ชื่อเรื่อง:	SOP สำหรับการดำเนินการกับ PBMC แบบข้ามเครือข่าย v6.0		
วันที่จัดทำ:	1 เมษายน 2009	**จำนวนหน้าทั้งหมด:**	48
วันที่มีผลบังคับใช้:	30 เมษายน 2018	**หมายเลข** SOP	HANC-LAB-P0001 v6.0
เขียนโดย:	กลุ่มทำงานด้าน SOP สำหรับ PBMC แบบข้ามเครือข่าย	**ใช้แทน** SOP **ที่ลงวันที่:**	30 สิงหาคม 2014

	เครือ	**ชื่อ, ตำแหน่ง**	**ลายเซ็น**	**วันที่**
อนุมัติโดย (เครือข่าย):	ACTG / IMPAACT	Grace Aldrovandi, MD ผู้วิจัยหลักของห้องปฏิบัติการเครือข่าย ACTG / IMPAACT	Grace Aldrovandi Grace Aldrovandi (Apr 2, 2018)	4/2/2018
	HPTN	Estelle Piwowar-Manning, MT(ASCP)SI รองผู้อำนวยการห้องปฏิบัติการเครือข่ายของ HPTN	Estelle Piwowar-Manning Estelle M Piwowar-Manning (Mar 27, 2018)	3/27/2018
	HVTN	John Hural, PhD รองผู้อำนวยการ HVTN ด้านการดำเนินการห้องปฏิบัติการ		4/23/2018
	MTN	Edward Livant ผู้จัดการการวิจัยของห้องปฏิบัติการเครือข่าย MTN		3/26/2018

ประวัติการแก้ไข	สำหรับประวัติการแก้ไขฉบับสมบูรณ์ ดูภาคผนวก ซ

	ชื่อ, ตำแหน่ง	**ลายเซ็น**	**วันที่**
ตรวจสอบโดย (ห้องปฏิบัติการ):			

สารบัญ

1 วัตถุประสงค์ 3
2 ขอบเขต 3
3 ที่มา 3
4 อำนาจหน้าที่และความรับผิดชอบ 3
5 การรายงานผล 3
6 สิ่งส่งตรวจ 6
7 อุปกรณ์ 7
8 สิ่งที่ใช้แล้วทิ้ง 9
9 อุปกรณ์ป้องกันส่วนบุคคล 9
10 น้ำยา 10
11 การเตรียมสารทำปฏิกิริยา 12
12 การเทียบมาตรฐาน 13
13 การควบคุมคุณภาพ 14
14 บทนำและแนวทางสำหรับการดำเนินการกับ PBMC 15
15 การแยกเซลล์และการเจือจางเลือดด้วยหลอดสำหรับการแยกเซลล์ที่มีตัวกั้นแบบฟริต (CSTFB) โดยมีการแทนที่พลาสมา 16
16 การแยกเซลล์ด้วยการใส่เลือดครบส่วนเจือจางด้านบนตัวกลางสำหรับการทำเกรเดียนต์ของความหนาแน่นหรือการใส่ตัวกลางสำหรับการทำเกรเดียนต์ของความหนาแน่นด้านล่างเลือดครบส่วนเจือจางด้วยมือและการเจือจางเลือดด้วยการแยกเซลล์ด้วยมือโดยใช้เกรเดียนต์ของความหนาแน่นโดยมีการแทนที่พลาสมา 20
17 การล้าง การนับ การแขวนลอยใหม่ ความเข้มข้น และการแช่แข็งข้ามคืนที่มีอัตราการแช่แข็งที่ถูกควบคุม 24
18 การจัดเก็บ PBMC (เก็บชั่วคราวหรือเก็บประจำที่แหล่งศึกษา) 28
19 การจัดทำเอกสารที่ใช้ประกอบการดำเนินการให้เสร็จสมบูรณ์ 29
20 การคำนวณ 30
21 ข้อจำกัดของขั้นตอน 30
22 อภิธานศัพท์ 30
23 เอกสารอ้างอิง 31
24 เอกสารเพิ่มเติม (เพื่อเก็บรักษาโดยห้องปฏิบัติการ) 32
25 ภาคผนวก 32
ภาคผนวก ก: ตารางงานสำหรับการดำเนินการกับ PBMC *ของ* HVTN .....**Error! Bookmark not defined.**
ภาคผนวก ข: บันทึกการเปลี่ยน ไอโซโพรพานอลของ NALGENE® Mr. Frosty *ที่ให้ไว้เป็นตัวอย่าง* ... 37
ภาคผนวก ค: การแก้ปัญหา: การเก็บ PBMC *ในกรณีที่ไม่มีแถบ* PBMC *ที่ชัดเจนหลังจากการปั่นแยกเกรเดียนต์ของความหนาแน่น* 38
ภาคผนวก ง: การรวมชั้นบัฟฟี โค้ตสำหรับการแยก PBMC *ด้วยตัวกลางสำหรับการทำเกรเดียนต์ของความหนาแน่น* 40
ภาคผนวก จ: คู่มือฉบับย่อสำหรับ SOP *สำหรับ* PBMC—CSTFB 42
ภาคผนวก ฉ: คู่มือฉบับย่อสำหรับ SOP *สำหรับ* PBMC—*การใส่ด้านบนด้วยมือ* 43
ภาคผนวก ช: สารทำปฏิกิริยาและวัสดุภัณฑ์ที่ให้ไว้เป็นตัวอย่าง 45
ภาคผนวก ซ: ประวัติการแก้ไข จากเวอร์ชั่น 5.0 ไปเป็น 6.0 47

*นอกจากนี้ยังได้จัดให้มีภาคผนวก ก ในรูปแบบที่ดาวน์โหลดได้และแก้ไขได้บนเว็บไซต์สาธารณะของ HANC ที่ http://www.hanc.info/labs/labresources/procedures/Pages/pbmcSop.aspx

1 วัตถุประสงค์

1.1 กระบวนการดำเนินการมาตรฐาน (Standard Operating Procedure, SOP) นี้อธิบายขั้นตอนสำหรับการแยกและการเก็บรักษาด้วยการแช่แข็งสำหรับเซลล์เม็ดเลือดชนิดนิวเคลียสเดียว (Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMC) จากเลือดครบส่วน

2 ขอบเขต

2.1 ขั้นตอนนี้ใช้สำหรับการดำเนินการกับตัวอย่างเลือดเพื่อการแยก การเก็บรักษาด้วยการแช่แข็ง และการเก็บรักษาตัวอย่าง PBMC คำแนะนำที่จำเพาะต่อโครงการวิจัยของเครือข่ายจะใช้แทนคำแนะนำใน SOP นี้

3 ที่มา

3.1 PBMC ที่เก็บมาใหม่หรือที่เก็บรักษาด้วยการแช่แข็งจะถูกนำมาใช้เพื่อการประเมินการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในระดับเซลล์ที่ชักนำโดยวัคซีนหรือการรักษาด้วยยาต้านรีโทรไวรัส การเปลี่ยนแปลงในการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่เกี่ยวข้องกับ HIV และการฟื้นตัวของไวรัสที่สามารถจำลองตัวเองได้
(replication competent virus) การตรวจวิเคราะห์เหล่านี้จำเป็นต้องใช้ PBMC ที่ถูกแยกออกมาและเก็บรักษาด้วยการแช่แข็งภายใต้สภาวะที่กำหนดไว้อย่างเคร่งครัดซึ่งจะทำให้แน่ว่าจะมีการฟื้นตัว (recovery) ความมีชีวิต (viability) และความสามารถในการทำหน้าที่
(functionality) ที่เหมาะสมที่สุด การศึกษาเพื่อตรวจสอบความเที่ยงตรงบางการศึกษาบ่งบอกว่าเป็นการเหมาะสมที่สุดที่จะมีการดำเนินการเก็บเลือดและแช่แข็งเลือดภายใน 8 ชั่วโมงนับจากเวลาที่เจาะเลือดเพื่อรักษาการทำหน้าที่ของเซลล์ในการตรวจวิเคราะห์เพื่อเฝ้าติดตามภูมิคุ้มกันให้อยู่ในระดับสูงสุด

4 อำนาจหน้าที่และความรับผิดชอบ

4.1 ผู้อำนวยการห้องปฏิบัติการของเครือข่าย (หรือผู้ที่ได้รับมอบหมายจากบุคคลดังกล่าว) มีอำนาจหน้าที่ในการสร้าง ตรวจสอบ และปรับปรุงขั้นตอนนี้

4.2 สำนักงานประสานงานเครือข่าย HIV/AIDS (HIV/AIDS Network Coordination (HANC) Office) รับผิดชอบในการรักษาและควบคุมเอกสารเกี่ยวกับ SOP

4.3 ผู้อำนวยการห้องปฏิบัติการรับผิดชอบในการนำ SOP ของ HANC หรือ SOP ที่จำเพาะต่อห้องปฏิบัติการนี้ไปใช้งาน และในการดูให้แน่ใจว่าบุคลากรที่เหมาะสมทั้งหมดได้รับการฝึกอบรม SOP ทางห้องปฏิบัติการจะต้อง:

- รวมถึงส่วนต่างๆ ของ SOP สำหรับการดำเนินการกับ PBMC แบบข้ามเครือข่ายเวอร์ชั่นปัจจุบันที่ใช้ภายในห้องปฏิบัติการที่เกี่ยวข้องกับสถานที่วิจัยของเครือข่าย โดยไม่มีการปรับวิธีการ
- อ้างอิงเวอร์ชั่นปัจจุบันของ SOP สำหรับการดำเนินการกับ PBMC แบบข้ามเครือข่าย

หมายเหตุ: สำหรับห้องปฏิบัติการที่ดำเนินการกับ PBMC ของ HVTN ห้องปฏิบัติการดังกล่าวจะต้องใช้ SOP สำหรับ PBMC ของ HANC ตามที่เขียนไว้ หรือเวอร์ชั่นที่จำเพาะต่อ HVTN ของ SOP ของ HANC

4.4 เจ้าหน้าที่ทางเทคนิคทุกคนรับผิดชอบในการอ่านและทำความเข้าใจ SOP นี้ก่อนที่จะดำเนินการขั้นตอนที่อธิบายไว้

5 การรายงานผล

5.1 กำหนดให้มีการใช้ตารางงานสำหรับการดำเนินการกับ PBMC และระบบการจัดการข้อมูลทางห้องปฏิบัติการ (Laboratory Data Management
System, LDMS) สำหรับเครือข่ายทั้งหมดเพื่อติดตามเวลาของการดำเนินการ การคำนวณ และการบันทึกปัญหาที่เกิดขึ้นในระหว่างการดำเนินการ

5.1.1 ข้อกำหนดสำหรับเครือข่ายทั้งหมด:

- กรอกข้อมูลลงใน LDMS สำหรับการสร้างฉลากของหลอดหลอดสำหรับการแช่แข็ง เอกสารเกี่ยวกับสถานที่เก็บรักษา และข้อกำหนดรายการสิ่งที่ขนส่ง ดูรายละเอียดของข้อกำหนดในตารางด้านล่าง
- รายงานการเบี่ยงเบนตามระเบียบวิธีของโครงการวิจัยด้านห้องปฏิบัติการ

5.1.2 ข้อกำหนดสำหรับ HVTN

กำหนดให้มีการใช้ตารางงานสำหรับการดำเนินการกับ PBMC ของ HVTN ทั้งหมด หากตารางงานเกี่ยวกับ PBMC ที่จำเพาะต่อโครงการวิจัยไม่ได้ถูกกำหนดให้มีไว้ใน "คำแนะนำในการดำเนินการที่จำเพาะต่อโครงการวิจัยของ HVTN" อาจใช้ตารางงานทั่วไปในภาคผนวก ก และที่ http://www.hanc.info/labs/labresources/procedures/Pages/pbmcSop.aspx ได้

5.1.3 ข้อกำหนดสำหรับ ACTG, IMPAACT, HPTN และ MTN

- ห้องปฏิบัติการอาจใช้ HVTN PBMC ประมวลผลข้อมูล ปรับเปลี่ยนไปตามข้อกำหนดของเครือข่ายที่สอดคล้อง และเหมาะสมสำหรับกระบวนงานของห้องปฏิบัติการ ถ้าเลือกห้องปฏิบัติการเพื่อพัฒนาตัวเองแผ่นแปรรูป PBMC และติดตามเสริมวัสดุ (เช่น LDMS หรือแผ่นงานที่แยกต่างหาก หรือล็อก) ห้องปฏิบัติการจะใช้แนวทางด้านล่าง
- ตารางงานสำหรับการดำเนินการกับ PBMC ที่แก้ไขได้ และตัวอย่างของวัสดุในการติดตามเสริมในรูปแบบอิเล็กทรอนิกส์จัดไว้ที่ http://www.hanc.info/labs/labresources/procedures/Pages/pbmcSop.aspx เพื่อให้ดาวน์โหลดและนำไปปรับ

แนวทางสำหรับการติดตามการดำเนินการกับ PBMC		
หัวข้อ	**ข้อกำหนดเกี่ยวกับตารางงานสำหรับ** ACTG, HPTN, IMPAACT, MTN* (HVTN: กำหนดให้มีการใช้ตารางงานสำหรับการดำเนินการกับ PBMC ของ HVTN ทั้งหมด	**ข้อกำหนดเกี่ยวกับ** LDMS **สำหรับเครือข่ายทั้งหมด** **
ห้องปฏิบัติการที่ดำเนินการกับสิ่งส่งตรวจ	W	L
หมายเลขประจำตัวผู้เข้าร่วมโครงการ	W	L
หมายเลขการนัดตรวจ	W	L
โครงการวิจัย	W	L
ID สำหรับทั่วโลกของสิ่งส่งตรวจใน LDMS	W	[อัตโนมัติ]
วันที่/เวลาที่เริ่มการดำเนินการ	W	N
ดำเนินการโดย (เจ้าหน้าที่ทางเทคนิค)	W	N
วิธีการนับ (ชื่อของเครื่องมือหรือการนับด้วยมือ)	W	
WDR ในปริมาตรที่แขวนลอยใหม่เพื่อการนับ (V)	W	
ความเข้มข้นเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ (C)	W	
จำนวนเซลล์ทั้งหมด (T) = C x V	W	N (ไม่จำเป็นสำหรับ HVTN)
คำนวณปริมาตรที่แขวนลอยใหม่ของ CPS ขั้นสุดท้าย (V_f)	W	
วันที่และเวลาที่แช่แข็ง	W	N

