
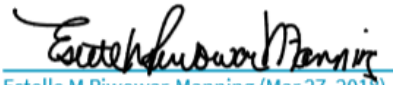




Título:	Procedimiento operativo estándar del procesamiento de PBMC entre redes v6.0		
Fecha de creación:	1 de abril de 2009	Páginas totales:	48
Fecha de entrada en vigencia:	30 de abril de 2018	Número de SOP:	HANC-LAB-P0001 v6.0
Redactado por:	Procedimiento Operativo Estándar (SOP) de PBMC entre Redes Grupo de trabajo	Reemplaza el SOP fechado el:	30 de agosto de 2014

	Red	Nombre, cargo	Firma	Fecha
Aprobado por (red):	ACTG / IMPAACT	Grace Aldrovandi, MD Investigador principal de laboratorio de la red de ACTG / IMPAACT	 <u>Grace Aldrovandi</u> Grace Aldrovandi (Apr 2, 2018)	4/2/2018
	HPTN	Estelle Piwowar-Manning, MT(ASCP)SI Directora adjunta del Laboratorio de la Red HPTN	 <u>Estelle M Piwowar-Manning</u> Estelle M Piwowar-Manning (Mar 27, 2018)	3/27/2018
	HVTN	John Hural, PhD Director adjunto para operaciones de laboratorio de HVTN		4/23/2018
	MTN	Edward Livant Gerente de investigación de laboratorio de la red MTN		3/26/2018

Historial de cambios	Para ver el historial de cambios completo, consulte el apéndice H.
-----------------------------	--

	Nombre, cargo	Firma	Fecha
Revisado por (laboratorio):			

Índice

1	Propósito	3
2	Alcance	3
3	Aspectos generales.....	3
4	Autoridad y responsabilidad	3
5	Información de resultados	3
6	Muestra	6
7	Equipos	7
8	Elementos desechables.....	9
9	Equipos de protección personal.....	10
10	Reactivos	10
11	Preparación de reactivos.....	12
12	Calibración.....	14
13	Control de calidad	14
14	Introducción y pautas sobre el procesamiento de PBMC16	15
15	Separación de células y dilución de sangre con reemplazo de plasma por medio de tubo de separación de células con barrera de fritada (CSTFB)	16
16	Separación de células por método manual de colocación por encima o por debajo del medio de gradiente de densidad y dilución de sangre con reemplazo de plasma mediante separación manual de células con gradiente de densidad	20
17	Lavado, recuento, resuspensión, concentración y congelación a velocidad controlada durante la noche	24
18	Almacenamiento de las PBMC (temporal o in situ)	28
19	Cómo completar el procesamiento de documentos.....	30
20	Cálculos	31
21	Limitaciones del procedimiento	31
22	Glosario de términos.....	31
23	Referencias.....	33
24	Documentos adicionales (que deben ser conservados por el laboratorio)	33
25	Apéndices	33
	Apéndice A: Hoja de trabajo para procesamiento de PBMC de HVTN	35
	Apéndice B: Modelo de diario de cambios del isopropanol del recipiente Mr. Frosty NALGENE®	37
	Apéndice C: Resolución de problemas: Recuperación de PBMC ante la ausencia de una banda definida de PBMC después del centrifugado en gradiente de densidad	38
	Apéndice D: Combinación de capas leucocíticas para el aislamiento de PBMC con medios de gradiente de densidad	40
	Apéndice E: Guía rápida del SOP de PBMC: Tubos CSTFB	41
	Apéndice F: Guía rápida del SOP de PBMC: Método de colocación manual por encima del medio de gradiente de densidad	43
	Apéndice G: Ejemplos de reactivos y suministros	45
	Apéndice H: Historial de cambios de la Versión 5.0 a 6.0	47

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

1 Propósito

- 1.1 El presente Procedimiento operativo estándar (Standard Operating Procedure, SOP) describe los procedimientos para el aislamiento y la criopreservación de células mononucleares de sangre periférica (Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMC) a partir de sangre entera.

2 Alcance

- 2.1 Este procedimiento se deberá utilizar para procesar muestras de sangre para el aislamiento, la criopreservación y el almacenamiento de muestras de PBMC. Las instrucciones específicas del protocolo de la red reemplazan aquellas incluidas en el presente SOP.

3 Aspectos generales

- 3.1 Se utilizan PBMC recientemente recolectadas o criopreservadas para la evaluación de respuestas inmunitarias celulares inducidas por vacunas o terapias antirretrovirales, cambios en la respuesta inmunitaria asociados con el VIH y recuperación de virus competente para la replicación. Estos ensayos requieren PBMC que se hayan aislado y criopreservado en circunstancias estrictamente definidas que garanticen una recuperación, viabilidad y funcionalidad óptimas. Algunos estudios de validación indican que es ideal procesar y congelar la sangre dentro de las ocho horas posteriores a su extracción para mantener la máxima función de las células en los ensayos de monitoreo del sistema inmunitario.

4 Autoridad y responsabilidad

- 4.1 El Director del Laboratorio de la Red (o la persona que este designe) tiene la autoridad para establecer, revisar y actualizar este procedimiento.
- 4.2 La Oficina de Coordinación de Redes para el VIH/SIDA (HIV/AIDS Network Coordination, HANC) está a cargo del mantenimiento y control de la documentación de SOP.
- 4.3 El Director del Laboratorio está a cargo de implementar este procedimiento SOP HANC o el procedimiento SOP específico del laboratorio y de asegurar que todo el personal adecuado esté capacitado. Un SOP de laboratorio debe:
- Incluir, *sin modificaciones en el procedimiento*, las partes de la versión actual del SOP de procesamiento de PBMC entre redes que se usan dentro del laboratorio de la red afiliado al sitio.
 - Hacer referencia a la versión actual del SOP de procesamiento de PBMC entre redes.

Nota: En el caso de los laboratorios que procesan PBMC de HVTN, el laboratorio debe implementar el SOP de PBMC de HANC tal como está escrito o la versión específica de HVTN del SOP de HANC.

- 4.4 Todos los técnicos son responsables de leer y comprender este SOP antes de realizar los procedimientos descritos.

5 Información de resultados

- 5.1 Se requiere una Hoja de trabajo para procesamiento de PBMC y el Sistema de Gestión de Datos del Laboratorio (Laboratory Data Management System, LDMS) para todas las redes a fin de llevar un registro del horario del procesamiento, los cálculos y la documentación de los problemas que surjan durante el procesamiento.

- 5.1.1 Requisitos para todas las redes:

- Ingresar los datos en el sistema LDMS para generar las etiquetas de los crioviales, la documentación del lugar de almacenamiento y los requisitos de las guías de envío. Consulte la tabla que aparece a continuación para ver información detallada sobre los requisitos.
- Informar las desviaciones de acuerdo con el protocolo del laboratorio.

5.1.2 Requisitos para la red HVTN:

Se requiere el uso de una Hoja de trabajo para procesamiento de PBMC de HVTN en su totalidad. Si en las “Instrucciones de procesamiento específicas del protocolo de HVTN” no se requiere una hoja de trabajo de PBMC específica del protocolo, se puede usar la hoja de trabajo genérica que aparece en el Apéndice A y en

<http://www.hanc.info/labs/labresources/procedures/Pages/pbmcSop.aspx>.

5.1.3 Requisitos para la red ACTG, IMPAACT, HPTN y MTN:

- El laboratorio puede usar la **Hoja de trabajo para procesamiento de PBMC de HVTN** modificado para cumplir con requisitos de red correspondiente y apropiados para los procedimientos del laboratorio. Si el laboratorio elige crear su propia Hoja de trabajo para procesamiento de PBMC y materiales de registro suplementarios (como el LDMS o una hoja de trabajo o registro independiente), deberá seguir las pautas especificadas a continuación.
- En <http://www.hanc.info/labs/labresources/procedures/Pages/pbmcSop.aspx>, encontrará versiones electrónicas de las Hojas de trabajo para procesamiento de PBMC editables y ejemplos de materiales de registro suplementarios.

Pautas para llevar el registro del procesamiento de PBMC		
Campo	Requisitos de la hoja de trabajo para las redes ACTG, HPTN, IMPAACT, MTN* <small>(HVTN: se requiere el uso de una Hoja de trabajo para procesamiento de PBMC de HVTN en su totalidad).</small>	Requisitos del LDMS para todas las redes**
Laboratorio de procesamiento de muestras	H	L
Identificador del participante	H	L
Número de visita	H	L
Protocolo	H	L
Id. de espécimen global LDMS	H	[Automático]
Fecha/hora de inicio del procesamiento	H	R
Procesado por (téc.)	H	R
Método de recuento (nombre del instrumento o recuento manual)	H	
Volumen de resuspensión para recuento de WDR (V)	H	
Concentración promedio del recuento celular (C)	H	
Cantidad total de células (T) = C x V	H	R (opcional para HVTN)
Cálculo del volumen final de resuspensión en CPS (V _f)	H	
Fecha y hora de congelación	H	R

Pautas para llevar el registro del procesamiento de PBMC		
Campo	Requisitos de la hoja de trabajo para las redes ACTG, HPTN, IMPACT, MTN* <small>(HVTN: se requiere el uso de una Hoja de trabajo para procesamiento de PBMC de HVTN en su totalidad).</small>	Requisitos del LDMS para todas las redes**
Comentarios y desviaciones del protocolo, lo que incluye, entre otros: <ul style="list-style-type: none"> • Todas las condiciones inesperadas de la muestra • Si la sangre está coagulada, la cantidad de tubos que contenían coágulos, la cantidad total de tubos del lote del PTID y la información detallada del procesamiento de la sangre coagulada • Rendimiento celular por debajo del rango esperado • Anomalías en el procesamiento • Medidas tomadas para la resolución de problemas • Nota si el tiempo total es mayor a ocho horas 	H	O
Fecha/hora de recolección	S	L
Reactivos (fabricantes, números de lote y fechas de vencimiento de dimetilsulfóxido [Dimethylsulfoxide, DMSO], suero bovino fetal [Fetal bovine serum, FBS], reactivos de dilución y lavado [Wash Diluent Reagents, WDR], tubo de separación de células con barrera de fritada [Cell separation tubes with frit barriers, CSTFB], medios de gradiente de densidad)	S	
Solución de criopreservación (CPS) (volumen de DMSO y FBS)	S	
Tipo de tubo de muestra (heparina sódica [NaHep]/ácido-citrato-dextrosa [ACD]/ácido etilendiamino tetraacético [EDTA]/otro)	S	L
Estado de la sangre (p. ej., SAT/HEMÓL./COAGULADA)	S	L
Volumen de sangre entera utilizable	S	L ("Volumen")
Recuentos celulares	S	
Cantidad real de células por vial	S	L
Cantidad de crioviales congelados	S	L
Información de almacenamiento en el congelador (módulo de almacenamiento LDMS)	O	R
Confirmación de control visual de calidad de los reactivos (téc.)	O	
Rendimiento celular/ml de sangre entera	O	
Volumen de resuspensión en CPS estimado (V1)	O	
Confirmación de control de calidad de la etiqueta de LDMS para contenido/códigos de barra (téc.)	O	
Confirmación de transferencia de crioviales a los lugares de almacenamiento designados por LDMS (téc.)	O	
Fecha/hora en que se transfirieron los crioviales desde el dispositivo de enfriamiento lento al lugar de almacenamiento.	O	
Revisor que realiza la revisión final/fecha	O	

* H = se requiere el registro en una Hoja de trabajo para procesamiento de PBMC.

S = se requiere el registro, pero se pueden usar materiales de registro suplementarios (como el LDMS u otra hoja de trabajo o diario).

O = el registro en una hoja de trabajo o en un material de registro suplementario es opcional.

** L = Campos requeridos en LDMS para la red de especímenes
 R = las redes deben realizar el registro en el LDMS.
 O = el registro en el LDMS es opcional.

6 Muestra

6.1 Preparación del paciente

Ninguna

6.2 Tipo de muestra

Sangre entera anticoagulada extraída en tubos para recolección de sangre

6.3 Volumen óptimo/mínimo de la muestra

Volumen de sangre requerido según el protocolo

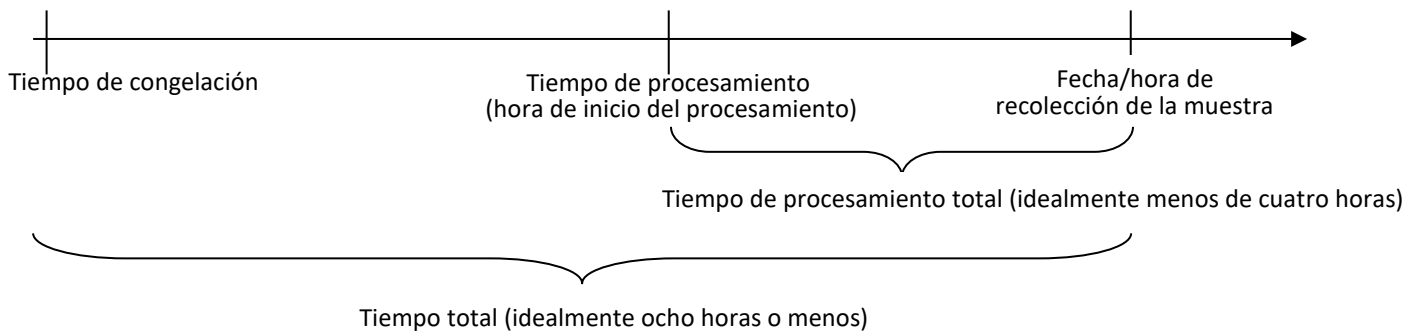
6.4 Condiciones de manejo

6.4.1 Las muestras de sangre entera fresca anticoagulada deben almacenarse a temperatura ambiente (entre 15 °C y 30 °C) desde el momento de la recolección hasta la entrega al laboratorio/la unidad de procesamiento.

6.4.2 Las muestras de sangre entera fresca anticoagulada deben entregarse a la unidad de procesamiento de laboratorio lo antes posible después de la recolección para permitir que el laboratorio de procesamiento tenga mucho tiempo para completar los procedimientos de criopreservación.

6.4.3 Las muestras de sangre entera fresca anticoagulada deben ser procesadas por la unidad de procesamiento de laboratorio lo antes posible, una vez que las reciba:

- La Hora de procesamiento (hora de inicio del procesamiento) es la hora en que se abre por primera vez el tubo o se lo coloca en la centrífuga, cualquiera sea la que suceda primero.
- La Hora de congelación se define como la hora en que:
 - Se coloca el StrataCooler® Cryo, NALGENE® Mr. Frosty o biocision® CoolCell en el congelador a -80 °C.
 - Se inicia el programa de enfriamiento del congelador a velocidad controlada, como CryoMed®.
- El Tiempo total se calcula a partir del Tiempo de recolección de la muestra y el Tiempo de congelación; idealmente, este tiempo equivale a ocho horas o menos, pero se deben procesar todas las muestras sin importar el Tiempo total.
- El Tiempo de procesamiento total se calcula a partir del Tiempo de procesamiento y el Tiempo de congelación; se recomienda que el Tiempo de procesamiento total sea menor a cuatro horas.



