวนการกับ PBMC
- น้ดหมายตามตารางเวลาครั้งที่สองรวมถึงหลอด ACD 8 x 8.5 มิลลิตร สำหรับการทำกระบวนการกับ PBMC
- น้ดหมายตามตารางเวลาครั้งที่สามรวมถึงหลอด NaHep 8 x 10.0 มิลลิตร สำหรับการทำกระบวนการกับ PBMC
- หลอดทั้งหมดที่คาดไว้ (18+8+8) = 34, 34 หลอด x 10.0 มิลลิตร = ปริมาตรสูงสุดที่คาดไว้ 340.0 มิลลิตร

เลือดครบที่สามารถใช้ได้ x	เซลล์ที่ได้ x	ความเข้มข้นของการแช่แข็งจนแข็ง =	CPS ที่ประมาณไว้ที่จะเตรียม
(340.0 มิลลิตร) x	(1.5 x 10 ⁶ เซลล์/1 มิลลิตร) x	(1.0 มิลลิตร/15 x 10 ⁶ เซลล์) =	34.0 มิลลิตร

ตัวอย่าง: เลือดของผู้ใหญ่—การเก็บเลือดในปริมาตรมากหนึ่งครั้ง ความเข้มข้นเป้าหมายของการแช่แข็งจนแข็ง (มิลลิตร/เซลล์) คือ (1.0 มิลลิตร/15 x 10⁶ เซลล์) หรือ 15 ล้านเซลล์ที่ถูกแช่แข็งใน CPS 1 มิลลิตร (V2) ชุดการผลิตของ CPS ที่สร้างขึ้นหลังจากวัด UWBV

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

ตัวอย่าง: เลือดของผู้ใหญ่—การเก็บเลือด NaHep 8 x 10.0 มิลลิตร ความเข้มข้นเป้าหมายของการแช่แข็งจนแข็ง (มิลลิตร/เซลล์) คือ (1.0 มิลลิตร/10 x 10⁶ เซลล์) หรือ 10 ล้านเซลล์ (N1) ที่ถูกแช่แข็งใน CPS 1 มิลลิตร (V2) ชุดการผลิตของ CPS ที่สร้างขึ้นหลังจากวัด UWBV

เลือดครบที่สามารถใช้ได้ x	เซลล์ที่ได้ x	ความเข้มข้นของการแช่แข็งจนแข็ง	CPS ที่ประมาณไว้ที่จะเตรียม
(80.0 มิลลิตร) x	(1.5 x 10 ⁶ เซลล์/1 มิลลิตร) x	(1.0 มิลลิตร/10x10 ⁶ เซลล์) =	12.0 มิลลิตร

11.2.4. ใช้สูตรต่อไปนี้ในการคำนวณปริมาณ DMSO และ FBS ที่จำเป็น

$$CPS = DMSO\ 1\ ส่วน + FBS\ 9\ ส่วน$$

ตัวอย่าง:

ปริมาตรของ CPS ที่ประมาณไว้	ปริมาตรของ DMSO = (.1) (ปริมาตรของ CPS)	ปริมาตร HI-FBS = ปริมาตร CPS - ปริมาตร DMSO	ปริมาตรทั้งหมดของ CPS = ปริมาตร DMSO + ปริมาตร FBS
10.0 มิลลิตร	1.0 มิลลิตร	9.0 มิลลิตร	10.0 มิลลิตร
5.0 มิลลิตร	0.5 มิลลิตร	4.5 มิลลิตร	5.0 มิลลิตร

11.2.5. บันทึกปริมาตรของ CPS, DMSO และ FBS ในแผ่นงาน PBMC และนำไปบันทึกวันที่และเวลาที่สร้าง

รวมทั้งชื่อของบุคคลที่สร้างชุดการผลิตในแผ่นงานและหลอดแบบกันแหลมด้วยเช่นกัน

11.2.6. หากมีการสร้างชุดการผลิตที่สองเพื่อทำกระบวนการให้เสร็จสิ้น โปรดอย่าลืมนับที่กรวยละเอียดเดียวกันนี้สำหรับชุดการผลิตเพิ่มเติมในแผ่นงาน รวมถึงวิธีการ/เวลาในการทำให้เย็น

11.2.7. **วิธีที่ 2: การเตรียม CPS สำหรับ ACTG**

หมายเหตุ: นี่คือวิธีการของ ACTG ในการประมาณปริมาตร CPS

ใช้เมื่อกำหนดจำนวนเซลล์ควอดสูงสุดสำหรับนัดหมายแต่ละครั้งและปริมาตรสุดท้ายของแอลิวอด (V2)

11.2.7.1. ใช้หลอดปั่นเหวี่ยงแบบกันแหลมขนาด 15 มิลลิตร หรือ 50 มิลลิตร แบบใช้แล้วทิ้ง ปราศจากเชื้อ และคิดค่าแล้วเพื่อบรรจุ CPS ที่เตรียมไว้

11.2.7.2. เตรียม CPS ล่วงหน้า โดยในอุดมคติควรเตรียมก่อนเริ่มทำกระบวนการ และทำให้เย็นในตู้แช่เย็น (2 ถึง 8°C) สามารถเก็บ CPS ไว้ที่ 2 ถึง 8°C เป็นเวลาสูงสุด 1 วันทำการ (<18 ชั่วโมง)

หมายเหตุ: การผสม DMSO และ FBS เป็นปฏิกิริยาแบบคายความร้อน บันทึกเวลาที่วางชุดการผลิตของ CPS

ในตู้แช่เย็นและตรวจสอบให้แน่ใจว่าได้ทำให้เย็นอย่างต่ำ 30 นาที ที่ 2 ถึง 8°C ก่อนใช้งาน หากจำเป็นต้องใช้ CPS อย่างเร่งด่วน

ให้ทำให้เย็นในอ่างน้ำแข็งควบคู่หมุ่ (น้ำแข็งเปียกและน้ำ) อย่างต่ำ 15 นาทีก่อนใช้งาน

- 11.2.7.3. ต้องรักษา CPS ไว้ที่ 2 ถึง 8°ซ เพื่อหลีกเลี่ยงความเสียหายที่จะเกิดกับเซลล์ ห้ามใช้ CPS ที่ไม่เป็นไปตามข้อกำหนดขั้นต่ำสำหรับการทำให้เย็นที่ระบุไว้ข้างต้น
- 11.2.7.4. กำหนดปริมาณที่ต้องการ โดยอิงตามจำนวนแอลกอฮอล์สูงสุดต่อหน่วยตามที่กำหนดในโครงการวิจัย หรือปริมาณของชุดการผลิตเพิ่มเติมที่ต้องการเพื่อให้เป็นไปตาม V_f ที่จำเป็นในปัจจุบัน
- 11.2.7.5. เติมปริมาตร CPS อีก 10-20% ที่ต้องการเพื่อชดเชยการสูญเสียที่อาจเกิดขึ้นระหว่างขั้นตอนการผสม/การปิด และปิดเศษผลผลิตขึ้นให้เป็นจำนวนเต็มถัดไป
- 11.2.7.6. สถานการณ์ A: จำนวนแอลกอฮอล์สูงสุดที่ทนต่อหน่วย
- ตัวอย่าง:* ตารางเวลาในห้องปฏิบัติการมีนัดหมายสำหรับ PBMC สองครั้ง ซึ่งต้องการจำนวนแอลกอฮอล์สูงสุดที่อนุญาตให้ใช้ได้ต่อแอลกอฮอล์ต่อหน่วย ปริมาตรต่อแอลกอฮอล์ (V2) ที่จำเพาะต่อโครงการวิจัยคือ 1.0 มิลลิตร รวมทั้งหมดสูงสุดต่อแอลกอฮอล์สำหรับวันนั้น ๆ คูณจำนวนแอลกอฮอล์ด้วย V2 เพื่อหา FBS ที่ต้องการ เติมปริมาตรเพิ่มเติม เช่น 10% เพื่อชดเชยการสูญเสียระหว่างการผสม/การปิด ปิดเศษขึ้นให้เป็นจำนวนเต็มถัดไปสำหรับปริมาตรสุดท้ายของ CPS ที่จะทำ
- $(8 \times 1.0 \text{ มิลลิตร} = 8.0 \text{ มิลลิตร}, 8.0 \text{ มิลลิตร} \times 1.1 = 8.8 \text{ มิลลิตร})$ (ปิดเศษขึ้นให้เป็นปริมาตรสุดท้ายที่ 9.0 มิลลิตร)
- 11.2.8. ใช้สูตรด้านล่างนี้ในการคำนวณปริมาณ DMSO และ FBS ที่จำเป็น

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

ตัวอย่าง:

ปริมาตรของ CPS ที่ประมาณไว้	ปริมาตรของ DMSO = (.1) (ปริมาตรของ CPS)	ปริมาตร HI-FBS = ปริมาตร CPS - ปริมาตร DMSO	ปริมาตรทั้งหมดของ CPS = ปริมาตร DMSO + ปริมาตร FBS
10.0 มิลลิตร	1.0 มิลลิตร	9.0 มิลลิตร	10.0 มิลลิตร
5.0 มิลลิตร	0.5 มิลลิตร	4.5 มิลลิตร	5.0 มิลลิตร

- 11.2.9. บันทึกปริมาตรของ CPS, DMSO และ FBS ในแผ่นงาน PBMC และนำไปบันทึกวันที่และเวลาที่สร้าง รวมทั้งชื่อของบุคคลที่สร้างชุดการผลิตในแผ่นงานและหลอดแบบกันแหลมด้วยเช่นกัน
- 11.2.10. หากมีการสร้างชุดการผลิตที่สองเพื่อทำการกระบวนการให้เสร็จสิ้น โปรดอย่าลืมบันทึกรายละเอียดเดียวกันนี้สำหรับชุดการผลิตเพิ่มเติมในแผ่นงาน รวมถึงวิธีการ/เวลาในการทำให้เย็น

12. บทนำและแนวทางเกี่ยวกับการทำกระบวนการกับ PBMC

มีหลักการและขั้นตอนมาตรฐานที่ใช้กันทั่วไปในกระบวนการทำกระบวนการกับ PBMC ทั้งหมด การแปรผันจะเกิดขึ้นจากตัวเลือกเทคนิคการแยก (CSTFB เทียบกับ โอเวอร์เลย์ด้วยมือ) การดำเนินการกับเลือด (การเจือจาง โดยมือหรือไม่มีการเปลี่ยนแปลงสมาธิกับการเก็บพลาสมาโดยตรง) ความเข้มข้นสุดท้ายของเซลล์ และการแช่แข็ง/การจัดเก็บ เลือกว่าข้อกระบวนการที่เหมาะสมสำหรับการแยกเซลล์และการดำเนินการกับเลือด และการแช่แข็งและการจัดเก็บตามข้อกำหนดของเครือข่ายและโครงการวิจัย

13. การแยกเซลล์และการเจือจางเลือดด้วยหลอดแยกเซลล์ที่มีตัวกันแบบฟรีด (CSTFB) โดยมีการเปลี่ยนแปลงสมาธิ

หัวข้อ 13 สามารถใช้ได้สำหรับเครือข่ายทั้งหมด ตรวจสอบข้อกำหนดของโครงการวิจัยและสื่อที่มี ใช้หัวข้อ 13 หรือหัวข้อ 14 สำหรับตัวอย่างที่กำหนดให้ใด ๆ แต่ไม่ใช่ทั้งสองหัวข้อ

- 13.1. การแยกภูมิโไฟซ์จากเลือดส่วนปลายโดยใช้หลอดแยก CSTFB ที่มีการเติมตัวกลางเกรเดียนต์ของความหนาแน่น (DGM) ที่อุณหภูมิห้อง (15 ถึง 25°ซ หรือสูงถึง 30°ซ โดยขึ้นอยู่กับสภาพภูมิอากาศ)
- 13.1.1. ดำเนินการปิดและการผสมทั้งหมดในตู้ชีวนิรภัย (BSC) คลาส II ระดับที่ 2 หรือสูงกว่า
- 13.1.2. สเปรย์บนพื้นผิว แท่นวาง และขวดรีเอเจนต์ทั้งหมดด้วยเอทานอล 70% โดยปริมาตร/ปริมาตรหรือสารฆ่าเชื้อที่เทียบเท่าทุกครั้งก่อนเข้าและใช้ BSC
- 13.1.3. ดำเนินกระบวนการที่อุณหภูมิห้อง (15 ถึง 25°ซ หรือสูงถึง 30°ซ โดยขึ้นอยู่กับสภาพภูมิอากาศ) เว้นแต่จะหมายเหตุไว้เป็นอย่างอื่น
- 13.1.4. ใช้ปิเปตใหม่สำหรับหมายเลขประจำตัวผู้เข้าร่วม (participant identification number, PTID) แต่ละหมายเลขและสารเติมแต่ง
- 13.2. เตรียมตัวอย่างเลือดครบ รีเอเจนต์ และวัสดุสิ้นเปลือง



กระบวนการปฏิบัติงานมาตรฐานเกี่ยวกับการทำกระบวนการกับ PBMC ข้ามเครือข่าย

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

หมายเหตุ: ควรเตรียมชุดการผลิตของ CPS ล่วงหน้าก่อนเริ่มขั้นตอนการทำกระบวนการกับสิ่งส่งตรวจ ต้องตรวจติดตามปริมาณของชุดการผลิต และบันทึกรายละเอียดทั้งหมดของการสร้างชุดการผลิตเพิ่มเติม (เมื่อจำเป็น) ในแผนงาน PBMC

- 13.2.2. เตรียมหลอด CSTFB ให้เพียงพอสำหรับการปริมาณเลือดสูงสุดที่คาดไว้

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

- 13.2.2.2. ตัวอย่าง:

- นัดหมายที่ 1 มีหลอด NaHep 3 x 10.0 มิลลิลิตร เตรียมหลอด CSTFB 2 หลอด
- นัดหมายที่ 10 มีหลอด ACD 10 x 8.5 มิลลิลิตร เตรียมหลอด CSTFB 5 หลอด

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

- 13.2.4. ตรวจสอบหลอด CSTFB ที่เดิมสารแล้วด้วยสายตาเพื่อยืนยันว่าไม่มีฟองอากาศขนาดใหญ่ ช่องว่างอยู่ระหว่าง DGM และตัวกั้นแบบพรีต และไม่มี DGM อยู่เหนือพรีตก่อนเติม WDR หรือเลือดลงในหลอด (ดูคำแนะนำในการเตรียม CSTFB ในหัวข้อ 10.4 สำหรับคำแนะนำเกี่ยวกับการจัดการกับปัญหาปริมาณของ DGM เมื่อมีหมายเหตุไว้)

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

ขนาดของ CSTFB (มิลลิลิตร)	ขนาดของหลอดปั่นเหวี่ยงแบบกันแหลม (มิลลิลิตร)
50	50

- 13.2.6. หากต้องการเปลี่ยนพลาสติก รวบรวมหลอดปั่นเหวี่ยงแบบกันแหลม มีขีดบอกปริมาตร ทำจากพอลิโพรพิลีน ปราศจากเชื้อขนาด 15 หรือ 50 มิลลิลิตร ที่เหมาะสมสำหรับปริมาตรที่จำเป็นของพลาสติกที่จะเก็บ คัดลอกด้วย PTID สารกันเลือดเป็นลิ่ม และอนุพันธ์ (derivative)

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

- 13.2.8. ตรวจสอบ PTID บนหลอดเลือดทั้งหมดที่ได้รับอย่างระมัดระวัง จัดระเบียบหลอดปฐมภูมิเพื่อไม่ให้มีโอกาสที่หลอดจะผสมปะปนกันระหว่าง PTID/PID หรือสารกันเลือดเป็นลิ่ม

ข้อเสนอแนะ: วางหลอดทั้งหมดสำหรับ PTID แต่ละหมายเลข/สารกันเลือดเป็นลิ่มแต่ละชนิดในตำแหน่งหนึ่งตำแหน่ง สามารถใช้ตำแหน่งคนละตำแหน่งเพื่อแยก PTID หรือประเภทหลอด และใช้ปากกามาร์กเกอร์ที่มีสีต่างกันสำหรับ PTID แต่ละหมายเลขเพื่อหลีกเลี่ยงความสับสน

13.3. การเปลี่ยนพลาสติก

หมายเหตุ: ดำเนินขั้นตอนการเปลี่ยนพลาสติกเฉพาะในกรณีที่ต้องการแอลกอฮอล์ของพลาสติกจากหลอดเก็บ PBMC ตามโครงการวิจัยหรือ SPL/LPC/LM เท่านั้น ไปที่ขั้นตอนที่ 13.4 หากไม่ต้องการแอลกอฮอล์ของพลาสติก

- 13.3.1. ต้องทำกระบวนการกับหลอดเก็บเลือดจาก PTID เดียวกันและสารกันเลือดเป็นลิ่มเดียวกันแยกกัน (ไม่รวมในหลอดปั่นเหวี่ยงแบบกันแหลมขนาด 50 มิลลิลิตร) เว้นแต่จะบ่งชี้ไว้เป็นอย่างอื่นใน SPL/LPC/LM ที่จำเพาะต่อโครงการวิจัย

- 13.3.2. ทำเครื่องหมายปริมาตรของเลือดครบบนหลอดเก็บแต่ละหลอดที่เมนิสคัส (meniscus)

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

- 13.3.4. ถ่ายพลาสติกไปยังหลอดปั่นเหวี่ยงแบบกันแหลม 15 หรือ 50 มิลลิลิตร ที่คัดลอกแล้วสำหรับการปั่นเหวี่ยงครั้งที่สองเพื่อนำเศษชิ้นส่วนเซลล์ใด ๆ ออก

- 13.3.5. เติม WDR ในปริมาณที่เพียงพอเพื่อให้เลือดกลับมามีเลือดครบในปริมาณดั้งเดิม ค่อย ๆ ผสม และทำกระบวนการกับ PBMC ต่อในขั้นตอนที่ 13.4

- 13.3.6. ทำกระบวนการกับพลาสติกให้เสร็จสิ้นด้วยการปั่นเหวี่ยงพลาสติกที่เก็บมาที่ 800 ถึง 1200 x แรงโน้มถ่วง เป็นเวลา 10 นาทีเพื่อให้ได้แอลกอฮอล์ PL2 หรือตามโครงการวิจัยหรือ SPL/LPC/LM ขั้นตอนนี้อาจเกิดขึ้นในภายหลังเมื่อไม่ได้ใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงสำหรับการทำกระบวนการกับ PBMC



กระบวนการปฏิบัติงานมาตรฐานเกี่ยวกับการทำกระบวนการกับ PBMC ข้ามเครือข่าย

- 13.3.7. แอลกอฮอล์พลาสมาที่อุกป็นคู่ (double spun) ลงในหลอดแอลกอฮอล์ที่ติดฉลากแล้วตามที่ SPL/LPC/LM ที่จำเพาะต่อโครงการวิจัยระบุไว้ และทิ้งเศษชิ้นส่วนเซลล์ที่เหลือ

13.4. การเจือจางเลือดสำหรับการแยก CSTFB

หมายเหตุ: ใช้หลอดขนาด 50 มิลลิเมตร หนึ่งหลอดสำหรับเลือดครบแต่ละ 12 ถึง 20 มิลลิเมตร ใช้หลอด CSTFB มากเท่าที่จำเป็นเพื่อกระจายเลือดทั้งหมดสำหรับ PID/PTID แต่ละหมายเลข