แนวทางสำหรับการติดตามการดำเนินการกับ PBMC		
หัวข้อ	**ข้อกำหนดเกี่ยวกับตารางงานสำหรับ** ACTG, HPTN, IMPAACT, MTN* (HVTN: กำหนดให้มีการใช้ตารางงานสำหรับการดำเนินการกับ PBMC ของ HVTN ทั้งหมด	**ข้อกำหนดเกี่ยวกับ** LDMS **สำหรับเครือข่ายทั้งหมด** **
ความคิดเห็นและการเบี่ยงเบนไปจากระเบียบวิธีของโครงการวิจัยซึ่งรวมถึงแต่ไม่จำกัดอยู่เพียงแค่: • สภาวะของสิ่งส่งตรวจที่ไม่ได้คาดไว้ทั้งหมด • หากเลือดจับตัวเป็นลิ่ม จำนวนหลอดที่มีลิ่มเลือด จำนวนหลอดทั้งหมดจากชุด PTID และรายละเอียดของการดำเนินการกับเลือดที่จับตัวเป็นลิ่ม • เซลล์ที่ได้ที่ต่ำกว่าช่วงที่คาดไว้ • ความผิดปกติในการดำเนินการ • ขั้นตอนการแก้ปัญหาที่ดำเนินการ • บันทึกไว้หากเวลาทั้งหมด >8 ชั่วโมง	W	O
วันที่/เวลาที่เก็บ	S	L
สารทำปฏิกิริยา (บริษัทผู้ผลิต หมายเลขชุดที่ผลิต และวันหมดอายุสำหรับ DMSO, FBS, WDR, CSTFB, ตัวกลางสำหรับการทำเกรเดียนต์ของความหนาแน่น (density gradient media))	S	
CPS (ปริมาตรของ DMSO และ FBS)	S	
ชนิดของหลอดใส่ตัวอย่าง (NaHep/ACD/EDTA/อื่นๆ)	S	L
สภาวะของเลือด (เช่น SAT/HEM/CLT)	S	L
ปริมาตรของเลือดครบส่วนที่ใช้ได้	S	L (“ปริมาตร”)
จำนวนเซลล์	S	
จำนวนของเซลล์ที่แท้จริงต่อหลอด	S	L
จำนวนของหลอดสำหรับการแช่แข็งที่แช่แข็ง	S	L
ข้อมูลการเก็บรักษาด้วยตู้แช่แข็ง (โมดูลการเก็บรักษาของ LDMS)	O	N
การยืนยันว่ามีการตรวจสอบคุณภาพสารทำปฏิกิริยาด้วยสายตา (เจ้าหน้าที่ทางเทคนิค)	O	
เซลล์ที่ได้/มล. ของเลือดครบส่วน	O	
ปริมาตรที่แขวนลอยใหม่ของ CPS ที่ประมาณไว้ (V1)	O	
การยืนยันว่ามีการตรวจสอบคุณภาพฉลากของ LDMS ในส่วนของเนื้อหา/บาร์โค้ด (เจ้าหน้าที่ทางเทคนิค)	O	
การยืนยันว่ามีการขนย้ายหลอดสำหรับการแช่แข็งไปยังสถานที่เก็บกล่องสำหรับการเก็บรักษาที่กำหนดโดย LDMS (เจ้าหน้าที่ทางเทคนิค)	O	
วันที่/เวลาที่หลอดสำหรับการแช่แข็งถูกขนย้ายจากอุปกรณ์ทำความเย็นในอัตราช้าๆ ไปยังกล่องสำหรับการเก็บรักษา	O	
ผู้ตรวจสอบที่ดำเนินการตรวจสอบขั้นสุดท้าย/วันที่	O	

* W = กำหนดให้มีการติดตามในตารางงานสำหรับการดำเนินการกับ PBMC
S = กำหนดให้มีการติดตาม แต่อาจใช้วัสดุในการติดตามเสริม (เช่น LDMS หรือตารางงานหรือบันทึกอื่นๆ)
O = อาจทำการติดตามในตารางงาน หรืออาจใช้วัสดุในการติดตามเสริม

** L = ฟิลด์ที่ต้องระบุใน LDMS สำหรับสิ่งส่งตรวจในเครือข่าย
N = กำหนดให้มีการติดตามใน LDMS โดยเครือข่าย
O = อาจทำการติดตามใน LDMS

6 สิ่งส่งตรวจ

6.1 การเตรียมผู้ป่วย

ไม่มี

6.2 ชนิดของสิ่งส่งตรวจ

เลือดครบส่วนที่ใส่สารต้านการแข็งตัวของเลือดซึ่งเจาะใส่ในหลอดเก็บเลือด

6.3 ปริมาตรของสิ่งส่งตรวจที่เหมาะสมที่สุด/ขั้นต่ำ

ปริมาตรของเลือดที่กำหนดไว้ซึ่งกำหนดโดยโครงการวิจัย

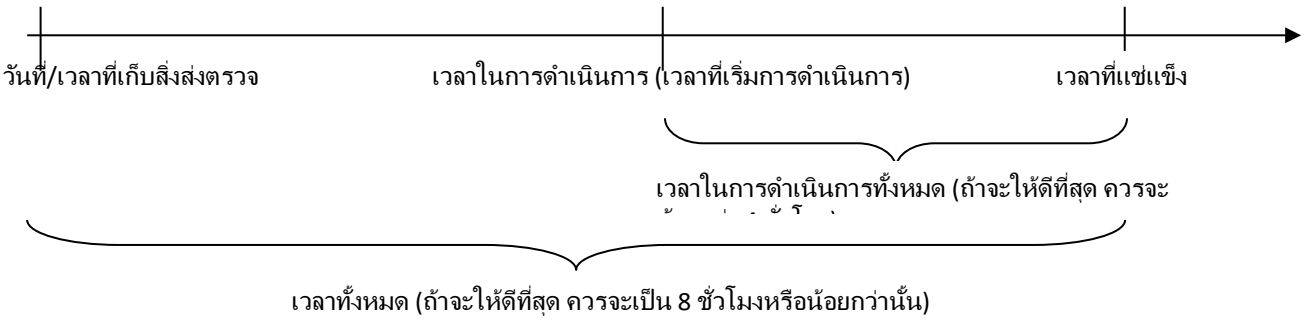
6.4 สภาวะในการจัดการ

6.4.1 ควรเก็บสิ่งส่งตรวจที่เป็นเลือดครบส่วนใหม่ที่ใส่สารต้านการแข็งตัวของเลือดไว้ที่อุณหภูมิห้อง (15 ถึง 30° ซ) ตั้งแต่เวลาที่เก็บจนถึงเมื่อมีการนำส่งไปยังห้องปฏิบัติการ/หน่วยดำเนินการ

6.4.2 ควรนำส่งสิ่งส่งตรวจที่เป็นเลือดครบส่วนใหม่ที่ใส่สารต้านการแข็งตัวของเลือดไปยังหน่วยดำเนินการของห้องปฏิบัติการให้เร็วที่สุดเท่าที่จะเป็นไปได้หลังจากที่เก็บเพื่อให้ห้องปฏิบัติการที่ดำเนินการมีเวลาเพียงพอในการดำเนินการขั้นตอนการเก็บรักษาด้วยการแช่แข็ง

6.4.3 หน่วยดำเนินการของห้องปฏิบัติการควรดำเนินการกับสิ่งส่งตรวจที่เป็นเลือดครบส่วนใหม่ที่ใส่สารต้านการแข็งตัวของเลือดให้เร็วที่สุดเท่าที่จะเป็นไปได้หลังจากที่ได้รับ:

- เวลาในการดำเนินการ (เวลาที่เริ่มการดำเนินการ) คือเวลาที่หลอดถูกเปิดหรือถูกใส่ในเครื่องปั่นแยกเป็นครั้งแรก โดยสิ่งใดเกิดขึ้นก่อนให้ถือตามสิ่งนั้น
- เวลาที่แช่แข็งถูกจำกัดความไว้ว่าคือเวลาที่:
  - StrataCooler® Cryo, NALGENE® Mr. Frosty หรือ biocision® CoolCell ถูกใส่ในตู้แช่แข็งที่มีอุณหภูมิ
    -80°ซ
  - โปรแกรมการทำความเย็นของตู้แช่แข็งที่มีอัตราการแช่แข็งที่ถูกควบคุม เช่น CryoMed® ได้เริ่มขึ้น
- เวลาทั้งหมดถูกคำนวณจากเวลาที่เก็บสิ่งส่งตรวจจนถึงเวลาที่แช่แข็ง ถ้าจะให้ดีที่สุด ควรจะเป็น 8 ชั่วโมงหรือน้อยกว่านั้น แต่สิ่งส่งตรวจทั้งหมดควรได้รับการดำเนินการโดยไม่คำนึงถึงเวลาทั้งหมด
- เวลาในการดำเนินการทั้งหมดถูกคำนวณจากเวลาในการดำเนินการจนถึงเวลาที่แช่แข็ง โดยขอแนะนำให้น้อยกว่าสี่ชั่วโมง



6.4.4 ห้ามนำเลือดครบส่วนแช่ตู้แช่เย็นหรือแช่แข็ง

6.5 สิ่งส่งตรวจรอง

บันทึกสภาวะของสิ่งส่งตรวจที่ไม่ได้คาดไว้ทั้งหมดและการปฏิบัติที่ได้ดำเนินการตามข้อกำหนดของเครือข่ายและห้องปฏิบัติการ ดูรายละเอียดในบทที่ 5

6.5.1 สิ่งส่งตรวจที่จับตัวเป็นลิ่ม

6.5.1.1 เลือดทั้งหมดควรได้รับการดำเนินการโดยไม่คำนึงว่ามีการจับตัวเป็นลิ่มหรือไม่ นอกจากโครงการวิจัยจะกำหนดไว้เป็นอย่างอื่น

6.5.1.2 นำลิ่มเลือดออกไปและดำเนินการตามปกติ

6.5.1.3 หากเซลล์ที่ได้ไม่เพียงพอตามความต้องการของโครงการวิจัย ขอให้ติดต่อคลินิกเพื่อขอสิ่งส่งตรวจทดแทนหากเป็นไปได้ สำหรับ HVTN หากเซลล์ที่ได้ ≤0.4 x 10^6 เซลล์/มล. ให้ติดต่อคลินิกเพื่อขอสิ่งส่งตรวจทดแทนหากเป็นไปได้

6.5.2 สิ่งส่งตรวจที่มีการแตกของเม็ดเลือดแดง

6.5.2.1 การแตกของเม็ดเลือดแดงอาจส่งผลกับคุณภาพของ PBMC

6.5.2.2 ดำเนินการตามปกติ

6.5.2.3 หากเซลล์ที่ได้ต่ำกว่าช่วงที่คาดไว้อย่างมีนัยสำคัญ ให้เก็บรักษา PBMC โดยใส่หมายเหตุอย่างเหมาะสมและติดต่อคลินิกเพื่อขอสิ่งส่งตรวจทดแทนหากเป็นไปได้ สำหรับ HVTN หากเซลล์ที่ได้ ≤0.4 x 10^6 เซลล์/มล. ให้ติดต่อคลินิกเพื่อขอสิ่งส่งตรวจทดแทนหากเป็นไปได้

6.6 สิ่งส่งตรวจที่ยอมรับไม่ได้

6.6.1 สิ่งส่งตรวจที่ไม่ติดฉลากหรือติดฉลากผิดจะถูกปฏิเสธ

6.6.2 สิ่งส่งตรวจที่รั่ว

แจ้งคลินิกหากมีการรั่วของสิ่งส่งตรวจใดๆ และตัดสินว่าสิ่งส่งตรวจดังกล่าวใช้ได้หรือไม่

7 อุปกรณ์

7.1 การเตรียมและการดำเนินการ

7.1.1 ตู้เพื่อความปลอดภัยทางชีวภาพ (biosafety cabinet, BSC) ประเภทที่ 2 ตามที่กำหนดโดยห้องปฏิบัติการ (P2, P2.5 หรือ P3)

7.1.2 เครื่องปั่นแยกที่มีความเร็วต่ำ (สามารถปั่นแยกที่ 300 ถึง 1000 x g) ที่มีโรเตอร์ที่มีถ้วยใส่หลอดแบบเหวี่ยงไปมา (swinging bucket rotor) ควรเป็นแบบมีระบบทำความเย็น แต่ที่ใช้อุณหภูมิโดยรอบก็ยอมรับได้

7.1.3 ไมโครปิเปต โดยมีช่วงตั้งแต่ 20, 200, 1000 μไมโครลิตร

7.1.4 อุปกรณ์ช่วยปิเปต (Pipet-Aid) (ควรเป็นแบบไร้สาย) สำหรับปิเปตทางซีรัมวิทยาแบบใช้แล้วทิ้ง

7.1.5 ตู้แช่เย็นที่มีอุณหภูมิระหว่าง 2 ถึง 8°ซ

7.1.6 ตู้แช่แข็งที่มีอุณหภูมิ -20°ซ (หรือต่ำกว่านั้น) ***ที่ไม่มี***การละลายน้ำแข็งอัตโนมัติ (สำหรับการเก็บรักษา FBS)

7.1.7 ตู้แช่แข็งที่มีอุณหภูมิ -80°ซ (-65 ถึง -95°ซ) สำหรับการเก็บรักษา PBMC ในระยะสั้น