6.4.4 No refrigere ni congele la sangre entera.

6.5 Muestras marginales

Registre todas las condiciones inesperadas de la muestra y las medidas que se tomaron según los requisitos de la red y del laboratorio. Consulte el Capítulo 5 para ver información detallada.

6.5.1 Muestras coaguladas

6.5.1.1 Se debe procesar toda la sangre sin importar si la sangre está coagulada o no, a menos que el protocolo indique lo contrario.

6.5.1.2 Quite el coágulo y continúe normalmente.

6.5.1.3 Si el rendimiento celular es insuficiente para satisfacer las necesidades del protocolo, comuníquese con la clínica para obtener un posible reemplazo de la muestra. En el caso de la red HVTN, si el rendimiento celular es menor o igual a $0,4 \times 10^6$ células/ml, comuníquese con la clínica para obtener un posible reemplazo de la muestra.

6.5.2 Muestras hemolizadas

6.5.2.1 La hemólisis puede afectar la calidad de las PBMC.

6.5.2.2 Continúe normalmente.

6.5.2.3 Si el rendimiento celular es significativamente menor al rango esperado, almacene las PBMC con las notas correspondientes y comuníquese con la clínica para obtener un posible reemplazo de la muestra. En el caso de la red HVTN, si el rendimiento celular es menor o igual a $0,4 \times 10^6$ células/ml, comuníquese con la clínica para obtener un posible reemplazo de la muestra.

6.6 Muestras inaceptables

6.6.1 Las muestras no etiquetadas o mal etiquetadas serán rechazadas.

6.6.2 Muestras con filtraciones

Notifique a la clínica si alguna de las muestras tiene filtraciones y determine si esa muestra se puede usar o no.

7 Equipos

7.1 Preparación y procesamiento

7.1.1 Gabinete de seguridad biológica (biosafety cabinet, BSC) de clase II según lo establezca el laboratorio (P2, P2.5 o P3)

7.1.2 Centrífuga, baja velocidad (capaz de generar de 300 a 1000 x g) con rotor con cubeta oscilante, preferentemente refrigerada, temperatura ambiente aceptable

7.1.3 Micropipetas, rango 20, 200, 1000 μ l

7.1.4 Pipet-Aid (preferentemente inalámbrica) para pipetas serológicas desechables

7.1.5 Refrigerador a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C

7.1.6 Congelador a una temperatura de -20 °C (o menor) *sin* descongelación automática (para almacenamiento de FBS)

7.1.7 Congelador a una temperatura de -80 °C (entre -65 °C y -95 °C) para almacenamiento de PBMC a corto plazo

- 7.1.8 Congelador mecánico a -150 °C (para la red IMPAACT, HPTN y MTN; si el congelador LN2 no está disponible para almacenamiento a largo plazo)
- 7.1.9 Baño María a una temperatura de 37 °C a 56 °C (para termoinactivar el FBS, si es necesario)
- 7.1.10 Cubeta o vaso de precipitado para cloro u otro desinfectante, para enjuague de pipetas si lo requiere la práctica local de seguridad
- 7.2 Equipo de nitrógeno líquido (LN2) (si lo requiere la red)
- 7.2.1 Tanque de almacenamiento de LN2 (≤ -140 °C)
- 7.2.2 Contenedor seco de LN2 aprobado por la Asociación Internacional de Transporte Aéreo (International Air Transport Association, IATA)
- 7.3 Recuento celular (seleccione una de las siguientes opciones)
- 7.3.1 Contador automático de células capaz de enumerar células viables (Beckman-Coulter Vi-Cell, Guava PCA® o un contador equivalente).
- Nota para la HVTN:** La HVTN debe revisar y aprobar previamente los métodos de recuento.
- 7.3.2 Contador automático de células incapaz de enumerar células viables (Coulter Counter, Abbott Cell-Dyn®, Sysmex® o un contador equivalente).
- Nota:** Se puede utilizar un contador automático de células incapaz de identificar células viables para obtener un recuento total de células sin distinguir entre células viables, a menos que las muestras se estén preparando para el Programa de Análisis de Aptitud sobre Criopreservación de PBMC de Immunology Quality Assurance (IQA). Si las muestras se están preparando para dicho programa, se debe utilizar azul de tripano para obtener el recuento de células viables.
- 7.3.3 Cámara para recuento celular manual (hemocitómetro) y microscopio de campo claro.
- Nota:** Si se utiliza la cámara para recuento celular manual con azul de tripano, se deben enumerar las células viables y se las debe usar para los cálculos celulares. Si se utiliza violeta cristal, se puede usar el recuento celular total para los cálculos celulares. Si las muestras se están preparando para el Programa de Análisis de Aptitud sobre Criopreservación de PBMC de IQA, se debe utilizar azul de tripano para obtener el recuento de células viables.
- 7.4 Criopreservación
- Implemente una de las siguientes opciones según las instrucciones del fabricante. Se prefiere Stratagene StrataCooler® y biocision® CoolCell.
- Nota:** Si no se siguen las instrucciones del fabricante, se debe realizar un estudio de validación.
- 7.4.1 Stratagene StrataCooler® Cryo
- StrataCooler® Cryo debe estar a una temperatura que varíe entre 2 °C y 8 °C antes de comenzar el enfriamiento de los crioviales. No coloque los crioviales en un StrataCooler® Cryo que esté por debajo de la temperatura inicial de 2 °C.
- 7.4.2 biocision® CoolCell
- Asegúrese de que la temperatura de todas las partes del CoolCell, incluido el anillo central, regrese a la temperatura ambiente entre un uso y otro.
- 7.4.3 Recipiente para criocongelación de 1 °C/minuto NALGENE® Mr. Frosty
- Mr. Frosty debe almacenarse a temperatura ambiente (entre 15 °C y 30 °C) entre un uso y otro.

El nivel de isopropanol debe ser correcto y el isopropanol debe ser completamente reemplazado después del quinto ciclo de congelación/descongelación. Debe usarse un diario para llevar un registro de los ciclos de congelación/descongelación y los cambios en los reactivos. Consulte el Apéndice B.

7.4.4 Congelador a velocidad controlada, como la cámara de congelación CryoMed® (Gordinier).

8 Elementos desechables

8.1 Plásticos

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

8.1.2 Puntas de precisión para pipetas, de 20, 100, 200, 1000 µl, estériles

8.1.3 Tubos de centrifuga desechables de 15 y 50 ml, estériles, con fondo cónico, graduados de polipropileno.

8.1.4 Viales criogénicos (crioviales), de 1,8 ml a 2 ml, tapa a rosca con junta tórica, estériles, de polipropileno únicamente, que se mantienen en pie por sí solos, graduados, a prueba de filtraciones, formulados para preservación en LN2 en fase de vapor (aproximadamente -140 °C).

Nota: No todas las marcas de crioviales son adecuadas para el almacenamiento a largo plazo en LN2. Consulte el Apéndice G para ver ejemplos que cumplen con los requisitos.

Nota: Si un protocolo requiere la cosecha de plasma, se prefieren los tubos roscados por el exterior para el almacenamiento de plasma.

Nota: No se permite el uso de tubos con tapa a presión. Además, los cryovial no deben llenarse más allá de la capacidad especificada por el fabricante y no hasta la parte superior del tubo.

Nota para ACTG e IMPAACT: Sólo pueden utilizarse cryovial roscados externamente.

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

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

8.1.7 **Opcional:** Si no se utilizan tubos de separación de células con barreras de fritada (CSTFB) prellenados, se requerirán tubos CSTFB vacíos (consulte la sección 9.2 para ver información detallada) o tubos de centrifuga con fondo cónico desechables de 15 y 50 ml, según lo indicado en la sección 8.1.3. Consulte el Apéndice G para ver ejemplos que cumplen con los requisitos.

8.2 Marcadores

Los marcadores para escribir sobre los viales y tubos de procesamiento deben tener punta fina y contener tinta indeleble y de secado rápido. (Consulte el Apéndice G para ver ejemplos.)

8.3 Etiquetas

Etiquetas criogénicas adecuadas para temperaturas de -80 °C y LN2. Consulte el Apéndice G para ver ejemplos que cumplen con los requisitos.

9 Equipos de protección personal

Se requieren equipos de protección personal para uso con patógenos transmitidos a través de la sangre. Cumpla las pautas y prácticas locales de laboratorio para manejar productos de la sangre.

- 9.1 Bata de laboratorio
- 9.2 Protección ocular
- 9.3 Guantes sin polvo, de nitrilo o equivalentes
- 9.4 Es necesario utilizar crioguantas y máscaras de protección (con mentonera opcional) si está usando LN2.

10 Reactivos

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

10.1.1 Almacene los frascos abiertos a la temperatura recomendada por el fabricante hasta que los utilice o hasta la fecha de vencimiento del fabricante.

10.1.2 Deséchelos si observa que se desarrollan signos visibles de contaminación, como un aspecto turbio.

10.2 Reactivos de dilución y lavado (Wash Diluent Reagents, WDR)

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

*Alternativa: 1X solución salina amortiguada con fosfato (PBS) sin calcio ni magnesio, lista para usar.

10.3 Tubo de separación de células con barrera de frita (CSTFB)

Nota: El laboratorio puede utilizar un CSTFB o puede usar un método de colocación manual por encima o por debajo del medio de gradiente de densidad con un tubo de centrifuga con fondo cónico.

Nota: Si usa el CSTFB, use el Capítulo 15. Si usa el método de colocación manual por encima o por debajo del medio de gradiente de densidad (sin barreras de frita), use el Capítulo 16.

10.3.1 CSTFB prellenado (medios de gradiente de densidad de 1,077)

La capacidad del tubo necesario dependerá del volumen de sangre entera (consulte la sección 15.4). Consulte el Apéndice G para ver ejemplos de CSTFB prellenados.

Condiciones de almacenamiento:

- Almacénelos en el refrigerador (de 2 °C a 8 °C).
- Protéjalos de la luz.
- El aspecto turbio indica el deterioro del producto.
- Deje que los tubos CSTFB lleguen a temperatura ambiente (entre 15 °C y 30 °C) antes de usarlos.

10.3.2 Alternativas al sistema de CSTFB prellenado:

Combine un CSTFB seco con medios de gradiente de densidad de 1,077. Consulte el Apéndice G para ver ejemplos que cumplen con los requisitos.

Capacidad del tubo (ml)	Volumen de medios de gradientes de densidad (ml)
50 ml	15 ml
15 ml	6 ml

Siga las recomendaciones de almacenamiento del fabricante de los medios de gradiente de densidad.

10.4 Reactivos de congelación

10.4.1 Se prefiere suero bovino fetal (FBS), termoinactivado.

10.4.1.1 *Consulte los proveedores preferidos en las redes correspondientes.* No todas las marcas de FBS son equivalentes. Antes de cambiar de proveedor, deben abordarse los asuntos relacionados con control de calidad, toxicidad, aspectos generales y envío/importación.

10.4.1.2 Obtenga un certificado de análisis del proveedor para los registros de control de calidad del laboratorio local.

Nota: Es posible que se requiera una copia del certificado de análisis de FBS para exportar (o importar) alícuotas de PBMC entre un país y otro.

10.4.1.3 El FBS almacenado en estado congelado (≤ -20 °C) sirve hasta la fecha de vencimiento del fabricante.

10.4.1.4 El FBS descongelado y almacenado a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C es estable durante un mes.

10.4.2 Dimetilsulfóxido (DMSO), grado de cultivo celular

10.4.2.1 Asegúrese de usar un DMSO de grado de cultivo celular. Consulte el Apéndice G para ver ejemplos que cumplen con los requisitos.

10.4.2.2 Almacene los frascos sin abrir a temperatura ambiente (entre 15 °C y 30 °C). Controle la fecha de vencimiento del frasco y deséchelo si está vencido.

10.4.2.3 Después de abrir el frasco, el DMSO sin diluir es estable a temperatura ambiente (entre 15 °C y 30 °C) cuando se lo protege de la luz y la humedad, durante seis meses.

10.4.2.4 Use una técnica aséptica al retirar el DMSO del frasco para evitar posibles contaminaciones.

10.4.2.5 Deseche el frasco abierto si se observan signos visibles de contaminación.

10.4.2.6 El reactivo puede dividirse en alícuotas en cantidades pequeñas para ayudar a preservar la esterilidad. Etiquete las alícuotas con "DMSO", la fecha en que se abrió/dividió en alícuotas, la fecha de vencimiento (seis meses a partir de la apertura) y las iniciales del técnico. Proteja las alícuotas de la luz.

10.4.3 Desinfectante

10.4.3.1 Frasco rociador de desinfectante de etanol al 70 % v/v

10.4.3.2 Cubeta o vaso de precipitado y frasco rociador con cloro al 10 % v/v

10.4.3.3 Otro desinfectante, según lo especificado por la política del laboratorio local

10.5 Reactivos para el recuento de células

Los requisitos para el recuento de reactivos serán distintos según el método utilizado. Consulte las instrucciones del método que está usando.

10.5.1 Solución de azul de tripano al 0,4 %

10.5.2 **Opcional:** se puede usar de violeta cristal al 0,05 % para teñir el núcleo de la célula, a fin de poder identificar las células mononucleares y contarlas con un hemocitómetro. Si se requiere viabilidad, podrá realizarse un segundo recuento manual utilizando azul de tripano. La solución de violeta cristal al 0,05 % contiene:

- 0,05 g de violeta cristal
- 2 ml de ácido acético glacial
- 98 ml de H₂O destilada o desionizada

11 Preparación de reactivos

11.1 FBS termoinactivado (HI-FBS)

El HI-FBS puede solicitarse al fabricante o se puede solicitar al fabricante FBS y termoinactivarlo en el laboratorio. Siga estas instrucciones para la descongelación, la división en alícuotas y el uso.

11.1.1 Saque el FBS del congelador.

11.1.2 Descongélalo en el refrigerador (entre 2 °C y 8 °C), preferentemente, o durante varias horas a temperatura ambiente. No permita que el FBS permanezca a temperatura ambiente más de lo necesario para realizar el proceso de descongelación.

11.1.3 Agítelo suavemente dos o tres veces durante la descongelación.

11.1.4 Si el FBS no fue termoinactivado por el fabricante, siga estas instrucciones adicionales. Si el FBS fue termoinactivado por el fabricante, pase a la sección 11.1.5.