หมายเหตุ: ตัวกลางเกรเดียนต์ของความหนาแน่นเป็นพิษต่อเซลล์ ควรทำงานอย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพในระหว่างขั้นตอนการแยก

- 13.4.1. ติดฉลาก CSTFB และหลอด “ล้าง” สำหรับการปั่นเหวี่ยงแบบกันแหลมปราศจากเชื้อที่สอดคล้องกันแต่ละหลอดด้วย PTID (และสารกันเลือดเป็นลิ่ม หากเหมาะสม)

- 13.4.2. เติม WDR ลงใน CSTFB ที่เตรียมไว้และติดฉลากแล้วแต่ละหลอดโดยใช้ปิเปตทางซีรัมวิทยาปราศจากเชื้อ:

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

- 13.4.3. เติม WDR ลงในหลอด “ล้าง” สำหรับการปั่นเหวี่ยงแบบกันแหลมปราศจากเชื้อที่ติดฉลากไว้ล่วงหน้าแต่ละหลอดโดยใช้ปิเปตทางซีรัมวิทยาปราศจากเชื้อ:

ขนาดของ CSTFB (มิลลิเมตร)	ขนาดของหลอดปั่นเหวี่ยงแบบกันแหลม (มิลลิเมตร)	ปริมาตรที่เติมไว้ล่วงหน้าของ WDR (มิลลิเมตร)
50	50	25

- 13.4.4. เปิดฝาหลอดเลือดที่ใส่สารกันเลือดเป็นลิ่ม หากไม่จำเป็นต้องมีการเปลี่ยนพลาสมา/ไม่ได้ดำเนินการขั้นตอนการเปลี่ยนพลาสมา

ให้บันทึกเวลาที่นำฟาออกเป็นเวลาที่เริ่มทำกระบวนการในแผนงาน PBMC

- 13.4.5. หากเลือดในหลอดเก็บจับตัวเป็นลิ่มหรือมีเม็ดเลือดแดงแตกที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า (grossly) ดูหัวข้อ 6.3

- 13.4.6. ใช้ปิเปตทางซีรัมวิทยาปราศจากเชื้อเพื่อค่อย ๆ ผสมเลือดครบ แล้วถ่ายเลือดลงใน CSTFB ที่ติดฉลากแล้ว

หมายเหตุ: ต้องถ่ายเลือดโดยใช้ปิเปตทางซีรัมวิทยา 10 มิลลิเมตร ในปริมาณที่วัดได้ที่ 10.0 มิลลิเมตร จนกระทั่งเหลือน้อยกว่า 10.0 มิลลิเมตร กระจายเลือดในหลอด CSTFB หลายหลอด โดยมีการเพิ่มขึ้นอย่างคงที่เพื่อให้แน่ใจว่าจะสามารถติดตามปริมาตรได้อย่างแม่นยำสำหรับการวัด UWBV ตลอดจนการกระจายเลือดครบ

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

ขนาดของ CSTFB (มิลลิเมตร)	ปริมาตรโดยประมาณของเลือด (มิลลิเมตร)*
50	15-20 (12 ถึง 22 จะอนุญาตให้ใช้ได้บางสถานการณ์)

*ปริมาตรของเลือดที่ต่ำกว่านี้ โดยเฉพาะเมื่อมีมาโทคริตต่ำ อาจทำให้บัพไฟโคต (buffy coat) ตกลงมากล้นกับบนฟริต ทำให้เก็บได้ยาก ปริมาตรของเลือดที่สูงกว่านี้อาจส่งผลให้มีส่วนประกอบที่ไม่สำคัญ (background)/เศษชิ้นส่วนในสิ่งส่งตรวจมากขึ้น ดูแนวทางที่จำเพาะต่อโครงการวิจัยสำหรับปริมาตรของการเจาะเลือดที่ต่ำกว่านี้

- 13.4.8. กำหนดและบันทึกการวัดปริมาตรของเลือดครบที่สามารถใช้ได้ อย่างแม่นยำภายใน 0.1 มิลลิเมตร

หมายเหตุ: ปริมาตรของเลือดครบที่สามารถใช้ได้ไม่จำเป็นต้องเท่ากับขนาดของหลอด

- 13.4.9. ก่อัว (rinse) หลอดเลือดที่ใส่สารกันเลือดเป็นลิ่มดั้งเดิมแต่ละหลอดที่มี WDR โดยใช้ปิเปตปราศจากเชื้อ เติมปริมาตรที่กล้างลงใน CSTFB โดยต้องแน่ใจว่าไม่เกินขีดจำกัดของปริมาตรทั้งหมดของหลอด (WDR + เลือดครบ)

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

- 13.4.10. ปิดฝา CSTFB อย่างระมัดระวัง

13.5. การปั่นเหวี่ยงความหนาแน่นและการเก็บ CSTFB

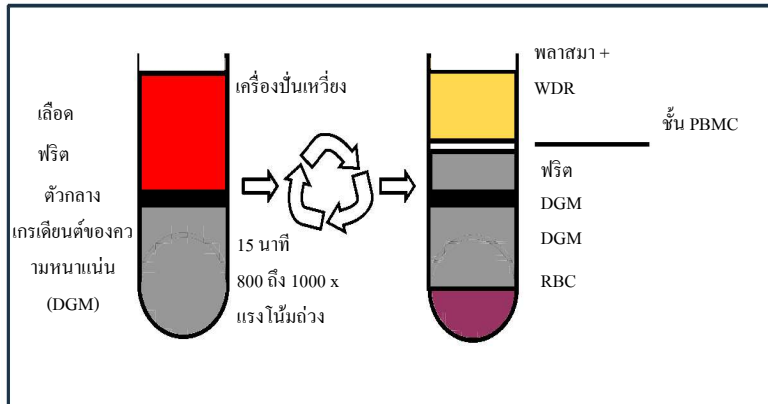
- 13.5.1. จับหลอดในลักษณะตั้งขึ้น วางลงในแท่นวาง และขนถ่ายไปยังเครื่องปั่นเหวี่ยง

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

หมายเหตุ: หากเปิดเบรกไว้ จะทำให้ชั้นแตกได้

- 13.5.3. ในขณะที่หลอด CSTFB กำลังปั่นอยู่ ให้ทิ้งหลอดเก็บทั้งหมดที่ทดสอบจนว่างเปล่าแล้วโดยปฏิบัติตามแนวปฏิบัติทางห้องปฏิบัติการ
ทำความสะอาดพื้นผิวของ BSC และจัดระเบียบสำหรับขั้นตอนถัดไป
- 13.5.4. ยืนยันว่ามีหลอดปั่นเหวี่ยงแบบกันแหลมปราศจากเชื้อที่ติดฉลากแล้วที่เติม WDR ไว้ล่วงหน้า (หลอด “ล้าง”) ในจำนวนที่ถูกต้องพร้อมอยู่ใน BSC
สำหรับขั้นตอนการเก็บ/การล้าง
- 13.5.5. เมื่อเครื่องปั่นเหวี่ยงหยุดสนิทแล้ว ค่อย ๆ นำ CSTFB แต่ละหลอดออกจากเครื่องปั่นเหวี่ยงเพื่อไม่ให้รบกวนชั้นต่าง ๆ
ใช้แท่นวางเพื่อรองรับหลอดและขนถ่ายไปยัง BSC อย่างระมัดระวัง
- 13.5.6. การปั่นเหวี่ยงทำให้สิ่งที่อยู่ในหลอดแบ่งตัวเป็นชั้นที่แตกต่างกันหกชั้น ซึ่งรวมถึงฟริตด้วย จากด้านบนของหลอด ชั้นเหล่านี้ ได้แก่:

- พลาสมา + WDR
- ชั้น PBMC
- ตัวกลางเกรเดียนต์ของความหนาแน่น (DGM)
- ฟริต
- ตัวกลางเกรเดียนต์ของความหนาแน่น (DGM)
- เซลล์เม็ดเลือดแดง (RBC)
ที่อัดแน่นและเกรนูลโลไซด์



- 13.5.7. ตรวจสอบหลอดเพื่อหาปัญหาที่อาจเกิดขึ้นได้ต่อไปนี้ บันทึกการสังเกตและการดำเนินการติดตามผลใด ๆ
ที่ดำเนินการตามข้อกำหนดของเครือข่ายและห้องปฏิบัติการ
- การแตกของเม็ดเลือดแดงในชั้นพลาสมา + WDR
 - ลิ่มเลือดที่สามารถมองเห็นได้บนฟริตหลังจากการปั่นเหวี่ยง
 - ชั้น PBMC ไม่ดีเนื่องจากข้อผิดพลาดในการปั่นเหวี่ยง เช่น เวลาเร่งความเร็วหรือการเบรก ชั้น PBMC จะดูเล็กและไม่ชัดเจน ขณะที่ชั้นพลาสมา + WDR อาจดูเล็กน้อย ดูภาคผนวก D สำหรับการแก้ไขปัญหา
 - ชั้น PBMC ที่เกิดขึ้นบนฟริตเนื่องจากจำนวนของ RBC จากการนับหรือปริมาตรของฮีมาโทคริตที่ต่ำ
 - ชั้น RBC ที่อยู่ติดกับได้และสัมผัสกับชั้น PBMC
- 13.5.8. นำส่วนพลาสมา-WDR สีค่อนข้างเหลืองด้านบนออกจนถึงภายใน 1 ถึง 2 เซนติเมตร ของแถบ PBMC สีขาวขุ่นที่อยู่ตรงรอยต่อ (interface)
ระหว่างส่วนพลาสมา-WDR (สีค่อนข้างเหลือง) และสารละลายตัวกลางสำหรับการแยกที่มีลักษณะใสโดยใช้ปิเปตทางชีววิทยาปราศจากเชื้อใหม่สำหรับ
PTID แต่ละหมายเลข ระมัดระวังการกวนชั้นเซลล์ในระหว่างกระบวนการนี้ ทั้งส่วนพลาสมา-WDR ตามนโยบายของห้องปฏิบัติการ
- หมายเหตุ:** ในอีกทางเลือกหนึ่ง อาจนำแถบ PBMC สีขาวขุ่นออกโดยการสอดปิเปตผ่านชั้นพลาสมา-WDR ด้านบนอย่างระมัดระวัง
- 13.5.9. เก็บเซลล์ทั้งหมดที่รอยต่อสีขาวขุ่นเหนือฟริตโดยใช้ปิเปตทางชีววิทยาปราศจากเชื้อ ใช้ความระมัดระวังไม่ดูดตัวกลาง
เกรเดียนต์ของความหนาแน่นออกมาเกินกว่าที่จำเป็น
- 13.5.9.1. ถ่ายเซลล์ที่เก็บมาจาก CSTFB หนึ่งหลอดไปยังหลอด “ล้าง”
สำหรับการปั่นเหวี่ยงแบบกันแหลมปราศจากเชื้อที่ติดฉลากไว้ล่วงหน้าที่สอดคล้องกันหลอดเดียว (ที่เตรียมตามหมายเหตุในหัวข้อ 13.4) เติม WDR
ในหลอดไว้ล่วงหน้าเพื่อประหยัดเวลา
- 13.5.10. ปิดฝา CSTFB ที่มีเซลล์เม็ดเลือดแดงและตัวกลางสำหรับการแยกที่เหลืออีกครั้ง ทั้ง CSTFB
โดยถือเป็นของเสียอันตรายทางชีวภาพ โดยปฏิบัติตามนโยบายของห้องปฏิบัติการ

13.6. ต้องแน่ใจว่าบันทึกของกระบวนการทั้งหมดตามข้อกำหนดของเครือข่ายและห้องปฏิบัติการแล้ว ไปที่หัวข้อ 15

14. การแยกเซลล์ด้วยโอเวอร์เลย์หรืออินเตอร์เลย์ตัวกลางเกรเดียนต์ของความหนาแน่นด้วยมือและการเจือจางเลือดด้วยการแยกเซลล์แบบเกรเดียนต์ของความหนาแน่นด้วยมือโดย มีการเปลี่ยนพลาสมา

หัวข้อ 14 สามารถใช้ได้สำหรับเครือข่ายทั้งหมด ตรวจสอบข้อกำหนดของโครงการวิจัยและสื่อที่มี ใช้หัวข้อ 13 หรือหัวข้อ 14 สำหรับตัวอย่างที่กำหนดให้ใด ๆ
แต่ไม่ใช่ทั้งสองหัวข้อ



กระบวนการปฏิบัติงานมาตรฐานเกี่ยวกับการทำกระบวนการกับ PBMC ข้ามเครือข่าย

หมายเหตุสำหรับ HVTN: HVTN ไม่แนะนำให้ใช้วิธีอื่นต่อเซลล์ ต้องได้รับอนุมัติวิธีอื่นต่อเซลล์ล่วงหน้าจากศูนย์ห้องปฏิบัติการของ HVTN ก่อนใช้สำหรับสิ่งส่งตรวจของโครงการวิจัย

14.1. การแยกผิวไฟโซต์จากเลือดส่วนปลายโดยใช้วิธีโอเวอร์เลย์ตัวกลางเกรเดียนต์ของความหนาแน่นด้วยมือ

- 14.1.1. ดำเนินการปั่นและผสมทั้งหมดในตู้ชีวนิรภัย (BSC) คลาส II ระดับที่ 2 หรือสูงกว่า
- 14.1.2. สเปรย์บนพื้นผิว แทนวาง และขวดรีเอเจนต์ทั้งหมดด้วยเอทานอล 70% โดยปริมาตร/ปริมาตรทุกครั้งก่อนเข้าและใช้ BSC
- 14.1.3. ดำเนินกระบวนการที่อุณหภูมิห้อง (15 ถึง 25°C หรือสูงถึง 30°C โดยขึ้นอยู่กับสภาพภูมิอากาศ) เว้นแต่จะหมายเหตุไว้เป็นอย่างอื่น
- 14.1.4. ใช้ปิเปตใหม่สำหรับหมายเลขประจำตัวผู้เข้าร่วม (participant identification number, PTID) แต่ละหมายเลขและสารเคมีแต่ง

14.2. เตรียมตัวอย่างเลือดครบ รีเอเจนต์ และวัสดุสิ้นเปลือง

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

หมายเหตุ: ควรเตรียมชุดการผลิตของ CPS ล่วงหน้าก่อนเริ่มขั้นตอนการทำกระบวนการกับสิ่งส่งตรวจ ต้องตรวจสอบติดตามปริมาตรของชุดการผลิต และบันทึกรายละเอียดทั้งหมดของการสร้างชุดการผลิตเพิ่มเติม (เมื่อจำเป็น) ในแผนงาน PBMC

- 14.2.2. ปลอ่ยให้ตัวกลางเกรเดียนต์ของความหนาแน่นอยู่ที่อุณหภูมิห้อง (15 ถึง 25°C หรือสูงถึง 30°C โดยขึ้นอยู่กับสภาพภูมิอากาศ) ดูหัวข้อ 10 รีเอเจนต์สำหรับข้อมูลเพิ่มเติม
- 14.2.3. รวบรวมหลอดปั่นเหวี่ยงแบบกันแหลม มีขีดบอกปริมาตร ทำจากพอลิโพรพิลีน ปราศจากเชื้อขนาด 50 มิลลิลิตร ให้เพียงพอสำหรับการขึ้นตอนการเจือจาง โอเวอร์เลย์/อันเดอร์เลย์ และการล้างทั้งหมด
- 14.2.4. หากต้องการเปลี่ยนพลาสติก รวบรวมหลอดปั่นเหวี่ยงแบบกันแหลม มีขีดบอกปริมาตร ทำจากพอลิโพรพิลีน ปราศจากเชื้อขนาด 15 หรือ 50 มิลลิลิตร ที่เหมาะสมสำหรับปริมาตรที่จำเป็นของพลาสติกที่จะเก็บ คัดลอกด้วย PTID สารกันเลือดเป็นลิ่ม และอนุพันธ์ (derivative)
- 14.2.5. หากหลอดสิ่งส่งตรวจเย็นเมื่อสัมผัส (เนื่องจากสภาวะโดยรอบที่เย็น เช่น การขนส่งในช่วงเดือนที่มีอากาศเย็นกว่า) ให้ปลอ่ยให้หลอดมีอุณหภูมิถึงอุณหภูมิห้อง (15 ถึง 25°C หรือสูงถึง 30°C โดยขึ้นอยู่กับสภาพภูมิอากาศ) ก่อนทำกระบวนการ
- 14.2.6. ตรวจสอบ PTID บนหลอดเลือดทั้งหมดที่ได้รับอย่างระมัดระวัง จัดระเบียบหลอดปฐมภูมิเพื่อไม่ให้มีโอกาสที่หลอดจะผสมปะปนกันระหว่าง PTID หรือสารกันเลือดเป็นลิ่มภายในชุด PTID หนึ่งชุด

ข้อเสนอแนะ: วางหลอดทั้งหมดสำหรับ PTID แต่ละหมายเลข/สารกันเลือดเป็นลิ่มแต่ละชนิดในตำแหน่งหนึ่งแทน สามารถใช้แทนวางคนละแทนเพื่อแยก PTID หรือประเภทหลอด และสามารถใช้ปากกาบาร์โค้ดที่มีสีต่างกันสำหรับ PTID แต่ละหมายเลขเพื่อหลีกเลี่ยงความสับสน

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

หมายเหตุสำหรับ HVTN: ไม่อนุญาตให้ใช้หลอดอ้างอิงหรือหลอดแบบกันแหลมเพื่อจุดประสงค์ในการวัด

14.3. การเปลี่ยนพลาสติก

หมายเหตุ: ดำเนินขั้นตอนการเปลี่ยนพลาสติกนี้เฉพาะในกรณีที่ต้องการแอลกอฮอล์ของพลาสติกจากหลอดเก็บ PBMC ตามโครงการวิจัยหรือ SPL/LPC/LM เท่านั้น ไปที่ขั้นตอนที่ 14.4 หากไม่ต้องการแอลกอฮอล์ของพลาสติก

- 14.3.1. อาจทำกระบวนการกับหลอดเก็บเลือดจาก PTID เดียวกันและสารกันเลือดเป็นลิ่มเดียวกันแยกกันหรือรวมในหลอดปั่นเหวี่ยงแบบกันแหลม 50 มิลลิลิตร (ไม่อนุญาตให้ทำการรวมสำหรับ HVTN)
- 14.3.2. ทำเครื่องหมายปริมาตรของเลือดครบบนหลอดเก็บแต่ละหลอดที่เมนิสคัส (meniscus)
- 14.3.3. บั่นเหวี่ยงเลือดครบที่ 200 ถึง 400 x แรงโน้มถ่วง เป็นเวลา 10 นาที บันทึกเวลาที่เริ่มทำกระบวนการในแผนงาน PBMC
- 14.3.4. ถ่ายพลาสติกไปยังหลอดปั่นเหวี่ยงแบบกันแหลม 15 หรือ 50 มิลลิลิตร ที่คัดลอกแล้วสำหรับการปั่นเหวี่ยงครั้งที่สองเพื่อนำเศษชิ้นส่วนเซลล์ใด ๆ ออก
- 14.3.5. เติมน้ำ WDR ในปริมาณที่เพียงพอเพื่อให้เลือดกลับมามีเลือดครบในปริมาตรดั้งเดิม ค่อย ๆ ผสม และทำกระบวนการกับ PBMC ต่อในขั้นตอนที่ 14.4
- 14.3.6. ทำกระบวนการกับพลาสติกให้เสร็จสิ้นด้วยการบั่นเหวี่ยงพลาสติกที่เก็บมาที่ 800 ถึง 1200 x แรงโน้มถ่วง เป็นเวลา 10 นาทีเพื่อให้ได้แอลกอฮอล์ PL2 หรือตาม SPL/LPC/LM ที่จำเพาะต่อโครงการวิจัย ขั้นตอนนี้อาจเกิดขึ้นในภายหลังเมื่อไม่ได้ใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงสำหรับการทำกระบวนการกับ PBMC
- 14.3.7. แอลกอฮอล์พลาสติกที่ถูกปั่นคู่ (double spun) ลงในหลอดแอลกอฮอล์ที่คัดลอกแล้วตามที่ SPL/LPC/LM ที่จำเพาะต่อโครงการวิจัยระบุไว้ และทิ้งเศษชิ้นส่วนเซลล์ที่เหลือ