7.1.8 ตู้แช่แข็งเชิงกลที่มีอุณหภูมิ -150°ซ (สำหรับ IMPAACT, HPTN และ MTN หากไม่มีถังแช่แข็ง LN2 สำหรับการเก็บรักษาในระยะยาว)

7.1.9 อ่างควบคุมอุณหภูมิที่มีอุณหภูมิระหว่าง 37 ถึง 56°ซ (สำหรับการทำให้ FBS หมดฤทธิ์ด้วยความร้อน หากจำเป็น)

7.1.10 ถังหรือบีกเกอร์สำหรับสารฟอกขาวหรือสารฆ่าเชื้ออื่นๆ สำหรับการล้างปิเปตหากกำหนดให้มีโดยหลักปฏิบัติเพื่อความปลอดภัยของท้องถิ่น

7.2 อุปกรณ์สำหรับไนโตรเจนเหลว (LN2) (หากกำหนดให้มีโดยเครือข่าย)

7.2.1 ถังเก็บรักษา LN2 (≤ -140°ซ)

7.2.2 อุปกรณ์ขนส่งแบบแห้งสำหรับ LN2 ที่ได้รับการอนุมัติจาก IATA

7.3 การนับเซลล์ (เลือกหนึ่งในทางเลือกต่อไปนี้)

7.3.1 เครื่องนับเซลล์อัตโนมัติที่สามารถนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (Beckman-Coulter Vi-Cell, Guava PCA® หรือสิ่งที่เทียบเท่ากัน)

หมายเหตุสำหรับ HVTN: วิธีการนับจะต้องได้รับการตรวจสอบและอนุมัติล่วงหน้าโดย HVTN

7.3.2 เครื่องนับเซลล์อัตโนมัติที่ไม่สามารถแยกแยะเซลล์ที่มีชีวิต (Coulter Counter, Abbott Cell-Dyn®, Sysmex® หรือสิ่งที่เทียบเท่ากัน)

หมายเหตุ: อาจใช้เครื่องนับเซลล์อัตโนมัติที่ไม่สามารถระบุเซลล์ที่มีชีวิตเพื่อหาจำนวนเซลล์ทั้งหมดโดยไม่มีการแยกแยะเซลล์ที่มีชีวิตก็ได้ ยกเว้นว่าตัวอย่างกำลังถูกเตรียมสำหรับโปรแกรมการทดสอบประสิทธิภาพของการเก็บรักษาด้วยการแช่แข็ง PBMC ของ IQA หากตัวอย่างกำลังถูกเตรียมสำหรับโปรแกรมการทดสอบประสิทธิภาพของการเก็บรักษาด้วยการแช่แข็ง PBMC ของ IQA จะต้องใช้สีทริแพนบลู (trypan blue) เพื่อให้ได้จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต

7.3.3 ช่องสำหรับนับเซลล์ด้วยมือ (ฮีมาไซโตมิเตอร์) และกล้องจุลทรรศน์ชนิดไลต์ฟิลด์

หมายเหตุ: หากช่องสำหรับนับเซลล์ด้วยมือถูกใช้ร่วมกับสีทริแพนบลู จะต้องนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตและใช้สำหรับการคำนวณเซลล์ หากใช้สีม่วงคริสตัลไวโอเล็ต สามารถใช้จำนวนเซลล์ทั้งหมดในการคำนวณเซลล์ได้ หากตัวอย่างกำลังถูกเตรียมสำหรับโปรแกรมการทดสอบประสิทธิภาพของการเก็บรักษาด้วยการแช่แข็ง PBMC ของ IQA จะต้องใช้สีทริแพนบลูเพื่อให้ได้จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต

7.4 การเก็บรักษาด้วยการแช่แข็ง

ใช้หนึ่งในทางเลือกต่อไปนี้ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต ถ้าจะให้ดี ควรจะเป็น Stratagene StrataCooler® และ bio cision® CoolCell

หมายเหตุ: หากไม่ปฏิบัติตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต จะต้องมีการดำเนินการศึกษาเพื่อตรวจสอบความเที่ยงตรง

7.4.1 Stratagene StrataCooler® Cryo

StrataCooler® Cryo จะต้องมีอุณหภูมิอยู่ที่ 2 ถึง 8°ซ ก่อนการเริ่มทำให้หลอดสำหรับการแช่แข็งเย็นลง ห้ามใส่หลอดสำหรับการแช่แข็งใน StrataCooler® Cryo ที่มีอุณหภูมิต่ำกว่าอุณหภูมิเริ่มต้นซึ่งเท่ากับ 2°ซ

7.4.2 biocision® CoolCell

ตรวจสอบให้แน่ใจว่าทุกส่วนของ CoolCell ซึ่งรวมถึงวงแหวนกลาง (central ring) กลับสู่อุณหภูมิห้องระหว่างการใช้งานแต่ละครั้ง

7.4.3 NALGENE® Mr. Frosty ภาชนะบรรจุสำหรับการแช่แข็งที่มีอัตราการแช่แข็ง 1°ซ/นาที

ควรเก็บ Mr. Frosty ไว้ที่อุณหภูมิโดยรอบ (15-30°ซ) ระหว่างการใช้งานแต่ละครั้ง

ระดับของไอโซโพรพานอลจะต้องถูกต้องและจะต้องมีการเปลี่ยนไอโซโพรพานอลทั้งหมดหลังจากรอบของการแช่แข็ง-
การละลายรอบที่ห้า จะต้องใช้บันทึกเพื่อติดตามรอบของการแช่แข็ง/การละลายและการเปลี่ยนแปลงของสารทำปฏิกิริยา ดูภาคผนวก ข

7.4.4 ตู้แช่แข็งที่มีอัตราการแช่แข็งที่มีการควบคุม เช่น ตู้แช่แข็ง CryoMed® Freezing Chamber (Gordinier)

8 สิ่งที่ใช้แล้วทิ้ง

8.1 พลาสติก

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

8.1.2 ปลายปิเปตเพื่อความแม่นยำขนาด 20, 100, 200, 1000 ไมโครลิตร μที่ปราศจากเชื้อ

8.1.3 หลอดสำหรับการปั่นแยกแบบใช้แล้วทิ้งขนาด 15 และ 50 มล. ปราศจากเชื้อ มีก้นรูปกรวย มีขีดแสดงปริมาณ และทำจากโพลีโพรพิลีน

8.1.4 หลอดสำหรับการแช่แข็งขนาด 1.8 ถึง 2 มล. มีฝาเกลียวที่มีวงแหวนรูปตัวโอซึ่งปราศจากเชื้อ ทำจากโพลีโพรพิลีนเท่านั้น วางตั้งได้ มีขีดบอกปริมาณ ป้องกันการรั่วไหลได้ ถูกผลิตขึ้นมาเพื่อการเก็บรักษาใน LN 2 ในเฟสที่เป็นไอระเหย (ประมาณ -140°ซ)

หมายเหตุ: มีเพียงแบรนด์ของหลอดสำหรับการแช่แข็งบางแบรนด์เท่านั้นที่เหมาะสำหรับการเก็บรักษาใน LN2 ในระยะยาว ดูตัวอย่างที่ตรงตามข้อกำหนดในภาคผนวก ช

หมายเหตุ: หากโครงการวิจัยกำหนดให้เก็บพลาสมา ควรใช้หลอดที่มีเกลียวอยู่ภายนอกสำหรับการเก็บรักษาพลาสมา

หมายเหตุ: อาจไม่ใช้หลอดสแนปแคป นอกจากนี้
ไม่ควรเติมสารลงในหลอดแช่แข็งเกินกว่าความจุที่ผู้ผลิตระบุไว้และไม่ถึงด้านบนของหลอด

หมายเหตุสำหรับ ACTG และ IMPAACT: อาจใช้หลอดแช่แข็งที่มีเกลียวด้านนอกเท่านั้น

8.1.5 อาจเลือกใช้ขวดรูปชมพู่ที่ปราศจากเชื้อแบบใช้แล้วทิ้งที่มีคอขนาด 45 มม. ขนาด 250 ถึง 500 มล. สำหรับการรวมเลือดครบส่วนที่เจาะมาในปริมาตรมากๆ ก่อนการแยก PBMC

8.1.6 อาจเลือกใช้ปิเปตสำหรับถ่ายสาร (transfer pipet) แบบพลาสติก ซึ่งปราศจากเชื้อ ขนาด 5 มล. ที่บรรจุอยู่ในซองแยก

8.1.7 หากไม่ใช้หลอดสำหรับการแยกเซลล์ที่มีตัวกั้นแบบฟริต (cell separation tubes with frit barriers, CSTFB) ซึ่งมีการเติมสารไว้ล่วงหน้า จะกำหนดให้มี CSTFB เปล่า (ดูรายละเอียดเพิ่มเติมในหัวข้อ 9.2) หรือหลอดสำหรับการปั่นแยกที่มีก้นรูปกรวยแบบใช้แล้วทิ้งขนาด 15 และ 50 มล. ดังในหัวข้อ 8.1.3 ดูตัวอย่างที่ตรงตามข้อกำหนดในภาคผนวก ช

8.2 ปากกาทำเครื่องหมาย

ปากกาทำเครื่องหมายสำหรับเขียนบนหลอดและหลอดสำหรับดำเนินการควรมีเส้นเล็กและมีหมึกที่แห้งเร็วซึ่งลบไม่ได้ (ดูตัวอย่างในภาคผนวก ช)

8.3 ฉลาก

ฉลากสำหรับการแช่แข็งที่เหมาะสำหรับอุณหภูมิ -
80°ซ และอุณหภูมิของ LN2 ดูตัวอย่างที่ตรงตามข้อกำหนดในภาคผนวก ช

9 อุปกรณ์ป้องกันส่วนบุคคล

กำหนดให้มีอุปกรณ์ป้องกันส่วนบุคคลที่เหมาะสำหรับการใช้กับจุลชีพก่อโรคที่มาทางเลือด ปฏิบัติตามแนวทางและหลักปฏิบัติของห้องปฏิบัติการของท้องถิ่นสำหรับการจัดการผลิตภัณฑ์เลือด

9.1 เสื้อคลุมสำหรับใส่ในห้องปฏิบัติการ

9.2 อุปกรณ์ป้องกันดวงตา

9.3 ถุงมือไนไตรล์ชนิดไม่มีผงแป้งหรือถุงมือที่เทียบเท่า

9.4 ถุงมือสำหรับการแช่แข็งและกระบังป้องกันใบหน้า (อาจมีแผ่นปิดคางหรือไม่ก็ได้) เป็นสิ่งจำเป็นหากท่านกำลังใช้ L N2

10 น้ำยา

10.1 กำหนดให้มีการจัดซื้อน้ำยาที่ปราศจากเชื้อและมีการใช้เทคนิคที่ปราศจากเชื้อ

10.1.1 เก็บรักษาหลอดที่เปิดแล้วไว้ที่อุณหภูมิที่แนะนำโดยบริษัทผู้ผลิตจนกว่าจะใช้หรือจนถึงวันหมดอายุที่บริษัทผู้ผลิตกำหนด

10.1.2 ทิ้งหากมีร่องรอยของการปนเปื้อนที่มองเห็นได้ เช่น มีลักษณะขุ่น

10.2 น้ำยาาสำหรับการล้างและการเจือจาง (Wash Diluent Reagents, WDR)

สารละลายเกลือแบบสมดุลของแฮงกส์ (Hanks' Balanced Salt Solution, HBSS*) ที่ไม่มีแคลเซียมหรือแมกนีเซียมแบบพร้อมใช้
*ทางเลือก: น้ำเกลือที่มีฟอสเฟตเป็นบัฟเฟอร์ (Phosphate-
Buffered Saline, PBS) 1X ที่ไม่มีแคลเซียมหรือแมกนีเซียมแบบพร้อมใช้

10.3 หลอดสำหรับการแยกเซลล์ที่มีตัวกั้นแบบฟริต (CSTFB)

หมายเหตุ: ห้องปฏิบัติการอาจใช้ CSTFB หรือสามารถใช้การใส่ด้านบน/การใส่ด้านล่างด้วยมือกับหลอดสำหรับการปั่นแยกที่มีกันรูปกรวยก็ได้

หมายเหตุ: หากใช้ CSTFB ให้ใช้บทที่ 15 หากใช้การใส่ด้านบนหรือการใส่ด้านล่างด้วยมือ (โดยไม่มีตัวกั้นแบบฟริต) ให้ใช้บทที่ 16

10.3.1 CSTFB ซึ่งมีการเติมสารไว้ล่วงหน้า (ตัวกลางสำหรับการทำเกรเดียนต์ของความหนาแน่น 1.077)

ความจุของหลอดที่กำหนดจะขึ้นกับปริมาตรของเลือดครบส่วน (ดูหัวข้อ 15.4) ดูตัวอย่าง CSTFB ซึ่งมีการเติมสารไว้ล่วงหน้าในภาคผนวก ช

สภาวะในการเก็บรักษา:

- เก็บรักษาในตู้แช่เย็น (2 ถึง 8°ซ)
- ปกป้องให้พ้นจากแสง
- ลักษณะขุ่นบ่งบอกถึงความเสื่อมของผลิตภัณฑ์
- ปล่อยให้ CSTFB อยู่ที่อุณหภูมิห้อง (15 ถึง 30°ซ) ก่อนการใช้

10.3.2 ทางเลือกสำหรับแทนระบบ CSTFB ซึ่งมีการเติมสารไว้ล่วงหน้า:

ใช้ CSTFB ที่แห้งร่วมกับตัวกลางสำหรับการทำเกรเดียนต์ของความหนาแน่น 1.077 ดูตัวอย่างที่ตรงตามข้อกำหนดในภาคผนวก ช

ความจุของหลอด (มล.)	ปริมาตรของตัวกลางสำหรับการทำเกรเดียนต์ของความหนาแน่น (มล.)
50 มล.	15 มล.
15 มล.	6 มล.