11.1.4.1 Coloque el FBS a baño María a 56 °C (entre 55 °C y 57 °C). Controle cuidadosamente la temperatura del baño María. **Las temperaturas más altas pueden degradar los componentes del FBS.**

11.1.4.2 **Nota:** El nivel de agua del baño María debe cubrir el nivel del FBS del frasco, pero no tocar la tapa del frasco. Esto ayuda a garantizar que el FBS se caliente de forma pareja y ayuda a evitar la contaminación.

11.1.4.3 Una vez que la temperatura del baño María haya vuelto a los 56 °C (entre 55 °C y 57 °C), caliente el FBS durante 30 minutos y mézclelo cada 5 a 10 minutos. **Calentarlo por períodos más prolongados puede degradar los componentes del FBS.**

11.1.4.4 **Nota:** Si la parte superior del frasco entra en contacto con el baño María, límpiela con un hisopo con etanol al 70 % v/v antes de abrirlo.

11.1.5 Mezcle el HI-FBS suavemente, pero a fondo, utilizando una técnica aséptica.

11.1.6 Divídalo en alícuotas en tubos de centrifuga cónicos, estériles y etiquetados de 50 ml o en alícuotas de otro tamaño según sea apropiado para la carga de trabajo esperada.

Nota: Las etiquetas deben identificar estos tubos como "HI-FBS" e incluir el número de lote, la fecha de la alícuota, la fecha de vencimiento y las iniciales del técnico. El FBS es estable durante un mes a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C o hasta la fecha de vencimiento del fabricante a -20 °C.

11.1.7 Refrigere (entre 2 °C y 8 °C) la cantidad de tubos de alícuotas necesarios para la carga de trabajo esperada. Mezcle bien antes de usar. Los tubos de alícuotas que no se usan inmediatamente se pueden poner en el congelador y son estables hasta la fecha de vencimiento del fabricante original.

Nota: La repetición de ciclos de congelación/descongelación tendrá un efecto adverso en la calidad del FBS. No vuelva a congelar las alícuotas que fueron almacenadas a temperatura de refrigeración.

11.1.8 Para usar las alícuotas congeladas, descongélelas en el refrigerador durante la noche, preferentemente, o durante varias horas a temperatura ambiente. Cambie la fecha de vencimiento a un mes. Mezcle bien antes de usar.

11.2 Solución de criopreservación (CPS) fresca

11.2.1

Componentes	Porcentaje (v/v)
DMSO	10 %
FBS (termoinactivado)	90 %

11.2.2 Preparación de CPS

Utilice un recipiente estéril, desechable, de 15 ml o 50 ml, para preparar la CPS. La mezcla de DMSO y FBS es una reacción exotérmica. La CPS debe prepararse de antemano y enfriarse en el refrigerador (entre 2 °C y 8 °C) durante al menos 30 minutos o en un baño de hielo durante al menos 15 minutos antes de usarla.

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

11.2.3 Utilice la fórmula que aparece a continuación para **calcular** el volumen de CPS que se debe preparar para la resuspensión de PBMC. También se proporcionan ejemplos.

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

Redondee al mililitro entero superior más cercano.

Nota: El volumen de sangre entera utilizable es el volumen de sangre entera que se procesa realmente. (El volumen de sangre entera utilizable puede no ser igual a la capacidad del tubo.)

Ejemplos: Sangre de adulto: recolección de un gran volumen de sangre

Sangre entera utilizable x	Rendimiento celular x	Concentración congelada =	CPS estimada que se debe preparar
(140 ml) x	(1,5 x 10 ⁶ células/1 ml) x	(1 ml/15 x 10 ⁶ células) =	14 ml

Ejemplos: Sangre de adolescente/pediátrica: recolección de poco volumen de sangre

Sangre entera utilizable x	Rendimiento celular x	Concentración congelada =	CPS estimada que se debe preparar
(10 ml) x	(1,5 x 10 ⁶ células/1 ml) x	(0,5 ml/5 x 10 ⁶ células) =	1,5 ml

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

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

Ejemplos:

Volumen de CPS estimado	Volumen de DMSO = (0,1)(volumen de CPS)	Volumen de HI-FBS = Volumen de CPS – volumen de DMSO	Volumen de CPS total = volumen de DMSO + volumen de FBS
9 ml	0,9 ml	8,1 ml	9 ml

- 11.2.5 Registre los volúmenes de CPS, DMSO y FBS según los requisitos de la red y del laboratorio. Consulte el Capítulo 5 para ver información detallada.

12 Calibración

- 12.1 No se necesita calibración para los pasos de procesamiento.
- 12.2 Siga los procedimientos de calibración correspondientes del laboratorio si utiliza un contador automático de células.

13 Control de calidad

13.1 Rendimientos celulares

Los rendimientos celulares son bastante uniformes dentro de las poblaciones de sujetos sanos. Por lo general, en las poblaciones de niños los rendimientos de linfocitos son más altos que en las poblaciones de adultos. De manera similar, los pacientes con SIDA o con enfermedad por VIH pueden tener linfopenia. Es importante tener en cuenta cuál es la recuperación prevista que deberá obtenerse para la población de participantes para quienes se realiza el procesamiento. En función de esta uniformidad, los rendimientos celulares pueden servir como marcadores de control de calidad interno para cada procedimiento. Los rendimientos que se encuentran fuera de los rangos previstos pueden indicar error procedimental, deterioro en los reactivos, error en el recuento de células o error de cálculo. El propósito de las recomendaciones que se proporcionan a continuación es brindar pautas para ayudar a identificar errores técnicos flagrantes antes de la criopreservación. Estos valores pueden variar según el anticoagulante que se utilice.

13.1.1 Rendimientos celulares **esperados** para poblaciones de sujetos sanos:

Población	Rango del rendimiento de células mononucleares (células/ml)
De adulto	$(0,8 \text{ a } 3,2) \times 10^6$
Pediátrica: menos de seis meses	$(3 \text{ a } 10) \times 10^6$
Pediátrica: seis meses a dos años	$(2 \text{ a } 9) \times 10^6$
Pediátrica: dos a cinco años	$(1 \text{ a } 6) \times 10^6$
Pediátrica: más de cinco años	$(0,8 \text{ a } 4) \times 10^6$
Pediátrica: edad desconocida	$(1 \text{ a } 10) \times 10^6$

13.1.2 Rendimientos celulares no previstos

Si los rendimientos celulares se encuentran fuera del rango esperado, revise los esquemas de dilución, los cálculos, las técnicas de procesamiento (especialmente, la mezcla adecuada de suspensiones para el recuento de células), así como los antecedentes del PTID, si se encuentran disponibles, para ver las posibles causas. Los rendimientos celulares de los pacientes con infección por VIH pueden ser menores que los indicados en la tabla anterior. Si se sospecha que hay errores de dilución o recuento de células, haga una nueva dilución y un nuevo recuento.

- 13.1.3 Registre todos los resultados y cualquier problema que ocurra durante el procesamiento y las medidas según los requisitos de la red y del laboratorio. Consulte el Capítulo 5 para ver información detallada.

Nota para la HVTN: Registre todos los problemas y las medidas en la Hoja de trabajo para procesamiento de PBMC de HVTN y en la sección de comentarios sobre rendimiento celular del Programa de PBMC de HVTN Atlas.

13.2 Viabilidad celular

La viabilidad celular de las PBMC frescas es bastante uniforme. El tiempo de procesamiento prolongado, una técnica deficiente y, en ocasiones, la muestra de un participante específico pueden afectar de manera adversa la viabilidad. Si cuenta las células viables, calcule y registre el porcentaje de células viables según los requisitos del laboratorio.

13.2.1 La viabilidad de las PBMC recientemente aisladas debe ser mayor al 95 %.

13.2.2 Si la viabilidad de las PBMC frescas es menor al 95 %, revise los resultados con el supervisor y documéntelos según los requisitos de la red y del laboratorio. Consulte el Capítulo 5 para ver información detallada.

Nota: Si las muestras se están preparando para el Programa de Análisis de Aptitud sobre Criopreservación de PBMC de IQA, se requiere el recuento de células viables.

14 Introducción y pautas sobre el procesamiento de PBMC16

Existen principios y medidas estándar comunes a todos los procedimientos de procesamiento de PBMC. Las variaciones se dan según la elección de las técnicas de separación (CSTFB prellenados en comparación con el método de colocación manual por encima del medio de gradiente de densidad), el tratamiento de la sangre (dilución con o sin reemplazo de plasma en comparación con cosecha directa de plasma), concentración final de células y congelación/almacenamiento. Seleccione las secciones de procedimientos correspondientes para la separación de células y el tratamiento de la sangre, y la congelación y el almacenamiento, de conformidad con los requisitos de la red y el protocolo.

Capítulo sobre el procesamiento de PBMC	Utilización para estas redes
<p><i>Separación de células y tratamiento de la sangre</i></p> <p>Capítulo 15: Separación de células y dilución de sangre con reemplazo de plasma por medio de tubo de separación de células con barrera de frita (CSTFB)</p> <p>○</p> <p>Capítulo 16: Separación de células por método manual de colocación por encima o por debajo del medio de gradiente de densidad y dilución de sangre con reemplazo de plasma mediante separación manual de células con gradiente de densidad</p>	<p>Puede utilizarse para todas las redes; verifique los requisitos del protocolo y los materiales disponibles</p> <p>Puede utilizarse para todas las redes; verifique los requisitos del protocolo y los materiales disponibles</p>
<p><i>Lavado, recuento, resuspensión, concentración y congelación a velocidad controlada durante la noche</i></p> <p>Capítulo 17</p>	<p>Todas las redes</p>
<p><i>Almacenamiento en el centro</i></p> <p>Capítulo 18.2: Almacenamiento temporal en el centro a -70/-80°C</p> <p>○</p> <p>Capítulo 18.3: Almacenamiento en el centro en contenedor de LN2 o congelador mecánico de -150°C.</p>	<p>ACTG y HVTN</p> <p>IMPAACT, HPTN y MTN</p>

15 Separación de células y dilución de sangre con reemplazo de plasma por medio de tubo de separación de células con barrera de frita (CSTFB)

El Capítulo 15 puede utilizarse para todas las redes; verifique los requisitos del protocolo y los materiales disponibles. Para una muestra en particular, use el Capítulo 15 o el Capítulo 16, pero no ambos.

- 15.1 Separación de linfocitos de sangre periférica utilizando tubos de separación CSTFB prellenados
 - 15.1.1 Todo el trabajo con pipetas y las mezclas se realizan en un gabinete de seguridad biológica (BSC) de nivel 2 o superior.
 - 15.1.2 Rocíe todas las superficies, las gradillas y los frascos de reactivos con etanol al 70 % v/v o un desinfectante equivalente antes de ingresar en el BSC y utilizarlo.
 - 15.1.3 A menos que se indique lo contrario, el procedimiento se realiza a temperatura ambiente (entre 15 °C y 30 °C).
 - 15.1.4 Utilice una nueva pipeta para cada número de identificación del participante (PTID) y para cada aditivo.
- 15.2 Prepare muestras de sangre entera, reactivos y suministros.
 - 15.2.1 Antes del procesamiento o con la suficiente anticipación antes de la mezcla con PBMC, prepare y enfríe la CPS (consulte el Capítulo 11, Preparación de reactivos).
 - 15.2.2 Asegúrese de que los tubos estén a temperatura ambiente antes del procesamiento.
 - 15.2.3 Antes de agregar la sangre, verifique visualmente los CSTFB para ver si hay líquido por encima de la frita. Si hay líquido por encima de la frita, centrifugue los CSTFB a 1000 x g durante 30 segundos. Si queda algo de solución de gradiente de densidad por encima de la frita después del centrifugado, se la debe aspirar.
 - 15.2.4 Verifique con atención el PTID en todos los tubos de sangre recibidos. Organice los tubos primarios para que no haya posibilidad de mezclar tubos con diferentes PTID ni los anticoagulantes dentro de la recolección de un mismo PTID.

Sugerencia: Coloque todos los tubos para cada PTID/anticoagulante en una gradilla. Pueden utilizarse diferentes gradillas para separar PTID o tipos de tubos, y puede utilizarse un color diferente de marcador para cada PTID con el fin de evitar confusiones.
 - 15.2.5 Determine cuál es una medición exacta del volumen de sangre entera utilizable dentro de los 0,5 ml y regístrela. El volumen de sangre entera utilizable no necesariamente es igual al tamaño del tubo.
- 15.3 Reemplazo de plasma

Realice este paso de reemplazo de plasma *solo* si se requieren alícuotas de plasma, según las instrucciones del protocolo. Si no se requieren alícuotas de plasma, omita este paso y continúe en el paso 15.4.

 - 15.3.1 Los tubos para recolección de sangre del mismo PTID y el mismo anticoagulante pueden procesarse de forma individual o combinarse en tubos de centrifuga cónicos de 50 ml.
 - 15.3.2 Marque el volumen de sangre entera en el menisco.
 - 15.3.3 Centrifugue la sangre entera a entre 200 y 400 x g durante 10 minutos.
 - 15.3.4 Transfiera el plasma a un tubo de centrifuga cónico de 15 o 50 ml etiquetado para realizar un segundo centrifugado que elimine todo resto de células.

- 15.3.5 Agregue una cantidad suficiente de WDR (consulte la sección 10.2) para llevar la sangre nuevamente a su volumen original de sangre entera, mezcle suavemente y continúe el procesamiento de PBMC en el paso 15.4.
- 15.3.6 Complete el procesamiento de plasma centrifugando el plasma recolectado a entre 800 y 1200 x g durante 10 minutos para obtener alícuotas de PL2 o según las instrucciones específicas del protocolo para obtener el derivado requerido por el protocolo. Esto se puede realizar posteriormente, cuando no se esté utilizando la centrifuga para el procesamiento de PBMC.
- 15.3.7 Divida el plasma en alícuotas y colóquelas en tubos de alícuotas etiquetados, según lo indique el protocolo, y elimine todo resto de células que se encuentre en el tubo de plasma centrifugado.

15.4 Dilución de sangre para separación de CSTFB

Nota: La relación máxima entre la sangre y el WDR debe ser, aproximadamente, 2:1. Utilice un tubo de 50 ml por cada 10 a 20 ml de sangre entera (o un tubo de 12 a 14 ml por cada 4 a 5 ml de sangre entera). Utilice tantos tubos CSTFB como sea necesario para distribuir toda la sangre para cada PTID.

Nota: Los medios de gradiente de densidad son tóxicos para las células; trabaje con rapidez y eficiencia mientras sigue los pasos de la separación.

- 15.4.1 Etiquete cada CSTFB con el PTID.
- 15.4.2 Si un tubo contiene sangre coagulada, consulte la sección 6.5 (Muestras inaceptables).

15.4.3 Con una pipeta estéril, agregue WDR a cada CSTFB:

Tamaño del CSTFB (ml)	Volumen aproximado de WDR (ml)
50	5
15	2

15.4.4 Mezcle la sangre entera suavemente; luego, utilice una pipeta estéril para transferir la sangre al CSTFB etiquetado.