14.4. การเจาะเลือดสำหรับการแยกเซลล์แบบเกรเดียนต์ของความหนาแน่นด้วยมือ

14.4.1. เปิดฟาหลอดเลือดที่ใส่สารกันเลือดเป็นลิ่ม หากไม่จำเป็นต้องมีขั้นตอนการเปลี่ยนฟลาสมา/ไม่ได้ดำเนินขั้นตอนการเปลี่ยนฟลาสมา ให้บันทึกเวลาที่นำฟาออกเป็นเวลาที่เริ่มทำกระบวนการในแผ่นงาน PBMC

14.4.2. หากหลอดมีการจับตัวเป็นลิ่มที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่าหรือมีเม็ดเลือดแดงแตกที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ดูหัวข้อ 6.3

หมายเหตุ: อนุญาตให้ทำการรวม Buffy Coat ตามแนวทางในภาคผนวก E: การรวมชั้น Buffy Coat สำหรับการแยก PBMC

ด้วยตัวกลางเกรเดียนต์ของความหนาแน่น ในการรวม Buffy Coat ให้ปฏิบัติตามคำแนะนำในภาคผนวก E แทนการดำเนินการตามขั้นตอนที่ 14.4.3 และ 14.4.4

14.4.3. ดัดลากหลอดปั่นเหวี่ยงแบบกันแหลมแต่ละหลอดด้วย PTID และสารกันเลือดเป็นลิ่ม

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

14.4.4. ถ่ายเลือดไปยังหลอดปั่นเหวี่ยงแบบกันแหลมขนาด 15 หรือ 50 มิลลิลิตร ปราศจากเชื้อที่ติดลากแล้ว และเติม WDR ในปริมาณที่เพียงพอเพื่อเจาะเลือดตามเอกสารกำกับ (package insert) ของตัวกลางเกรเดียนต์ของความหนาแน่น (อัตราส่วนของ WDR ต่อเลือดครบในอุณหภูมิตัวเป็น WDR หนึ่งส่วนต่อเลือดครบหนึ่งส่วน)

14.5. สำหรับการแยกเซลล์แบบเกรเดียนต์ของความหนาแน่น:

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

14.5.1. วิธีโอเวอร์เลย์:

14.5.1.1. เตรียมหลอดปั่นเหวี่ยงแบบกันแหลมปราศจากเชื้อที่ติดลากแล้วสำหรับแต่ละหลอดที่มีเลือดที่เจาะแล้ว

14.5.1.2. เติมตัวกลางเกรเดียนต์ของความหนาแน่นในปริมาณที่เหมาะสมลงในหลอดปั่นเหวี่ยงแบบกันแหลมปราศจากเชื้อเปล่า

หมายเหตุ:

ปริมาตรของตัวกลางเกรเดียนต์ของความหนาแน่นจะขึ้นอยู่กับอัตราส่วนของตัวกลางเกรเดียนต์ของความหนาแน่นต่อเลือดที่เจาะแล้วตามที่ผู้ผลิตแนะนำ

14.5.1.3. เปิดเลือดที่เจาะแล้วบนด้านบนของตัวกลางเกรเดียนต์ของความหนาแน่นอย่างระมัดระวังและช้า ๆ

ข้อเสนอแนะ: ค่อย ๆ ปล่อยให้ของผสมของ WDR-

เลือดที่เจาะแล้วไหลลงด้านข้างของหลอดและรวมที่ด้านบนของพื้นผิวตัวกลางเกรเดียนต์ของความหนาแน่นโดยไม่ทำให้ระนาบของพื้นผิวแตก

14.5.1.4. ปิดฟาหลอดอย่างระมัดระวัง ไปที่หัวข้อ 14.6

14.5.2. วิธีอินเตอร์เลย์:

14.5.2.1. ค่อย ๆ ผสมอย่างทั่วถึงเพื่อลดการเกาะกลุ่ม (clumping) ของเซลล์ในระหว่างการแยก

เลือกได้: เติม WDR อีกปริมาณหนึ่งที่เท่ากับปริมาตรทั้งหมดของเลือดลงในเลือดครบหรือเลือด-WDR

14.5.2.2. กำหนดปริมาตรของตัวกลางเกรเดียนต์ของความหนาแน่นที่จำเป็นสำหรับแต่ละหลอดโดยอิงตามปริมาตรของ WDR-เลือดที่เจาะแล้ว

หมายเหตุ:

ปริมาตรของตัวกลางเกรเดียนต์ของความหนาแน่นจะขึ้นอยู่กับอัตราส่วนของตัวกลางเกรเดียนต์ของความหนาแน่นต่อเลือดที่เจาะแล้วตามที่ผู้ผลิตแนะนำ

14.5.2.3. เปิดสารละลายตัวกลางเกรเดียนต์ของความหนาแน่นใต้เลือด-WDR อย่างระมัดระวังและช้า ๆ

14.5.2.4. ปิดฟาหลอดอย่างระมัดระวัง ไปที่หัวข้อ 14.6

14.6. การปั่นเหวี่ยงความหนาแน่นและการเก็บลิ้มโฟไซต์:

14.6.1. จับหลอดในลักษณะตั้งขึ้น วางลงในแท่นวาง และค่อย ๆ ขนถ่ายไปยังเครื่องปั่นเหวี่ยง

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

หมายเหตุ: หากเปิดเบรกไว้ จะทำให้ชิ้นแตกได้ ต้องปิดเบรกของเครื่องปั่นเหวี่ยงเพื่อให้แยกได้อย่างสมบูรณ์และเพื่อดึง PBMC ออกมาให้ได้มากที่สุด

- 14.6.3. ในขณะที่หลอดแบบกันแหลมกำลังปั่นอยู่ ให้ทิ้งหลอดเก็บทั้งหมดที่เสารอกจนว่างเปล่าแล้วโดยปฏิบัติตามแนวปฏิบัติทางห้องปฏิบัติการ ทำความสะอาดพื้นผิวของ BSC และจัดระเบียบสำหรับขั้นตอนถัดไป
- 14.6.4. ดัดฉลาก (ที่มี PTID/สารกันเลือดเป็นลิ่ม)
หลอดปั่นเหวี่ยงแบบกันแหลมปราศจากเชื้อหลอดใหม่ในจำนวนและขนาดที่เท่ากับหลอดปั่นเหวี่ยงแบบกันแหลมที่ใช้ในขั้นตอนการปั่นเหวี่ยงสำหรับภา
รแยก ใช้หลอดใหม่เหล่านี้สำหรับขั้นตอนการเก็บและการล้างเซลล์หลังจากนี้
- 14.6.5. เติมน้ำ WDR ลงในหลอด “ล้าง” สำหรับการปั่นเหวี่ยงแบบกันแหลมปราศจากเชื้อที่ดัดฉลากไว้ล่วงหน้าแต่ละหลอดโดยใช้ปิเปตปราศจากเชื้อ:

ขนาดของหลอดปั่นเหวี่ยงแบบกันแหลม (มิลลิลิตร)	ปริมาตรที่เติมน้ำล่วงหน้าของ WDR (มิลลิลิตร)
50	25
15	5

- 14.6.6. เมื่อเครื่องปั่นเหวี่ยงหยุดสนิทแล้ว ค่อย ๆ นำหลอดแบบกันแหลมแต่ละหลอดออกจากเครื่องปั่นเหวี่ยงเพื่อไม่ให้รบกวนชั้น
ต่าง ๆ ใช้แท่นวางเพื่อรองรับหลอดและขนถ่ายไปยัง BSC อย่างระมัดระวัง
- 14.6.7. หากไม่สามารถมองเห็นชั้นเซลล์ได้ ให้ยืนยันว่าเครื่องปั่นเหวี่ยงกำลังปฏิบัติการอย่างเหมาะสมหรือไม่ แก้ไขปัญหาใด ๆ ที่ท่านพบ ปั่นเหวี่ยงหลอดซ้ำ
บันทึกปัญหาและการดำเนินการที่ดำเนินการตามข้อกำหนดของเครือข่ายและห้องปฏิบัติการ
- 14.6.8. บันทึกการแตกของเม็ดเลือดแดงหรือลิ่มเลือดขนาดเล็กที่สามารถมองเห็นได้ที่รอยต่อของเซลล์
หมายเหตุ: มองหาการแตกของเม็ดเลือดแดงหรือลิ่มเลือดหลังจากการปั่นเหวี่ยง ประเมินการแตกของเม็ดเลือดแดง +1 ถึง +4
ตามคำอธิบายที่ให้ไว้ในอภิธานศัพท์ บันทึกการสังเกตของท่าน
- 14.6.9. นำส่วนพลาสมา-WDR สีค่อนข้างเหลืองด้านบนออกจนถึงภายใน 1 ถึง 2 เซนติเมตร ของแถบ PBMC สีขาวขุ่นที่อยู่ตรงรอยต่อระหว่างส่วนพลาสมา-
WDR (สีค่อนข้างเหลือง) และสารละลายตัวกลางสำหรับการแยกที่มีลักษณะใส โดยใช้ปิเปตปราศจากเชื้อ (ปิเปตทางซีรัมวิทยาหรือปิเปตสำหรับถ่ายสาร)
ใหม่สำหรับ PTID แต่ละหมายเลข ระวังอย่ารบกวนชั้นเซลล์ในระหว่างกระบวนการนี้ ทั้งส่วนพลาสมา-WDR ตามนโยบายของห้องปฏิบัติการ
หมายเหตุ: ในอีกทางเลือกหนึ่ง อาจนำแถบ PBMC สีขาวขุ่นออกโดยการสอดปิเปตผ่านชั้นพลาสมา-WDR ด้านบนอย่างระมัดระวัง
- 14.6.10. เก็บเซลล์ทั้งหมดที่รอยต่อสีขาวขุ่นโดยใช้ปิเปตทางซีรัมวิทยาหรือปิเปตสำหรับถ่ายสารปราศจากเชื้อ
ใช้ความระมัดระวังไม่ดูดสารละลายตัวกลางสำหรับการแยกออกมากเกินไปซึ่งจำเป็น
- 14.6.11. ถ่ายเซลล์ที่เก็บมาจากหลอดปั่นเหวี่ยงแบบกันแหลมหนึ่งหลอดไปยังหลอดปั่นเหวี่ยงแบบกันแหลมปราศจากเชื้อที่ดัดฉลากไว้ล่วงหน้าที่สอดคล้องกันหล
อดเดียว สามารถเติม WDR ในหลอดไว้ล่วงหน้าเพื่อประหยัดเวลา (หัวข้อ 14.6.5)
- 14.6.12. ปิดฝาหลอดปั่นเหวี่ยงแบบกันแหลมที่มีเซลล์เม็ดเลือดแดง/ตัวกลางสำหรับการแยกที่เหลืออีกครั้ง
และทิ้งหลอดดังกล่าวโดยถือเป็นของเสียอันตรายทางชีวภาพโดยปฏิบัติตามนโยบายของห้องปฏิบัติการ

14.7. ต้องแน่ใจว่าบันทึกของกระบวนการทั้งหมดตามข้อกำหนดของเครือข่ายและห้องปฏิบัติการแล้ว ไปที่หัวข้อ 15

15. การล้าง การนับ การแขวนตะกอนใหม่ ความเข้มข้น และการแช่แข็งข้ามคืนแบบควบคุมอัตรา

15.1. การล้างครั้งที่ 1:

- 15.1.1. QS (เพิ่มปริมาตรของส่วน PBMC ขึ้น) ถึงประมาณ 45 มิลลิลิตร (สำหรับหลอดปั่นเหวี่ยงแบบกันแหลมขนาด 50 มิลลิลิตร) หรือ 10 มิลลิลิตร
(สำหรับหลอดปั่นเหวี่ยงแบบกันแหลมขนาด 15 มิลลิลิตร) โดยการเติม WDR ค่อย ๆ ผสม
- 15.1.2. ปิดฝาหลอดแบบกันแหลมทั้งหมดที่ตอนนี้มีเซลล์ที่เก็บมาซึ่งเจือจางอยู่ใน WDR อีกครั้ง
- 15.1.3. ปั่นเหวี่ยงเซลล์ที่เจือจางแล้วที่ 200 ถึง 400 x แรงโน้มถ่วง เป็นเวลา 10 นาทีที่ 15 ถึง 25°C (หรือสูงถึง 30°C โดยขึ้นอยู่กับสภาพภูมิอากาศ)
โดยเลือกใช้เบรกค้างหรือไม่ก็ได้
- 15.1.4. นำหลอดออกจากเครื่องปั่นเหวี่ยงและตรวจสอบหาตะกอนเซลล์
 - 15.1.4.1. หากไม่สามารถมองเห็นตะกอนเซลล์ (cell pellet) ได้
ให้ยืนยันว่าเครื่องปั่นเหวี่ยงกำลังปฏิบัติการอย่างเหมาะสมหรือไม่ ใช้การตั้งค่าที่ถูกต้องหรือไม่ แก้ไขปัญหาใด ๆ ที่ท่านพบ ปั่นเหวี่ยงหลอดซ้ำ
บันทึกปัญหาและการดำเนินการที่ดำเนินการตามข้อกำหนดของเครือข่ายและห้องปฏิบัติการ
หากยังไม่สามารถมองเห็นตะกอนเซลล์ได้หลังจากการปั่นเหวี่ยงหลอดซ้ำ
ให้ดำเนินการขั้นตอนการทำกระบวนการต่อและบันทึกรายละเอียดในแผนงานการทำกระบวนการ

- 15.1.5. นำส่วนเหนือตะกอน (supernatant) ของ WDR ออกและทิ้งอย่างระมัดระวังโดยไม่รบกวนตะกอนเซลล์โดยเทลงในภาชนะบรรจุของเสียที่เป็นของเหลวที่กำหนดไว้ใน BSC อย่างรวดเร็ว อาจใช้วิธีการทางเลือก เช่น การนำออกด้วยปิเปตทางชีววิทยาหรือโดยการดูดออก สำหรับตะกอนที่หวมหรือมีเซลล์เม็ดเลือดแดงในปริมาณมาก

15.2. การล้างครั้งที่ 2:

- 15.2.1. ทำการแขวนตะกอนใหม่กับตะกอนแต่ละก้อนใน WDR ปริมาตรเล็กน้อย โดยค่อย ๆ ผสมแต่ทั่วถึงให้กลายเป็นสารแขวนตะกอนของเซลล์ที่เป็นเนื้อเดียวกัน

ขนาดของหลอด (มิลลิลิตร)	ปริมาตรของการแขวนตะกอนใหม่ของ WDR (มิลลิลิตร)
50	≤ 5
15	≤ 3

- 15.2.2. รวมสารแขวนตะกอนของตะกอนจาก PTID/สารกันเลือดเป็นลิ่มเดียวกัน หลอดนี้เป็นหลอดเซลล์ที่เก็บมา

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

- 15.2.3. ใช้ WDR ในปริมาตรเล็กน้อยเพื่อกลั้วหลอดที่ถ่ายตะกอนมา เก็บปริมาตรที่กลั้วของ WDR ในหลอดเซลล์ที่เก็บมา

- 15.2.4. QS ส่วน PBMC โดยเติม WDR และค่อย ๆ ผสม

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

- 15.2.5. ปิดฝาหลอดอีกครั้งและวางหลอดในเครื่องปั่นเหวี่ยง

- 15.2.6. บั่นเหวี่ยงเซลล์ที่เจือจางแล้วที่ 200 ถึง 400 x แรงโน้มถ่วง เป็นเวลา 10 นาทีที่ 15 ถึง 25°C (หรือสูงถึง 30°C โดยขึ้นอยู่กับสภาพภูมิอากาศ) โดยเลือกใช้เบอร์ค่าหรือไม่ก็ได้

- 15.2.7. นำหลอดออกจากเครื่องปั่นเหวี่ยงและตรวจสอบหาตะกอนเซลล์

หมายเหตุ: หากไม่สามารถมองเห็นตะกอนเซลล์ได้ ให้ยืนยันว่าเครื่องปั่นเหวี่ยงกำลังปฏิบัติการอย่างเหมาะสมหรือไม่ แก้ไขปัญหาใด ๆ และบั่นเหวี่ยงหลอดซ้ำ บันทึกปัญหาและการดำเนินการที่ดำเนินการตามข้อกำหนดของเครือข่ายและห้องปฏิบัติการ

หากยังไม่สามารถมองเห็นตะกอนเซลล์ได้หลังจากการบั่นเหวี่ยงหลอดซ้ำ

ให้ดำเนินการขั้นตอนการทำกระบวนการต่อและบันทึกรายละเอียดในแผนงานการทำกระบวนการ

- 15.2.8. นำส่วนเหนือตะกอน (supernatant) ของ WDR

ออกและทิ้งอย่างระมัดระวังโดยไม่รบกวนตะกอนเซลล์โดยเทลงในภาชนะบรรจุของเสียที่เป็นของเหลวที่กำหนดไว้ใน BSC อย่างรวดเร็ว อาจใช้วิธีการทางเลือก เช่น การนำออกด้วยปิเปตทางชีววิทยาหรือโดยการดูดออก สำหรับตะกอนที่หวมหรือมีเซลล์เม็ดเลือดแดงในปริมาณมาก

15.3. จำนวนเซลล์ PBMC จากการนับ

- 15.3.1. กำหนดและบันทึกปริมาตรของการแขวนตะกอนใหม่สำหรับการนับของ WDR (V) ที่แม่นยำภายใน 0.1 มิลลิลิตร V มีความสำคัญเนื่องจากเป็นปริมาตรที่ใช้ในการนับจำนวนเซลล์

หมายเหตุ: ปริมาตรของการแขวนตะกอนใหม่สำหรับการนับ (V) คือ 20% ของปริมาตรของเลือดครบที่สามารถใช้ได้ทั้งหมด ซึ่งปัดเศษให้เป็นค่ามิลลิลิตรเต็มที่ใกล้ที่สุด (บันทึก X.0) ในเกือบทุกกรณี

ตัวอย่าง: ปริมาตรของเลือดครบที่สามารถใช้ได้ทั้งหมดได้บันทึกได้เป็น 78.6 มิลลิลิตร ปริมาตรของการแขวนตะกอนใหม่สำหรับการนับจะเป็น 16.0 มิลลิลิตร ($78.6 \times 20\% = 15.72$ เมื่อปัดเศษ 15.72 ให้เป็นจำนวนเต็มที่ใกล้ที่สุดจะได้ 16.0 มิลลิลิตร)