ปฏิบัติตามข้อแนะนำในการเก็บรักษาของบริษัทผู้ผลิตตัวกลางสำหรับการทำเกรเดียนต์ของความหนาแน่น

10.4 สารทำปฏิกิริยาสำหรับการแช่แข็ง

10.4.1 ซีรัมจากตัวอ่อนวัว (Fetal Bovine Serum, FBS) ถ้าจะให้ดี ควรจะทำให้หมดฤทธิ์ด้วยความร้อน

10.4.1.1 *ตรวจสอบกับเครือข่ายที่เกี่ยวข้องในเรื่องของผู้จำหน่ายที่ควรเลือก* FBS เพียงบางเครื่องหมายการค้าเท่านั้นที่เทียบเท่ากันได้ ปัญหาเกี่ยวกับการควบคุมคุณภาพ ความเป็นพิษ ที่มา และการขนส่ง/การนำเข้าจะต้องได้รับการจัดการแก้ไขก่อนการเปลี่ยนผู้จำหน่าย

10.4.1.2 ขอหนังสือรับรองการวิเคราะห์จากผู้จำหน่ายสำหรับเก็บไว้เป็นบันทึกการควบคุมคุณภาพของห้องปฏิบัติการของท้องถิ่น

หมายเหตุ: อาจจำเป็นต้องมีสำเนาหนังสือรับรองการวิเคราะห์ FBS เพื่อการส่งออก (หรือนำเข้า) PBMC ในรูปส่วนลงตัวระหว่างประเทศต่างๆ

10.4.1.3 FBS ที่เก็บรักษาแบบแช่แข็ง (≤ -20°ซ) สามารถใช้ได้จนถึงวันหมดอายุที่บริษัทผู้ผลิตกำหนด

10.4.1.4 FBS ที่ถูกละลายและเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 2 ถึง 8°ซ มีความคงตัวเป็นเวลาหนึ่งเดือนปฏิทิน

10.4.2 ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (Dimethylsulfoxide, DMSO) เกรดสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์

10.4.2.1 ตรวจสอบให้แน่ใจว่าได้ใช้ DMSO ในเกรดสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์ ดูตัวอย่างที่ตรงตามข้อกำหนดในภาคผนวก ช

10.4.2.2 เก็บรักษาหลอดที่ยังไม่ได้เปิดที่อุณหภูมิห้อง (15 ถึง 30°ซ) ตรวจสอบที่หลอดเพื่อดูวันหมดอายุและทิ้งหากหมดอายุแล้ว

10.4.2.3 หลังจากที่เปิดแล้ว DMSO ที่ยังไม่ได้เจือจางต้องมีความคงตัวที่อุณหภูมิห้อง (15 ถึง 30°ซ) เป็นเวลา 6 เดือน เมื่อได้รับการปกป้องให้พ้นจากแสงและความชื้น

10.4.2.4 ใช้เทคนิคที่ปราศจากเชื้อเมื่อนำ DMSO ออกจากหลอดเพื่อหลีกเลี่ยงการปนเปื้อนที่อาจเกิดขึ้นได้

10.4.2.5 ทิ้งหลอดที่เปิดแล้วหากสังเกตพบร่องรอยของการปนเปื้อนที่มองเห็นได้

10.4.2.6 อาจแบ่งส่วนสารทำปฏิกิริยาให้ได้เป็นปริมาณที่ลงตัวเท่ากันเพื่อช่วยคงความปราศจากเชื้อ ติดฉลากส่วนลงตัว
(aliquots) ด้วยคำว่า "DMSO" วันที่เปิด/วันที่แบ่งส่วน วันหมดอายุ (หกเดือนนับจากการเปิด) และชื่อย่อของเจ้าหน้าที่ทางเทคนิค ปกป้องส่วนลงตัวให้พ้นจากแสง

10.4.3 สารฆ่าเชื้อ

10.4.3.1 สารฆ่าเชื้อที่เป็นเอทานอล 70% โดยปริมาตร/ปริมาตร หลอดสเปรย์

10.4.3.2 สารฟอกขาว 10% โดยปริมาตร/ปริมาตร ถังหรือบีกเกอร์ และหลอดสเปรย์

10.4.3.3 สารฆ่าเชื้ออื่นๆ ตามที่ระบุไว้โดยนโยบายของห้องปฏิบัติการของท้องถิ่น

10.5 สารทำปฏิกิริยาสำหรับการนับเซลล์

ข้อกำหนดสำหรับสารทำปฏิกิริยาสำหรับการนับจะแตกต่างกันไปโดยขึ้นกับวิธีการที่ใช้ ดูคำแนะนำสำหรับวิธีการที่ใช้

10.5.1 สารละลายสีทริแพนบลู 0.4%

10.5.2 ***อาจเลือกใช้ได้:*** สามารถใช้สารละลายสีม่วงคริสตัลไวโอเล็ต 0.05% เพื่อย้อมสีนิวเคลียสของเซลล์ เพื่อที่ว่าจะได้สามารถระบุและนับเซลล์ที่มีนิวเคลียสเดียวโดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ได้ หากจำเป็นต้องดูความมีชีวิต สามารถทำการนับด้วยมือครั้งที่สองโดยใช้สีทริแพนบลูได้
สารละลายสีม่วงคริสตัลไวโอเล็ต 0.05% ประกอบด้วย:
สีม่วงคริสตัลไวโอเล็ต 0.05 กรัม
กรดอะซิติกบริสุทธิ์ (glacial acetic acid) 2 มล.

น้ำกลั่นหรือน้ำที่ปราศจากไอออน 98 มล.

11 การเตรียมสารทำปฏิกิริยา

11.1 FBS ที่ทำให้หมดฤทธิ์ด้วยความร้อน (Heat-Inactivated FBS, HI-FBS)

สามารถสั่งซื้อ HI-FBS จากบริษัทผู้ผลิต หรือสามารถสั่งซื้อ FBS จากบริษัทผู้ผลิต และทำให้หมดฤทธิ์ด้วยความร้อนในห้องปฏิบัติการ ปฏิบัติตามคำแนะนำเหล่านี้ในการละลาย การแบ่งส่วน และการใช้

11.1.1 นำ FBS ออกจากตู้แช่แข็ง

11.1.2 ถ้าจะให้ดี ควรจะละลายในตู้แช่เย็น (2 ถึง 8°ซ) หรือที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาหลายชั่วโมง ห้ามปล่อยให้ FBS อยู่ที่อุณหภูมิห้องนานกว่าที่จำเป็นในการดำเนินกระบวนการละลาย

11.1.3 ค่อยๆ หมุนหลอดเป็นวงกลมสองหรือสามครั้งในช่วงของการละลาย

11.1.4 หาก FBS ไม่ได้รับการทำให้หมดฤทธิ์โดยบริษัทผู้ผลิต ปฏิบัติตามคำแนะนำเพิ่มเติมเหล่านี้ หาก FBS ได้รับการทำให้หมดฤทธิ์โดยบริษัทผู้ผลิต ข้ามไปยังหัวข้อ 11.1.5

11.1.4.1 วาง FBS ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่มีอุณหภูมิ 56°ซ (55 ถึง 57°ซ) เฝ้าติดตามอุณหภูมิของอ่างควบคุมอุณหภูมิอย่างใส่ใจ **อุณหภูมิที่สูงกว่านี้สามารถทำให้ส่วนประกอบของ FBS เสื่อมสภาพได้**

11.1.4.2 ***หมายเหตุ:*** ระดับน้ำในอ่างควบคุมอุณหภูมิควรจะเลยระดับของ FBS ในหลอดแต่ไม่ถึงฝาของหลอด การเป็นเช่นนี้จะช่วยให้แน่ใจว่ามีการให้ความร้อน FBS อย่างเสมอกันและช่วยหลีกเลี่ยงการปนเปื้อน

11.1.4.3 เมื่ออ่างควบคุมอุณหภูมิมีอุณหภูมิกลับคืนมาที่ 56°ซ (55 ถึง57°ซ) ให้ความร้อนแก่ FBS เป็นเวลา 30 นาที และทำการผสมให้เข้ากันทุก 5 ถึง 10 นาที **การให้ความร้อนเป็นระยะเวลานานกว่านี้สามารถทำให้ส่วนประกอบของ FBS เสื่อมสภาพได้**

11.1.4.4 ***หมายเหตุ:*** หากด้านบนของหลอดสัมผัสกับอ่างควบคุมอุณหภูมิ ให้เช็ดที่ด้านบนของหลอดด้วยเอทานอล 70% โดยปริมาตร/ปริมาตร ก่อนเปิด

11.1.5 ผสม HI-FBS ให้เข้ากันอย่างเบาๆ แต่ทั่วถึงโดยใช้เทคนิคที่ปราศจากเชื้อ

11.1.6 แบ่งส่วนลงในหลอดสำหรับการปั่นแยกที่มีก้นรูปกรวยขนาด 50 มล. ที่ติดฉลากไว้ซึ่งปราศจากเชื้อ หรือแบ่งเป็นส่วนลงตัวอื่นๆ ที่เหมาะสมสำหรับงานที่คาดไว้

หมายเหตุ: ฉลากควรระบุหลอดเหล่านี้ว่าเป็น "HI-FBS" และรวมถึงหมายเลขชุดที่ผลิต วันที่แบ่งส่วน วันหมดอายุ และชื่อย่อของเจ้าหน้าที่ทางเทคนิค FBS มีความคงตัวเป็นเวลา 1 เดือนที่อุณหภูมิ 2 ถึง 8°ซ หรือจนถึงวันหมดอายุเดิมที่บริษัทผู้ผลิตกำหนดที่อุณหภูมิ -20°ซ

11.1.7 แช่เย็น (2 ถึง 8°ซ) หลอดสำหรับส่วนที่มีปริมาณลงตัวในจำนวนที่จำเป็นสำหรับงานที่คาดไว้ ผสมให้เข้ากันดีก่อนใช้ สามารถเก็บหลอดสำหรับส่วนที่มีปริมาณลงตัวซึ่งยังไม่จำเป็นต้องใช้ในทันทีไว้ในตู้แช่แข็ง และจะมีความคงตัวจนถึงวันหมดอายุเดิมที่บริษัทผู้ผลิตกำหนด

หมายเหตุ: รอบของการแช่แข็ง/การละลายที่ดำเนินการซ้ำๆ จะมีผลเสียต่อคุณภาพของ FBS ห้ามแช่แข็งส่วนลงตัวซึ่งได้ถูกเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิของตู้แช่เย็น

11.1.8 ในการใช้ส่วนลงตัวที่แช่แข็งไว้ ถ้าจะให้ดี ควรจะละลายในตู้แช่เย็นข้ามคืน หรือที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาหลายชั่วโมง เปลี่ยนวันหมดอายุเป็นหนึ่งเดือน ผสมให้เข้ากันดีก่อนใช้

11.2 สารละลายสำหรับการเก็บรักษาด้วยการแช่แข็ง (Cryopreservation Solution, CPS) ใหม่

11.2.1

ส่วนประกอบ	เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร/ปริมาตร)
DMSO	10%
FBS (ที่ทำให้หมดฤทธิ์ด้วยความร้อน)	90%

11.2.2 การเตรียม CPS

ใช้ภาชนะบรรจุขนาด 15 มล. หรือ 50 มล. แบบใช้แล้วทิ้งที่ปราศจากเชื้อเพื่อเตรียม CPS การผสม DMSO และ FBS เป็นปฏิกิริยาคายความร้อน จะต้องเตรียม CPS ไว้ล่วงหน้าและทำให้เย็นในตู้แช่เย็น (2 ถึง 8°ซ) เป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาทีหรือในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลาอย่างน้อย 15 นาทีก่อนการใช้

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

11.2.3 ใช้สูตรด้านล่างในการประมาณปริมาตรของ CPS เพื่อเตรียมสำหรับการแขวนลอยใหม่ของ PBMC นอกจากนี้ยังมีการแสดงตัวอย่างไว้

เลือดครบส่วนที่ใช้ได้ (มล.) x *เซลล์ที่ได้ (เซลล์/มล.)* x *ความเข้มข้นของการแช่แข็ง (มล./เซลล์)* = CPS *ที่ประมาณไว้ (มล.)*
ปัดขึ้นให้เป็นค่ามล. เต็มที่ใกล้ที่สุด

หมายเหตุ: ปริมาตรของเลือดครบส่วนที่ใช้ได้คือปริมาตรของเลือดครบส่วนที่ถูกดำเนินการจริง (ปริมาตรของเลือดครบส่วนที่ใช้ได้อาจไม่เท่ากับความจุของหลอด)

ตัวอย่าง: เลือดจากผู้ใหญ่—การเก็บเลือดในปริมาตรมาก

เลือดครบส่วนที่ใช้ได้ x	**เซลล์ที่ได้** x	**ความเข้มข้นของการแช่แข็ง** =	CPS **ที่ประมาณไว้ที่จะเตรียม**
(140 มล.) x	(1.5 x 10^6 เซลล์/1 มล.) x	(1 มล./15 x 10^6 เซลล์) =	14 มล.

ตัวอย่าง: เลือดจากวัยรุ่น/จากเด็ก—การเก็บเลือดในปริมาตรน้อย

เลือดครบส่วนที่ใช้ได้ x	**เซลล์ที่ได้** x	**ความเข้มข้นของการแช่แข็ง** =	CPS **ที่ประมาณไว้ที่จะเตรียม**
(10 มล.) x	(1.5 x 10^6 เซลล์/1 มล.) x	(0.5 มล./5 x 10^6 เซลล์) =	1.5 มล.