Tamaño del CSTFB (ml)	Volumen aproximado de sangre (ml)*
50	12 a 22
15	4 a 5

15.4.5 ***Nota:** Los volúmenes de sangre menores, especialmente en presencia de una baja cantidad de hematocritos, pueden hacer que la capa leucocítica descienda hasta quedar cerca de la frita o sobre ella, lo que dificulta la cosecha. Los volúmenes de sangre mayores pueden hacer que haya más restos/fondo en las muestras. En el caso de menores volúmenes de extracción de sangre, consulte las pautas específicas del protocolo.

15.4.6 Con una pipeta estéril, enjuague cada tubo de sangre anticoagulada original con WDR, agregue volúmenes de enjuague a los tubos CSTFB y asegúrese de no superar el límite del volumen total del tubo (WDR + sangre entera).

Tamaño del CSTFB (ml)	Límite del volumen total del tubo (ml) (sangre entera +WDR)
50	30
15	7,5

15.4.7 Tape los tubos CSTFB con cuidado.

15.5 Centrifugado en gradiente de densidad y recolección de CSTFB

15.5.1 Sostenga los tubos en posición vertical y transfíralos con cuidado a la centrífuga. Consulte el Capítulo 20, Cálculos, para convertir g a rpm según la longitud del rotor.

15.5.2 Centrifugue a entre 800 y 1000 x g durante 15 minutos, a una temperatura de entre 15 °C y 30 °C con el freno desactivado.

Nota: La separación de PBMC puede mejorarse para algunas muestras realizando un centrifugado a 1000 x g.

Nota: Si el freno está activado, afectará las capas.

15.5.3 Prepare la misma cantidad de tubos de centrifuga cónicos nuevos, estériles que los tubos CSTFB utilizados en el paso de centrifugado para separación.

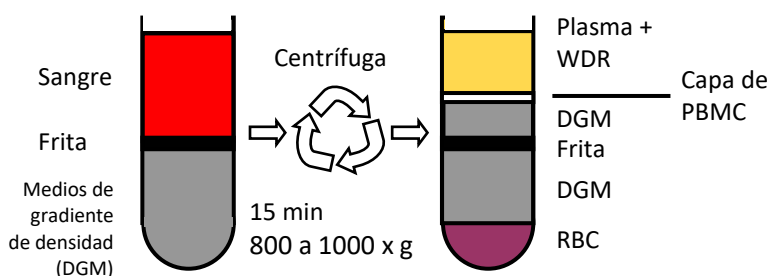
Tamaño del CSTFB (ml)	Tamaño del tubo de centrifuga cónico (ml)
50	50
15	15

15.5.4 Etiquete cada tubo con el PTID. Utilice estos nuevos tubos para el siguiente lavado.

15.5.5 Quite con cuidado los tubos CSTFB de la centrifuga para no afectar las capas.

15.5.6 El centrifugado hace que los contenidos del tubo se dividan en seis capas diferentes, incluida la frita. Desde la parte superior del tubo, estas capas son las siguientes:

- Plasma + WDR
- Capa de PBMC
- Medios de gradiente de densidad
- Frita
- Medios de gradiente de densidad (DGM)
- Concentrado de glóbulos rojos (red blood cells, RBC) y granulocitos



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

- Hemólisis en la capa de plasma + WDR
- Coágulos visibles en la frita después del centrifugado.
- Capa deficiente de PBMC debido a un error en el centrifugado, como velocidad, tiempo o frenado. La capa de PBMC parecerá pequeña y poco definida, mientras que la capa de plasma + WDR puede estar levemente turbia. Consulte el Apéndice C para la resolución de problemas.
- La capa de PBMC se formó sobre la frita debido al recuento de RBC o al volumen de hematocritos bajos.

15.5.8 Con una nueva pipeta estéril (pipeta serológica o de transferencia) para cada PTID, retire la fracción amarillenta de plasma-WDR que se encuentra en la parte superior hasta llegar a, aproximadamente, 1 a 2 cm de la banda blanca turbia de PBMC ubicada en la interfaz entre

la fracción de plasma-WDR (amarillenta) y la solución de medio de separación transparente. Deseche la fracción de plasma-WDR según la política del laboratorio.

Nota: Como alternativa, la fracción de plasma-WDR que se encuentra en la parte superior puede dejarse en su lugar, y la banda blanca turbia de PBMC puede quitarse insertando con cuidado la pipeta a través de la capa superior hasta la banda de PBMC.

15.5.9 Con una pipeta serológica o de transferencia estéril, recolecte todas las células en la interfaz blanca turbia que se encuentra por encima de la frita. Tenga cuidado de no aspirar más solución de medio de separación de lo necesario.

15.5.10 Transfiera las células recolectadas de un tubo CSTFB a un único tubo de centrifuga cónico correspondiente, previamente etiquetado y estéril. Los tubos pueden prellenarse con WDR para ahorrar tiempo.

Tamaño del CSTFB (ml)	Tamaño del tubo de centrifuga cónico (ml)	Volumen de prellenado del WDR (ml)
50	50	25
15	15	5

15.5.11 Vuelva a tapar el tubo CSTFB que contiene los glóbulos rojos restantes y los medios de separación. Elimine el tubo CSTFB como desecho biopeligroso, siguiendo la política del laboratorio.

15.6 Asegúrese de que toda la información correspondiente esté registrada según los requisitos de la red y del laboratorio. Consulte el Capítulo 5 para ver información detallada.

Omita el Capítulo 16 y continúe con el Capítulo 17.

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

El Capítulo 16 puede utilizarse para todas las redes; verifique los requisitos del protocolo y los materiales disponibles. Para una muestra en particular, use el Capítulo 15 o el Capítulo 16, pero no ambos.

- 16.1 Separación de linfocitos de sangre periférica con el método manual de colocación por encima del medio de gradiente de densidad
- 16.1.1 Todo el trabajo con pipetas y las mezclas se realizan en un gabinete de seguridad biológica (BSC) de nivel 2 o superior.
- 16.1.2 Rocíe todas las superficies, las gradillas y los frascos de reactivos con etanol al 70 % v/v antes de ingresar en el BSC y utilizarlo.
- 16.1.3 A menos que se indique lo contrario, el procedimiento se realiza a temperatura ambiente (entre 15 °C y 30 °C).
- 16.1.4 Utilice una nueva pipeta para cada número de identificación del participante (PTID) y para cada aditivo.
- 16.2 Prepare muestras de sangre entera, reactivos y suministros
- 16.2.1 Antes del procesamiento o con la suficiente anticipación antes de la mezcla con PBMC, prepare y enfríe la CPS (consulte el Capítulo 11, Preparación de reactivos).
- 16.2.2 Si los tubos de muestras están fríos al tacto (debido al frío del ambiente, como cuando se transportan en los meses más fríos), deje que los tubos lleguen a temperatura ambiente (entre 15 °C y 30 °C) antes del procesamiento.
- 16.2.3 Deje que los medios de gradiente de densidad lleguen a temperatura ambiente (entre 15 °C y 30 °C). Consulte el Capítulo 10, Reactivos, para obtener más información.
- 16.2.4 Verifique con atención el PTID en todos los tubos de sangre recibidos. Organice los tubos primarios para que no haya posibilidad de mezclar tubos con diferentes PTID ni los anticoagulantes dentro de la recolección de un mismo PTID.
- Sugerencia: Coloque todos los tubos para cada PTID/anticoagulante en una gradilla. Pueden utilizarse diferentes gradillas para separar PTID o tipos de tubos, y puede utilizarse un color diferente de marcador para cada PTID con el fin de evitar confusiones.
- 16.2.5 Determine cuál es una medición exacta del volumen de sangre entera utilizable dentro de los 0,5 ml y regístrela. El volumen de sangre entera utilizable no necesariamente es igual al tamaño del tubo.
- 16.3 Reemplazo de plasma
- Realice este paso de reemplazo de plasma solo si se requieren alícuotas de plasma, según las instrucciones del protocolo. Si no se requieren alícuotas de plasma, omita este paso y continúe en el paso 16.4.
- 16.3.1 Los tubos para recolección de sangre pueden procesarse de forma individual según las instrucciones especificadas a continuación o se puede usar la técnica de combinación de capa leucocítica según se describe en el Apéndice D.
- 16.3.2 Marque el volumen de sangre entera en cada tubo del menisco.

- 16.3.3 Centrifugue la sangre entera a entre 200 y 400 x g durante 10 minutos.
 - 16.3.4 Transfiera el plasma a un tubo de centrifuga cónico de 15 o 50 ml para realizar un segundo centrifugado que elimine todo resto de células.
 - 16.3.5 Agregue una cantidad suficiente de WDR (consulte la sección 10.2) para llevar la sangre nuevamente a su volumen original de sangre entera, mezcle suavemente y continúe el procesamiento de PBMC en el paso 16.4.
 - 16.3.6 Complete el procesamiento de plasma centrifugando el plasma recolectado a entre 800 y 1200 x g durante 10 minutos para obtener alícuotas de PL2 o según las instrucciones específicas del protocolo para obtener el derivado requerido por el protocolo. Esto se puede realizar posteriormente, cuando no se esté utilizando la centrifuga para el procesamiento de PBMC.
 - 16.3.7 Divida el plasma en alícuotas y colóquelas en tubos de alícuotas etiquetados, según lo indique el protocolo, y elimine todo resto de células que se encuentre en el tubo de plasma centrifugado.
- 16.4 Dilución de sangre y separación manual de células con gradiente de densidad
- 16.4.1 Destape los tubos de sangre anticoagulada.
 - 16.4.2 Si la sangre del tubo está marcadamente coagulada, consulte la sección 6.5 (Muestras marginales).
 - 16.4.3 **Nota:** Para las recolecciones de sangre de mayor volumen, se permite combinar capas leucocíticas según las pautas del Apéndice D: Combinación de capas leucocíticas para el aislamiento de PBMC con medios de gradiente de densidad. Para combinar capas leucocíticas, reemplace los pasos 16.4.4 y 16.4.5 por las instrucciones del Apéndice D.
 - 16.4.4 Etiquete cada tubo de centrifuga cónico con el PTID.

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

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

Opcional: Se permite agregar el WDR y realizar la mezcla en el tubo de sangre inicial, si hay volumen suficiente disponible.
- 16.4.6 Para la separación de células con gradiente de densidad:

Para cualquier muestra en particular, use el método de colocación por encima del medio de gradiente de densidad (16.4.6.1) o el método de colocación por debajo del medio de gradiente de densidad (16.4.6.2), pero no ambos.
 - 16.4.6.1 **Método de colocación por encima del medio de gradiente de densidad:**

Prepare un tubo de centrifuga cónico etiquetado, estéril, para cada tubo que contenga sangre diluida.

Con una técnica aséptica, agregue el volumen correspondiente de medios de gradiente de densidad a los tubos de centrifuga cónicos vacíos, estériles. El volumen de medios de gradiente de densidad dependerá de la relación que exista entre los medios de gradiente de densidad y la sangre diluida recomendada por el fabricante.

Con una pipeta, coloque con cuidado y lentamente la sangre diluida sobre el medio de gradiente de densidad.

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

16.4.6.2 Método de colocación por debajo del medio de gradiente de densidad:

Mezcle suavemente y a fondo para reducir la aglutinación de células durante la separación.

Opcional: A la sangre entera o a la sangre-WDR, agréguele otro volumen de WDR igual al volumen de la sangre total.

En función del volumen de sangre diluida con WDR, determine el volumen de medio de gradiente de densidad que se requiere para cada tubo. El volumen de medios de gradiente de densidad dependerá de la relación que exista entre los medios de gradiente de densidad y la sangre diluida recomendada por el fabricante.

Con una pipeta, coloque la solución de medios de gradiente de densidad con cuidado y lentamente por DEBAJO de la sangre-WDR.

16.4.6.3 Tape los tubos con cuidado.

16.5 Centrifugado en gradiente de densidad y recolección de linfocitos

16.5.1 Sostenga los tubos en posición vertical y transfíeralos con cuidado a la centrífuga.

16.5.2 Centrifugue a 400 x g durante 30 minutos a una temperatura de entre 15 °C y 30 °C con el freno desactivado según se describe en el folleto que acompaña el medio de gradiente.

Nota: Si el freno está activado, afectará las capas. El freno de la centrífuga debe estar DESACTIVADO para que la separación sea limpia y para maximizar la recuperación de PBMC. Consulte el Capítulo 20, Cálculos, para convertir g a rpm según la longitud del rotor.

16.5.3 Prepare la misma cantidad de tubos de centrífuga cónicos nuevos, estériles y del mismo tamaño que los tubos de centrífuga cónicos utilizados en el paso de centrifugado para separación.

16.5.4 Etiquete cada tubo con el PTID/anticoagulante. Utilice estos nuevos tubos para el siguiente lavado.

16.5.5 Retire los tubos de la centrífuga.

16.5.6 Si la capa celular no es visible, confirme que la centrífuga está funcionando correctamente. Solucione cualquier problema que encuentre. Vuelva a centrifugar el tubo. Registre el problema y cualquier medida de seguimiento tomada según los requisitos de la red y del laboratorio.

Nota: Si aún no se ve la capa de células después de volver a centrifugar, documente, retire y deseche el sobrenadante de WDR y continúe.

Nota: Si el plasma está muy turbio, es posible que sea difícil ver la interfaz con el medio de gradiente de densidad. Es posible mejorar la recolección de linfocitos al retirar la mayor parte del plasma que se encuentra sobre la interfaz con una pipeta de 10 ml, lo que deja un resto de solo 0,5 cm. Esto permite colocar mejor la punta de la pipeta para la recolección de células.

16.5.7 Inspeccione si los tubos tienen hemólisis o coágulos pequeños visibles en la interfaz celular, que no se hayan observado con anterioridad, y documéntelos.

Nota: Vea si hay hemólisis o coágulos después del centrifugado. Clasifique la hemólisis de +1 a +4 según la descripción incluida en el glosario. Registre sus observaciones.

16.5.8 Con una nueva pipeta estéril (pipeta serológica o de transferencia) para cada PTID, retire la fracción amarillenta de plasma-WDR que se encuentra en la parte superior hasta llegar a, aproximadamente, 1 a 2 cm de la banda blanca turbia de PBMC ubicada en la interfaz entre la fracción de plasma-WDR (amarillenta) y la solución de medio de separación transparente. Deseche la fracción de plasma-WDR según la política del laboratorio.

Nota: Como alternativa, la fracción de plasma-WDR que se encuentra en la parte superior puede dejarse en su lugar, y la banda blanca turbia de PBMC puede quitarse insertando con cuidado la pipeta a través de la capa superior hasta la banda de PBMC.