ตัวอย่างสถานการณ์ซึ่งอาจมีการแก้ไข V:

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

15.3.2. หากมีตะกอนมากกว่าหนึ่งก้อนจาก PTID/สารกันเลือดเป็นลิ่มเดียวกัน ให้ใช้ปริมาณที่วัดได้/ติดตามได้เพียงเล็กน้อยของ WDR เพื่อค่อย ๆ แว่นตะกอนใหม่และรวมตะกอนเซลล์ลงในหนึ่งหลอด กลั้วหลอดที่ถ้ำเซลล์มาโดยใช้ปริมาณที่เหลือของการแว่นตะกอนใหม่ เติมปริมาตรที่กลั้วลงในหลอดที่มีสารแว่นตะกอนของเซลล์

15.3.3. ค่อย ๆ ผสมเซลล์ แต่ทั่วถึงทันทีก่อนเก็บตัวอย่างสำหรับจำนวนเซลล์จากการนับ

15.3.4. ถ้ำปริมาณเล็กน้อยของการแว่นตะกอนใหม่ลงในหลอดขนาดเล็กหนึ่งหลอดสำหรับการนับ ปฏิบัติตามเครื่องมือหรือคำแนะนำใน SOP เกี่ยวกับการนับสำหรับปริมาตรที่เหมาะสม

หมายเหตุ: หากจำเป็นต้องมีการนับซ้ำ ให้ลดปริมาตรของการเก็บตัวอย่างที่จำเป็นให้ต่ำที่สุด

15.3.5. ปฏิบัติตาม SOP สำหรับวิธีการนับเซลล์ที่ได้รับอนุมัติที่ห้องปฏิบัติการที่ทำกระบวนการเพื่อกำหนดความเข้มข้นของเซลล์ x 10⁶ ต่อมิลลิลิตร

หมายเหตุ: เซลล์ที่ 10³/ไมโครลิตร = เซลล์ที่ 10⁶/มิลลิลิตร

หมายเหตุ: อาจดำเนินการนับโดยอัตโนมัติหนึ่งครั้ง การนับด้วยมือต้องนับสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาดใหญ่สี่อัน (1 ตารางมิลลิเมตร)

15.3.6. คำนวณจำนวนเซลล์ทั้งหมดโดยใช้สูตรต่อไปนี้

$$T = C \times V$$

T = จำนวนเซลล์ทั้งหมด

C = ความเข้มข้น (10⁶/มิลลิลิตร) ที่กำหนดในวิธีการนับ

V = ปริมาตรของการแว่นตะกอนใหม่สำหรับการนับของ WDR เป็นมิลลิลิตร

15.3.7. คำนวณเซลล์ที่ได้เป็นเซลล์/มิลลิลิตรของเลือดครบที่สามารถใช้ได้โดยใช้สูตรด้านล่าง

$$\text{เซลล์ที่ได้ (10}^6 \text{ เซลล์/มิลลิลิตร)} = T / \text{ปริมาตรของเลือดครบที่สามารถใช้ได้}$$

หมายเหตุ: คำนวณเซลล์ที่ได้เพื่อจุดประสงค์ด้านคุณภาพ ดูหัวข้อ 16

การควบคุมคุณภาพสำหรับช่วงที่คาดไว้ของเซลล์ที่ได้และเคล็ดลับในการแก้ไขปัญหา

15.4. การคำนวณปริมาตรสุดท้ายของการแว่นตะกอนใหม่

15.4.1. คำนวณปริมาตรของการแว่นตะกอนใหม่ที่แช่แข็งจนแข็งของ CPS

ที่จำเป็นโดยการคำนวณขั้นตอนด้านล่างสำหรับจำนวนเซลล์เป้าหมายต่อไวแอลให้เสร็จสิ้น

หมายเหตุ: จำนวนเซลล์เป้าหมายต่อไวแอลจะแตกต่างกันไปตามและ โครงการวิจัย ดูโครงการวิจัยหรือ SPLI/LPC/LM

ที่จำเพาะต่อโครงการวิจัยสำหรับข้อมูลความเข้มข้นสุดท้ายของเซลล์ที่เป็นเป้าหมาย

15.4.2. คำนวณปริมาตรของการแว่นตะกอนใหม่ที่แช่แข็งจนแข็งของ CPS ที่ประมาณไว้ (V1) ที่จำเป็นโดยใช้จำนวนเซลล์เป้าหมายต่อไวแอล

หมายเหตุ: ขึ้นันว่าได้เตรียม CPS ในปริมาตรที่เพียงพอและทำให้เย็นในตู้แช่เย็น (2 ถึง 8°C) เป็นเวลาอย่างต่ำ 30 นาทีแล้ว

อนุญาตให้ดำเนินการเตรียมในอ่างน้ำแข็งควบคุมอุณหภูมิ (น้ำแข็งเปียกกับน้ำ) เป็นเวลาอย่างต่ำ 15 นาทีก่อนใช้งานได้ในกรณีฉุกเฉินเท่านั้น

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

T = จำนวนเซลล์ทั้งหมด

N1 = จำนวนเซลล์เป้าหมายต่อไวแอล

V2 = ปริมาตรสุดท้ายของแอลิควอตเป็นมิลลิลิตร

บดเศษ V1 ลงให้เป็นค่ามิลลิลิตรเต็มที่ใกล้เคียงที่สุด (1.0) เพื่อกำหนด V_f

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

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

N2 = จำนวนเซลล์จริงต่อไวแอล

T = จำนวนเซลล์ทั้งหมด

V2= ปริมาตรสุดท้ายของแอลิควอตเป็นมิลลิลิตร (1.0 มิลลิลิตร เว้นแต่จะมีคำสั่งไว้เป็นอย่างอื่นในเอกสารที่จำเพาะต่อโครงการวิจัย)

15.5. การติดฉลาก

15.5.1. ดำเนินการพิมพ์ การควบคุมคุณภาพ และการติดฉลากไครโอไวแอลให้เสร็จสิ้นก่อนบั่นเหวี่ยงขึ้นสุดท้าย

หมายเหตุ: สิ่งสำคัญคือต้องเวลาที่เซลล์ยังอยู่ในตะกอนให้ต่ำที่สุด

15.5.2. สร้างฉลากโครโอไวแอลโดยใช้ LDMS

- 15.5.2.1. ปฏิบัติตามแนวปฏิบัติทางห้องปฏิบัติการของเครือข่ายสำหรับการดำเนินการป้อนข้อมูลให้เสร็จสิ้น
- 15.5.2.2. ตรวจสอบฉลากโครโอไวแอลแต่ละประเภทที่ได้มาสำหรับข้อผิดพลาดในการป้อนข้อมูล โดยเทียบกับคำขอของห้องปฏิบัติการและแผนงานการทำกระบวนการก่อนติดฉลากโครโอไวแอล
- 15.5.2.3. ตรวจสอบบาร์โค้ดบนฉลากและพื้นที่พิมพ์ด้วยสายตาเพื่อดูการปรับแนวและคุณภาพของการพิมพ์
- 15.5.2.4. แก้ไขข้อผิดพลาดในการป้อนข้อมูลใด ๆ ใน LDMS และพิมพ์ฉลากอีกครั้งตามที่จำเป็น

15.5.3. ติดฉลากบนโครโอไวแอลเพื่อให้สามารถมองเห็นสิ่งที่อยู่ในหลอดได้

15.5.4. สแกนโครโอไวแอลเปล่าที่ติดฉลากแล้วตามลำดับ GSID เข้าไปในโมดูลการจัดเก็บของ LDMS เพื่อให้แน่ใจว่าสามารถสแกนบาร์โค้ดได้

การทวนสอบความสามารถในการสแกนและการกำหนดสถานที่จัดเก็บจะรวมอยู่ในขั้นตอนนี้

หมายเหตุ: แนะนำเป็นอย่างยิ่งให้ใช้แท่นวาง Nunc เพื่อให้สามารถเปิด/ปิดโครโอไวแอลด้วยมือเดียว ห้ามวางฝ่าโครโอไวแอลบนพื้นผิวใด ๆ

15.6. การปั่นเหวี่ยงขั้นสุดท้าย

หมายเหตุ: หากเซลล์จะถูกแช่แข็งในรูปแบบตะกอนของ PBMC (PEL) ที่ไม่มีชีวิตและในรูปแบบเซลล์ที่มีชีวิต ให้นำปริมาณของ PBMC ที่จำเป็นสำหรับการสร้างตะกอนเซลล์ที่ไม่มีชีวิตออกก่อนขั้นตอนการปั่นเหวี่ยงขั้นสุดท้าย และดำเนินการทำกระบวนการของตะกอนเซลล์ที่ไม่มีชีวิตให้เสร็จสิ้น และปฏิบัติตามคำแนะนำที่จำเพาะต่อโครงการวิจัยสำหรับตะกอนของ PBMC ที่ไม่มีชีวิต

- 15.6.1. QS (เพิ่มปริมาตรของสารแขวนตะกอนของเซลล์) ถึง 45 มิลลิลิตร ด้วย WDR และวางหลอดแบบกันแหลมที่มีเซลล์ที่เก็บมาและเจือจางแล้วในเครื่องปั่นเหวี่ยง
- 15.6.2. ปั่นเหวี่ยงเซลล์ที่เจือจางแล้วที่ 200 ถึง 400 x แรงโน้มถ่วง เป็นเวลา 10 นาทีที่ 15 ถึง 25°C (หรือสูงถึง 30°C โดยขึ้นอยู่กับสภาพภูมิอากาศ) โดยเลือกใช้เบรคหรือไม่ก็ได้
- 15.6.3. ทวนสอบว่าโครโอไวแอลทั้งหมดติดฉลากแล้วและสามารถเข้าถึงได้ง่าย
หมายเหตุ: อนุญาตให้ทำโครโอไวแอลเย็นล่วงหน้าและ/หรือทำงานบนน้ำแข็งเปียก
หมายเหตุสำหรับ HVTN: ไม่ควรทำให้โครโอไวแอลเย็นล่วงหน้าและทำงานบนน้ำแข็งเปียก และต้องได้รับอนุมัติจากศูนย์ห้องปฏิบัติการของ HVTN ก่อนใช้กับตัวอย่างของเครือข่าย HVTN
- 15.6.4. เลือกหน่วยแช่แข็งแบบควบคุมอัตรา: StrataCooler®, Mr. Frosty™, CoolCell®
ติดฉลากหน่วยแช่แข็งอย่างเหมาะสมเพื่อให้เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการสามารถกำหนดสิ่งที่อยู่ภายในได้
ต้องแน่ใจว่าหน่วยมีอุณหภูมิที่ถูกต้องสำหรับการใช้งานในเวลาที่ทำกรบรรจุโครโอไวแอลและสามารถเข้าถึงได้ทันทีก่อนนำตะกอนเซลล์ขั้นสุดท้ายออกจากเครื่องปั่นเหวี่ยง ดูหัวข้อ 7.5 สำหรับข้อมูลการจัดเก็บและการบำรุงรักษา

15.7. การแอลิควอตสำหรับการเก็บรักษาในสภาวะเย็นชวยิ่ง

หมายเหตุ: ขั้นตอนต่อไปนี้จะต้องดำเนินการอย่างรวดเร็วเพื่อรักษาความสมบูรณ์ของเซลล์

- 15.7.1. นำส่วนเหนือตะกอน (supernatant) ของ WDR ออกและทิ้งอย่างระมัดระวังโดยไม่รบกวนตะกอนเซลล์โดยเทลงในภาชนะบรรจุของเสียที่เป็นของเหลวที่กำหนดไว้ใน BSC อย่างรวดเร็ว อาจใช้วิธีการทางเลือก เช่น การนำออกด้วยปิเปตทางซีรัมวิทยาหรือโดยการดูดออก สำหรับตะกอนที่หยาบหรือมีเซลล์เม็ดเลือดแดงในปริมาณมาก
- 15.7.2. ค่อย ๆ ทำการแขวนตะกอนใหม่กับตะกอนเซลล์ก่อนเดิม CPS โดยการคิด การเคาะ หรือการเปิดตามทีละบู่ไว้ด้านล่าง
 - 15.7.2.1. HVTN อนุญาตให้ทำการแขวนตะกอนใหม่กับตะกอนโดยใช้ปริมาตรที่วัดได้/ติดตามได้ของ CPS ปริมาตรเดียวกันกับปริมาตรของการแขวนตะกอนใหม่ของ WDR ที่ใช้ในการแขวนตะกอนใหม่ในขั้นตอนการล้างก่อนหน้า อย่าลืมลบปริมาตร CPS นี้ออกจากปริมาตรสุดท้ายทั้งหมดของการแขวนตะกอนใหม่ของ CPS (V_f) ที่จะเพิ่ม หากปริมาตรสุดท้ายทั้งหมดของการแขวนตะกอนใหม่ของ CPS (V_f) มากกว่าปริมาตรที่ใช้ในการแขวนตะกอนใหม่
 - 15.7.2.2. ค่อย ๆ เติมปริมาตรของ CPS เย็น (V_f) ที่กำหนดไว้ในหัวข้อ 15.4 (ลบปริมาตรของการแขวนตะกอนใหม่ใด ๆ ที่ใช้ในการสลายตะกอน) ลงในเซลล์ที่แขวนตะกอนใหม่แล้ว พร้อมกับหมุนอย่างต่อเนื่อง
- 15.7.3. ทำงานอย่างรวดเร็วเมื่อเติม CPS แล้ว ห้ามปล่อยให้เซลล์อยู่ในสารละลายสำหรับการเก็บรักษาในสภาวะเย็นชวยิ่งเป็นเวลานานกว่า 10 นาทีก่อนนำไปวางในตู้แช่แข็ง
- 15.7.4. ค่อย ๆ ผสมสารแขวนตะกอนทั้งหมดแต่ทั้งนี้และรวดเร็วด้วยปิเปตทางซีรัมวิทยาทันทีก่อนที่จะแอลิควอต ใช้ความระมัดระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศในระหว่างขั้นตอนเหล่านี้ รักษาสารแขวนตะกอนไว้ตลอดกระบวนการบรรจุโครโอไวแอล



กระบวนการปฏิบัติงานมาตรฐานเกี่ยวกับการทำกระบวนการกับ PBMC ข้ามเครือข่าย

- 15.7.4.1. แอลลิควอต 1.0 มิลลิลิตรต่อโครโอไอแอล เว้นแต่ SPL/LPC/LM ที่จำเพาะต่อโครงการวิจัยจะมีคำสั่งไว้เป็นอย่างอื่น
- หมายเหตุ: กระจายส่วนเกินใด ๆ ให้เท่า ๆ กันในโครโอไอแอลทั้งหมดสำหรับ PTID นั้น
- 15.8. การแช่แข็งข้ามคืนแบบควบคุมอัตรา
- 15.8.1. หลังจากการทำกระบวนการและการนับ ให้ดำเนินขั้นตอนที่จำเป็นในการแช่แข็งเซลล์ให้เสร็จสิ้นทันที
- 15.8.2. จัดวางหน่วยแช่แข็งแบบควบคุมอัตราที่เลือกสำหรับการขนถ่าย: StrataCooler® ของ Agilent Technologies, Nalgene® Mr. Frosty™, Corning® CoolCell® ดูหัวข้อ 7.5 สำหรับข้อมูลการจัดเก็บและการบำรุงรักษา
- 15.8.3. ขนถ่ายโครโอไอแอลทั้งหมดตามลำดับ ID ของสิ่งส่งตรวจทั่วโลกไปยังหน่วยแช่แข็งแบบควบคุมอัตราทันที
- สำหรับ CRFU ทั้งหมด ซึ่งคือ Nalgene® Mr. Frosty™, Corning® CoolCell® และ StrataCooler® ของ Agilent Technologies ให้ปิดภาชนะบรรจุและวางไว้ในตู้แช่แข็ง -80°C (-65 ถึง -95°C สำหรับ ACTG, -70 ถึง -95°C สำหรับ HVTN และ HPTN) ในสถานที่ที่ไม่ถูกรบกวนจากการเข้าถึงตู้แช่แข็งซ้ำ ๆ (นั่นคือ ห่างจากด้านหน้าหรือด้านบนของตู้แช่แข็งที่ใกล้กับประตูเปิด/ฝาปิด) ห้ามวางซ้อนกัน แนะนำให้ CRFU ทั้งหมดอยู่ในตู้แช่แข็งข้ามคืน
- สำหรับ CryoMed® หรือตู้แช่แข็งเชิงกลแบบควบคุมอัตราอื่น ๆ ให้เริ่มโปรแกรมทำความเย็นตาม SOP ในสถานที่ที่เหมาะสม (หมายเหตุสำหรับ HVTN: ไม่อนุญาตให้ใช้ตู้แช่แข็งแบบควบคุมอัตราสำหรับตัวอย่างของ HVTN) 15.8.4.
- 15.8.4. บันทึกวันที่/เวลาที่ถูกแช่แข็งทันทีในแผ่นงาน PBMC ป้อนวันที่/เวลาที่ถูกแช่แข็งที่บันทึกในแผ่นงานลงใน LDMS
- 15.9. บันทึกองค์ประกอบหลักทั้งหมดตามข้อกำหนดของเครือข่ายและห้องปฏิบัติการ
16. การควบคุมคุณภาพ
- 16.1. เซลล์ที่ได้
- สิ่งสำคัญคือต้องรับรู้การขึ้นตัวที่คาดไว้สำหรับประชากรผู้เข้าร่วมซึ่งกำลังทำกระบวนการ เซลล์ที่สามารถทำหน้าที่เป็นเครื่องหมายของการควบคุมคุณภาพภายใน (internal quality control marker) สำหรับการดำเนินการแต่ละรอบ ผลที่ได้นอกช่วงที่คาดไว้อาจบ่งชี้ถึงข้อผิดพลาดในกระบวนการ การเสื่อมสภาพของรีเอเจนต์ ข้อผิดพลาดเกี่ยวกับจำนวนเซลล์จากการนับ หรือข้อผิดพลาดในการคำนวณ
- หมายเหตุ: กำหนดหน้าที่ให้ไว้ด้านล่างไว้เพื่อให้แนวทางในการช่วยระบุข้อผิดพลาดทางเทคนิคที่ร้ายแรงก่อนการเก็บรักษาในสภาวะเย็นขจัดยั้ง
- ค่าเหล่านี้อาจแตกต่างกันไปโดยขึ้นอยู่กับสารกันเลือดเป็นลิ่มที่ใช้
- 16.1.1. เซลล์ที่ได้ที่คาดไว้สำหรับประชากรผู้ใหญ่:
- | ประชากร | ช่วงของเซลล์ที่มีนิวเคลียสเดียวที่ได้ (เซลล์/มิลลิลิตร) |
|---------|---|
| ผู้ใหญ่ | (0.8 ถึง 3.2) x 10 ⁶ |
- 16.1.2. เซลล์ที่ได้ที่ไม่คาดคิด
- 16.1.2.1. หากเซลล์ที่ได้อยู่นอกช่วงที่คาดไว้ให้บทวนแผนการเจือจาง (dilution schema) การคำนวณ เทคนิคการทำกระบวนการ (โดยเฉพาะการผสมสารแขวนตะกอนสำหรับการนับเซลล์ให้เพียงพอ) และประวัติ PTID หากมี เพื่อหาสาเหตุที่เป็นไปได้
- 16.1.2.2. เซลล์ที่ได้จากผู้เข้าร่วมที่มีชีวิตอยู่กับเชื้อไวรัสอาจต่ำกว่าที่แสดงในตารางข้างต้น
- 16.1.2.3. หากสงสัยว่ามีข้อผิดพลาดในการเจือจางเซลล์หรือการนับ ให้ทำการเจือจางใหม่และนับใหม่
- 16.1.3. บันทึกผลลัพธ์ทั้งหมดและปัญหาใด ๆ ที่เกิดขึ้นในระหว่างการทำกระบวนการและการดำเนินการตามข้อกำหนดของเครือข่ายและห้องปฏิบัติการ ดูหัวข้อ 5 สำหรับรายละเอียด
- หมายเหตุสำหรับ HVTN และ HPTN: บันทึกปัญหาและการดำเนินการใด ๆ ในแผ่นงานการทำกระบวนการกับ PBMC ของ HVTN ที่จำเพาะต่อโครงการวิจัย รายการที่ป้อนใน LDMS สำหรับแอลลิควอต และในหัวข้อความคิดเห็นเกี่ยวกับเซลล์ที่ได้ของโปรแกรม Atlas HVTN PBMC หากเหมาะสม ติดต่อศูนย์ห้องปฏิบัติการของ HVTN หากมีข้อกังวลใด ๆ
- 16.2. ความอยู่รอดได้ของเซลล์
- 16.2.1. ความอยู่รอดได้ของ PBMC ที่แยกใหม่ ๆ ควร >95%
- 16.2.2. หากความอยู่รอดได้ของ PBMC ใหม่ ๆ <95% ให้บทวนผลลัพธ์กับหัวหน้างานและบันทึกตามข้อกำหนดของเครือข่ายและห้องปฏิบัติการ