11.2.4 ใช้สูตรต่อไปนี้ในการคำนวณปริมาณของ DMSO และ FBS ที่จำเป็นต้องใช้

CPS = DMSO *1 ส่วน+* FBS *9 ส่วน*

ตัวอย่าง:

ปริมาตรของ CPS **ที่ประมาณไว้**	**ปริมาตรของ** DMSO = **(.1)(ปริมาตรของ** CPS)	**ปริมาตรของ** HI-FBS = **ปริมาตรของ** CPS – **ปริมาตรของ** DMSO	**ปริมาตรของ** CPS **ทั้งหมด = ปริมาตรของ** DMSO **+ ปริมาตรของ** FBS
9 มล.	0.9 มล.	8.1 มล.	9 มล.

11.2.5 บันทึกปริมาตรของ CPS, DMSO และ FBS ตามข้อกำหนดของเครือข่ายและห้องปฏิบัติการ ดูรายละเอียดในบทที่ 5

12 การเทียบมาตรฐาน

12.1 ไม่กำหนดให้มีการเทียบมาตรฐานสำหรับขั้นตอนการดำเนินการต่างๆ

12.2 ปฏิบัติตามขั้นตอนการเทียบมาตรฐานของห้องปฏิบัติการที่เกี่ยวข้องหากใช้เครื่องนับเซลล์อัตโนมัติ

13 การควบคุมคุณภาพ

13.1 เซลล์ที่ได้

เซลล์ที่ได้ค่อนข้างสม่ำเสมอกันภายในประชากรที่มีสุขภาพดี ประชากรทารกโดยทั่วไปจะให้ลิมโฟไซต์ที่ได้สูงกว่าประชากรผู้ใหญ่ ในทำนองเดียวกัน ผู้ป่วยที่เป็นโรคเอดส์หรือโรคติดเชื้อ HIV ขั้นลุกลามอาจมีจำนวนลิมโฟไซต์น้อย เป็นสิ่งสำคัญที่จะต้องตระหนักถึงการเก็บที่คาดไว้สำหรับประชากรของผู้เข้าร่วมโครงการซึ่งมีการดำเนินการให้อยู่ เมื่อพิจารณาตามลักษณะที่เป็นเช่นนี้ เซลล์ที่ได้จึงสามารถทำหน้าที่เป็นเครื่องหมายการควบคุมคุณภาพภายในสำหรับการดำเนินการแต่ละครั้ง เซลล์ที่ได้ที่อยู่นอกช่วงที่คาดไว้อาจบ่งบอกถึงความผิดพลาดของขั้นตอน การเสื่อมของสารทำปฏิกิริยา ความผิดพลาดในการนับเซลล์ หรือความผิดพลาดในการคำนวณ ข้อแนะนำที่ให้ไว้ด้านล่างมุ่งหมายให้เป็นแนวทางเพื่อช่วยระบุความผิดพลาดทางเทคนิคอย่างร้ายแรงก่อนการเก็บรักษาด้วยการแช่แข็ง ค่าเหล่านี้อาจแตกต่างกันไปโดยขึ้นกับสารต้านการแข็งตัวของเลือดที่ใช้

13.1.1 เซลล์ที่ได้ที่คาดไว้สำหรับประชากรที่มีสุขภาพดี:

ประชากร	ช่วงเซลล์ที่ได้ชนิดนิวเคลียสเดียว (เซลล์/มล.)
ผู้ใหญ่	(0.8 to 3.2) x 10^6
เด็ก—น้อยกว่า 6 เดือน	(3 to 10) x 10^6
เด็ก—6 เดือนถึง 2 ปี	(2 to 9) x 10^6
เด็ก—2 ถึง 5 ปี	(1 to 6) x 10^6
เด็ก—มากกว่า 5 ปี	(0.8 to 4) x 10^6
เด็ก—ไม่ทราบอายุ	(1 to 10) x 10^6

13.1.2 เซลล์ที่ได้ที่ไม่ได้คาดไว้

หากเซลล์ที่ได้อยู่นอกช่วงที่คาดไว้ ตรวจสอบแผนการเจือจาง การคำนวณ เทคนิคในการดำเนินการ (โดยเฉพาะอย่างยิ่งการผสมสารแขวนลอยสำหรับการนับเซลล์อย่างเพียงพอ) และประวัติของ PTID หากมี เพื่อหาสาเหตุที่เป็นไปได้ เซลล์ที่ได้จากผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HIV อาจต่ำกว่าที่แสดงในตารางข้างต้น หากสงสัยว่ามีความผิดพลาดในการเจือจางเซลล์หรือการนับเซลล์ ทำการเจือจางใหม่และนับใหม่อีกครั้ง

13.1.3 บันทึกผลทั้งหมดและปัญหาใดๆ ที่เกิดขึ้นในระหว่างการดำเนินการและการปฏิบัติตามข้อกำหนดของเครือข่ายและห้องปฏิบัติการ ดูรายละเอียดในบทที่ 5

หมายเหตุสำหรับ HVTN: บันทึกปัญหาและการปฏิบัติใดๆ ลงในตารางงานสำหรับการดำเนินการกับ PBMC ของ HVTN และในส่วนของความคิดเห็นเกี่ยวกับเซลล์ที่ได้ของโปรแกรม Atlas HVTN PBMC

13.2 ความมีชีวิตของเซลล์

ความมีชีวิตของเซลล์ของ PBMC ใหม่ค่อนข้างสม่ำเสมอกัน เวลาในการดำเนินการที่นาน เทคนิคที่ไม่ดี และในบางครั้งสิ่งส่งตรวจของผู้เข้าร่วมโครงการที่จำเพาะอันหนึ่งอันใดอาจส่งผลเสียต่อความมีชีวิต หากนับเซลล์ที่มีชีวิต คำนวณและบันทึก % เซลล์ที่มีชีวิตตามข้อกำหนดของห้องปฏิบัติการ

13.2.1 ความมีชีวิตของเซลล์ PBMC ที่แยกใหม่ควร >95%

13.2.2 หากความมีชีวิตของ PBMC ใหม่ <95% ตรวจสอบผลร่วมกับหัวหน้างานและบันทึกตามข้อกำหนดของเครือข่ายและห้องปฏิบัติการ ดูรายละเอียดในบทที่ 5

หมายเหตุ: หากตัวอย่างกำลังถูกเตรียมสำหรับโปรแกรมการทดสอบประสิทธิภาพของการเก็บรักษาด้วยการแช่แข็ง PBMC ของ IQA กำหนดให้มีจำนวนของเซลล์ที่มีชีวิต

14 บทนำและแนวทางสำหรับการดำเนินการกับ PBMC

มีหลักการและขั้นตอนมาตรฐานที่มีอยู่ในขั้นตอนการดำเนินการกับ PBMC ทั้งหมด มีความแตกต่างกันในเรื่องของตัวเลือกของเทคนิคในการแยก (CSTFB ซึ่งมีการเติมสารไว้ล่วงหน้าเปรียบเทียบกับการใส่ด้านบนด้วยมือ) การดำเนินการกับเลือด (การเจือจางโดยมีหรือโดยไม่มีการแทนที่พลาสมาเปรียบเทียบกับการเก็บพลาสมาโดยตรง) ความเข้มข้นของเซลล์ชั้นสุดท้าย และการแช่แข็ง/การเก็บรักษา เลือกส่วนของขั้นตอนที่เหมาะสมสำหรับการแยกเซลล์และการดำเนินการกับเลือด และการแช่แข็งและการเก็บรักษาตามข้อกำหนดของเครือข่ายและโครงการวิจัย

บทที่เกี่ยวกับการดำเนินการกับ PBMC	**การใช้สำหรับเครือข่ายเหล่านี้**
การแยกเซลล์และการดำเนินการกับเลือด	
บทที่ 15: การแยกเซลล์และการเจือจางเลือดโดยมีการแทนที่พลาสมาด้วยหลอดสำหรับการแยกเซลล์ที่มีตัวกั้นแบบฟริต (CSTFB) **หรือ** บทที่ 16: การแยกเซลล์ด้วยการใส่เลือดครบส่วนจือจางด้านบนตัวกลางสำหรับการทำเกรเดียนต์ของความหนาแน่นหรือการใส่ตัวกลางสำหรับการทำเกรเดียนต์ของความหนาแน่นด้านล่างเลือดครบส่วนเจือจางด้วยมือและการเจือจางเลือดโดยมีการแทนที่พลาสมาด้วยการแยกเซลล์ด้วยมือโดยใช้เกรเดียนต์ของความหนาแน่น	สามารถถูกนำไปใช้สำหรับเครือข่ายทั้งหมด ตรวจสอบข้อกำหนดของโครงการวิจัยและวัสดุที่มี สามารถถูกนำไปใช้สำหรับเครือข่ายทั้งหมด ตรวจสอบข้อกำหนดของโครงการวิจัยและวัสดุที่มี
การล้าง การนับ การแขวนลอยใหม่ ความเข้มข้น และการแช่แข็งข้ามคืนที่มีอัตราการแช่แข็งที่ถูกควบคุม	
บทที่ 17:	เครือข่ายทั้งหมด
การเก็บรักษาที่ศูนย์วิจัย	
บทที่ 18.2: การเก็บรักษาชั่วคราวที่ศูนย์วิจัยที่อุณหภูมิ -70/-80°ซ **หรือ** บทที่ 18.3: การเก็บรักษาที่ศูนย์วิจัยในถังไนโตรเจนเหลว (LN2 dewar) หรือตู้แช่แข็งเชิงกล (Mechanical Freezer) ที่มีอุณหภูมิ -150°ซ	ACTG และ HVTN IMPAACT, HPTN และ MTN

15 การแยกเซลล์และการเจือจางเลือดด้วยหลอดสำหรับการแยกเซลล์ที่มีตัวกั้นแบบฟริต (CSTFB) โดยมีการแทนที่พลาสมา

<u>บทที่ 15 สามารถถูกนำไปใช้สำหรับเครือข่ายทั้งหมด ตรวจสอบข้อกำหนดของโครงการวิจัยและวัสดุที่มี สำหรับตัวอย่างที่ให้มาใดๆ ให้ใช้บทที่ 15 หรือบทที่ 16 บทใดบทหนึ่ง แต่ไม่ใช่ทั้งสองบท</u>

15.1 การแยกลิมโฟไซต์จากเลือดโดยใช้หลอดสำหรับการแยก CSTFB ซึ่งมีการเติมสารไว้ล่วงหน้า

15.1.1 ทำการปิเปตและการผสมทั้งหมดในตู้เพื่อความปลอดภัยทางชีวภาพ (biological safety cabinet, BSC) ระดับที่ 2 หรือสูงกว่านั้น

15.1.2 สเปรย์พื้นผิว ชั้นวาง และหลอดสารทำปฏิกิริยาทั้งหมดด้วยเอทานอล 70% โดยปริมาตร/ปริมาตร หรือสารฆ่าเชื้อโรคที่เทียบเท่ากันก่อนการเข้าและการใช้ BSC

15.1.3 นอกจากจะมีการหมายเหตุไว้เป็นอย่างอื่น ขั้นตอนจะถูกดำเนินการที่อุณหภูมิห้อง (15 ถึง 30°ซ)

15.1.4 ใช้ปิเปตใหม่สำหรับหมายเลขประจำตัวผู้เข้าร่วมโครงการ (participant identification number, PTID) แต่ละหมายเลข และสารเติมแต่ง

15.2 เตรียมตัวอย่างเลือดครบส่วน สารทำปฏิกิริยา และวัสดุภัณฑ์

15.2.1 เตรียมและทำให้ CPS เย็น (ดูบทที่ 11 การเตรียมสารทำปฏิกิริยา) ก่อนที่จะดำเนินการหรือก่อนที่จะผสมกับ PBMC โดยให้มีระยะเวลาก่อนการผสมที่มากเพียงพอ

15.2.2 ดูแลให้แน่ใจว่าหลอดอยู่ที่อุณหภูมิห้องก่อนการดำเนินการ

15.2.3 ก่อนการเติมเลือด ตรวจสอบ CSTFB ด้วยสายตาว่ามีของเหลวอยู่เหนือฟริตหรือไม่ หากมีของเหลวอยู่เหนือฟริต ปั่นแยก CSTFB ที่
1000 x g เป็นเวลา 30 วินาที หากยังมีสารละลายที่มีเกรเดียนต์ของความหนาแน่นใดๆ อยู่เหนือฟริตหลังจากการปั่นแยก ควรดูดออก

15.2.4 ตรวจสอบ PTID บนหลอดเลือดที่ได้รับทุกหลอดอย่างรอบคอบ จัดหลอดปฐมภูมิในลักษณะที่ไม่ให้มีโอกาสผสมกันของหลอดระหว่าง PTID หรือระหว่างสารต้านการแข็งตัวของเลือดภายในชุด PTID ชุดหนึ่ง

ข้อเสนอแนะ: วางหลอดทั้งหมดสำหรับ PTID/สารต้านการแข็งตัวของเลือดแต่ละหมายเลขหรือแต่ละสารในชั้นวางเดียว สามารถใช้ชั้นวางที่แตกต่างกันในการแยก PTID หรือชนิดของหลอด และสามารถใช้สีของปากกาทำเครื่องหมายที่แตกต่างกันสำหรับ PTID แต่ละหมายเลขเพื่อหลีกเลี่ยงความสับสน

15.2.5 หาและบันทึกการวัดที่ถูกต้องของปริมาตรของเลือดครบส่วนที่ใช้ได้ภายใน 0.5 มล ปริมาตรของเลือดครบส่วนที่ใช้ได้ไม่จำเป็นต้องเท่ากับขนาดของหลอด

15.3 การแทนที่พลาสมา

ดำเนินขั้นตอนการแทนที่พลาสมานี้ เฉพาะเมื่อกำหนดให้มีพลาสมาในรูปส่วนลงตัว ตามคำแนะนำของโครงการวิจัยเท่านั้น หากไม่กำหนดให้มีพลาสมาในรูปส่วนลงตัว ข้ามขั้นตอนนี้และไปที่ขั้นตอน 15.4