16.5.9 Con una pipeta serológica o de transferencia estéril, recolecte todas las células en la interfaz blanca turbia que se encuentra por encima de la frita. Tenga cuidado de no aspirar más solución de medio de separación de lo necesario.

16.5.10 Transfiera las células recolectadas de un tubo de centrifuga cónico a un único tubo de centrifuga cónico correspondiente, previamente etiquetado y estéril. Los tubos pueden prellenarse con WDR para ahorrar tiempo.

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

16.5.11 Vuelva a taponar el tubo de centrifuga cónico que contiene los glóbulos rojos restantes/el medio de separación restante y elimine el tubo como desecho biopeligroso, siguiendo la política del laboratorio.

16.6 Asegúrese de que toda la información correspondiente esté registrada según los requisitos de la red y del laboratorio. Consulte el Capítulo 5 para ver información detallada.

Diríjase al Capítulo 17.

17 Lavado, recuento, resuspensión, concentración y congelación a velocidad controlada durante la noche

Use el Capítulo 17 para todas las redes.

17.1 Lavado 1:

- 17.1.1 Agregue WDR en QS a la fracción de PBMC hasta obtener aproximadamente 10 ml (para tubos de centrifuga cónicos de 15 ml) o 45 ml (para tubos de centrifuga cónicos de 50 ml). Mezcle suavemente.
- 17.1.2 Vuelva a tapar todos los tubos de células cosechadas.
- 17.1.3 Centrifugue las células diluidas a entre 200 y 400 x g durante 10 minutos, a una temperatura de entre 15 °C y 30 °C (el freno es opcional).
- 17.1.4 Retire los tubos de la centrifuga y verifique la presencia del sedimento celular.
Si el sedimento celular no es visible, confirme que la centrifuga está funcionando correctamente. Solucione cualquier problema que encuentre. Vuelva a centrifugar el tubo. Registre el problema y cualquier medida de seguimiento tomada según los requisitos de la red y del laboratorio. Si aún no se ve el sedimento celular después de volver a centrifugar el tubo, documéntelo.
- 17.1.5 Retire y deseche el sobrenadante sin alterar el sedimento celular.

17.2 Lavado 2:

- 17.2.1 Resuspenda cada sedimento en un volumen pequeño de WDR y mezcle suavemente, pero a fondo, hasta obtener una suspensión celular homogénea.

Tamaño del tubo (ml)	Volumen de resuspensión de WDR (ml)
50	≤ 5
15	≤ 3

- 17.2.2 Combine hasta cuatro suspensiones de sedimentos del mismo PTID/anticoagulante. Este es el tubo de células cosechadas.

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

- 17.2.3 Use un volumen reducido de WDR para enjuagar los tubos de donde se transfirieron los sedimentos. Recolecte el enjuague de WDR en el tubo de células cosechadas.

- 17.2.4 Agregue WDR en QS a la fracción de PBMC y mezcle suavemente.

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

- 17.2.5 Vuelva a tapar los tubos y colóquelos en la centrifuga.
- 17.2.6 Centrifugue las células diluidas a entre 200 y 400 x g durante 10 minutos, a una temperatura de entre 15 °C y 30 °C (el freno es opcional).
- 17.2.7 Retire los tubos de la centrifuga y verifique la presencia del sedimento celular.

Nota: Si el sedimento celular no es visible, confirme que la centrifuga está funcionando correctamente. Solucione cualquier problema y vuelva a centrifugar el tubo. Registre el problema y cualquier medida de seguimiento tomada según los requisitos de la red y del

laboratorio. Si aún no se ve el sedimento celular después de volver a centrifugar el tubo, documéntelo.

17.2.8 Retire y deseche el sobrenadante sin alterar el sedimento celular.

17.3 Recuento de células PBMC

17.3.1 Calcule y registre el volumen (V) de resuspensión para recuento de WDR exacto para 0,1 ml. El volumen es importante porque es el volumen en el que se basa el recuento celular.

Nota: En general, el volumen es aproximadamente el 20 % del volumen de sangre entera utilizable redondeado al mililitro entero más cercano. Sin embargo, el volumen puede variar según el tamaño del sedimento celular y el método de recuento celular. También se lo puede ajustar para permitir una medición o resuspensión conveniente. Por lo tanto, el volumen puede variar entre el 10 % y el 50 % del volumen de sangre entera utilizable. Consulte el método de recuento celular aprobado por el laboratorio para obtener orientación.

17.3.2 Si hay más de un sedimento del mismo PTID/anticoagulante, utilice una pequeña cantidad de WDR para volver a suspender y combinar cuidadosamente los sedimentos celulares en un tubo. Mediante el uso del volumen restante, enjuague los tubos de donde se transfirieron las células. Agregue el enjuague al tubo de células cosechadas.

17.3.3 Complete el recuento celular usando el SOP correspondiente al método de recuento celular aprobado por el laboratorio. Para ver un ejemplo de SOP de recuento celular manual, consulte <http://www.hanc.info/labs/labresources/procedures/Pages/pbmcSop.aspx>.

17.3.4 Mezcle las células suavemente, pero a fondo, antes de extraer las muestras para el recuento celular.

17.3.5 Transfiera un pequeño volumen de la resuspensión a un tubo pequeño para el recuento.

Nota: Si es necesario realizar varios recuentos, minimice el volumen de muestreo necesario.

17.3.6 Siga el SOP correspondiente al método de recuento celular aprobado en el laboratorio de procesamiento para determinar la concentración de células x 10⁶ por ml.

Nota: Células a 10³/μl = células a 10⁶/ml.

Nota: Los recuentos automáticos pueden realizarse una vez. Los recuentos manuales deben contar, al menos, los cuatro cuadrados grandes de las esquinas (1 mm²).

17.3.7 Calcule la cantidad total de células usando la siguiente fórmula:

$$T = C \times V$$

T = Cantidad total de células

C = Concentración (10⁶/ml) determinada en el método de recuento

V = Volumen de resuspensión para recuento de WDR en ml

17.3.8 Calcule el rendimiento celular en células/ml de sangre entera utilizable usando la fórmula que aparece a continuación.

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

Nota: El rendimiento celular se calcula con fines de seguridad únicamente. Consulte el Capítulo 13, Control de calidad, para conocer el rango de rendimientos celulares previsto. Si el rendimiento celular se encuentra fuera del rango previsto, siga las pautas de resolución de problemas que se describen en el Capítulo 13, Control de calidad. Vuelva a realizar la dilución y el recuento, si es necesario.

17.4 Cálculo del volumen final de resuspensión

17.4.1 Calcule el volumen de resuspensión congelado en CPS requerido completando los pasos que figuran a continuación, a fin de obtener la concentración final de células objetivo.

Nota: La concentración final de células objetivo varía en función de la red y del protocolo. Consulte el protocolo para obtener información sobre la concentración final de células objetivo.

17.4.2 Calcule el volumen de resuspensión congelado en CPS (V1) requerido usando la concentración final de células objetivo.

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

T = Cantidad total de células

N1 = Concentración final de células objetivo

V2 = Volumen final de la alícuota en ml

Redondee el V1 al 0,1 ml inferior más cercano para determinar el volumen de resuspensión en CPS (V_f) real.

Nota para la HVTN: Redondee el V1 al mililitro entero (1,0 ml) inferior más cercano para determinar el V_f.

Nota: Para algunas redes, el V2 será de 1 ml/criovial, de modo que la cantidad de viales requeridos será igual a los mililitros de CPS. Para el ACTG y la IMPAACT, ajuste el volumen por criovial de acuerdo con la tabla de procesamiento del laboratorio o con el protocolo.

Nota para la IMPAACT: La mayoría de los protocolos de la IMPAACT requerirán PBMC viables a 10⁷/ml y 5,0 x 10⁶/vial y solicitarán que se almacenen todas las PBMC recuperadas. En general, cuando las recuperaciones de PBMC son menores al número previsto:

- Agregue cantidades de PBMC residuales menores a 2 x 10⁶ a un tubo con 5,0 x 10⁶ células.
- Divida en alícuotas cantidades de células residuales mayores a 2 x 10⁶, pero menores a 5 x 10⁶ en un vial independiente.

Ejemplos:

Requisito del protocolo de la IMPAACT	Recuperación	Preparación de alícuotas
10 ⁷ PBMC en dos viales	9,3 x 10 ⁶ PBMC	Prepare un vial con 5,0 x 10 ⁶ PBMC y otro vial con 4,3 x 10 ⁶ PBMC
20 millones de PBMC	16,5 x 10 ⁶ PBMC	Prepare dos viales con 5 x 10 ⁶ PBMC cada uno y un vial con 6,5 x 10 ⁶ PBMC

Recuerde registrar la cantidad de PBMC real por vial en el LDMS.

17.4.3 **Solo para la HVTN:** Calcule la cantidad real de células por vial (N2) usando el volumen congelado en CPS (V_f) real determinado en el cálculo anterior.

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

N2 = Cantidad real de células por vial

T = Cantidad total de células

V2 = Volumen final de la alícuota en ml

17.5 Etiquetado

17.5.1 Complete la impresión y el etiquetado de los crioviales ANTES del centrifugado final.

Nota: Es importante reducir al mínimo el tiempo durante el cual las células permanecen en el sedimento.

17.5.2 Las etiquetas de los crioviales deben generarse usando el Sistema de Gestión de Datos del Laboratorio (LDMS).

17.5.2.1 Siga la práctica de laboratorio de la red para realizar el ingreso de datos.

17.5.2.2 Verifique que cada tipo derivado de etiqueta de criovial no tenga errores de ingreso de datos, comparándolo con la petición del laboratorio y con la Hoja de trabajo para procesamiento ANTES de etiquetar el criovial.

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

17.5.2.4 Corrija los errores de ingreso de datos en el LDMS y reimprima las etiquetas, según sea necesario (asegurándose de que estén seleccionadas las identificaciones globales correspondientes).

17.5.3 Aplique las etiquetas en los crioviales de modo que la información sea fácil de leer y que el contenido del tubo pueda verse claramente.

Nota para la HVTN: Revise los crioviales vacíos etiquetados siguiendo las pautas vigentes de la HVTN para garantizar que se pueda escanear el código de barras.

17.6 Centrifugado final

17.6.1 Coloque el tubo de células cosechadas en la centrífuga.

Nota para la HVTN: Agregue WDR en QS a la suspensión celular hasta obtener 45 ml antes del centrifugado.

17.6.2 Centrifugue las células diluidas a entre 200 y 400 x g durante 10 minutos, a una temperatura de entre 15 °C y 30 °C (el freno es opcional).

17.6.3 Verifique que todos los crioviales estén etiquetados y que estén en un lugar de fácil acceso.

17.7 División en alícuotas para la criopreservación

Nota: Los pasos siguientes deben realizarse rápidamente para preservar la integridad de las células. Se recomienda conservar los viales fríos en hielo común. No deje que los viales se sumerjan en el hielo común. No deje que se acumule humedad cerca de las tapas de los viales.

17.7.1 Retire y deseche el sobrenadante de WDR. Conserve el sedimento.

Nota para el ACTG y la IMPAACT: Si las células deben ser congeladas como sedimentos de PBMC (SED.) inviábiles, no se recomienda la resuspensión de células en un medio de congelación (CPS) debido a que el DMSO es un potente inhibidor de la reacción en cadena de la polimerasa (polymerase chain reaction, PCR). Si las PBMC han estado en contacto con el DMSO (p. ej., medio de congelación), lave el SED. dos veces con WDR antes del almacenamiento. Consulte el SOP de procesamiento de muestras en <http://www.hanc.info/labs/labresources/procedures/Pages/actgImpaactLabManual.aspx>.

17.7.2 Resuspenda el sedimento usando el volumen de CPS (V_f) frío que determinó en la sección 17.4.

Nota: Se pueden preenfriar los viales y/o trabajar sobre hielo común.

17.7.2.1 **Con cuidado**, resuspenda el sedimento celular antes de agregar la CPS dando capirotaños al tubo, agitándolo en la gradilla o usando una pipeta.

- 17.7.2.2 *Con cuidado*, agregue la CPS a las células resuspendidas agitando de forma constante.
- 17.7.3 Trabaje *rápidamente* una vez que se haya agregado la CPS. No deje que las células permanezcan en la solución de congelación durante más de 10 minutos antes de colocarlas en el congelador.
- 17.7.4 Divida en alícuotas de 0,5 a 1 ml por criovial, según los requisitos de la red y del protocolo. Si la red o el protocolo lo requieren, prepare una alícuota parcial final con cualquier exceso de volumen de suspensión celular que pueda haber.
- Nota para la HVTN:** En lugar de crear una alícuota parcial final, distribuya de manera uniforme cualquier exceso de volumen entre todos los crioviales para ese PTID.
- 17.8 Congelación a velocidad controlada durante la noche
- 17.8.1 Después del procesamiento y del recuento, las células deben ser congeladas inmediatamente.
- 17.8.2 Seleccione el método de congelación que se utilizará: StrataCooler® Cryo, NALGENE® Mr. Frosty, biocision® CoolCell o CryoMed®. Consulte la sección 7.4 para ver información sobre el almacenamiento y el mantenimiento.
- 17.8.3 Transfiera inmediatamente todos los crioviales al recipiente de congelación a velocidad controlada.
- En el caso de NALGENE® Mr. Frosty, biocision® CoolCell y StrataCooler® Cryo, cierre el recipiente y colóquelo en un congelador a -80 °C (entre -65 °C y -95 °C), en un lugar que no se vea afectado por los reiterados accesos al congelador (es decir, alejado de la parte delantera o superior del congelador cerca de la puerta o tapa de apertura) durante un mínimo de cuatro horas en el caso del recipiente Mr. Frosty y CoolCell, y durante toda la noche en el caso de StrataCooler® Cryo.
- En el caso de CryoMed® u otro congelador a velocidad controlada, inicie el programa de enfriamiento según el SOP del centro correspondiente.
- Nota:** Este es el tiempo de congelación.
- 17.9 Asegúrese de que toda la información correspondiente esté registrada según los requisitos de la red y del laboratorio. Consulte el Capítulo 5 para ver información detallada.

18 Almacenamiento de las PBMC (temporal o in situ)

- 18.1 Se debe mantener la cadena de frío durante todos los pasos de la transferencia para evitar daños en las células.

Nota para la HVTN: Envíe en hielo seco al depósito central de muestras **dentro de la semana** posterior a la recolección, a menos que la HVTN indique lo contrario.

Nota para el ACTG: Envíe en hielo seco dentro de las cuatro semanas posteriores a la fecha de congelación.