หมายเหตุ: หากกำลังเตรียมตัวอย่างสำหรับการทดสอบความชำนาญในการเก็บรักษาในสภาวะเย็นขจัดสำหรับ PBMC ของ IQA ต้องมีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตจากการนับ

17. การจัดเก็บ PBMC (ชั่วคราวหรือในสถานที่)

17.1. รักษาห่วงโซ่ความเย็น (cold chain) ในระหว่างขั้นตอนการขนถ่ายทั้งหมดเพื่อหลีกเลี่ยงความเสียหายที่จะเกิดกับเซลล์

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

หมายเหตุสำหรับ HPTN: ปฏิบัติตามคำแนะนำที่ให้ไว้ในคู่มือห้องปฏิบัติการที่จำเพาะต่อโครงการวิจัย

หมายเหตุสำหรับ ACTG: ขนส่งบนน้ำแข็งแห้งภายใน 4 สัปดาห์นับจากวันที่แช่แข็ง เว้นแต่จะมีการให้คำแนะนำไว้เป็นอย่างอื่นใน LPC ดำเนินการต่อไปที่ 17.2

17.2. ขนถ่าย PBMC ไปยังที่จัดเก็บชั่วคราวในตู้แช่แข็ง -80°C

17.2.1. ขนถ่ายโครโมโซมไอโซแลตจากระบบทำความเย็นแบบควบคุมอัตราไปยังสถานที่จัดเก็บที่กำหนดไว้ที่ -65 ถึง -95°C สำหรับ ACTG, -70 ถึง -95°C สำหรับ HVTN และ HPTN

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

หมายเหตุ: จำเป็นสำหรับ HVTN และ HPTN แนะนำสำหรับ ACTG: อนุญาตให้ใช้ถาดสำหรับขนถ่ายแบบใช้น้ำแข็งแห้ง (dry ice transfer pan) สำหรับหน่วยแช่แข็งแบบควบคุมอัตราเท่านั้น ต้องใช้กล่องเก็บความเย็นแบบด้านข้างสูง (tall-sided cooler) ที่ทำให้เย็นล่วงหน้าแล้วสำหรับตู้แช่แข็ง/กล่องจัดเก็บ PBMC ดูแนวทางเกี่ยวกับห่วงโซ่ความเย็นข้ามเครือข่าย (หัวข้อ 7 กระบวนการขนถ่ายสิ่งส่งตรวจ) สำหรับรายละเอียดเพิ่มเติม ต้องแน่ใจว่าใช้น้ำแข็งแห้งไปะทบกล่องโครโมโซมไอโซแลตสำหรับตู้แช่แข็งและฝาปิดทุกด้านแล้วทำงานอย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพเพื่อลดการสัมผัสโครโมโซมไอโซแลตกับอุณหภูมิโดยรอบ

หมายเหตุ: ห้ามเก็บในไนโตรเจนเหลว (LN2) เก็บไว้ที่ -65 ถึง -95°C สำหรับ ACTG, -70 ถึง -95°C สำหรับ HVTN และ HPTN จนกว่าจะขนส่ง

หมายเหตุ:

ทำให้ถึงเก็บสำหรับขนส่งแบบใช้น้ำแข็งแห้งเย็นล่วงหน้าและใช้กล่องเก็บความเย็นแบบด้านข้างสูงที่ทำให้เย็นล่วงหน้าแล้วในระหว่างขั้นตอนการควบคุมคุณภาพและการบรรจุ ต้องแน่ใจว่าใช้น้ำแข็งแห้งเต็มถึงเก็บสำหรับขนส่งแบบใช้น้ำแข็งแห้งก่อนปิดฝานึก

17.2.3. ติดต่อบุคลากรของศูนย์ห้องปฏิบัติการของเครือข่ายหากตัวอย่างไปไม่ถึงปลายทางภายในเวลาจัดเก็บชั่วคราวที่เครือข่ายกำหนด ศูนย์ห้องปฏิบัติการของเครือข่ายจะตัดสินใจว่าขนถ่ายไปยังสถานที่จัดเก็บ LN2 และการขนส่งในถังเก็บ LN2 สำหรับขนส่งนั้นเหมาะสมหรือไม่

17.3. ถ่าย PBMC ไปยังถัง LN2 (LN2 dewar) หรือตู้แช่แข็งเชิงกล -150°C

หมายเหตุสำหรับ HVTN: ไม่อนุญาตให้ทำการจัดเก็บ LN2 หรือใช้ถัง LN2 หรือตู้แช่แข็งเชิงกล -150°C สำหรับการจัดเก็บ PBMC ของ HVTN โดยมีข้อยกเว้นซึ่งเป็นกรณีที่เกิดขึ้นอย่างหาได้ยาก ห้องปฏิบัติการต้องไม่ขนถ่ายตัวอย่างจากตู้แช่แข็ง -80°C เว้นแต่ LC ของ HVTN จะมีคำสั่งให้ทำเช่นนั้น

17.3.1. ภายใน 72 ชั่วโมงหลังจากการแช่แข็งโครโมโซมไอโซแลตในระบบทำความเย็นแบบควบคุมอัตรา ขนถ่ายบนน้ำแข็งแห้งไปยังสถานที่จัดเก็บที่กำหนดไว้ในถัง LN2 หรือระบบการจัดเก็บ -150°C

17.3.2. ตัวอย่าง PBMC ที่ถูกแช่แข็งมีวิธีในเฟสไอของ LN2 อย่างไม่มีกำหนด ห้ามขนถ่ายตัวอย่างจาก LN2 หรือ -150°C กลับไปยังตู้แช่แข็ง -80°C เว้นแต่เครือข่ายหรือทีมโครงการวิจัยจะมีคำสั่งให้ทำ

17.3.3. เมื่อเก็บตัวอย่างใน LN2 แล้ว ต้องทำการขนถ่ายหรือการขนส่งทั้งหมดใน LN2 ($\leq -140^\circ\text{C}$) และขนส่งในถังเก็บ LN2 สำหรับขนส่งแบบแห้งที่ได้รับอนุมัติจาก IATA

18. การกรอกเอกสารเกี่ยวกับการทำกระบวนการ

18.1. ต้องแน่ใจว่าบันทึกข้อมูลที่เหมาะสมทั้งหมดโดยปฏิบัติตามแนวปฏิบัติการจัดทำเอกสารที่ติดตามข้อกำหนดของเครือข่ายและห้องปฏิบัติการ และการคำนวณทั้งหมดถูกต้อง ดูหัวข้อ 5 สำหรับรายละเอียด

18.2. เก็บค่าของห้องปฏิบัติการ แผนงานการทำกระบวนการกับ PBMC และเอกสารติดตามอื่นใดตามนโยบายของห้องปฏิบัติการ

19. คำจำกัดความและคำย่อ



กระบวนการปฏิบัติงานมาตรฐานเกี่ยวกับการทำกระบวนการกับ PBMC ข้ามเครือข่าย

คำศัพท์	คำจำกัดความ
ACTG	Advancing Clinical Therapeutics Globally
อุณหภูมิในการปั่นเหวี่ยง	15 ถึง 25°ซ หรือสูงถึง 30°ซ โดยขึ้นอยู่กับสภาพภูมิอากาศ
จับตัวเป็นลิ่มที่มองเห็น ได้ด้วยตาเปล่า	มากกว่า ¼ ของมวลเลือดครบจับตัวเป็นลิ่ม
ลิ่มเลือดขนาดเล็ก	ลิ่มเลือดขนาดเล็กที่สังเกตเห็นหลังจากการทำกระบวนการกับ PBMC ในหลอดเลือดครบ แต่สังเกตเห็นบนฟริตของหลอดแยกหลังจากการปั่นเหวี่ยง
CPS	สารละลายสำหรับการเก็บรักษาในสภาวะเย็นชั่วคราว
CSTFB	หลอดแยกเซลล์ที่มีตัวกั้นแบบฟริต
DGM	ตัวกลางเกรเดียนต์ของความหนาแน่น
FBS	ซีรัมจากตัวอ่อนวัว
HBSS	สารละลายเกลือสมดุลของแองกัส
การแตกของเม็ดเลือดแดง	การเปลี่ยนสีของซีรัมหรือพลาสมาจากสีชมพูเป็นแดงเนื่องจากเซลล์เม็ดเลือดแดงแตก ประเมินการแตกของเม็ดเลือดแดงตามสเกลต่อไปนี้: 1+ สีออกชมพู-แดงซีดในซีรัมหรือพลาสมา สามารถอ่านหนังสือพิมพ์ที่วางไว้ด้านหลังหลอดเลือดได้อย่างชัดเจน 2+ สีออกชมพู-แดงในซีรัมหรือพลาสมา สามารถอ่านหนังสือพิมพ์ได้แต่ไม่คมชัดเท่า 3+ สีออกชมพู-แดงเข้มในซีรัมหรือพลาสมา เห็นหนังสือพิมพ์ได้ไม่ชัด 4+ สีแดงมะสอกกามิเข้มในซีรัมหรือพลาสมา ไม่สามารถอ่านหนังสือพิมพ์ได้ <u>หมายเหตุ:</u> เซลล์เม็ดเลือดแดงแตกจะทำให้ซีรัมหรือพลาสมามีลักษณะที่มีสี แต่ใส ในขณะที่เมื่อมีการปนเปื้อนเซลล์เม็ดเลือดแดงจะทำให้ซีรัมหรือพลาสมามีลักษณะขุ่น
HI-FBS	ซีรัมจากตัวอ่อนวัวที่ถูกลดฤทธิ์ด้วยความร้อน
HPTN	HIV Prevention Trials Network
HVTN	HIV Vaccine Trials Network
มีดีซ่าน (icteric)	พลาสมามีสีเขียวหรือส้มซึ่งบ่งบอกว่ามีบิลิรูบินเพิ่มขึ้น
LDMS	ระบบการจัดการข้อมูลห้องปฏิบัติการ
LM	คู่มือห้องปฏิบัติการ (HPTN)
LPC	แผนภูมิการทำกระบวนการของห้องปฏิบัติการ (ACTG)
PBMC	เซลล์เม็ดเลือดชนิดนิวเคลียสเดี่ยวจากเลือดส่วนปลาย
PBS	น้ำเกลือที่บัฟเฟอร์ด้วยฟอสเฟต
PI	ผู้วิจัยหลัก
PTID/PIID	หมายเลขประจำตัวผู้เข้าร่วม
QS	ทำให้มีปริมาณเพียงพอ—เดิมปริมาณของเหลวให้เพียงพอเพื่อให้ได้ปริมาตรที่ระบุไว้
อุณหภูมิห้อง (RT)	15 ถึง 25°ซ หรือสูงถึง 30°ซ โดยขึ้นอยู่กับสภาพภูมิอากาศ
SPLI	คำแนะนำห้องปฏิบัติการที่ทำกระบวนการกับสิ่งส่งตรวจ (HVTN)
ปริมาตรของเลือดครบที่สามารถใช้ได้ (UWBV)	ปริมาตรที่วัดได้ของเลือดครบ ซึ่งจะถูกทำกระบวนการจริง (ปริมาตรของเลือดครบที่สามารถใช้ได้อาจไม่เท่ากับความจริงของหลอด)
การจัดเก็บในเฟสไอ	ที่จัดเก็บในโตรเจนเหลว (LN2) ในเฟสไอเป็นพื้นที่ในถังจัดเก็บที่อยู่เหนือ LN2 เหลวที่กั้นถึง
WDR	รีเอเจนต์สำหรับการล้างและการเจือจาง (HBSS, PBS)

20. เอกสารอ้างอิง

- 20.1. Bull M., Lee B., Stucky J., Chiu Y.L., Rubin A., Horton H., and McElrath MJ. Defining blood processing parameters for optimal detection of cryopreserved antigen-specific responses for HIV vaccine trials. J. Immunol. Methods 322:57-69 (2007).
- 20.2. CHAVI SOP for PBMC Isolation and Cryopreservation, CHAVI-A0001, v5, Nov 3 2008.
- 20.3. Cox J.H., DeSouza M., Ratto-Kim S., Ferrari G., Weinhold K.J., and Birx B.L. Cellular Immune assays for evaluation of Vaccine efficacy in developing countries. Manual of Clinical laboratory Immunology. Rose N.R., Hamilton R.G., Detrick B. Eds. (6th ed.) p.301-315 (2002).
- 20.4. Islam B., Lindbert A., and Christensen B. Peripheral blood cells preparation influences the level of expression of leukocyte cell surface markers as assessed with quantitative multicolor flow cytometry. Cytometry 22:128-134 (1995).

- 20.5. Immunovirology Research Network (IVRN) Laboratory Manual: Separation and storage of serum, plasma and PBMCs. IVRN. Dec 12 2007.
- 20.6. Kierstead L.S., Dubey S., Meyer B., Tobery T.W., Mogg R., Fernandez V.R., Long R., Guan L., Gaunt C., Collins K., Sykes K.J., Mehrotra B.V., Chirmule N., Shiver J.W., and Casimiro B.R. Enhanced rates and magnitude of immune responses detected against an HIV vaccine: effect of using an optimized process for isolating PBMC. AIDS Res Hum Retroviruses 23:86-92 (2007).
- 20.7. Shearer WT, Rosenblatt HM, Gelman RS, Oyomopito R, Plaeger S, Stiehm ER, Wara DW, Douglas SD, Luzuriaga K, McFarland EJ, Yogeve R, Rathore MH, Levy W, Graham BL, Spector SA; Pediatric AIDS Clinical Trials Group. Lymphocyte subsets in healthy children from birth through 18 years of age: the Pediatric AIDS Clinical Trials Group P1009 study. J Allergy Clin Immunol. 112(5):973-80 (2003).
- 20.8. Sigma-Aldrich Accuspin™ System-Histopaque® -1077, procedure number A6929/A7054/A0561, Dated 2003-09.
- 20.9. Weinberg A., Betensky R., Zhang L., and Ray G. Effect of shipment, storage, anticoagulant, and cell separation on lymphocyte proliferation assays for human immunodeficiency virus-infected patients. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 5:804-807 (1998).
- 20.10. Weinberg A, Song LY, Wilkening CL, Fenton T, Hural J, Louzao R, Ferrari G, Etter PE, Berrong M, Canniff JD, Carter D, Defawe OD, Garcia A, Garrelts TL, Gelman R, Lambrecht LK, Pahwa S, Pilakka-Kanthikeel S, Shugarts DL, and Tustin NB. Optimization of storage and shipment of cryopreserved peripheral blood mononuclear cells from HIV-infected and uninfected individuals for ELISPOT assays. J Immunol Methods. 363(1):42-50 (2010).

21. ภาคผนวก

- 21.1. ภาคผนวก A: แผนงานการทำกระบวนการกับ PBMC ทัวไปของ HVTN-HPTN
หมายเหตุ: ภาคผนวก A ยังมีให้ในรูปแบบที่สามารถดาวน์โหลดได้ในเว็บไซต์สาธารณะของ HANC ที่ <https://www.hanc.info/resources/sops-guidelines-resources/laboratory/cross-network-pbmc-processing-sop.html>
- 21.2. ภาคผนวก B: แผนงานการทำกระบวนการกับ PBMC ของ ACTG
- 21.3. ภาคผนวก C: ตัวอย่างบันทึกการเปลี่ยนไอโซโทป Nalgene® Mr. Frosty
- 21.4. ภาคผนวก D: การแก้ไขปัญหา: การฟื้นตัวของ PBMC เมื่อไม่มีแถบ PBMC ที่กำหนดไว้หลังจากการปั่นเหวี่ยงแบบเกรเดียนต์ของความหนาแน่น
- 21.5. ภาคผนวก E: การรวมชั้นบัฟเฟอร์สำหรับการแยก PBMC ด้วยตัวกลางเกรเดียนต์ของความหนาแน่น
- 21.6. ภาคผนวก F: คู่มือฉบับย่อของ SOP เกี่ยวกับการทำกระบวนการกับ PBMC ข้ามเครือข่าย—CSTFB
- 21.7. ภาคผนวก G: คู่มือฉบับย่อของ SOP เกี่ยวกับการทำกระบวนการกับ PBMC ข้ามเครือข่าย—วิธี โอเวอร์เลย์ด้วยมือ
- 21.8. ภาคผนวก H: รีเอเจนต์ตัวอย่าง
- 21.9. ภาคผนวก I: ประวัติการแก้ไข



ภาคผนวก A: แผนงานการทำกระบวนการกับ PBMC หัวข้อของ HVTN-HPTN

หมายเหตุ: สำหรับ HPTN และ HVTN ให้ใช้แผนงานการทำกระบวนการกับ PBMC ที่จำเพาะต่อ โครงการวิจัยที่พบในคำแนะนำห้องปฏิบัติการที่ทำกระบวนการกับสิ่งส่งตรวจ (SPLI) หรือคู่มือห้องปฏิบัติการที่จำเพาะต่อโครงการวิจัย เว้นแต่จะมีคำสั่งไว้เป็นอย่างอื่น กรอกข้อมูลทุกช่องด้วยลายมือโดยใช้ปากกา

ห้องปฏิบัติการที่ทำกระบวนการกับสิ่งส่งตรวจ:		โครงการวิจัย:
ID ของผู้เข้าร่วม (PTID/PID):	หมายเลขนัดหมาย:	ประเภทนัดหมาย:
วันที่เก็บ:	เวลาที่เก็บ:	
วันที่เริ่มทำกระบวนการ:	เวลาที่เริ่มทำกระบวนการ:	ทำกระบวนการ โดย (ชื่อย่อ):