15.3.1 หลอดเก็บเลือดจาก PTID เดียวกัน และสารต้านการแข็งตัวของเลือดเดียวกันอาจถูกดำเนินการแยกกันหรือใส่รวมกันในหลอดสำหรับการปั่นแยกที่มีก้นรูปกรวยขนาด 50 มล. ก็ได้

15.3.2 ทำเครื่องหมายปริมาตรของเลือดครบส่วนตรงกับพื้นผิวด้านบนสุดของเลือด

15.3.3 ปั่นแยกเลือดครบส่วนที่ 200 ถึง 400 x g เป็นเวลา 10 นาที

15.3.4 ถ่ายพลาสมาไปยังหลอดสำหรับการปั่นแยกที่มีก้นรูปกรวยขนาด 15 หรือ 50 มล. ที่ติดฉลากไว้สำหรับการปั่นแยกครั้งที่สองเพื่อเอาเศษชิ้นส่วนเซลล์ใดๆ ออกไป

15.3.5 เติม WDR ในปริมาณที่เพียงพอ (ดูส่วนที่ 10.2) เพื่อทำให้เลือดกลับคืนมามีปริมาตรของเลือดครบส่วนเดิม ผสมเบาๆ และดำเนินการกับ PBMC ต่อไปที่ขั้นตอน 15.4

15.3.6 ดำเนินการกับพลาสมาให้เสร็จสิ้นด้วยการปั่นแยกพลาสมาที่เก็บมาที่ 800 ถึง 1200 x g เป็นเวลา 10 นาทีเพื่อให้ได้ PL2 ในรูปส่วนลงตัว หรือตามคำแนะนำที่จำเพาะต่อโครงการวิจัยเพื่อให้ได้อนุพันธ์ที่กำหนดสำหรับโครงการวิจัย ขั้นตอนนี้อาจถูกดำเนินการได้ในภายหลังเมื่อไม่ได้ใช้เครื่องปั่นแยกสำหรับการดำเนินการกับ PBMC

15.3.7 แบ่งส่วนพลาสมาที่ปั่นแล้วลงในหลอดสำหรับส่วนที่มีปริมาณลงตัวที่ติดฉลากไว้ตามที่ระบุไว้โดยโครงการวิจัยและทิ้งเศษชิ้นส่วนเซลล์ใดๆ ในหลอดพลาสมาที่ปั่นแล้ว

15.4 การเจือจางเลือดสำหรับการแยกด้วย CSTFB

หมายเหตุ: อัตราส่วนสูงสุดของเลือดต่อ WDR ควรเท่ากับประมาณ 2:1 ใช้หลอดขนาด 50 มล. หนึ่งหลอดสำหรับเลือดครบส่วน 10 ถึง 20 มล. แต่ละชุด (หรือหลอดขนาด 12 ถึง 14 มล. หนึ่งหลอดสำหรับเลือดครบส่วน 4 ถึง 5 มล. แต่ละชุด) ใช้ CSTFB มากเท่าที่จำเป็นเพื่อแจกจ่ายเลือดทั้งหมดสำหรับ PTID แต่ละหมายเลข

หมายเหตุ: ตัวกลางสำหรับการทำเกรเดียนต์ของความหนาแน่นเป็นพิษต่อเซลล์ ดังนั้นให้ดำเนินการอย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพในขั้นตอนการแยก

15.4.1 ทำฉลาก PTID ใส่ CSTFB แต่ละหลอด

15.4.2 หากหลอดๆ หนึ่งมีการจับตัวเป็นลิ่ม ดูส่วนที่ 6.5 (สิ่งส่งตรวจที่ยอมรับไม่ได้)

15.4.3 เติม WDR ลงใน CSTFB แต่ละหลอดโดยใช้ปิเปตที่ปราศจากเชื้อ:

ขนาดของ CSTFB **(มล.)**	**ปริมาตรโดยประมาณของ** WDR **(มล.)**
50	5
15	2

15.4.4 ผสมเลือดครบส่วนเบาๆ จากนั้นใช้ปิเปตที่ปราศจากเชื้อเพื่อถ่ายเลือดลงใน CSTFB ที่ติดฉลากไว้

ขนาดของ CSTFB **(มล.)**	**ปริมาตรโดยประมาณของ** WDR **(มล.)**
50	12 ถึง 22
15	4 ถึง 5

15.4.5 ****หมายเหตุ:*** ปริมาตรของเลือดที่ต่ำกว่านี้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อมีฮีมาโตคริตต่ำ อาจทำให้บัฟฟีโค้ต (buffy coat) ตกลงไปอยู่ใกล้ๆ กับ/อยู่บนฟริตทำให้เก็บเซลล์ได้ยาก ปริมาตรของเลือดที่สูงกว่านี้อาจนำไปสู่การมีส่วนประกอบที่ไม่สำคัญ/เศษชิ้นส่วนในสิ่งส่งตรวจมากขึ้น ดูปริมาตรของการเจาะเลือดที่ต่ำกว่านี้ได้ในแนวทางที่จำเพาะต่อโครงการวิจัย

15.4.6 ล้างหลอดของเลือดที่ใส่สารต้านการแข็งตัวของเลือดเดิมแต่ละหลอดด้วย WDR โดยใช้ปิเปตที่ปราศจากเชื้อ เติมปริมาตรที่ล้างลงใน
CSTFB โดยดูแลให้แน่ใจว่าไม่เกินขีดจำกัดของปริมาตรของหลอดทั้งหมด (WDR+เลือดครบส่วน)

ขนาดของ CSTFB **(มล.)**	**ขีดจำกัดของปริมาตรของหลอดทั้งหมด (มล.) (เลือดครบส่วน +**WDR)
50	30
15	7.5

15.4.7 ปิดฝา CSTFB อย่างระมัดระวัง

15.5 การปั่นแยกตามความหนาแน่นสำหรับ CSTFB และการเก็บ

15.5.1 จับหลอดในลักษณะตั้งขึ้นและค่อยๆ ขนย้ายหลอดไปยังเครื่องปั่นแยก ดูบทที่ 20 การคำนวณ เพื่อเปลี่ยน g ไปเป็น rpm สำหรับความยาวโรเตอร์ของท่าน

15.5.2 ปั่นแยกที่ 800 ถึง 1000 x g เป็นเวลา 15 นาทีที่อุณหภูมิ 15 ถึง 30°ซ โดยปิดเบรก

หมายเหตุ: การแยก PBMC อาจถูกปรับปรุงให้ดีขึ้นสำหรับสิ่งส่งตรวจบางอย่างได้ด้วยการปั่นแยกที่ 100 0 x g

หมายเหตุ: หากเปิดเบรกไว้ จะทำให้ชั้นแตก

15.5.3 เตรียมหลอดสำหรับการปั่นแยกที่มีก้นรูปกรวยที่ปราศจากเชื้อใหม่ในจำนวนเท่ากับ CSTFB ที่ใช้ในขั้นตอนการปั่นแยก

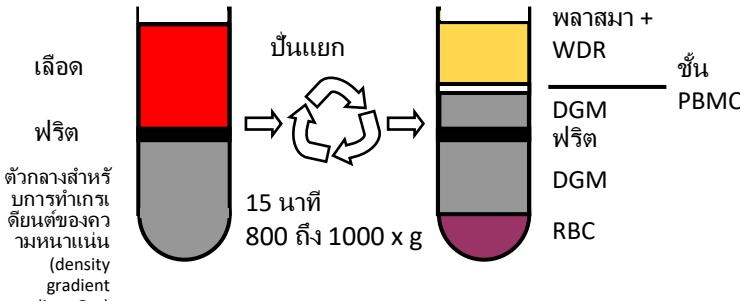
ขนาดของ CSTFB **(มล.)**	**ขนาดของหลอดสำหรับการปั่นแยกที่มีก้นรูปกรวย (มล.)**
50	50
15	15

15.5.4 ทำฉลาก PTID ใส่ CSTFB แต่ละหลอด ใช้หลอดใหม่เหล่านี้สำหรับการล้างต่อไปนี้

15.5.5 ค่อยๆ นำ CSTFB ออกจากเครื่องปั่นแยกเพื่อไม่ให้มีการรบกวนชั้นต่างๆ

15.5.6 การปั่นแยกทำให้สิ่งที่อยู่ในหลอดแบ่งตัวเป็นชั้นที่แตกต่างกันหกชั้น ซึ่งรวมถึงฟริตด้วย จากด้านบนของหลอด ชั้นเหล่านี้ได้แก่:

- พลาสมา + WDR
- ชั้น PBMC
- ตัวกลางสำหรับการทำเกรเดียนต์ของความหนาแน่น (density gradient media)
- ฟริต
- ตัวกลางสำหรับการทำเกรเดียนต์ของความหนาแน่น (density gradient media)
- เซลล์เม็ดเลือดแดง (red blood cells, RBC) ที่อัดแน่นและแกรนูโลไซต์



15.5.7 ตรวจสอบหลอดเพื่อดูว่ามีปัญหาที่อาจเกิดขึ้นได้ต่อไปนี้หรือไม่ บันทึกการสังเกตและการปฏิบัติเพื่อการติดตามผลใดๆ ที่ได้ดำเนินการตามข้อกำหนดของเครือข่ายและห้องปฏิบัติการ

- การแตกของเม็ดเลือดแดงในชั้นพลาสมา + WDR
- ลิ่มเลือดที่มองเห็นได้บนฟริตหลังจากการปั่นแยก
- ชั้น PBMC ที่ไม่ดีอันเนื่องมาจากความผิดพลาดในการปั่นแยก เช่น ความเร็ว เวลา หรือการเบรก ชั้น PBM C จะปรากฏเป็นชั้นเล็กๆ และไม่ชัดเจนในขณะที่ชั้นพลาสมา + WDR อาจขุ่นเล็กน้อย ดูการแก้ปัญหาในภาคผนวก ค
- ชั้น PBMC ที่เกิดขึ้นบนฟริตอันเนื่องมาจากจำนวน RBC หรือปริมาตรของฮีมาโตคริตที่ต่ำ

15.5.8 นำเอาส่วนของพลาสมา-
WDR ที่อยู่ด้านบนและมีสีค่อนข้างเหลืองออกจนถึงภายในประมาณ 1 ถึง 2 ซม. ของแถบ PBMC
สีขาวขุ่น ซึ่งอยู่ตรงรอยต่อระหว่างส่วนของพลาสมา-
WDR (สีค่อนข้างเหลือง) และสารละลายของตัวกลางสำหรับการแยกที่ใส
โดยใช้ปิเปตที่ปราศจากเชื้ออันใหม่ (ปิเปตทางซีรัมวิทยาหรือปิเปตสำหรับถ่ายสาร) สำหรับ PTID แต่ละหมายเลข ทิ้งส่วนของพลาสมา-WDR ตามนโยบายของห้องปฏิบัติการ

หมายเหตุ: ในอีกทางเลือกหนึ่ง อาจปล่อยส่วนของพลาสมา-
WDR ด้านบนไว้อย่างนั้น และอาจนำเอาแถบ PMBC
สีขาวขุ่นออกโดยการสอดปิเปตอย่างระมัดระวังผ่านชั้นด้านบนไปยังแถบ PBMC

15.5.9 เก็บเซลล์ทั้งหมดตรงรอยต่อสีขาวขุ่นที่อยู่เหนือฟริต โดยใช้ปิเปตทางซีรัมวิทยาหรือปิเปตสำหรับถ่ายสารที่ปราศจากเชื้อ ระวังไม่ให้ดูดสารละลายของตัวกลางสำหรับการแยกออกมามากเกินกว่าที่จำเป็น

15.5.10 ถ่ายเซลล์ที่เก็บมาจาก CSTFB หลอดหนึ่งไปยังหลอดสำหรับการปั่นแยกที่มีก้นรูปกรวยที่ปราศจากเชื้อที่ติดฉลากไว้ล่วงหน้าซึ่งเข้าคู่กันหนึ่งหลอด สามารถเติม WDR ลงในหลอดไว้ล่วงหน้าเพื่อประหยัดเวลา

ขนาดของ CSTFB **(มล.)**	**ขนาดของหลอดสำหรับการปั่นแยกที่มีก้นรูปกรวย (มล.)**	**ปริมาตรที่เติมไว้ล่วงหน้าของ** WDR **(มล.)**
50	50	25
15	15	5

15.5.11 ปิดฝา CSTFB ที่มีเซลล์เม็ดเลือดแดงและตัวกลางสำหรับการแยกที่เหลืออีกครั้ง ทิ้ง CSTFB โดยถือเป็นของเสียที่มีอันตรายทางชีวภาพโดยปฏิบัติตามนโยบายของห้องปฏิบัติการ

15.6 ตรวจสอบให้แน่ใจว่ามีการบันทึกข้อมูลที่เหมาะสมทั้งหมดตามข้อกำหนดของเครือข่ายและห้องปฏิบัติการ ดูรายละเอียดในบทที่ 5

ข้ามบทที่ 16 และไปที่บทที่ 17

16 การแยกเซลล์ด้วยการใส่เลือดครบส่วนเจือจางด้านบนตัวกลางสำหรับการทำเกรเดียนต์ของความหนาแน่นหรือการใส่ตัวกลางสำหรับการทำเกรเดียนต์ของความหนาแน่นด้านล่างเลือดครบส่วนเจือจางด้วยมือและการเจือจางเลือดด้วยการแยกเซลล์ด้วยมือโดยใช้เกรเดียนต์ของความหนาแน่นโดยมีการแทนที่พลาสมา

<u>บทที่ 16 สามารถถูกนำไปใช้สำหรับเครือข่ายทั้งหมด ตรวจสอบข้อกำหนดของโครงการวิจัยและวัสดุที่มี สำหรับตัวอย่างที่ให้มาใดๆ ให้ใช้บทที่ 15 หรือบทที่ 16 บทใดบทหนึ่ง แต่ไม่ใช่ทั้งสองบท</u>