Nota para HVTN, IMPAACT y MTN: PBMCs deben ser transferidos al contenedor de LN2 o a un congelador mecánico de -150°C dentro de las 72 horas luego de colocados en el congelador gradual de enfriamiento controlado. Continúe al 18.3

- 18.2 Transferir PBMC que serán almacenadas temporalmente a -70/-80 °C en el congelador del sitio.
- 18.2.1 Transfiera los crioviales desde el sistema de enfriamiento a velocidad controlada hasta el lugar de almacenamiento designado a -70/-80 °C. Asegúrese de que el congelador que se utilice para el almacenamiento de las células mononucleares de sangre periférica (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) tenga un punto de ajuste de -70 °C con un rango de alarma de -65 °C hasta al menos -80 °C.
- Transfiera los crioviales después de un mínimo de cuatro horas en el caso de Mr. Frosty NALGENE® y biocision® CoolCell y después de toda la noche en el caso de StrataCooler® Cryo. Si se va a utilizar CryoMed®, transfiera los crioviales una vez finalizado el programa al congelador de -70/-80 °C.
- Nota: Requerido para la HVTN, recomendado para el ACTG:** Utilice una bandeja de transferencia con hielo seco. Asegúrese de que la caja de cryovial para el congelador esté profundamente cubierta en todos sus lados con hielo seco. Trabaje de manera rápida y eficiente para reducir al mínimo la exposición de los crioviales a temperaturas ambientales.
- 18.2.2 **Nota:** No almacene en nitrógeno líquido (LN2). Almacene a una temperatura que varíe entre -65 °C y -95 °C hasta el envío.
- 18.2.3 **Nota: Requerido para la HVTN, recomendado para el ACTG:** Mantenga la cadena de frío durante la preparación para el envío al enfriar previamente el contenedor de hielo seco y usar una bandeja de transferencia con hielo seco durante los pasos de envasado. Asegúrese de que el contenedor de hielo seco esté completamente lleno de hielo seco. NO almacene temporalmente las muestras en LN2 a menos que la red o el protocolo se lo indiquen. NO vuelva a transferir muestras de LN2 a los congeladores de -70/-80 °C, a menos que la red o el equipo del protocolo se lo indiquen.
- 18.2.4 Comuníquese con el personal de operaciones de laboratorio de la red si las muestras no pueden llegar a su destino final dentro del tiempo de almacenamiento temporal asignado por la red. Es necesario obtener un permiso para pasar las muestras a almacenamiento en LN2 y para realizar el envío en contenedores de LN2 si no pueden cumplirse las condiciones de almacenamiento temporal y de envío.
- 18.3 Transferir PBMCs que se almacenarán en contenedor de LN2 o congelador mecánico de -150°C.
- Nota para HVTN:** Los refrigeradores mecánicos de -150°C no son aceptables para el almacenamiento de PBMC de HVTN.
- 18.3.1 Dentro de 72 horas de congelar los criotubos en el sistema de enfriamiento gradual controlado, transferir en hielo seco al lugar de almacenamiento designado en el contenedor de LN2 o en el congelador mecánico de -150°C.
- 18.3.2 Las muestras de PBMC congeladas pueden almacenarse de forma segura en LN2 en fase de vapor indefinidamente. NO vuelva a transferir las muestras de LN2 o -150°C a los congeladores de -70/-80 °C, a menos que la red o el equipo del protocolo se lo indiquen.
- 18.3.3 Una vez que las muestras han sido almacenadas en LN2, todas las transferencias o envíos deben mantenerse en LN2 (≤ -140 °C), y las muestras no pueden enviarse en hielo seco.
- Todas las muestras de materiales infecciosos deben enviarse en recipientes de LN2 aprobados por la Asociación Internacional de Transporte Aéreo (International Air Transport Association, IATA); consulte los requisitos del protocolo para ver las excepciones.

19 Cómo completar el procesamiento de documentos

- 19.1 Asegúrese de que toda la información correspondiente esté registrada según los requisitos de la red y del laboratorio, y de que todos los cálculos sean correctos. Consulte el Capítulo 5 para ver información detallada.
- 19.2 Guarde la Hoja de trabajo para procesamiento de PBMC y cualquier otro documento de registro según la política del laboratorio. Consulte el Capítulo 5 para ver información detallada.

Esto indica el fin del procesamiento y del almacenamiento.

Siga los procedimientos de laboratorio correspondientes para la preparación y el procesamiento de los envíos.

20 Cálculos

- 20.1 Las revoluciones por minuto (r. p. m.), por lo general, se leen de un nomograma. Los nomogramas a menudo están incluidos en el manual de mantenimiento de la centrífuga. Asegúrese de usar los cuadros específicos para la centrífuga y el rotor.
- 20.2 Se recomienda colocar la conversión de g en r. p. m. correspondiente en su centrífuga para que pueda usarse fácilmente como referencia.
- 20.3 Si no se cuenta con un nomograma, las fuerzas g pueden convertirse en r. p. m. mediante la siguiente fórmula.

$$RPM = \sqrt{\frac{g}{1,18r \times 10^{-5}}}$$

r = radio del rotor en centímetros

g = fuerza centrífuga relativa expresada en unidades de gravedad

RPM = revoluciones por minuto

21 Limitaciones del procedimiento

- 21.1 El tiempo óptimo de procesamiento desde la recolección hasta la congelación de sangre fresca para PBMC es menos de ocho horas desde el momento de la recolección. La función celular puede reducirse en las muestras más viejas.
- 21.2 El tiempo óptimo de procesamiento para PBMC es menos de tres horas desde el momento en que se agrega sangre a los tubos de separación de células (Accuspin™ o equivalente) hasta el inicio del ciclo de congelación a velocidad controlada.
- 21.3 Los estudios indican que las muestras recolectadas en anticoagulante ácido etilendiamino tetraacético (ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA) producen menores rendimientos a lo largo del tiempo.
- 21.4 Evite eliminar las cantidades excedentes de los medios de separación con la banda de PBMC, dado que esto puede incrementar la contaminación de granulocitos.
- 21.5 Evite eliminar el sobrenadante excedente con la banda de PBMC para limitar la contaminación con proteínas del plasma.

22 Glosario de términos

Término	Definición
ACTG	Grupo de ensayos clínicos sobre el SIDA (AIDS Clinical Trials Group)
Temperatura de la centrífuga	Entre 15 °C y 30 °C
Marcadamente coagulada	Más de las ¾ partes de la masa de sangre entera está coagulada y queda muy poca sangre entera libre.
Coágulo pequeño	Por lo general, no suelen verse coágulos pequeños en el tubo de sangre entera, pero pueden verse en la frita del tubo de separación después del centrifugado.
CPS	Solución de criopreservación (Cryopreservation Solution)
CSR	Depósito de muestras central (Central Specimen Repository)
CSTFB	Tubo de separación de células con barrera de frita (Cell Separation Tube with Frit Barrier)

Término	Definición
<i>Medios de DG</i>	Medios de gradiente de densidad
<i>FBS</i>	Suero bovino fetal (Fetal Bovine Serum)
<i>HBSS</i>	Solución salina balanceada de Hanks (Hanks' Balanced Salt Solution)
<i>Hemólisis</i>	<p>Una coloración de rosado a rojo del suero o plasma debido a la lisis de los glóbulos rojos. La hemólisis se clasifica y se informa según la siguiente escala:</p> <p style="padding-left: 20px;">1+ Color rojo tirando a rosa pálido del suero o plasma, que permite leer claramente un periódico colocado detrás del tubo de sangre.</p> <p style="padding-left: 20px;">2+ Color rojo tirando a rosa del suero o plasma; el periódico puede leerse, pero no tan nítidamente.</p> <p style="padding-left: 20px;">3+ Color rojo tirando a rosa oscuro del suero o plasma; el periódico se ve poco claro.</p> <p style="padding-left: 20px;">4+ Color rojo caoba oscuro del suero o plasma, que no permite leer el periódico.</p> <p>Nota: Los glóbulos rojos lisados confieren al suero o plasma un aspecto coloreado, pero transparente, mientras que la contaminación con glóbulos rojos confiere al suero o plasma un aspecto turbio.</p>
<i>HI-FBS</i>	Suero bovino fetal termoinactivado (Heat Inactivated Fetal Bovine)
<i>HPTN</i>	Red de ensayos de prevención del VIH (HIV Prevention Trials Network)
<i>HVTN</i>	Red de ensayos sobre vacunas contra el VIH (HIV Vaccine Trials Network)
<i>Ictérico</i>	Plasma de color verde o naranja, que sugiere la presencia de mayores niveles de bilirrubina.
<i>IMPAACT</i>	Red de ensayos clínicos internacionales sobre el SIDA en adolescentes, niños y madres (International Maternal Pediatric Adolescent AIDS Clinical Trials Network)
<i>LDMS</i>	Sistema de gestión de datos del laboratorio (Laboratory Data Management System, LDMS)
<i>MTN</i>	Red de ensayos sobre microbicida (Microbicide Trials Network)
<i>PBMC</i>	Células mononucleares de sangre periférica (Peripheral Blood Mononuclear Cells)
<i>PBS</i>	Solución salina amortiguada con fosfato (Phosphate-buffered saline)
<i>PTID/PID</i>	Número de identificación del participante
<i>QS</i>	Cantidad suficiente (Quantum satis): Agregar cantidad suficiente de líquido para alcanzar el volumen especificado
<i>Temperatura ambiente (Room Temperature, RT)</i>	Entre 15 °C y 30 °C
<i>Volumen de sangre entera utilizable</i>	El volumen de sangre entera que se puede procesar realmente (El volumen de sangre entera utilizable puede no ser igual a la capacidad del tubo.)
<i>Almacenamiento en fase de vapor</i>	El almacenamiento en fase de vapor del nitrógeno líquido (LN2) es el espacio en el tanque de almacenamiento que está por encima del líquido LN2 en la parte inferior del tanque.
<i>WDR</i>	Reactivo de dilución y lavado (Wash Diluent Reagent) (HBSSo PBS)

23 Referencias

- 23.1 Bull M., Lee B., Stucky J., Chiu Y.L., Rubin A., Horton H. y McElrath MJ. Defining blood processing parameters for optimal detection of cryopreserved antigen-specific responses for HIV vaccine trials. *J. Immunol. Methods* 322:57-69 (2007).
- 23.2 CHAVI SOP for PBMC Isolation and Cryopreservation, CHAVI-A0001, v5, 3 de noviembre de 2008.
- 23.3 Cox J.H., DeSouza M., Ratto-Kim S., Ferrari G., Weinhold K.J. y Birx B.L. Cellular Immune assays for evaluation of Vaccine efficacy in developing countries. *Manual of Clinical laboratory Immunology*. Rose N.R., Hamilton R.G., Detrick B. Eds. (6.ª edición) p. 301-315 (2002).
- 23.4 Islam B., Lindbert A. y Christensen B. Peripheral blood cells preparation influences the level of expression of leukocyte cell surface markers as assessed with quantitative multicolor flow cytometry. *Cytometry* 22:128-134 (1995).
- 23.5 Immunovirology Research Network (IVRN) Laboratory Manual: Separation and storage of serum, plasma and PBMCs. IVRN. 12 de diciembre de 1007.
- 23.6 Kierstead L.S., Dubey S., Meyer B., Tobery T.W., Mogg R., Fernandez V.R., Long R., Guan L., Gaunt C., Collins K., Sykes K.J., Mehrotra B.V., Chirmule N., Shiver J.W. y Casimiro B.R. Enhanced rates and magnitude of immune responses detected against an HIV vaccine: effect of using an optimized process for isolating PBMC. *AIDS Res Hum Retroviruses* 23:86-92 (2007).
- 23.7 Shearer WT, Rosenblatt HM, Gelman RS, Oyomopito R, Plaeger S, Stiehm ER, Wara DW, Douglas SD, Luzuriaga K, McFarland EJ, Yogev R, Rathore MH, Levy W, Graham BL, Spector SA; Pediatric AIDS Clinical Trials Group. Lymphocyte subsets in healthy children from birth through 18 years of age: the Pediatric AIDS Clinical Trials Group P1009 study. *J Allergy Clin Immunol.* 112(5):973-80 (2003).
- 23.8 Sigma-Aldrich Accuspin™ System-Histopaque®-1077, procedure number A6929/A7054/A0561, fechado 2003-09.
- 23.9 Weinberg A., Betensky R., Zhang L. y Ray G. Effect of shipment, storage, anticoagulant, and cell separation on lymphocyte proliferation assays for human immunodeficiency virus-infected patients. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 5:804-807 (1998).
- 23.10 Weinberg A, Song LY, Wilkening CL, Fenton T, Hural J, Louzao R, Ferrari G, Etter PE, Berrong M, Canniff JD, Carter D, Defawe OD, Garcia A, Garrelts TL, Gelman R, Lambrecht LK, Pahwa S, Pilakka-Kanthikeel S, Shugarts DL y Tustin NB. Optimization of storage and shipment of cryopreserved peripheral blood mononuclear cells from HIV-infected and uninfected individuals for ELISPOT assays. *J Immunol Methods.* 363(1):42-50 (2010).