รีเอเจนต์	ผู้ผลิต	หมายเลขรุ่นที่ผลิต			วันหมดอายุ
DMSO					
FBS					
WDR: HBSS หรือ PBS (วงกลมเลือกหนึ่งอย่าง)					
หลอดแยกเซลล์ (ฟริค)					
ตัวกลางกระตุ้นเซลล์ของเซลล์ความหนาแน่น					
	ปริมาตรเป็นมิลลิลิตร (บันทึกเป็น X.Y)				วันหมดอายุ
CPS		CPS	DMSO	FBS	1 วันทำการ (<18 ชั่วโมง)
ข้อมูลที่จะบันทึกในระหว่างการทำกระบวนการ					ตัวอย่าง
ประเภทหลอดตัวอย่าง (วงกลมเลือกหนึ่งประเภท หรือบันทึกประเภทหลอด "อื่น ๆ")					ACD / HEP / EDT อื่น ๆ: _____
สถานะของเลือด (วงกลมเลือกหนึ่งสถานะหรือมากกว่า เพิ่มความคิดเห็นในหน้าหลังตามที่จำเป็น)					SAT/ HEM / CLT
ปริมาตรของเลือดครบที่สามารถใช้ได้ (ให้ใกล้เคียงกับ 0.1 มิลลิลิตร มากที่สุด)					มิลลิลิตร
บ่งชี้วิธีการทำกระบวนการ (วงกลมเลือกหนึ่งวิธี)					CSTFB / โอเวอร์เลย์ / อันเดอร์เลย์
วิธีการนับ: ชื่อเครื่องมือจำเพาะหรือการนับด้วยมือ (บันทึกในช่องทางด้านขวา)					
ปริมาตรของการแขวนตะกอนใหม่สำหรับการนับของ HBSS (หรือ WDR อื่น ๆ) (V) (บันทึกเป็น X.Y)					มิลลิลิตร
ความเข้มข้นเฉลี่ยของจำนวนเซลล์จากการนับ (C)					x 10 ⁶ เซลล์/มิลลิลิตร
จำนวนเซลล์ทั้งหมด (T) = C x V					x 10 ⁶ เซลล์
คำนวณเซลล์ที่ได้/มิลลิลิตรของเลือดครบ (การตรวจสอบการควบคุมคุณภาพ)=(T/ปริมาตรของเลือดครบที่สามารถใช้ได้)					x 10 ⁶ เซลล์/มิลลิลิตร
คำนวณปริมาตรของการแขวนตะกอนใหม่ของ CPS ที่ประมาณไว้ (V1) = (T/15x10 ⁶ เซลล์)/(1 มิลลิลิตร)					มิลลิลิตร
คำนวณปริมาตรสุดท้ายของการแขวนตะกอนใหม่ของ CPS (V1) (V1 ซึ่งปัดเศษลงให้เป็นค่ามิลลิลิตรเต็มที่ใกล้เคียงที่สุด (X.0) มิลลิลิตร)					มิลลิลิตร
คำนวณจำนวนเซลล์จริงต่อไมแอล N2 = (T/ V1) x V2; (V2=1 มิลลิลิตร)					x 10 ⁶ เซลล์/ไมแอล
พิมพ์และควบคุมคุณภาพเนื้อหาบาร์โค้ดของฉลาก LDMS (ชื่อย่อของบุคคลที่ดำเนินการควบคุมคุณภาพ)					
วันที่และเวลาที่ถูกแช่แข็ง (วาดคดปปป /ชช:นน) (อธิบายในหัวข้อความคิดเห็น หากไม่อยู่ใน 4 ชั่วโมงของเวลาที่เริ่มทำกระบวนการ)					
จำนวนไมโครไอแอลที่ถูกแช่แข็งจริง					
<u>หมายเหตุ:</u> ควรเท่ากับปริมาตรสุดท้ายของการแขวนตะกอนใหม่ของ CPS สำหรับแอลคิวค 1 มิลลิลิตร (V1)					
กรอกรายการ LDMS ที่เหลือ รวมถึงจำนวนเซลล์ทั้งหมดจากการนับและเวลาที่ถูกแช่แข็ง (ชื่อย่อ)					



ภาคผนวก A: แผนงานการทำกระบวนการกับ PBMC หัวข้อของ *HVTN-HPTN* หน้า 2 ของจำนวน 2 หน้า

หมายเหตุ: สำหรับ HPTN และ HVTN ให้ใช้แผนงานการทำกระบวนการกับ PBMC ที่จำเพาะต่อโครงการวิจัยที่พบในคำแนะนำห้องปฏิบัติการที่ทำกระบวนการกับสิ่งส่งตรวจ (SPLI) หรือคู่มือห้องปฏิบัติการที่จำเพาะต่อโครงการวิจัย เว้นแต่จะมีคำสั่งไว้เป็นอย่างอื่น กรอกข้อมูลทุกช่องด้วยลายมือโดยใช้ปากกา

ห้องปฏิบัติการที่ทำกระบวนการกับสิ่งส่งตรวจ:

PTID/PID:

การขนส่งโครโมโซมไปยังกล่องจัดเก็บสำหรับตู้แช่แข็ง	
บุคคลที่ขนส่งโครโมโซมไปยังสถานที่เก็บกล่องจัดเก็บที่กำหนดโดย LDMS	
วันที่ (วาดคปปปป)/เวลาที่ขนส่งโครโมโซมจากอุปกรณ์แช่แข็งแบบควบคุมอัตราไปยังกล่องจัดเก็บ (ต้องรักษาตัวอย่างไว้ที่ -80°C ในระหว่างการขนส่ง)	
การทบทวนครั้งแรก (ปฐมภูมิ) (ชื่อ/วันที่)	
การทบทวนครั้งสุดท้าย (ทุติยภูมิ) (ชื่อ/วันที่)	

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

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

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

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

ความคิดเห็น การเบี่ยงเบนจากโครงการวิจัย และข้อมูลเพิ่มเติมที่ไม่ได้บันทึกไว้ที่อื่นในแผนงานนี้:



ภาคผนวก B: แผนงานการทำกระบวนการกับ PBMC ของ ACTG เวอร์ชัน 8.0 (หน้า 1 ของจำนวน 2 หน้า)

หมายเหตุ: ต้องกรอกช่องข้อมูลในแผนงานนี้ด้วยลายมือ โดยใช้ปากกา

โปรตีน N1 และ A ใน LPC ของโครงการวิจัย (สำหรับการรับรอง/การทดสอบ IQA โปรดดูรายละเอียดโปรแกรมปัจจุบัน)

ห้องปฏิบัติการที่ทำกระบวนการกับสิ่งส่งตรวจ:		ประเภทการส่ง (วงหนึ่งตัวเลือก): IQA หรือโครงการวิจัย		
หมายเลขโครงการวิจัย (ไม่ต้องระบุหากเป็น IQA):		N1:		A*:
ID ของผู้เข้าร่วม (PTID/PID):		หมายเลขนัดหมาย:		ประเภทนัดหมาย:
วันที่เก็บ:		เวลาที่เก็บ:		
วันที่เริ่มทำกระบวนการ:		เวลาที่เริ่มทำกระบวนการ:		ทำกระบวนการ โดย (ชื่อย่อ):
รีเอเจนต์	การตรวจสอบคุณภาพด้วยสายตา (ใช่/ไม่ใช่)	ผู้ผลิต	หมายเลขรุ่นที่ผลิต	วันหมดอายุ
DMSO				
FBS				
WDR: HBSS หรือ PBS (วงกลมเลือกหนึ่งอย่าง)				
หลอดแยกเซลล์ (ฟรีด)				
ตัวกลางเกรเดียนต์ของความหนาแน่น				
		ปริมาณเป็นมิลลิลิตร (บันทึกเป็น X.Y)		
CPS	CPS	DMSO	FBS	1 วันทำการ (<18 ชั่วโมง)
ข้อมูลที่จะบันทึกในระหว่างการทำกระบวนการ				ตัวอย่าง
ประเภทหลอดตัวอย่าง (วงกลมเลือกหนึ่งประเภท หรือบันทึกประเภทหลอด “อื่น ๆ”)				ACD / HEP / EDT อื่น ๆ: _____
สภาวะของเลือด (วงกลมเลือกหนึ่งสภาวะหรือมากกว่า เพิ่มความคิดเห็นในหน้าหลังตามที่เป็น)				SAT/ HEM / CLT อื่น ๆ: _____
ปริมาณของเลือดครบที่สามารถใช้ได้ทีวัดได้ (WBV) (ให้ใกล้เคียงกับ 0.1 มิลลิเมตร มากที่สุด)				มิลลิลิตร
ปริมาณพลาสมาที่วัดได้ที่น่าออกและเปลี่ยนด้วย WDR ในปริมาณที่เท่ากัน (ให้ใกล้เคียงกับ 0.1 มิลลิเมตรมากที่สุด)				
บ่งชี้วิธีการทำกระบวนการ (วงกลมเลือกหนึ่งวิธี)				CSTFB / โอเวอร์เลย์ / อินเตอร์เลย์
วิธีการนับ: ชื่อเครื่องมือเฉพาะหรือการนับด้วยมือ (บันทึกในช่องทางด้านขวา)				
ปริมาณของการแขวนตะกอนใหม่สำหรับการนับของ WDR (V) = WBV X 0.20 (พิเศษให้เป็น (X.0) มิลลิเมตร ที่เป็นจำนวนเต็มทีใกล้เคียงที่สุด)				มิลลิลิตร
ความเข้มข้นเฉลี่ยของจำนวนเซลล์จากการนับ (C)				x 10 ⁶ เซลล์/มิลลิลิตร
จำนวนเซลล์ทั้งหมด (T) = C x V				x 10 ⁶ เซลล์
คำนวณเซลล์ที่ได้/มิลลิลิตรของเลือดครบ (การตรวจสอบการควบคุมคุณภาพ)=(T/ปริมาณของเลือดครบที่สามารถใช้ได้)				x 10 ⁶ เซลล์/มิลลิลิตร
หาก $T/A \geq NI$ จากนั้น ปริมาณของการแขวนตะกอนใหม่ของ CPS (V1) = A*				มิลลิลิตร
หาก $T/A < NI$ จากนั้น คำนวณปริมาณของการแขวนตะกอนใหม่ของ CPS ที่ประมาณไว้ (V1) = (T/NI x 10 ⁶ เซลล์) (1 มิลลิลิตร)				
คำนวณปริมาณของการแขวนตะกอนใหม่ขั้นสุดท้ายของ CPS (V1), (V1 ซึ่งปัดเศษลงให้เป็นค่ามิลลิลิตรเต็มที่ใกล้เคียงที่สุด (X.0))				มิลลิลิตร
คำนวณจำนวนเซลล์จริงต่อไมแอล N2 = (T/V) x V2; (V2=1 มิลลิลิตร)				x 10 ⁶ เซลล์/ไมแอล
หมายเหตุ: ห้ามเก็บเซลล์เกิน 50 ล้านเซลล์ต่อไมแอล				
จำนวนไมโรไมแอลที่ถูกแช่แข็งจริง				
หมายเหตุ: ควรเท่ากับปริมาณสุดท้ายของการแขวนตะกอนใหม่ของ CPS สำหรับแอลคิวต 1 มิลลิลิตร (V) และ ≤ (A)*				
พิมพ์และควบคุมคุณภาพเนื้อหาบาร์โค้ดของฉลาก LDMS (ชื่อของบุคคลที่ดำเนินการควบคุมคุณภาพ)				
วันที่และเวลาที่ถูกแช่แข็ง (วาดคดปปป/ชช:น) (อธิบายในหัวข้อความคิดเห็น หากไม่อยู่ภายใน 4 ชั่วโมงของเวลาที่เริ่มทำกระบวนการ)				
กรอกรายการ LDMS ที่เหลือ รวมถึงจำนวนเซลล์ทั้งหมดจากการนับและเวลาที่ถูกแช่แข็ง (ชื่อย่อ)				

หมายเหตุ: A* = จำนวนแอลคิวตสูงสุดที่ต้องการตามแผนภูมิการทำกระบวนการของห้องปฏิบัติการ (LPC) ที่จำเพาะต่อโครงการวิจัย ห้ามเก็บเกินจำนวนแอลคิวตนี้ สำหรับ IMPAACT
โปรดปฏิบัติตามข้อกำหนดที่ระบุไว้ในโครงการวิจัย

ภาคผนวก B: แผนงานการทำกระบวนการกับ PBMC ของ ACTG เวอร์ชัน 8.0 (หน้า 2 ของจำนวน 2 หน้า)

หมายเหตุ: ต้องกรอกช่องข้อมูลในแผนงานนี้ด้วยลายมือโดยใช้ปากกา

ห้องปฏิบัติการที่ทำกระบวนการกับสิ่งส่งตรวจ: _____

PTID/PID: _____



การขนส่งไครโอไวแอลไปยังกล่องจัดเก็บสำหรับตู้แช่แข็ง	
บุคคลที่ขนส่งไครโอไวแอลไปยังสถานที่เก็บกล่องจัดเก็บที่กำหนดโดย LDMS	
วันที่ (วคคปปปป)/เวลาที่ขนส่งไครโอไวแอลจากอุปกรณ์แช่แข็งแบบควบคุมอัตราไปยังกล่องจัดเก็บ (ต้องรักษาตัวอย่างไว้ที่ -80°C ระหว่างการขนส่ง)	
การทบทวนครั้งแรก (ปฐมภูมิ) (ชื่อ/วันที่)	
การทบทวนครั้งสุดท้าย (ทุติยภูมิ) (ชื่อ/วันที่)	

จำนวนฮีมาไซโตมิเตอร์จากการนับ	จำนวนทั้งหมดจากการนับ	เซลล์ที่มีชีวิต	ไม่มีชีวิต
สไลด์เข็มจุ่ม #1 (เซลล์/ตารางมิลลิเมตร)			
สไลด์เข็มจุ่ม #2 (เซลล์/ตารางมิลลิเมตร)			
สไลด์เข็มจุ่ม #3 (เซลล์/ตารางมิลลิเมตร)			
สไลด์เข็มจุ่ม #4 (เซลล์/ตารางมิลลิเมตร)			
จำนวนเซลล์เฉลี่ยจากการนับต่อสไลด์เข็มจุ่ม (เซลล์/ตารางมิลลิเมตร)			
แฟกเตอร์ในการเจือจาง PBMC (1:DF*)			
แฟกเตอร์ของฮีมาไซโตมิเตอร์สำหรับเซลล์/มิลลิลิตร	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴
ความเข้มข้นของจำนวนเซลล์จากการนับ (C) = (เซลล์เฉลี่ย/ตารางมิลลิเมตร)(DF)(10 ⁴); แปลงให้เป็น 10 ⁶ เซลล์/มิลลิลิตร	ไม่เกี่ยวข้อง	x 10 ⁶ เซลล์/มิลลิลิตร	ไม่เกี่ยวข้อง
% ความอยู่รอดได้ = (สไลด์เข็มจุ่มของเซลล์ที่มีชีวิต 4 อัน/สไลด์เข็มจุ่มของเซลล์ทั้งหมด 4 อัน) (100)	ไม่เกี่ยวข้อง		ไม่เกี่ยวข้อง

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

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

*****หมายเหตุ:** การเจือจางสำหรับเครื่องนับอัตโนมัติเป็นกรณีที่เหมาะสมที่สุดหากเป็นไปได้

หากดำเนินการนับโดยตรง ให้ป้อน 1 ในช่อง DF และกรอกในคอลัมน์

ความคิดเห็น การเขียนจากโครงการวิจัย และข้อมูลเพิ่มเติมที่ไม่ได้บันทึกไว้ที่อื่นในแผ่นงานนี้:

ภาคผนวก D: การแก้ไขปัญหา: การฟื้นตัวของ PBMC เมื่อไม่มีแอม PBMC ที่กำหนดไว้หลังจากการปั่นเหวี่ยงแบบ
เกรเดียนต์ของความหนาแน่น

D.1. ที่มา: หากมีบางอย่างผิดพลาดในระหว่างการปั่นเหวี่ยงเลือดแบบเกรเดียนต์ของความหนาแน่น ตัวกลางเกรเดียนต์ของความหนาแน่นและชั้นพลาสมาจะไม่แยกกันอย่างสมบูรณ์ และท่านอาจไม่เห็นชั้น PBMC อย่างตั้งใจ การฟื้นตัวของ PBMC บางส่วนสามารถทำได้ด้วยขั้นตอนเพิ่มเติม

D.2 ระบุปัญหา:

D.2.1 นำหลอดออกจากเครื่องปั่นเหวี่ยงและขนถ่ายไปยังแท่นวาง

D.2.2 พยายามระบุสาเหตุที่ทำให้ไม่มีชั้น PBMC ที่ชัดเจน สาเหตุที่เป็นไปได้มีดังต่อไปนี้:

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

D.3 จากสาเหตุข้างต้น หากสาเหตุแรกสามารถแก้ไขได้ง่าย หากสาเหตุเกิดจากเครื่องปั่นเหวี่ยงไม่สมดุล ให้หาว่าเหตุใดเครื่องปั่นเหวี่ยงจึงไม่สมดุล ตรวจสอบดังต่อไปนี้:

D.3.1 ตรวจสอบว่าหลอดสมดุลหรือไม่

D.3.2 ตรวจสอบว่าถ้วยใส่หลอดของเครื่องปั่นเหวี่ยงสมดุลหรือไม่

D.3.3 ตรวจสอบว่าแขนและถ้วยใส่หลอดของเครื่องปั่นเหวี่ยงได้รับการใส่จารบีและน้ำมันอย่างเหมาะสมหรือไม่

หมายเหตุ: หากสงสัยเครื่องปั่นเหวี่ยงเครื่องใดเครื่องหนึ่ง ให้ใช้เครื่องอื่น

D.4 หากปัญหาน่าจะได้รับการแก้ไขแล้ว ให้ปั่นเหวี่ยงตัวอย่างข้างนี้:

D.4.1 รีเอเจนต์:

- ตัวกลางเกรเดียนต์ของความหนาแน่น
- หลอดปั่นเหวี่ยงแบบกันแหลมขนาด 50 มิลลิลิตร
- ปิเปต

D.4.2 วิธีการ:

หมายเหตุ: ตัวกลางเกรเดียนต์ของความหนาแน่นเป็นพิษต่อเซลล์ ดังนั้นจึงควรทำงานอย่างมีประสิทธิภาพ

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

D.4.2.2 ปล่อยให้ตัวกลางเกรเดียนต์ของความหนาแน่นอุ่นจนมีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง (15 ถึง 25°C หรือสูงถึง 30°C โดยขึ้นอยู่กับสภาพภูมิอากาศ) ขณะทำงานกับตัวอย่าง

D.4.2.3 สำหรับหลอดที่ผสมแล้วแต่ละหลอด ให้ดูดจากหลอดขนาด 50 มิลลิลิตร ด้วย PTID ใช้ปิเปตเพื่อนำสิ่งที่อยู่ในตัวอย่างที่ผสมแล้วออกจากการแยกหรือ CSTFB อย่างช้า ๆ (โดยปกติ ทรินของ CSTFB จะหลุดออกจากที่)

D.4.2.4 ถ่ายตัวอย่างที่ผสมแล้ว 30 มิลลิลิตร ลงในหลอดที่มีตัวกลางเกรเดียนต์ของความหนาแน่น