16.1 การแยกลิมโฟไซต์จากเลือดโดยใช้วิธีการใส่ด้านบนตัวกลางสำหรับการทำเกรเดียนต์ของความหนาแน่นด้วยมือ

16.1.1 ทำการปิเปตและการผสมทั้งหมดในตู้เพื่อความปลอดภัยทางชีวภาพ (biological safety cabinet, BSC) ระดับที่ 2 หรือสูงกว่านั้น

16.1.2 สเปรย์พื้นผิว ชั้นวาง และหลอดสารทำปฏิกิริยาทั้งหมดด้วยเอทานอล 70% โดยปริมาตร/ปริมาตร ก่อนการเข้าและการใช้ BSC

16.1.3 นอกจากจะมีการหมายเหตุไว้เป็นอย่างอื่น ขั้นตอนจะถูกดำเนินการที่อุณหภูมิห้อง (15 ถึง 30°ซ)

16.1.4 ใช้ปิเปตใหม่สำหรับหมายเลขประจำตัวผู้เข้าร่วมโครงการ (participant identification number, PTID) แต่ละหมายเลข และสารเติมแต่ง

16.2 เตรียมตัวอย่างเลือดครบส่วน สารทำปฏิกิริยา และวัสดุภัณฑ์

16.2.1 เตรียมและทำให้ CPS เย็น (ดูบทที่ 11 การเตรียมสารทำปฏิกิริยา) ก่อนที่จะดำเนินการหรือก่อนที่จะผสมกับ PBMC โดยให้มีระยะเวลาก่อนการผสมที่มากเพียงพอ

16.2.2 หากหลอดของสิ่งส่งตรวจเย็นเมื่อสัมผัส (เนื่องจากสภาวะโดยรอบเย็น เช่น การขนส่งในเดือนที่อากาศเย็นกว่าเดือนอื่นๆ) ปล่อยให้หลอดกลับสู่อุณหภูมิห้อง (15 ถึง 30°ซ) ก่อนการดำเนินการ

16.2.3 ปล่อยให้ตัวกลางสำหรับการทำเกรเดียนต์ของความหนาแน่นกลับสู่ที่อุณหภูมิห้อง (15 ถึง 30°ซ) ดูข้อมูลเพิ่มเติมในบทที่ 10 สารทำปฏิกิริยา

16.2.4 ตรวจสอบ PTID บนหลอดเลือดที่ได้รับทุกหลอดอย่างรอบคอบ จัดหลอดปฐมภูมิในลักษณะที่ไม่ให้มีโอกาสผสมกันของหลอดระหว่าง PTID หรือระหว่างสารต้านการแข็งตัวของเลือดภายในชุด PTID ชุดหนึ่ง

ข้อเสนอแนะ: วางหลอดทั้งหมดสำหรับ PTID/สารต้านการแข็งตัวของเลือดแต่ละหมายเลขหรือแต่ละสารในชั้นวางเดียว สามารถใช้ชั้นวางที่แตกต่างกันในการแยก PTID หรือชนิดของหลอด และสามารถใช้สีของปากกาทำเครื่องหมายที่แตกต่างกันสำหรับ PTID แต่ละหมายเลขเพื่อหลีกเลี่ยงความสับสน

16.2.5 หาและบันทึกการวัดที่ถูกต้องของปริมาตรของเลือดครบส่วนที่ใช้ได้ภายใน 0.5 มล ปริมาตรของเลือดครบส่วนที่ใช้ได้ไม่จำเป็นต้องเท่ากับขนาดของหลอด

16.3 การแทนที่พลาสมา

ดำเนินขั้นตอนการแทนที่พลาสมานี้เฉพาะเมื่อกำหนดให้มีพลาสมาในรูปส่วนลงตัวตามคำแนะนำของโครงการวิจัยเท่านั้น หากไม่กำหนดให้มีพลาสมาในรูปส่วนลงตัว ข้ามขั้นตอนนี้และไปที่ขั้นตอน 16.4

16.3.1 หลอดเก็บเลือดอาจถูกดำเนินการแยกกันตามคำแนะนำที่ระบุไว้ด้านล่าง หรืออาจใช้เทคนิคการรวมบัฟฟีโค้ตที่แสดงไว้ในภาคผนวก ง

16.3.2 ทำเครื่องหมายปริมาตรของเลือดครบส่วนในแต่ละหลอดที่พื้นผิวด้านบนสุดของเลือด

16.3.3 ปั่นแยกเลือดครบส่วนที่ 200 ถึง 400 x g เป็นเวลา 10 นาที

16.3.4 ถ่ายพลาสมาไปยังหลอดสำหรับการปั่นแยกที่มีก้นรูปกรวยขนาด 15 หรือ 50 มล. สำหรับการปั่นแยกครั้งที่สองเพื่อเอาเศษชิ้นส่วนเซลล์ใดๆ ออกไป

16.3.5 เติม WDR ในปริมาณที่เพียงพอ (ดูส่วนที่ 10.2) เพื่อทำให้เลือดกลับคืนมามีปริมาตรของเลือดครบส่วนเดิม ผสมเบาๆ และดำเนินการกับ PBMC ต่อไปที่ขั้นตอน 16.4

16.3.6 ดำเนินการกับพลาสมาให้เสร็จสิ้นด้วยการปั่นแยกพลาสมาที่เก็บมาที่ 800 ถึง 1200 x g เป็นเวลา 10 นาทีเพื่อให้ได้ PL2 ในรูปส่วนลงตัว หรือตามคำแนะนำที่จำเพาะต่อโครงการวิจัยเพื่อให้ได้อนุพันธ์ที่กำหนดสำหรับโครงการวิจัย ขั้นตอนนี้อาจถูกดำเนินการได้ในภายหลังเมื่อไม่ได้ใช้เครื่องปั่นแยกสำหรับการดำเนินการกับ PBMC

16.3.7 แบ่งส่วนพลาสมาที่ปั่นแล้วลงในหลอดสำหรับส่วนที่มีปริมาณลงตัวที่ติดฉลากไว้ตามที่ระบุไว้โดยโครงการวิจัยและทิ้งเศษชิ้นส่วนเซลล์ใดๆ ในหลอดพลาสมาที่ปั่นแล้ว

16.4 การเจือจางเลือดและการแยกเซลล์ด้วยมือโดยใช้เกรเดียนต์ของความหนาแน่น

16.4.1 เปิดฝาหลอดของเลือดที่ใส่สารต้านการแข็งตัวของเลือด

16.4.2 หากหลอดมีเลือดที่จับตัวเป็นลิ่มเป็นจำนวนมาก ดูส่วนที่ 6.5 (สิ่งส่งตรวจรอง)

16.4.3 ***หมายเหตุ:*** สำหรับการเก็บเลือดในปริมาตรที่มากขึ้น อนุญาตให้มีการรวมบัฟฟีโค้ตได้ตามแนวทางในภาคผนวก ง: การรวมชั้นบัฟฟีโค้ตสำหรับการแยก PBMC ด้วยตัวกลางสำหรับการทำเกรเดียนต์ของความหนาแน่น ในการรวมบัฟฟีโค้ต แทนที่ขั้นตอน 16.4.4 และ 16.4.5 ด้วยคำแนะนำในภาคผนวก ง

16.4.4 ทำฉลาก PTID ใส่ หลอดสำหรับการปั่นแยกที่มีก้นรูปกรวยแต่ละหลอด

ขนาดของหลอดสำหรับการปั่นแยกที่มีก้นรูปกรวย (มล.)	**ปริมาตรของเลือดโดยประมาณ (มล.)***
50	12 ถึง 22
15	4 ถึง 5

16.4.5 ถ่ายเลือดไปยังหลอดสำหรับการปั่นแยกที่มีก้นรูปกรวยขนาด 15 หรือ 50 มล. ที่ติดฉลากไว้ซึ่งปราศจากเชื้อ และเติม WDR ในปริมาตรที่เพียงพอเพื่อเจือจางเลือดตามเอกสารกำกับตัวกลางสำหรับการทำเกรเดียนต์ของความหนาแน่น (อัตราส่วนสูงสุดของเลือดต่อสารทำเจือจางควรเป็น 2:1)

อาจเลือกทำได้: การเติม WDR และการผสมสามารถดำเนินการได้ในหลอดเลือดเดิมหากมีปริมาตรเพียงพอ

16.4.6 สำหรับการแยกเซลล์โดยใช้เกรเดียนต์ของความหนาแน่น:

สำหรับตัวอย่างที่ให้มาใดๆ ให้ใช้วิธีการใส่ด้านบน (16.4.6.1) หรือวิธีการใส่ด้านล่าง (16.4.6.2) วิธีการใดวิธีการหนึ่ง แต่ไม่ใช่ทั้งสองวิธีการ

16.4.6.1 วิธีการใส่ด้านบน:

เตรียมหลอดสำหรับการปั่นแยกที่มีก้นรูปกรวยที่ปราศจากเชื้อที่ติดฉลากไว้สำหรับแต่ละหลอดที่มีเลือดที่ถูกเจือจางแล้ว

เติมตัวกลางสำหรับการทำเกรเดียนต์ของความหนาแน่นในปริมาตรที่เหมาะสมลงในหลอดสำหรับการปั่นแยกที่มีก้นรูปกรวยที่ปราศจากเชื้อเปล่าๆ โดยใช้เทคนิคที่ปราศจากเชื้อ ปริมาตรของตัวกลางสำหรับการทำเกรเดียนต์ของความหนาแน่นจะขึ้นกับอัตราส่วนของตัวกลางสำหรับการทำเกรเดียนต์ของความหนาแน่นต่อเลือดที่ถูกเจือจางแล้วซึ่งแนะนำโดยบริษัทผู้ผลิต

ใส่เลือดที่ถูกเจือจางแล้วลงไปบนตัวกลางสำหรับการทำเกรเดียนต์ของความหนาแน่นด้วยปิเปตอย่างระมัดระวังและอย่างช้าๆ

ข้อเสนอแนะ: ค่อยๆ ปล่อยให้สารผสมของเลือดที่ถูกเจือจางแล้วด้วย WDR ไหลลงไปตามด้านข้างของหลอดและไปกองรวมอยู่บนพื้นผิวของตัวกลางสำหรับการทำเกรเดียนต์ของความหนาแน่นโดยไม่ทำให้ระนาบของพื้นผิวแตก

16.4.6.2 วิธีการใส่ด้านล่าง:

ผสมเบาๆ และอย่างทั่วถึงเพื่อลดการจับกันเป็นกลุ่มของเซลล์ในระหว่างการแยก

อาจเลือกทำได้: เติม WDR ในปริมาตรที่เท่ากับปริมาตรของเลือดทั้งหมดลงไปในเลือดครบส่วนหรือเลือดกับ WDR

กำหนดปริมาตรของตัวกลางสำหรับการทำเกรเดียนต์ของความหนาแน่นที่จำเป็นสำหรับแต่ละหลอดตามปริมาตรของเลือดที่ถูกเจือจางแล้วด้วย WDR ปริมาตรของตัวกลางสำหรับการทำเกรเดียนต์ของความหนาแน่นจะขึ้นกับอัตราส่วนของตัวกลางสำหรับการทำเกรเดียนต์ของความหนาแน่นต่อเลือดที่ถูกเจือจางแล้วซึ่งแนะนำโดยบริษัทผู้ผลิต

ใส่สารละลายของตัวกลางสำหรับการทำเกรเดียนต์ของความหนาแน่นลงไปข้างใต้เลือดกับ WDR ด้วยปิเปตอย่างระมัดระวังและอย่างช้าๆ

16.4.6.3 ปิดฝาหลอดอย่างระมัดระวัง

16.5 การปั่นแยกตามความหนาแน่นสำหรับลิมโฟไซต์และการเก็บ

16.5.1 จับหลอดในลักษณะตั้งขึ้นและค่อยๆ ขนย้ายหลอดไปยังเครื่องปั่นแยก

16.5.2 ปั่นแยกที่ 400 x g เป็นเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิ 15 ถึง 30°ซ โดยปิดเบรก ดังที่แสดงไว้ในเอกสารกำกับที่มาพร้อมกับตัวกลางสำหรับการทำเกรเดียนต์

หมายเหตุ: หากเปิดเบรกไว้ จะทำให้ชั้นแตก จะต้องปิดเบรกของเครื่องปั่นแยกเพื่อให้การแยกสะอาด และเพื่อให้ได้ PBMC ในปริมาณที่มากที่สุด ดูบทที่ 20 การคำนวณ เพื่อเปลี่ยน g ไปเป็น rpm สำหรับความยาวโรเตอร์ของท่าน

16.5.3 เตรียมหลอดสำหรับการปั่นแยกที่มีก้นรูปกรวยที่ปราศจากเชื้อใหม่ในจำนวนและขนาดเท่ากับหลอดสำหรับการปั่นแยกที่มีก้นรูปกรวยที่ใช้ในขั้นตอนการปั่นแยก

16.5.4 ติดฉลากแต่ละหลอดด้วย PTID/สารต้านการแข็งตัวของเลือด ใช้หลอดใหม่เหล่านี้สำหรับการล้างต่อไปนี้

16.5.5 เอาหลอดออกจากเครื่องปั่นแยก

16.5.6 หากไม่สามารถมองเห็นชั้นเซลล์ได้ ตรวจสอบยืนยันว่าเครื่องปั่นแยกทำงานได้อย่างเหมาะสม แก้ไขปัญหาใดๆ ที่ท่านพบ ทำการปั่นแยกหลอดอีกครั้ง บันทึกปัญหาและการปฏิบัติที่ได้ดำเนินการตามข้อกำหนดของเครือข่ายและห้องปฏิบัติการ

หมายเหตุ: หากยังไม่สามารถมองเห็นชั้นเซลล์ได้หลังจากการปั่นแยกอีกครั้ง บันทึก เอาส่วนเหนือตะกอนที่เป็น WDR ออกและนำไปทิ้ง และดำเนินการต่อ