24 Documentos adicionales (que deben ser conservados por el laboratorio)

- 24.1 Folleto de FBS y Certificado de Análisis
- 24.2 Folleto de WDR (HBSS o PBS)
- 24.3 Folleto del medio de gradiente de densidad
- 24.4 Folleto del tubo de separación de células con barrera de fritada

25 Apéndices

- 25.1 Apéndice A: Hoja de trabajo para procesamiento de PBMC requerida por la HVTN

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

- 25.2 Apéndice B: Modelo de diario de cambios del isopropanol del recipiente Mr. Frosty NALGENE®
- 25.3 Apéndice C: Resolución de problemas: Recuperación de PBMC ante la ausencia de una banda definida de PBMC después del centrifugado en gradiente de densidad
- 25.4 Apéndice D: Combinación de capas leucocíticas para el aislamiento de PBMC con medios de gradiente de densidad
- 25.5 Apéndice E: Guía rápida del SOP de PBMC entre redes: Tubos CSTFB
- 25.6 Apéndice F: Guía rápida del SOP de PBMC entre redes: Método de colocación manual por encima del medio de gradiente de densidad
- 25.7 Apéndice G: Ejemplo de reactivos
- 25.8 Apéndice H: Historial de cambios

Apéndice A: Hoja de trabajo para procesamiento de PBMC de HVTN

Laboratorio de procesamiento de muestras:

Identificación del participante (PTID): _____ Visita: _____ Protocolo: _____

Fecha de la recolección: _____ Hora: _____

Fecha de inicio del procesamiento: _____ Hora: _____ Procesado por: _____

Reactivos/fabricante	Número de lote			Fecha de vencimiento
DMSO (Fabr.: _____)				
FBS (Fabr.: _____)				
HBSS u otro WDR (Fabr.: _____)				
Tubo de separación de células (Fabr.: _____)				
Medios de gradiente de densidad (Fabr.: _____)				
	Volumen en ml			
CPS	CPS	DMSO	FBS	1 día laborable
Datos que deben registrarse durante el procesamiento				Muestra
Tipo de tubo para muestras (marque una opción con un círculo)				NaHep/ACD/EDTA Otro: _____
Estado de la sangre (marque una o más opciones con un círculo)				NORMAL/HEMOL./COAGULADA
Si se indica en el protocolo o en las instrucciones de procesamiento, coseche el plasma antes del procesamiento de PBMC. Reemplace el volumen de plasma con HBSS/WDR. Indique la cosecha.				Sí No
Volumen de sangre entera utilizable				ml
Indique el método de procesamiento: barrera de frita, colocación por encima o por debajo del medio de gradiente de densidad o combinación con capa leucocítica				
Método de recuento (nombre del instrumento o recuento manual)				
Volumen de resuspensión para recuento en HBSS (u otro WDR) (V)				ml
Concentración promedio del recuento celular (C)				x 10 ⁶ células/ml
Cantidad total de células (T) = C x V				x 10 ⁶ células
Cálculo del rendimiento celular/ml de sangre entera (verificación de control de calidad) = (T/volumen de sangre entera utilizable)				x 10 ⁶ células/ml
Cálculo del volumen de resuspensión en CPS estimado (V1)=(T/15 x 10⁶ células/ml)(1 ml)				ml
Cálculo del volumen final de resuspensión en CPS (Vf), redondeado al mililitro entero INFERIOR más cercano				ml
Cálculo de la cantidad real de células por vial N2 = (T/Vf) x V2; (v2 = 1 ml para la mayoría de los protocolos de HVTN).				x 10 ⁶ células/vial
Fecha y hora de congelación (explique en la sección de comentarios si no está dentro de las 4 horas del procesamiento inicial)				
Impresión y control de calidad del contenido/los códigos de barras de las etiquetas del LDMS (iniciales de la persona que realiza el control de calidad)				
Cantidad de crioviales efectivamente congelados Nota: Debe ser igual al volumen de resuspensión congelado para alícuotas de 1 ml.				
Completar las entradas restantes en el LDMS, incluido el recuento celular total y el tiempo de congelación.				

Apéndice A: Hoja de trabajo para procesamiento de PBMC de HVTN

Laboratorio de procesamiento de muestras:

PTID:

Transferencia de crioviales al almacenamiento en congelador	
Persona que transfirió los crioviales a las ubicaciones en las cajas de almacenamiento asignadas por el LDMS	
Fecha (ddmmaaaa)/hora en que se transfirieron los crioviales desde el dispositivo de enfriamiento lento al lugar de almacenamiento. (La muestra debe mantenerse a -70/-80 °C durante la transferencia)	
Revisión final (Revisor/Fecha)	

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

Recuentos celulares automáticos (10 ³ /µl=10 ⁶ /mL)	Recuento n.º 1			
Recuento celular (C) como células x 10 ⁶ /ml				
Factor de dilución de PBMC (1:DF*)				
Concentración de células = (C)(DF)	x 10 ⁶ células/ml			

*Nota: Factor de dilución (DF) = (partes de células + partes de líquido de dilución)/partes de células

Comentarios y desviaciones del protocolo:

Apéndice C: Resolución de problemas: Recuperación de PBMC ante la ausencia de una banda definida de PBMC después del centrifugado en gradiente de densidad

C.1 Aspectos generales:

Si se produce alguna falla durante el centrifugado en gradiente de densidad de la sangre, las capas de los medios de gradiente de densidad y de plasma no se separan claramente y, como consecuencia, no puede verse la capa de PBMC. No se asuste. Las PBMC pueden recuperarse parcialmente siguiendo pasos adicionales.

C.2 Identifique el problema:

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

C.2.2 Trate de determinar por qué no se separó claramente la capa de PBMC. A continuación, se enumeran las posibles causas:

C.2.2.1 El tubo se cayó o se golpeó.

C.2.2.2 Se dejó activado el freno.

C.2.2.3 La velocidad de centrifugado fue demasiado rápida. Verifique que la configuración de r. p. m. haya sido la correcta para el procedimiento utilizado (CSTFB o separación manual de células en gradiente de densidad) revisando el cuadro de RCF/r. p. m. para el rotor. Algunas centrífugas requieren que las configuraciones de la centrífuga coincidan con el tipo de cubeta utilizada. Si las configuraciones no son correctas, la centrífuga puede calcular erróneamente su velocidad.

C.2.2.4 La centrífuga se detuvo debido a una interrupción del suministro eléctrico.

C.2.2.5 La frita se salió de lugar. (Con frecuencia, esto se debe a una velocidad de centrifugado demasiado alta, pero, ocasionalmente, puede haber un tubo defectuoso en la partida.)

C.2.2.6 La centrífuga no estaba balanceada.

C.2.2.7 El donante tiene un bajo recuento de linfocitos, glóbulos blancos o hematocritos.

C.3 De las causas mencionadas, las primeras cinco se pueden resolver fácilmente. Si la causa se debe a una centrífuga no balanceada, determine por qué la centrífuga no estaba balanceada.

Verifique lo siguiente:

C.3.1 Verifique que los tubos hayan sido balanceados.

C.3.2 Verifique que las cubetas de la centrífuga hayan sido balanceadas.

C.3.3 Verifique que los brazos y las cubetas de la centrífuga hayan sido engrasados y aceitados de forma adecuada.

Nota: En caso de tener alguna duda con respecto a la centrífuga, utilice otra.

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

C.4.1 Reactivos:

C.4.1.1 Medios de gradiente de densidad

C.4.1.2 Tubos de 50 ml

C.4.1.3 Pipetas

C.4.2 Método:

Nota: El medio de gradiente de densidad es tóxico para las células, de modo que debe trabajar con eficiencia.

- C.4.2.1 Agregue 15 ml del medio de gradiente de densidad a los tubos estériles de 50 ml (no a los tubos CSTFB).
- C.4.2.2 Deje que el medio de gradiente de densidad alcance la temperatura ambiente mientras trabaja con la muestra.
- C.4.2.3 Por cada tubo mezclado, etiquete los tubos de 50 ml con el PTID del sujeto. Use una pipeta para eliminar lentamente el contenido de la muestra mezclada del tubo de separación o del CSTFB. (Por lo general, la frita del CSTFB se habrá salido de lugar.)
- C.4.2.4 Transfiera hasta un máximo de 30 ml de la muestra mezclada al tubo que contiene el medio de gradiente de densidad.
- C.4.2.5 Repita este procedimiento para todas las muestras mezcladas.
- C.4.2.6 Coloque los tubos en la centrífuga y verifique que los tubos estén balanceados.
- C.4.2.7 Centrifugue durante 30 a 40 minutos a 400 x g con el freno desactivado a una temperatura de entre 15 y 30 °C.
- C.4.2.8 Ahora debe poder verse una capa de PBMC. (Con frecuencia, se pierden algunas células, de modo que la capa puede ser delgada.)
- C.4.2.9 En esta etapa, puede recolectarse la capa superior, que es plasma posiblemente contaminado con el medio de gradiente de densidad, y procesarse según se describe en las Secciones “Aislamiento de PBMC y de plasma” y “Almacenamiento de plasma” del protocolo principal. Sin embargo, la información acerca de que esta muestra de plasma puede estar contaminada con el medio de gradiente de densidad debe ingresarse en la sección de comentarios de esta muestra en el LDMS.
- C.4.2.10 Con cuidado, transfiera la capa de PBMC a un tubo de centrífuga cónico de 50 ml etiquetado con el identificador PTID. Utilice un tubo nuevo para cada tubo que contiene el medio de gradiente de densidad.
- C.4.2.11 Vuelva a tapar el tubo que contiene el medio de gradiente de densidad.
- C.4.2.12 Regrese al Capítulo 15 del protocolo principal.

Nota: En la sección “Comentarios y desviaciones del Protocolo” de la **Hoja de trabajo para procesamiento de PBMC**, registre los detalles de la desviación del SOP (es decir, que se siguieron los pasos del “Apéndice B” para recuperar las PBMC debido a la ausencia de una banda definida de PBMC después del centrifugado en gradiente de densidad). Además, señale cuánto tiempo demoró el recentrifugado, a fin de proporcionar una estimación de cuánto tiempo estuvieron las células en el medio de gradiente de densidad. También indique que la muestra de plasma recuperada estaba posiblemente contaminada con medio de gradiente de densidad en la **Hoja de trabajo para procesamiento de PBMC** y en la sección de comentarios de la entrada en el LDMS para las muestras de plasma.

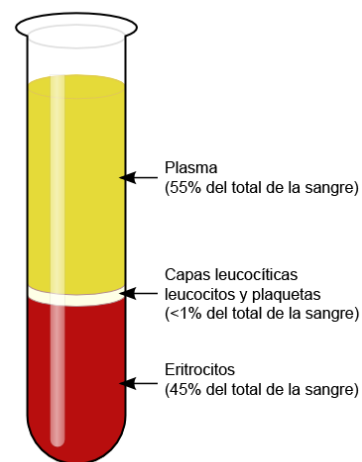
Apéndice D: Combinación de capas leucocíticas para el aislamiento de PBMC con medios de gradiente de densidad

Este procedimiento puede usarse al aislar PBMC de múltiples tubos de sangre de la sangre de la misma combinación de PTID-anticoagulante. Este procedimiento permite consolidar las capas leucocíticas para reducir el uso de reactivos y elementos consumibles, aumentar la recuperación y disminuir la contaminación.

La capa leucocítica es la fracción de sangre entera anticoagulada que contiene glóbulos blancos (WBC) y plaquetas y se produce después de la centrifugación en la interfaz de las capas de plasma y glóbulos rojos. La mayoría de los WBC se encuentran en la capa leucocitaria y solo una fracción muy pequeña (< 1 millón en total) permanece en el concentrado de glóbulos rojos después de la obtención de la capa leucocitaria. La capa leucocítica se cosecha con una pequeña fracción de plasma y glóbulos rojos (aproximadamente 1,5 ml) y luego se diluye antes de la colocación por encima del medio de gradiente de densidad para la separación de linfocitos.

Procedimiento:

- D1. Asegúrese de haber realizado los pasos 16.4.1 a 16.4.3.
- D2. Centrifugue la sangre entera a entre 200 y 400 x g durante 10 minutos.
- D3. Coseche plasma (y guarde lo necesario, consulte los pasos 16.3.4 a 16.3.7) de cada tubo hasta aproximadamente 5 mm de la capa leucocítica blanca (que es evidente en la mayoría de los casos, a menos que el paciente tenga neutropenia/linfopenia grave).
- D4. Determine la capacidad y la cantidad de tubos de centrifuga cónicos que se necesitarán para cada combinación PTID-anticoagulante. No mezcle las muestras de diferentes PTID/anticoagulantes. En general:
 - Las capas leucocíticas de dos tubos de recolección de sangre de 10 ml se pueden combinar en un tubo de centrifuga cónico de 15 ml.
 - Las capas leucocíticas de hasta seis tubos de recolección de sangre de 10 ml se pueden combinar en un tubo de centrifuga cónico de 50 ml.
- D5. Etiquete cada tubo de centrifuga cónico con el PTID.
- D6. Agregue WDR a cada tubo de centrifuga cónico estéril.



Capacidad del tubo de centrifuga cónico (ml)	Volumen de WDR (ml)
15	3
50	10-15

- D7. Sustenga el tubo al que se le redujo el plasma (que ahora contiene una pequeña cantidad de plasma residual y concentrado de glóbulos rojos) a un ángulo de alrededor de 30°.
- D8. Use una pipeta desechable de polipropileno, estéril, de diámetro grande, de 2,5 ml para cosechar la capa leucocítica. Aspire la capa leucocítica avanzando a lo largo del extremo inferior del tubo. Coloque lentamente el plasma seguido por la capa leucocítica que se “deslizará” por la capa de concentrado de glóbulos rojos (alrededor de 1,5 ml del aspirado). Transfiera la capa leucocítica al tubo que contiene WDR y enjuague la pipeta de 2 a 3 veces con WDR/suspensión de células.
- D9. Coseche y combine las capas leucocíticas de los tubos restantes para esa combinación de PTID-anticoagulante.
- D10. Agregue WDR/suspensión celular en QS con WDR adicional al volumen deseado para realizar la separación celular en gradiente de densidad. Mezcle suavemente la combinación de capa leucocítica entre tres y cuatro veces con una pipeta.
- D11. Continúe con la separación celular en gradiente de densidad en el paso 16.4.6. del SOP. En el paso 16.4.6, “sangre diluida” se refiere a la “capa leucocítica”.

Materiales adicionales necesarios: Una pipeta estéril de polipropileno de 2,5 ml, de diámetro grande.

Apéndice E: Guía rápida del SOP de PBMC: Tubos CSTFB

Se requiere el uso de la **Hoja de trabajo para procesamiento de PBMC** y el LDMS *para todas las redes* (consulte el Capítulo 5 para ver información detallada). Antes de usar esta guía rápida por primera vez, asegúrese de revisar el SOP de PBMC completo para ver las notas importantes y los detalles, y las pautas específicas de la red.