D.4.2.5 ทำเช่นนี้ซ้ำสำหรับตัวอย่างที่ผสมแล้วทั้งหมด

D.4.2.6 วางหลอดลงในเครื่องปั่นเหวี่ยง โดยตรวจสอบว่าหลอดสมดุลหรือไม่

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

D.4.2.8 คอนนี้ควรสามารถมองเห็นชั้น PBMC ได้ (บ่อยครั้งจะสูญเสียบางเซลล์ไป ดังนั้นชั้นจึงอาจบางได้)

D.4.2.9 ถ่ายชั้น PBMC ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงแบบกันแหลมขนาด 50 มิลลิลิตร ที่ติดฉลากด้วยตัวระบุ PTID อย่างระมัดระวัง
ใช้หลอดใหม่หนึ่งหลอดสำหรับหลอดตัวกลางเกรเดียนต์ของความหนาแน่นทุกหลอด

D.4.2.10 ปิดฝาหลอดตัวกลางเกรเดียนต์ของความหนาแน่นอีกครั้ง

D.4.2.11 กลับไปที่หัวข้อ 15 ของโครงการวิจัยหลัก

หมายเหตุ: ในหัวข้อ “ความคิดเห็นและการเบี่ยงเบนจากโครงการวิจัย” ของแผนงานการทำกระบวนการกับ PBMC ให้บันทึกรายละเอียดของการเบี่ยงเบนจาก SOP (นั่นคือ การดำเนินการขั้นตอนจาก “ภาคผนวก D” เพื่อฟื้นตัว PBMC เนื่องจากไม่มีแถบ PBMC ที่กำหนดไว้หลังจากการปั่นเหวี่ยงแบบเกรเดียนต์ของความหนาแน่น) นอกจากนี้
สังเกตว่าการปั่นเหวี่ยงซ้ำใช้เวลานานเท่าไรเพื่อจะประมาณได้ว่าเซลล์อยู่ในตัวกลางเกรเดียนต์ของความหนาแน่นนานเพียงใด

ภาคผนวก E: การรวมชั้นบัฟเฟอร์โคตสำหรับการแยก PBMC ด้วยตัวกลางเกรเดียนต์ของความหนาแน่น

สามารถใช้กระบวนการนี้เมื่อทำการแยก PBMC จากหลอดเลือดหลายหลอดที่มีการรวมกันของ PTID-สารกันเลือดเป็นลิ่มเดียวกัน

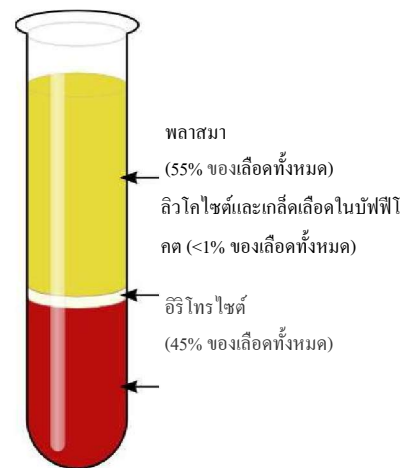
กระบวนการนี้ช่วยให้สามารถรวมชั้นบัฟเฟอร์โคตเพื่อลดการใช้รีเอเจนต์และวัสดุสิ้นเปลือง เพิ่มการฟื้นตัว และลดการปนเปื้อน

บัฟเฟอร์โคตเป็นส่วนหนึ่งของเลือดครบที่ใส่สารกันเลือดเป็นลิ่มที่มีเซลล์เม็ดเลือดขาว (WBC) และเกล็ดเลือด และเกิดขึ้นหลังจากการปั่นเหวี่ยงที่รียอต่อของชั้นพลาสมาและเซลล์เม็ดเลือดแดง WBC ส่วนใหญ่จะพบในชั้นบัฟเฟอร์โคต โดยมีเพียงเล็กน้อยมาก (ทั้งหมด <1 ล้าน) ที่ยังคงอยู่ในกลุ่มเซลล์เม็ดเลือดแดงหลังจากเก็บบัฟเฟอร์โคต

ชั้นบัฟเฟอร์โคตจะถูกเก็บพร้อมกับส่วนเล็กน้อยของพลาสมาและเซลล์เม็ดเลือดแดง (ประมาณ 1.5 มิลลิกรัม) แล้วถูกเจือจางก่อนการไอเวอร์เลี่ยนตัวกลางเกรเดียนต์สำหรับการแยกภูมิโฟไซต์

กระบวนการ:

- E1. ต้องแน่ใจว่าท่านได้คำนวณขั้นตอนในหัวข้อ 14.4.1 ถึง 14.4.2 เสร็จสิ้นแล้ว
- E2. ปั่นเหวี่ยงเลือดครบที่ 200 ถึง 400 x แรงโน้มถ่วง เป็นเวลา 10 นาที
- E3. เก็บพลาสมา (และเก็บรักษาไว้ตามที่จำเป็น - ดูหัวข้อ 14.3.4 ถึง 14.3.7) จากแต่ละหลอดจนถึงภายในประมาณ 5 มิลลิเมตร จากชั้นบัฟเฟอร์โคต (ซึ่งเห็นได้ชัดในกรณีส่วนใหญ่ เว้นแต่ผู้บวจะมีความไวโรฟิลต่ำลิมโฟไซต์ต่ำอย่างรุนแรง)
- E4. กำหนดความจุและจำนวนของหลอดปั่นเหวี่ยงแบบกันแหลมที่จะจำเป็นสำหรับการรวมกันของ PTID-สารกันเลือดเป็นลิ่มแต่ละชุด ห้ามรวมตัวอย่างจาก PTID/สารกันเลือดเป็นลิ่มที่แตกต่างกัน โดยทั่วไป:
 - สามารถรวมบัฟเฟอร์โคตจากหลอดเก็บเลือดขนาด 10 มิลลิกรัม สองหลอดลงในหลอดปั่นเหวี่ยงแบบกันแหลม 15 มิลลิกรัม หนึ่งหลอด
 - สามารถรวมบัฟเฟอร์โคตจากหลอดเก็บเลือดขนาด 10 มิลลิกรัม สูงถึงหกหลอดลงในหลอดปั่นเหวี่ยงแบบกันแหลม 50 มิลลิกรัม หนึ่งหลอด



- E5. ดึงหลอดปั่นเหวี่ยงแบบกันแหลมแต่ละหลอดด้วย PTID
- E6. เติมน้ำ WDR ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงแบบกันแหลมปราศจากเชื้อแต่ละหลอด

ความจุของหลอดปั่นเหวี่ยงแบบกันแหลม (มิลลิกรัม)	ปริมาตรของ WDR (มิลลิกรัม)
15	3
50	10-15

- E7. จับหลอดที่พลาสมาหมดไปแล้ว (ซึ่งตอนนี้มีพลาสมาตกค้างในปริมาณเล็กน้อยและเซลล์ที่อัดแน่น) ที่มุมประมาณ 30°
- E8. ใช้ปิเปตที่ทำจากโพลีโพรพิลีนแบบใช้แล้วทิ้งที่มีรูกว้าง (wide bore) ขนาด 2.5 มิลลิกรัม ปราศจากเชื้อในการเก็บบัฟเฟอร์โคต ดูดบัฟเฟอร์โคตออกโดยขยับปลายด้านล่างของหลอดลงให้ต่ำลง ดูดพลาสมาซ้ำ ๆ ตามด้วยบัฟเฟอร์โคต ซึ่งจะ “เลื่อน” ชั้นเซลล์เม็ดเลือดแดงที่อัดแน่น (การดูดออกประมาณ 1.5 มิลลิกรัม) ลงด้านล่าง ถ้ายังบัฟเฟอร์โคตไปยังหลอดที่มี WDR โดยกลั้วปิเปต 2 ถึง 3 ครั้งด้วยสารแขวนตะกอนของ WDR/เซลล์
- E9. เก็บและรวมบัฟเฟอร์โคตจากหลอดที่เหลือสำหรับการรวมกันของ PTID-สารกันเลือดเป็นลิ่มดังกล่าว
- E10. QS สารแขวนตะกอนของ WDR/เซลล์ด้วย WDR เติมน้ำจนได้ปริมาตรที่ต้องการสำหรับการดำเนินการแยกเซลล์แบบเกรเดียนต์ของความหนาแน่น ถ้อย ๆ ผสมบัฟเฟอร์โคตที่รวมกัน 3 ถึง 4 ครั้งด้วยปิเปต
- E11. ดำเนินการแยกเซลล์แบบเกรเดียนต์ของความหนาแน่นต่อในขั้นตอนในหัวข้อ 14.5 สำหรับ 14.5 “เลือดที่เจือจางแล้ว” หมายถึง “บัฟเฟอร์โคตที่เจือจางแล้ว”

ภาคผนวก F: รีโอเจนต์และวัสดุสิ้นเปลืองตัวอย่าง

หมายเหตุ: ต้องจัดซื้อรีโอเจนต์ทั้งหมดแบบปราศจากเชื้อ และต้องใช้เทคนิคปลอดเชื้อ

รีโอเจนต์/วัสดุสิ้นเปลือง	ตัวอย่าง	เลือกได้/จำเป็น
CSTFB แห้ง	• หลอดแยก Accuspin™ • หลอดแยก Leucosep®	เลือกได้ (หมายเหตุสำหรับ HVTN: จำเป็น)
หลอดแยกเซลล์ที่มีตัวกันแบบพรีด (CSTFB) ที่เติมสารไว้วางหน้าที่มีตัวกลางเกรเดียนต์ของความหนาแน่น 1.077	• Accuspin™ System Histopaque® -1077	เลือกได้ (หมายเหตุสำหรับ HVTN: ไม่อนุญาตหากไม่ได้รับอนุมัติจากเครือข่าย)
ตัวกลางเกรเดียนต์ของความหนาแน่น 1.077	• Ficoll-Paque PLUS และ PREMIUM • Lymphoprep™ • ตัวกลางสำหรับการแยกภูมิโฟไซค์ - LSM™	เลือกได้
ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) เกรดสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์	• Hybrimax, Sigma-Aldrich แค็ตตาล็อก # D2650, ที่ผ่านการทดสอบชีวพิษภายในตัว (endotoxin) และการทดสอบไฮบริโดมาแล้ว • หรือผลิตภัณฑ์ที่เทียบเท่า	จำเป็น
ซีรัมจากตัวอ่อนวัว (FBS)		ACTG: โปรดดูที่ www.actg-impact-lc.org ภายใต้ resources > documents สำหรับข้อมูลการสั่งซื้อ FBS ในปัจจุบันและรุ่นที่ผลิตที่ต้องการ HPTN: โปรดดูข้อมูลเกี่ยวกับรุ่นที่ผลิตปัจจุบันที่ตรวจสอบความเที่ยงตรงโดย IQA HVTN (และโครงการวิจัยข้ามเครือข่ายบางโครงการกับ HVTN): เครือข่ายเป็นผู้จัดเตรียม FBS ที่ได้รับอนุมัติจาก HVTN ให้ห้องปฏิบัติการในลักษณะที่ถูกดัดแปรด้วยความร้อนแล้ว และห้ามจัดซื้อนอกห่วงโซ่อุปทาน/กระบวนการของ HVTN
ไครโอไวแอล	• หลอด Nunc CryoTubes™ ที่ทำจากพอลิโพรพิลีน (PP) มีเกลียวใน และฝาเกลียว #377267 • Greiner Cryotubes แบบมีเกลียวใน ฝาเกลียวธรรมชาติ ทำจากพอลิโพรพิลีน (PP) กันกลม มีพื้นที่เขียน ฐานรูปดาว ปราศจากเชื้อ #122263 • ไวแอลแบบไครโอเจนิกที่ทำจากพอลิโพรพิลีน มีเกลียวใน ตั้งได้เอง และมีกันกลม Coming® ขนาด 2 มิลลิเมตร #430488	ควรใช้ Nunc/ต้องมีเกลียวในสำหรับเครือข่ายทั้งหมด หมายเหตุสำหรับ HVTN: ต้องใช้ Nunc CryoTubes™ #377267 สำหรับโครงการวิจัยของเครือข่ายของ HVTN การใช้สิ่งใด ๆ แทนที่ต้องได้รับอนุมัติจาก HVTN ก่อนที่ห้องปฏิบัติการจะทำการจัดซื้อ
ฉลากแบบไครโอเจนิก	• Cryo-Tags® และ Cryo-Babies® Brady B461 หรือ B490 • ฉลากสำหรับผู้แช่แข็ง Shamrock	เลือกได้
ปากกามาร์กเกอร์	• ปากกามาร์กเกอร์ Fisherband® #13-379 • ปากกาสำหรับห้องปฏิบัติการ/ปากกามาร์กเกอร์สำหรับห้องปฏิบัติการ Nalgene® #6310/#6311	เลือกได้

ภาคผนวก G: คู่มือฉบับย่อของ SOP เกี่ยวกับ PBMC—CSTFB

ต้องใช้แผนงานการทำกระบวนการกับ PBMC และ LDMS สำหรับเครือข่ายทั้งหมด (ดูรายละเอียดในหัวข้อ 5) ก่อนใช้คู่มือฉบับย่อนี้เป็นครั้งแรก ต้องทบทวน SOP เกี่ยวกับ PBMC

ฉบับเต็มเพื่อดูหมายเหตุและรายละเอียดที่สำคัญ ตลอดจนแนวทางที่จำเพาะต่อเครือข่าย

ขั้นตอน	การอ้างอิงกับ SOP
1. เตรียมและทำให้ CPS เย็น	11.2
2. เตรียมตัวอย่างเลือดครบ รีเอเจนต์ และวัสดุสิ้นเปลือง	13.2
3. หากต้องใช้แอลกอฮอล์ของพลาสมาตามคำแนะนำของโครงการวิจัย: a. บั่นเหรียญเลือดครบที่ 200 ถึง 400 x แรงโน้มถ่วง เป็นเวลา 10 นาที b. ทำเครื่องหมายปริมาตรทั้งหมดของเลือดที่เมนิสคัส แล้วถ่ายพลาสมาไปยังหลอดปั่นเหวี่ยงแบบกันแหลมขนาด 15 หรือ 50 มิลลิลิตร ที่ติดฉลากแล้วสำหรับการทำกระบวนการเพิ่มเติม (800 ถึง 1200 x แรงโน้มถ่วง เป็นเวลา 10 นาที โดยเลือกใช้เบรกหรือไม่ก็ได้) c. เดิม WDR ในปริมาณที่เพียงพอเพื่อทำให้เลือดกลับมามีเลือดครบในปริมาตรดั้งเดิม ก่อข ๑ ผสม และทำกระบวนการกับ PBMC ต่อ	13.3
4. เดิม WDR 5 มิลลิลิตร ลงใน CSTFB ที่ติดฉลากแล้วแต่ละหลอด และ WDR 25 มิลลิลิตรลงในหลอดล้างแบบกันแหลมขนาด 50 มิลลิลิตร ที่สอดคล้องกันที่ติดฉลากแล้วแต่ละหลอด (หมายเหตุ: สามารถดำเนินการก่อนหน้านั้น ได้โดยเป็นส่วนของการเตรียมการ [ขั้นตอนที่ 2]) 5. ถ่ายเลือด 15 ถึง 20 มิลลิลิตร (12-22 กิโลกรัม) ลงใน CSTFB ที่ติดฉลากแล้ว a. ติดตามปริมาตรที่วัดได้อย่างระมัดระวัง บันทึก UWBV ที่วัดได้ให้แม่นยำให้ใกล้เคียงกับ 0.1 มิลลิลิตร มากที่สุด 6. เดิมปริมาตรที่กลั่นในหลอด WDR และ WDR ขั้นสุดท้ายลงใน CSTFB สูงถึง 30 มิลลิลิตร (WDR + เลือดครบ)	13.4
7. บั่นเหรียญที่ 800 ถึง 1000 x แรงโน้มถ่วง เป็นเวลา 15 นาทีที่ 15 ถึง 30°๔ โดยปิดเบรก/ตั้งค่าเป็นศูนย์ 8. ตรวจสอบหลอดเพื่อหาปัญหาที่อาจเกิดขึ้นได้ 9. เก็บบัฟเฟอร์โคของ CSTFB แต่ละชั้นลงในหลอดปั่นเหวี่ยงแบบกันแหลมขนาด 50 มิลลิลิตร ที่สอดคล้องกันหลอดเดียวที่ติดฉลากแล้วที่เดิม WDR 25 มิลลิลิตร ไว้ล่วงหน้า	13.5
10. เดิม WDR เพื่อ QS ให้มีปริมาตรทั้งหมดที่ 45 มิลลิลิตร และก่ข ๑ ผสม 11. การล้าง #1—บั่นเหรียญที่ 200 ถึง 400 x แรงโน้มถ่วง เป็นเวลา 10 นาทีที่ 15 ถึง 30°๔ โดยเลือกใช้เบรกหรือไม่ก็ได้ 12. ตรวจสอบหาคะกอนเซลล์ บันทึกการสังเกตที่ไม่คาดคิด 13. ก่ข ๑ นำส่วนเหนือตะกอนออกโดยไม่รบกวนตะกอนเซลล์	15.1
14. ทำการแขวนตะกอนใหม่กับตะกอนเซลล์ใน WDR ปริมาณเล็กน้อย ทำให้ได้สารแขวนตะกอนของเซลล์ที่เป็นเนื้อเดียวกัน 15. รวมสารแขวนตะกอนของตะกอนสูงถึง 4 ชนิดลงในหลอดปั่นเหวี่ยงแบบกันแหลมขนาด 50 มิลลิลิตร หนึ่งหลอด 16. เดิมปริมาตรที่กลั่นในหลอด WDR และ WDR ขั้นสุดท้ายที่ 45 มิลลิลิตร ลงในหลอดเซลล์ 17. การล้าง #2—บั่นเหรียญที่ 200 ถึง 400 x แรงโน้มถ่วง เป็นเวลา 10 นาทีที่ 15 ถึง 30°๔ โดยเลือกใช้เบรกหรือไม่ก็ได้ 18. ตรวจสอบหาคะกอนเซลล์ บันทึกการสังเกตที่ไม่คาดคิด 19. ก่ข ๑ นำส่วนเหนือตะกอนออกโดยไม่รบกวนตะกอนเซลล์	15.2
20. คำนวณปริมาตรของการแขวนตะกอนใหม่สำหรับการนับของ WDR (V) 21. รวมตะกอนเซลล์ลงในหนึ่งหลอดโดยใช้ WDR ในปริมาตรของการแขวนตะกอนใหม่ ปริมาตรนี้เป็นปริมาตรที่ใช้ใช้ในการนับจำนวนเซลล์ 22. นับและคำนวณจำนวนเซลล์ทั้งหมด 23. คำนวณเซลล์ที่ได้เป็นเซลล์/มิลลิลิตรของเลือดครบที่สามารถใช้ได้	15.3
24. คำนวณปริมาตรสุดท้ายของการแขวนตะกอนใหม่ของ CPS ตรวจสอบการคำนวณ	15.4
25. ดำเนินการพิมพ์ การติดฉลาก และการควบคุมคุณภาพโครโอวแอลให้เสร็จสิ้นก่อนปั่นเหวี่ยงขั้นสุดท้าย	15.5
26. บั่นเหรียญที่ 200 ถึง 400 x แรงโน้มถ่วง เป็นเวลา 10 นาทีที่ 15 ถึง 30°๔ โดยเลือกใช้เบรกหรือไม่ก็ได้	15.6
27. ก่ข ๑ นำส่วนเหนือตะกอนออกโดยไม่รบกวนตะกอนเซลล์	15.7
28. ก่ข ๑ ทำการแขวนตะกอนใหม่กับตะกอนใน CPS เย็น (V _c) ขณะหมุนหลอดเพื่อให้กระจายเท่า ๆ กัน ก่ข ๑ ทำแอลกอฮอล์ของ CPS-เซลล์	15.8
29. ขนถ่ายโครโอวแอลทั้งหมดไปยังหน่วยแช่แข็งแบบควบคุมอัตราวันที่ (≤ 10 นาทีหลังจากการเดิม CPS ลงในตัวอย่าง) และวางไว้ในตู้แช่แข็ง	17
30. หลังจากช่วงเวลาที่เหมาะสม ให้ขนถ่ายโครโอวแอลไปยังอุปกรณ์จัดเก็บในสถานที่และขนส่งภายในช่วงเวลาที่เครือข่ายกำหนดไว้	18.1
31. กรอกและทบทวนแผนงานการทำกระบวนการกับ PBMC และการป้อนข้อมูลตามที่เครือข่ายมีคำสั่ง	

ภาคผนวก H: คู่มือฉบับย่อของ SOP เกี่ยวกับ PBMC—โอเวอร์เลย์ด้วยมือ

ต้องใช้แผนงานการทำกระบวนการกับ PBMC และ LDMS สำหรับเครือข่ายทั้งหมด (ดูรายละเอียดในหัวข้อ 5) ก่อนใช้คู่มือฉบับย่อนี้เป็นครั้งแรก ต้องทบทวน SOP เกี่ยวกับ PBMC

ฉบับเต็มเพื่อดูหมายเหตุและรายละเอียดที่สำคัญ ตลอดจนแนวทางที่จำเพาะต่อเครือข่าย

ขั้นตอน (ปริมาณสำหรับตัวอย่างที่มีขนาดเล็กกว่าจะเป็นตัวเอียง)	การอ้างอิงกับ SOP
1. เตรียมและทำให้ CPS เย็น	11.2
2. เตรียมตัวอย่างเลือดครบ ริเอเจนต์ และวัสดุสิ้นเปลือง	14.2
3. หากต้องใช้แอลกอฮอล์ของพลาสมาตามคำแนะนำของโครงการวิจัย: a. บั่นเหรียญเลือดครบที่ 200 ถึง 400 x แรงโน้มถ่วง เป็นเวลา 10 นาที b. ทำเครื่องหมายปริมาตรทั้งหมดของเลือดที่เมนิสคัส แล้วถ่ายพลาสมาไปยังหลอดปั่นเหวี่ยงแบบกันแหลมขนาด 15 หรือ 50 มิลลิลิตร สำหรับการทำการกระบวนการเพิ่มเติม (800 ถึง 1200 x แรงโน้มถ่วง เป็นเวลา 10 นาที โดยเลือกใช้เบรกหรือไม่ก็ได้) c. เดิม WDR ในปริมาณที่เพียงพอเพื่อให้เลือดกลับมามีเลือดครบในปริมาตรดั้งเดิม ถ้อย ๆ ผสม และทำการกระบวนการกับ PBMC ต่อ	14.3
4. ถ่ายเลือดครบลงในหลอดปั่นเหวี่ยงแบบกันแหลมขนาด 50 มิลลิลิตร (15 มิลลิลิตร) ปราศจากเชื้อและเจือจางด้วย WDR ตามที่จำเป็น	14.4
5. โอเวอร์เลย์เลือดบนด้านบนของตัวกลางการเคียนซ์ของความหนาแน่นอย่างระมัดระวังและช้า ๆ (วิธีอื่นคือโอเวอร์เลย์เป็นทางเลือกหนึ่งที่ได้รับอนุมัติ ยกเว้นโครงการวิจัยของ HVTN)	
6. บั่นเหรียญที่ 400-800 x แรงโน้มถ่วง เป็นเวลา 15-30 นาที โดยปิดเบรก/ตั้งค่าเป็นศูนย์	14.5
7. ตรวจสอบหลอดปั่นเหวี่ยงแบบกันแหลมแต่ละหลอดเพื่อหาปัญหาที่อาจเกิดขึ้นได้	
8. เก็บบัพฟิโคตแต่ละชั้นลงในหลอดปั่นเหวี่ยงแบบกันแหลมขนาด 50 มิลลิลิตร (15 มิลลิลิตร) ที่สอดคล้องกันหลอดเดียว	
9. เดิม WDR จนถึง QS เพื่อให้มีปริมาตรทั้งหมด 45 มิลลิลิตร (10 มิลลิลิตร) และถ้อย ๆ ผสม	15.1
10. การล้าง #1—บั่นเหรียญที่ 200 ถึง 400 x แรงโน้มถ่วง เป็นเวลา 10 นาทีที่ 15 ถึง 30°ซ โดยเลือกใช้เบรกหรือไม่ก็ได้	
11. ตรวจสอบหาคะกอนเซลล์	
12. ถ้อย ๆ นำส่วนเหนือตะกอนออกโดยไม่รบกวนตะกอนเซลล์	
13. ทำการแขวนตะกอนใหม่กับตะกอนเซลล์ใน WDR ปริมาณเล็กน้อย ทำให้ได้สารแขวนตะกอนของเซลล์ที่เป็นเนื้อเดียวกัน	15.2
14. รวมสารแขวนตะกอนของตะกอนสูงถึง 4 ชนิดลงในหลอดปั่นเหวี่ยงแบบกันแหลมขนาด 50 มิลลิลิตร หนึ่งหลอด (2 ชนิดลงในหลอดขนาด 15 มิลลิลิตร)	
15. เดิมปริมาตรที่กักไว้ในหลอด WDR และ WDR สุดท้ายสูงถึง 45 มิลลิลิตร (10 มิลลิลิตร) ลงในหลอดเซลล์	
16. การล้าง #2—บั่นเหรียญที่ 200 ถึง 400 x แรงโน้มถ่วง เป็นเวลา 10 นาทีที่ 15 ถึง 30°ซ โดยเลือกใช้เบรกหรือไม่ก็ได้	
17. ตรวจสอบหาคะกอนเซลล์	
18. ถ้อย ๆ นำส่วนเหนือตะกอนออกโดยไม่รบกวนตะกอนเซลล์	
19. คำนวณปริมาตรของการแขวนตะกอนใหม่สำหรับการนับของ WDR (V)	15.3
20. รวมตะกอนเซลล์ลงในหนึ่งหลอดโดยใช้ WDR ในปริมาตรของการแขวนตะกอนใหม่ ปริมาตรนี้เป็นปริมาตรที่ใช้ใช้ในการนับจำนวนเซลล์	
21. นับและคำนวณจำนวนเซลล์ทั้งหมด	
22. คำนวณเซลล์ที่ได้เป็นเซลล์/มิลลิลิตรของเลือดครบที่สามารถใช้ได้	
23. คำนวณปริมาตรสุดท้ายของการแขวนตะกอนใหม่ของ CPS ตรวจสอบการคำนวณ	15.4
24. ดำเนินการพิมพ์ การติดฉลาก และการควบคุมคุณภาพโคร โอไอแอลให้เสร็จสิ้นก่อนบั่นเหรียญขั้นสุดท้าย	15.5
25. บั่นเหรียญที่ 200 ถึง 400 x แรงโน้มถ่วง เป็นเวลา 10 นาทีที่ 15 ถึง 30°ซ โดยเลือกใช้เบรกหรือไม่ก็ได้	15.6
26. ถ้อย ๆ นำส่วนเหนือตะกอนออกโดยไม่รบกวนตะกอนเซลล์	15.7
27. ถ้อย ๆ ทำการแขวนตะกอนใหม่กับตะกอนใน CPS เย็น (V) ขณะหมุนหลอดเพื่อให้กระจายเท่า ๆ กัน แนะนำให้ทำงานบนน้ำแข็งเปียก	
28. ถ้อย ๆ ทำแอลกอฮอล์ของ CPS-เซลล์	
29. ขนถ่ายโคร โอไอแอลทั้งหมดไปยังหน่วยแช่แข็งแบบควบคุมอัตราทันที (≤ 10 นาทีหลังจากการเดิม CPS ลงในตัวอย่าง) และวางไว้ในตู้แช่แข็ง	15.8
30. หลังจากช่วงเวลาที่เหมาะสม ให้ขนถ่ายโคร โอไอแอลไปยังอุปกรณ์จัดเก็บในสถานที่และขนส่งภายในช่วงเวลาที่เครือข่ายกำหนดไว้	17
31. กรอกและทบทวนแผนงานการทำกระบวนการกับ PBMC และการป้อนข้อมูลตามที่เครือข่ายมีคำสั่ง	18.1

ภาคผนวก I: ประวัติการแก้ไขจากเวอร์ชัน 7.0 เป็น 8.0

วันที่มีผลของเวอร์ชัน (วว/ตต/ปป)	หัวข้อ	การแก้ไข
8.0 14 มิถุนายน 2026	หน้าปก	อัปเดตเวอร์ชัน วันที่มีผล วันที่ใช้แทน และการอ้างอิงภาคผนวก
	สารบัญ	เพิ่มสารบัญที่มีหมายเลขหน้าใหม่สำหรับหัวข้อและภาคผนวกทั้งหมด
	5	ชี้แจงข้อกำหนดของแผนงานที่จำเพาะต่อเครือข่ายให้ชัดเจน เพิ่มข้อกำหนดของ ACTG ลบการอ้างอิงถึง LPC ออก อัปเดตตารางการติดตามขององค์ประกอบหลัก
	6	แก้ไขคำเล็กน้อยในหัวข้อสิ่งส่งตรวจที่จับตัวเป็นลิ่มและเซลล์ที่ได้ต่ำ
	10	อัปเดตการอ้างอิง โยงภาคผนวกเนื่องจากการเปลี่ยนตัวอักษรในภาคผนวก
	11	ปรับโครงสร้างการเตรียม CPS ใหม่: แบ่งออกเป็นวิธีที่ 1 (HVTN/HPTN) และวิธีที่ 2 (ACTG) พร้อมอัปเดตสูตร ตัวอย่าง และขั้นตอน
	15	จัดลำดับขั้นตอนการแขวนตะกอนใหม่ของ CPS ใหม่และชี้แจงให้ชัดเจน อัปเดตการอ้างอิงโยงภาคผนวก
	ภาคผนวก	เพิ่มภาคผนวก B ใหม่ (แผนงานการทำกระบวนการกับ PBMC ของ ACTG) เปลี่ยนตัวอักษรในภาคผนวกทั้งหมดใหม่ เปลี่ยนชื่อภาคผนวก A ใหม่
	ภาคผนวก I (ประวัติการแก้ไข)	เปลี่ยนชื่อจากภาคผนวก H อัปเดตเพื่อให้สอดคล้องกับเวอร์ชัน 8.0
7.0 19 สิงหาคม 2024	ทั้งหมด	เพิ่มโลโก้ HANC ที่แก้ไขใหม่ในส่วนหัว
	ทั้งหมด	ลบการอ้างอิงถึง MTN
	ทั้งหมด	ลบการอ้างอิงถึง IMPAACT
	ทั้งหมด	อัปเดตหัวข้อทั้งหมดอย่างครอบคลุมให้สอดคล้องกับแนวทาง โครงการวิจัย และแนวปฏิบัติในปัจจุบัน
	การอนุมัติ	ลบการอนุญาตของ MTN
	การอนุมัติ	ลบการอนุญาตของ IMPAACT
	การอนุมัติ	Kathryn Dougherty ทำหน้าที่แทน John Hural สำหรับการอนุญาตของ HVTN
	8.1.5	ข้อกำหนดสำหรับโครโอไอแอลที่มีเกลียวสำหรับการจัดเก็บ PBMC
	15.4	วิธีการบรรจุไอแอลที่สอดคล้องกันสำหรับ ACTG, HPTN และ HVTN
6.0 26 เมษายน 2018	การอนุมัติ	Grace Aldrovandi ทำหน้าที่แทน Bob Coombs สำหรับการอนุญาตของ ACTG John Hural ทำหน้าที่แทน Constance Ducar สำหรับการอนุญาตของ HVTN Edward Livant ทำหน้าที่แทน Charlene Dezzutti สำหรับการอนุญาตของ MTN
	8.1.4	เพิ่มข้อกำหนดเพิ่มเติมที่บันทึกในบันทึกประจำวันวันที่ 7 ตุลาคม 2016 สำหรับห้องปฏิบัติการของ ACTG และ IMPAACT เท่านั้น อีกทั้งเพิ่มข้อกำหนดเพิ่มเติมเกี่ยวกับโครโอไอแอลสำหรับเครือข่ายทั้งหมด
	18.2.1	เพิ่มแนวทางเพิ่มเติมที่เกี่ยวข้องกับจุดตั้งอุณหภูมิตู้แช่แข็ง
	ภาคผนวก D	เปลี่ยน “WBC ส่วนมาก...” เป็น “WBC ส่วนใหญ่...”
	ภาคผนวก G	เพิ่มข้อมูลเพิ่มเติมในหัวข้อโครโอไอแอลที่เกี่ยวข้องกับการใช้หลอดไมโครทิวป์เกลียว SARSTEDT
5.2 22 กันยายน 2014	5.1.3	เปลี่ยน “ห้องปฏิบัติการอาจใช้แผนงานการทำกระบวนการกับ PBMC ของ HVTN หรือแก้ไขให้เหมาะสมสำหรับกระบวนการของห้องปฏิบัติการนั้น” เป็น “ห้องปฏิบัติการอาจใช้แผนงานการทำกระบวนการกับ PBMC ของ HVTN ซึ่งแก้ไขให้เป็นไปตามข้อกำหนดของเครือข่ายที่สอดคล้องกันและเหมาะสมสำหรับกระบวนการของห้องปฏิบัติการนั้น”
5.1 30 กรกฎาคม 2014	5.1.3	แนวทางสำหรับการติดตามแผนภูมิการทำกระบวนการกับ PBMC-: จำนวนเซลล์ทั้งหมด : เดิม “(เลือกได้สำหรับ HVTN)” ถัดจาก N
	16.4.5	ละเว้นหมายเหตุเนื่องจากไม่มีพริตในหลอดแบบกันแหลมเมื่อทำไอเวอร์เลย์หรืออินเตอร์เลย์ด้วยมือ
	16.4.6	เปลี่ยนการอ้างอิงสำหรับวิธีไอเวอร์เลย์เป็น 16.4.6.1 และวิธีอินเตอร์เลย์เป็น 16.4.6.2
	18.1	เพิ่มแนวทางเกี่ยวกับเวลาจัดเก็บ/ขนถ่ายสำหรับ HPTN, IMPAACT และ MTN
	14, 18.1, 18.3, 18.3.1	เปลี่ยน “ตู้แช่แข็งเชิงกล LN2 /-150°ซ” เป็น “ถัง LN2 หรือตู้แช่แข็งเชิงกล -150°ซ”
	18.3	ปรับภาษาเกี่ยวกับ PBMC ที่เก็บในถัง LN2 หรือตู้แช่แข็งเชิงกล -150°ซ ให้ง่ายขึ้นและไม่รวมข้อระบุว่า “นานกว่า 4 สัปดาห์”
	18.3.1-18.3.2	เปลี่ยนแนวทางเกี่ยวกับเวลาขนถ่ายที่จำเป็นจาก “วันทำการถัดไป” เป็น “ภายใน 72 ชั่วโมง”
	18.3.1	เปลี่ยน “LN2 /-150°ซ” เป็น “LN2 หรือ -150°ซ”

	22, 24.2	ลบตัวเลือก RPMI
	ภาคผนวก E, F	เปลี่ยนการอ้างอิงถึง SOP ขั้นตอนที่ 1 จาก “11.3” เป็น “11.2”
	ภาคผนวก E	เปลี่ยนการอ้างอิงถึง SOP ขั้นตอนที่ 31 จาก “18 หรือ 19” เป็น “18”
	ภาคผนวก E	เปลี่ยนการอ้างอิงถึง SOP ขั้นตอนที่ 32 จาก “19.2” เป็น “19.1”
	ภาคผนวก E	เปลี่ยนข้อความของขั้นตอนที่ 32 เป็น “กรอกแผนงานการทำกระบวนการกับ PBMC ตามที่เครือข่ายมีคำสั่ง”
	ภาคผนวก F	ขั้นตอนที่ 9-12: เปลี่ยน “16.1” เป็น “17.1”
	ภาคผนวก F	ขั้นตอนที่ 13-18: เปลี่ยน “16.2” เป็น “17.2”
	ภาคผนวก F	ขั้นตอนที่ 19-22: เปลี่ยน “16.3” เป็น “17.3”
	ภาคผนวก F	เปลี่ยนการอ้างอิงถึง SOP ขั้นตอนที่ 30 จาก “18 หรือ 19” เป็น “18”
	ภาคผนวก F	เปลี่ยนการอ้างอิงถึง SOP ขั้นตอนที่ 31 จาก “19.2” เป็น “19.1”
	ภาคผนวก F	เปลี่ยนข้อความของขั้นตอนที่ 31 เป็น “กรอกแผนงานการทำกระบวนการกับ PBMC ตามที่เครือข่ายมีคำสั่ง”
5.0 01 พฤษภาคม 2014	การอนุมัติ	Grace Aldrovandi ทำหน้าที่แทน Susan Fiscus สำหรับการอนุญาตของ IMPAACT
	5.1.3	แนวทางสำหรับการติดตามแผนภูมิการทำกระบวนการกับ PBMC : คำแนะนำ: เปลี่ยน “L = LDMS กำหนดให้ต้องทำการติดตามใน LDMS” เป็น “L= ช่องข้อมูลที่จำเป็นใน LDMS สำหรับสิ่งส่งตรวจของเครือข่าย”
	5.1.3	แนวทางสำหรับการติดตามตารางการทำกระบวนการกับ PBMC-: เปลี่ยน “หมายเลขสิ่งส่งตรวจของ LDMS” เป็น “ID ของสิ่งส่งตรวจทั่วโลกของ LDMS”
	5.1.3	เปลี่ยนเซลล์ที่เดิมสีเทาเพื่อป้องกันข้อมูลไม่จำเป็นเป็นสีดำ
	7.1.8	เพิ่ม HPTN และ MTN
	10.2	ละเว้นทางเลือกสำหรับการใช้ RPMI เป็นสิ่งแทนที่
	14	การเปลี่ยนแปลงการจัดรูปแบบ
	18 และ 19	รวมคำแนะนำในการจัดเก็บชั่วคราวและในสถานที่จากสองหัวข้อในหัวข้อ 18 หัวข้อเดียว
	19	แยกภาษาที่อธิบายการกรอกเอกสารเกี่ยวกับการทำกระบวนการที่ซ้ำในหัวข้อ 18 และหัวข้อ 19 is ออกเป็นหัวข้อของตัวเอง
	ภาคผนวก H	ลบการเปลี่ยนแปลงประวัติเวอร์ชันอื่น โดยเก็บไว้เฉพาะการเปลี่ยนแปลงเวอร์ชันปัจจุบันที่เหมาะสมกับเอกสารนี้เท่านั้น