Pasos (las cantidades para los volúmenes de muestra más pequeños están en <i>bastardilla</i>).	Referencia al SOP
1. Prepare y enfríe la CPS.	11.2
2. Prepare muestras de sangre entera, reactivos y suministros.	15.2
3. Si se requieren alícuotas de plasma según las instrucciones del protocolo: <ol style="list-style-type: none"> Centrifugue la sangre entera a entre 200 y 400 x g durante 10 minutos. Marque el volumen de sangre total en el menisco y, luego, transfiera el plasma a un tubo de centrifuga cónico de 15 o 50 ml para continuar el procesamiento (entre 800 y 1200 x g durante 10 minutos; el freno es opcional). Agregue una cantidad suficiente de WDR para llevar la sangre nuevamente a su volumen original de sangre entera, mezcle suavemente y continúe el procesamiento de PBMC. 	15.3
4. Agregue 5 ml (<i>2 ml</i>) de WDR a cada tubo CSTFB. 5. Transfiera entre 12 y 22 ml (<i>4 a 5 ml</i>) de sangre a los tubos CSTFB etiquetados. 6. Agregue el enjuague de tubos con WDR y el WDR final a los tubos CSTFB hasta alcanzar los 30 ml (<i>7,5 ml</i>) (WDR + sangre entera).	15.4
7. Centrifugue a entre 800 y 1000 x g durante 15 minutos, a una temperatura de entre 15 °C y 30 °C con el <u>freno desactivado</u> . 8. Inspeccione los tubos para detectar posibles problemas. 9. Coseche cada capa leucocítica del CSTFB en el tubo de centrifuga cónico de 50 ml (<i>15 ml</i>) correspondiente.	15.5
10. Agregue WDR en QS hasta obtener un volumen total de 45 ml (<i>10 ml</i>) y mezcle suavemente. 11. Lavado n.º 1: centrifugue a entre 200 y 400 x g durante 10 minutos, a una temperatura de entre 15 °C y 30 °C (el freno es opcional). 12. ¡Verifique la presencia de los sedimentos celulares! 13. Retire suavemente el sobrenadante sin alterar el sedimento celular.	17.1
14. Resuspenda el sedimento celular en una pequeña cantidad de WDR hasta lograr una suspensión celular homogénea. 15. Combine hasta cuatro suspensiones de sedimento en un tubo de centrifuga cónico de 50 ml (<i>2 en un tubo de 15 ml</i>). 16. Agregue el enjuague de tubos con WDR y el WDR final de 45 ml (<i>10 ml</i>) al tubo de células. 17. Lavado n.º 2: centrifugue a entre 200 y 400 x g durante 10 minutos, a una temperatura de entre 15 °C y 30 °C (el freno es opcional). 18. ¡Verifique la presencia de los sedimentos celulares! 19. Retire suavemente el sobrenadante sin alterar el sedimento celular.	17.2
20. Calcule el volumen de resuspensión para recuento de WDR (V). 21. Combine los sedimentos celulares en un tubo mediante el uso de WDR de volumen de resuspensión. Este es el volumen sobre el que se basa el recuento celular. 22. Realice el recuento y calcule la cantidad total de células. 23. Calcule el rendimiento celular en células/ml de sangre entera utilizable.	17.3
24. Calcule el volumen final de resuspensión en CPS. Revise los cálculos.	17.4
25. Complete la impresión, el etiquetado y el control de calidad de los crioviales ANTES del centrifugado final.	17.5

Pasos (las cantidades para los volúmenes de muestra más pequeños están en <i>bastardilla</i>).	Referencia al SOP
26. Centrifugue a entre 200 y 400 x g durante 10 minutos, a una temperatura de entre 15 °C y 30 °C (el freno es opcional).	17.6
27. Retire suavemente el sobrenadante sin alterar el sedimento celular. 28. Resuspenda suavemente el sedimento en CPS fría (V_f) mientras agita el tubo para lograr una distribución uniforme. Se recomienda trabajar sobre hielo común. 29. Con cuidado, realice alícuotas de CPS-células.	17.7
30. Transfiera inmediatamente (<u>menos</u> de 10 minutos) todos los crioviales al equipo de congelación a velocidad controlada e inicie la congelación.	17.8
31. Después del período correspondiente, transfiera los crioviales al equipo de almacenamiento en el centro y envíelos dentro del período designado por la red.	18
32. Completar la Hoja de trabajo para procesamiento de PBMC según lo indicado por la red.	19.1

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

Se requiere el uso de la **Hoja de trabajo para procesamiento de PBMC** y el LDMS *para todas las redes* (consulte el Capítulo 5 para ver información detallada). Antes de usar esta guía rápida por primera vez, asegúrese de revisar el SOP de PBMC completo para ver las notas importantes y los detalles, y las pautas específicas de la red.

Pasos (las cantidades para los volúmenes de muestra más pequeños están en <i>bastardilla</i>).	Referencia al SOP
1. Prepare y enfríe la CPS.	11.2
2. Prepare muestras de sangre entera, reactivos y suministros.	16.2
3. Si se requieren alícuotas de plasma según las instrucciones del protocolo: <ol style="list-style-type: none"> Centrifugue la sangre entera a entre 200 y 400 x g durante 10 minutos. Marque el volumen de sangre total en el menisco y, luego, transfiera el plasma a un tubo de centrifuga cónico de 15 o 50 ml para continuar el procesamiento (entre 800 y 1200 x g durante 10 minutos; el freno es opcional). Agregue una cantidad suficiente de WDR para llevar la sangre nuevamente a su volumen original de sangre entera, mezcle suavemente y continúe el procesamiento de PBMC. 	16.3
4. Transfiera la sangre entera a un tubo de centrifuga cónico estéril de 50 ml (<i>15 ml</i>) y dilúyala con WDR, según sea necesario. 5. Con una pipeta, coloque con cuidado y lentamente la sangre diluida sobre el medio de gradiente de densidad. (El método de colocación por debajo del medio de gradiente de densidad es una alternativa aprobada.)	16.4
6. Centrifugue a 400 x g durante 30 minutos <u>con el freno desactivado</u> . 7. Revise cada tubo de centrifuga cónico para detectar posibles problemas. 8. Coseche cada capa leucocítica en el tubo de centrifuga cónico de 50 ml (<i>15 ml</i>) correspondiente.	16.5
9. Agregue WDR en QS hasta obtener un volumen total de 45 ml (<i>10 ml</i>) y mezcle suavemente. 10. Lavado n.º 1: centrifugue a entre 200 y 400 x g durante 10 minutos, a una temperatura de entre 15 °C y 30 °C (el freno es opcional). 11. ¡Verifique la presencia de los sedimentos celulares! 12. Retire suavemente el sobrenadante sin alterar el sedimento celular.	17.1
13. Resuspenda el sedimento celular en una pequeña cantidad de WDR hasta lograr una suspensión celular homogénea. 14. Combine hasta cuatro suspensiones de sedimento en un tubo de centrifuga cónico de 50 ml (<i>2 en un tubo de 15 ml</i>). 15. Agregue el enjuague de tubos con WDR y el WDR final de 45 ml (<i>10 ml</i>) al tubo de células. 16. Lavado n.º 2: centrifugue a entre 200 y 400 x g durante 10 minutos, a una temperatura de entre 15 °C y 30 °C (el freno es opcional). 17. ¡Verifique la presencia de los sedimentos celulares! 18. Retire suavemente el sobrenadante sin alterar el sedimento celular.	17.2
19. Calcule el volumen de resuspensión para recuento de WDR (V). 20. Combine los sedimentos celulares en un tubo mediante el uso de WDR de volumen de resuspensión. Este es el volumen sobre el que se basa el recuento celular. 21. Realice el recuento y calcule la cantidad total de células. 22. Calcule el rendimiento celular en células/ml de sangre entera utilizable.	17.3
23. Calcule el volumen final de resuspensión en CPS. Revise los cálculos.	17.4

Pasos (las cantidades para los volúmenes de muestra más pequeños están en <i>bastardilla</i>).	Referencia al SOP
24. Complete la impresión, el etiquetado y el control de calidad de los crioviales ANTES del centrifugado final.	17.5
25. Centrifugue a entre 200 y 400 x g durante 10 minutos, a una temperatura de entre 15 °C y 30 °C (el freno es opcional).	17.6
26. Retire suavemente el sobrenadante sin alterar el sedimento celular. 27. Resuspenda suavemente el sedimento en CPS fría (V_f) mientras agita el tubo para lograr una distribución uniforme. Se recomienda trabajar sobre hielo común. 28. Con cuidado, realice alícuotas de CPS-células.	17.7
29. Transfiera inmediatamente (<u>menos</u> de 10 minutos) todos los crioviales al equipo de congelación a velocidad controlada e inicie la congelación.	17.8
30. Después del período correspondiente, transfiera los crioviales al equipo de almacenamiento en el centro y envíelos dentro del período designado por la red.	18
31. Completar la Hoja de trabajo para procesamiento de PBMC según lo indicado por la red.	19.1

Apéndice G: Ejemplos de reactivos y suministros

Nota: Todos los reactivos se deben comprar estériles y se requiere el uso de técnicas asépticas.

Reactivo/suministro	Ejemplo(s)	Opcional/obligatorio
Tubos de separación de células con barrera de frita (CSTFB) prellenados con medio de gradiente de densidad de 1,077	<ul style="list-style-type: none"> • Sistema Accuspin™ • Histopaque®-1077 • Ficoll-Paque™ PLUS 	Opcional
CSTFB seco	<ul style="list-style-type: none"> • Tubos de separación Accuspin™ • Tubos de separación Leucosep® 	Opcional
Medios de gradiente de densidad de 1,077	<ul style="list-style-type: none"> • Ficoll-Paque PLUS y PREMIUM • Lymphoprep™ • Medios de separación de linfocitos: LSM™ 	Opcional
Dimetilsulfóxido (DMSO), grado de cultivo celular	<ul style="list-style-type: none"> • Hybrimax, Sigma-Aldrich n.º de cat. D2650, probado para endotoxina y probado para hibridoma 	Opcional
Suero bovino fetal (FBS)		<p>ACTG, IMPAACT y HPTN: Consulte la información sobre los lotes actuales validados por IQA.</p> <p>HVTN y MTN: Utilice los lotes validados por HVTN; si no puede acceder a los lotes especificados por HVTN o importarlos, consulte a HVTN/MTN para conocer otras opciones.</p>
Crioviales	<ul style="list-style-type: none"> • Vial criogénico de polipropileno de 2 ml con rosca externa Corning®, que se mantiene en pie por sí solo y tiene fondo redondo n.º 430659 • Tubos de polipropileno con rosca interna Nunc CryoTubes™ y tapa a rosca n.º 377267 • Viales criogénicos de plástico WHEATON Cryule®, con rosca externa, n.º 985742 • Microtubo con tapa a rosca SARSTEDT, con rosca externa n.º 72.694.006 	<p>Opcional</p> <p>Nota para el microtubo con tapa roscada SARSTEDT: el fabricante solo proporciona aprobación por escrito para el almacenamiento en frío hasta -86 °C, pero las Redes tienen datos históricos exhaustivos que validan la integridad mantenida mediante el uso estos tubos para la criopreservación de las PBMC. De este modo, estos tubos todavía están aprobados para la criopreservación de las PBMC.</p>
Etiquetas criogénicas	<ul style="list-style-type: none"> • Cryo-Tags® y Cryo-Babies® Brady B461 o B490 • Etiquetas de congelador Shamrock. 	Opcional
Marcadores	<ul style="list-style-type: none"> • Marcadores Fisherband* n.º 13-379 	Opcional

	<ul style="list-style-type: none">• Rotulador/marcador de laboratorio Nalgene® n.º 6310 y 6311	
--	--	--

Apéndice H: Historial de cambios de la Versión 5.0 a 6.0

Versión Fecha de entrada en vigencia (dd/mmm/aa)	Comentarios	
6.0 30 de abril de 2018	Aprobaciones	Grace Aldrovandi reemplazó a Bob Coombs para la autorización de ACTG. John Hural reemplazó a Constance Ducar para la autorización de HVTN. Edward Livant reemplazó a Charlene Dezzutti para la autorización de MTN.
	8.1.4	Solo se agregan los requisitos adicionales extraídos del memo del 7 de octubre de 2016 para los laboratorios de ACTG e IMPAACT. También se agregan requisitos adicionales relacionados con cryovial para todas las redes.
	18.2.1	Se agregan pautas adicionales relacionadas con las temperaturas de punto de ajuste de congelador.
	Apéndice D	Se cambió "La mayor parte de los glóbulos blancos..." por "La mayoría de los glóbulos blancos..."
	Apéndice G	Se agregó información adicional a la sección de Cryovial relacionada con el uso del microtubo con tapa roscada SARSTEDT.
5.2 22 de septiembre de 2014	5.1.3	Modificado de " El laboratorio puede usar la Hoja de trabajo para procesamiento de PBMC de HVTN o modificarla según corresponda para los procedimientos de ese laboratorio" a " El laboratorio puede usar la Hoja de trabajo para procesamiento de PBMC de HVTN , modificado para cumplir con requisitos de red correspondiente y apropiados para los procedimientos del laboratorio"
5.1 30 de julio de 2014	5.1.3	Directrices para el seguimiento de PBMC procesamiento gráfico-: Total número de celular: "(optional for HVTN)" fue agregado al lado R
	16.4.5	Nota fue omitido puesto que no no frita en los tubos cónicos haciendo superposición manual o arpillera
	16.4.6	Referencias para el método de superposición se cambió a 16.4.6.1 y el método de la arpillera para 16.4.6.2
	18.1	Se añadió directrices de almacenamiento en el tiempo para transferencia para HPTN, IMPAACT, and MTN.
	14, 18.1, 18.3, 18.3.1	Modificado a LN2/-150°C congelador mecánico a "contenedor LN2 o congelador mecánico de -150°C"
	18.3	Lenguaje simplificado a PBMCs almacenados en contenedor LN2 o congelador mecánico de -150°C y eliminado "más de 4 semanas".
	18.3.1-18.3.2	Modificado directriz de tiempo de transferencia de "Día siguiente de trabajo" a "dentro de las 72 horas"
	18.3.1	Modificado de "LN2 /-150°C" a "LN2 o -150°C"
	22, 24.2	La opción "RPMI" fue omitida.
	Apéndice E, F	Paso cambiado 1 SOP referencia de "11.3" a "11.2"
	Apéndice E	Paso cambiado 31 SOP referencia de "18 ou 19" a "18"
	Apéndice E	Paso cambiado 32 SOP referencia de "19.2" a "19.1"
	Apéndice E	Declaración de paso 32 modificado para "Completar la Hoja de trabajo de procesamiento de PBMC según lo indicado por la red".
	Apéndice F	9-12 pasos: cambió "16.1" a "17.1"
Apéndice F	13-18 pasos: cambió "16.2" a "17.2"	

5.1 30 de julio de 2014	Apéndice F	19-22 pasos: cambió "16.3" a "17.3"
	Apéndice E	Paso cambiado 30 SOP referencia de "18 ou 19" a "18"
	Apéndice E	Paso cambiado 31 SOP referencia de "19.2" a "19.1"
	Apéndice F	Declaración de paso 31 modificado para "Completar la Hoja de trabajo de procesamiento de PBMC según lo indicado por la red".
5.0 1 de mayo de 2014	Aprobaciones	Grace Aldrovandi reemplazó a Susan Fiscus en la autorización IMPAACT
	5.1.3	Pautas para llevar el registro del Gráfico de procesamiento PBMC: Instrucciones: "L = El LDMS requiere el registro en el LDMS" se cambió a "L = Campo requerido en el LDMS para la red de especímenes"
	5.1.3	Pautas para llevar el registro de la tabla de procesamiento PBMC: "Número de espécimen LDMS" se cambió por "Id. de espécimen global LDMS"
	5.1.3	Las celdas que se llenaron con Gris indican que la información no se necesita y cambian a negro.
	7.1.8	Añadido HPTN y MTN
	10.2	La alternativa para usar RMPI como un sustituto está omitida
	14	Cambios de formato
	18 y 19	Instrucciones para el almacenamiento temporal e in situ de dos secciones a una, Sección 18.
	19	Cómo completar el procesamiento del lenguaje de documentos, que fue repetido en la Sección 18 y Sección 19, está separado en su propia sección.
	Apéndice H	Borrado el historial de cambios de otra versión, manteniendo solo los cambios en la versión actual que son apropiados para este documento.