หมายเหตุ: หากพลาสมาขุ่นมาก อาจเป็นการยากที่จะมองเห็นรอยต่อกับตัวกลางสำหรับการทำเกรเดียนต์ของความหนาแน่น เป็นไปได้ที่จะปรับปรุงการเก็บลิมโฟไซต์ให้ดีขึ้นด้วยการเอาพลาสมาส่วนใหญ่ที่อยู่เหนือรอยต่อออกด้วยปิเปตขนาด 10 มล. โดยให้เหลือไว้เพียง 0.5 ซม. การทำเช่นนี้ทำให้สามารถวางตำแหน่งของปลายปิเปตในการเก็บเซลล์ได้ดีขึ้น

16.5.7 ตรวจสอบหลอดเพื่อดูว่ามีการแตกของเม็ดเลือดแดงหรือมีลิ่มเลือดขนาดเล็กที่มองเห็นได้ที่รอยต่อของเซลล์ซึ่งไม่ได้ถูกสังเกตพบมาก่อนหรือไม่ และบันทึกสิ่งดังกล่าวไว้

หมายเหตุ: มองหาการแตกของเม็ดเลือดแดงหรือลิ่มเลือดหลังจากการปั่นแยก ประเมินระดับของการแตกของเม็ดเลือดแดงจาก +1 จนถึง +4 ตามคำอธิบายที่ให้ไว้ในอภิธานศัพท์ บันทึกการสังเกตของท่าน

16.5.8 นำเอาส่วนของพลาสมา-
WDR ที่อยู่ด้านบนและมีสีค่อนข้างเหลืองออกจนถึงภายในประมาณ 1 ถึง 2 ซม. ของแถบ PBMC สีขาวขุ่น ซึ่งอยู่ตรงรอยต่อระหว่างส่วนของพลาสมา-
WDR (สีค่อนข้างเหลือง) และสารละลายของตัวกลางสำหรับการแยกที่ใส โดยใช้ปิเปตที่ปราศจากเชื้ออันใหม่ (ปิเปตทางซีรัมวิทยาหรือปิเปตสำหรับถ่ายสาร) สำหรับ PTID แต่ละหมายเลข ทิ้งส่วนของพลาสมา-
WDR ตามนโยบายของห้องปฏิบัติการ

หมายเหตุ: ในอีกทางเลือกหนึ่ง อาจปล่อยส่วนของพลาสมา-
WDR ด้านบนไว้อย่างนั้น และอาจนำเอาแถบ PMBC
สีขาวขุ่นออกโดยการสอดปิเปตอย่างระมัดระวังผ่านชั้นด้านบนไปยังแถบ PBMC

16.5.9 เก็บเซลล์ทั้งหมดตรงรอยต่อสีขาวขุ่นโดยใช้ปิเปตทางซีรัมวิทยาหรือปิเปตสำหรับถ่ายสารที่ปราศจากเชื้อ ระวังไม่ให้ดูดสารละลายของตัวกลางสำหรับการแยกออกมามากเกินกว่าที่จำเป็น

16.5.10 ถ่ายเซลล์ที่เก็บมาจากหลอดสำหรับการปั่นแยกที่มีก้นรูปกรวยหลอดหนึ่งไปยังหลอดสำหรับการปั่นแยกที่มีก้นรูปกรวยที่ปราศจากเชื้อที่ติดฉลากไว้ล่วงหน้าซึ่งเข้าคู่กันหนึ่งหลอด สามารถเติม WDR ลงในหลอดไว้ล่วงหน้าเพื่อประหยัดเวลา

ขนาดของหลอดสำหรับการปั่นแยกที่มีก้นรูปกรวย (มล.)	**ปริมาตรที่เติมไว้ล่วงหน้าของ** WDR **(มล.)**
50	25
15	5

16.5.11 ปิดฝาหลอดสำหรับการปั่นแยกที่มีก้นรูปกรวยที่มีเซลล์เม็ดเลือดแดง/ตัวกลางสำหรับการแยกที่เหลืออีกครั้ง และทิ้งหลอดโดยถือเป็นของเสียที่มีอันตรายทางชีวภาพโดยปฏิบัติตามนโยบายของห้องปฏิบัติการ

16.6 ตรวจสอบให้แน่ใจว่ามีการบันทึกข้อมูลที่เหมาะสมทั้งหมดตามข้อกำหนดของเครือข่ายและห้องปฏิบัติการ ดูรายละเอียดในบทที่ 5

ไปที่บทที่ 17

17 การล้าง การนับ การแขวนลอยใหม่ ความเข้มข้น และการแช่แข็งข้ามคืนที่มีอัตราการแช่แข็งที่ถูกควบคุม

<u>ใช้บทที่ 17 สำหรับเครือข่ายทั้งหมด:</u>

17.1 การล้างครั้งที่ 1:

17.1.1 QS ส่วนของ PBMC จนได้ประมาณ 10 มล. (สำหรับหลอดสำหรับการปั่นแยกที่มีก้นรูปกรวยขนาด 15 มล.) หรือ 45 มล. (สำหรับหลอดสำหรับการปั่นแยกที่มีก้นรูปกรวยขนาด 50 มล.) ด้วยการเติม WDR ผสมเบาๆ

17.1.2 ปิดฝาหลอดของเซลล์ที่เก็บมาทั้งหมดอีกครั้ง

17.1.3 ปั่นแยกเซลล์ที่ถูกเจือจางแล้วที่ 200 ถึง 400 x g เป็นเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิ 15 ถึง 30°ซ (อาจใช้เบรกหรือไม่ก็ได้)

17.1.4 นำหลอดออกจากเครื่องปั่นแยกและตรวจสอบหาตะกอนเซลล์ (cell pellet)

หากไม่สามารถมองเห็นตะกอนเซลล์ได้ ตรวจสอบยืนยันว่าเครื่องปั่นแยกทำงานได้อย่างเหมาะสม แก้ไขปัญหาใดๆ ที่ท่านพบ ทำการปั่นแยกหลอดอีกครั้ง บันทึกปัญหาและการปฏิบัติที่ได้ดำเนินการตามข้อกำหนดของเครือข่ายและห้องปฏิบัติการ หากยังไม่สามารถมองเห็นตะกอนเซลล์ได้หลังจากการปั่นแยกหลอดอีกครั้ง บันทึกไว้

17.1.5 เอาส่วนเหนือตะกอนออกและนำไปทิ้งโดยไม่ให้รบกวนตะกอนเซลล์

17.2 การล้างครั้งที่ 2:

17.2.1 แขวนลอยตะกอนเซลล์แต่ละก้อนใหม่ใน WDR ในปริมาตรเล็กน้อยโดยผสมเบาๆ แต่ทั่วถึงให้ได้เป็นสารแขวนลอยของเซลล์ที่เป็นเนื้อเดียว

ขนาดของหลอด (มล.)	**ปริมาตรที่แขวนลอยใหม่ของ WDR (มล.)**
50	≤ 5
15	≤ 3

17.2.2 รวมสารแขวนลอยของตะกอนจาก PTID/สารต้านการแข็งตัวของเลือดเดียวกัน นี่เป็นหลอดของเซลล์ที่เก็บมา

ขนาดของหลอด (มล.)	**จำนวนของสารแขวนลอยของตะกอนที่จะรวมกัน**	**ปริมาตรทั้งหมด (มล.)**
50	≤ 4	≤ 20
15	≤ 2	≤ 6

17.2.3 ใช้ WDR ในปริมาตรเล็กน้อยเพื่อล้างหลอดที่ถ่ายตะกอน เก็บ WDR ที่ใช้ล้างในหลอดของเซลล์ที่เก็บมา

17.2.4 QS ส่วนของ PBMC ด้วยการเติม WDR และผสมเบาๆ

ขนาดของหลอด (มล.)	**ปริมาตรที่ QS (มล.)**
50	≤ 45
15	≤10

17.2.5 ปิดฝาหลอดอีกครั้งและวางหลอดในเครื่องปั่นแยก

17.2.6 ปั่นแยกเซลล์ที่ถูกเจือจางแล้วที่ 200 ถึง 400 x g เป็นเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิ 15 ถึง 30°ซ (อาจใช้เบรกหรือไม่ก็ได้)

17.2.7 นำหลอดออกจากเครื่องปั่นแยกและตรวจสอบหาตะกอนเซลล์

หมายเหตุ: หากไม่สามารถมองเห็นตะกอนเซลล์ได้ ตรวจสอบยืนยันว่าเครื่องปั่นแยกทำงานได้อย่างเหมาะสม แก้ไขปัญหาใดๆ และทำการปั่นแยกหลอดอีกครั้ง บันทึกปัญหาและการปฏิบัติที่ได้ดำเนินการตามข้

อกำหนดของเครือข่ายและห้องปฏิบัติการ หากยังไม่สามารถมองเห็นตะกอนเซลล์ได้หลังจากการปั่นแยกหลอดอีกครั้ง บันทึกไว้

17.2.8 เอาส่วนเหนือตะกอนออกและนำไปทิ้งโดยไม่ให้รบกวนตะกอนเซลล์

17.3 จำนวนเซลล์ PBMC

17.3.1 หาและบันทึกปริมาตรที่แขวนลอยใหม่เพื่อการนับของ WDR (V) ที่ถูกต้องถึงภายใน 0.1 มล. V มีความสำคัญเนื่องจากนี่เป็นปริมาตรซึ่งเป็นพื้นฐานของจำนวนเซลล์

หมายเหตุ: โดยปกติแล้ว V จะเท่ากับประมาณ 20% ของปริมาตรของเลือดครบส่วนที่ใช้ได้ที่ปัดให้เป็นค่ามล. เต็มที่ใกล้ที่สุด อย่างไรก็ตาม V อาจแตกต่างกันไปโดยขึ้นกับขนาดของตะกอนเซลล์และวิธีการนับเซลล์ มันยังสามารถถูกปรับเพื่อให้มีการวัดได้อย่างสะดวกหรือเพื่อการแขวนลอยใหม่ได้ ดังนั้น V อาจมีช่วงตั้งแต่ 10% ถึง 50% ของปริมาตรของเลือดครบส่วนที่ใช้ได้ ดูวิธีการนับเซลล์ที่ได้รับการอนุมัติในห้องปฏิบัติการเพื่อเป็นแนวทาง

17.3.2 หากมีตะกอนมากกว่าหนึ่งก้อนจาก PTID/สารต้านการแข็งตัวของเลือดเดียวกัน ใช้ WDR ในปริมาณเล็กน้อยเพื่อค่อยๆ แขวนลอยตะกอนเซลล์ใหม่และรวมตะกอนเซลล์ให้เป็นหลอดเดียว ล้างหลอดที่ถ่ายเซลล์โดยใช้ปริมาตรที่เหลือ เติมสิ่งที่ใช้ล้างลงในหลอดของเซลล์ที่เก็บมา

17.3.3 ดำเนินการนับเซลล์ให้เสร็จสิ้นโดยใช้ SOP สำหรับวิธีการนับเซลล์ที่ได้รับการอนุมัติที่ห้องปฏิบัติการ สำหรับ SOP สำหรับการนับเซลล์ด้วยมือที่ให้ไว้เป็นตัวอย่าง ดูที่ http://www.hanc.info/labs/labresources/procedures/Pages/pbmcSop.aspx

17.3.4 ผสมเซลล์เบาๆ แต่ทั่วถึงก่อนจะเก็บตัวอย่างเพื่อการนับเซลล์

17.3.5 ถ่ายสารแขวนลอยใหม่ในปริมาตรเล็กน้อยไปยังหลอดขนาดเล็กเพื่อการนับ

หมายเหตุ: หากจำเป็นต้องมีการนับซ้ำ ลดปริมาตรของการเก็บตัวอย่างที่จำเป็นให้เหลือน้อยที่สุด

17.3.6 ปฏิบัติตาม SOP สำหรับวิธีการนับเซลล์ที่ได้รับการอนุมัติที่ห้องปฏิบัติการที่ดำเนินการเพื่อหาความเข้มข้นของเซลล์ x 10^6 ต่อมล.

หมายเหตุ: เซลล์ที่ 10^3/µล. = เซลล์ที่ 10^6/มล.

หมายเหตุ: อาจดำเนินการนับอัตโนมัติหนึ่งครั้ง การนับด้วยมือควรนับที่สี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาดใหญ่ทั้งสี่ซึ่งอยู่ที่มุมเป็นอย่างน้อย (1มม.^{2})

17.3.7 คำนวณจำนวนของเซลล์ทั้งหมดโดยใช้สูตรต่อไปนี้:

$$T = C \times V$$

T = จำนวนของเซลล์ทั้งหมด

C = ความเข้มข้น (10^6/มล.) ที่หาได้ในวิธีการนับ

V = ปริมาตรที่แขวนลอยใหม่เพื่อการนับของ WDR ในหน่วย มล.

17.3.8 คำนวณเซลล์ที่ได้ในหน่วยเซลล์/มล. ของเลือดครบส่วนที่ใช้ได้โดยใช้สูตรด้านล่าง

เซลล์ที่ได้ (10^6 เซลล์/มล.) = T */ปริมาตรของเลือดครบส่วนที่ใช้ได้*

หมายเหตุ: เซลล์ที่ได้ถูกคำนวณเพื่อวัตถุประสงค์ด้านคุณภาพเท่านั้น ดูช่วงที่คาดไว้ของเซลล์ที่ได้ในบทที่ 13 การควบคุมคุณภาพ หากเซลล์ที่ได้อยู่นอกช่วงที่คาดไว้ ให้ปฏิบัติตามแนวทางในการแก้ปัญหาในบทที่ 13 การควบคุมคุณภาพ เจือจางใหม่และนับใหม่หากจำเป็น

17.4 การคำนวณปริมาตรที่แขวนลอยใหม่ขั้นสุดท้าย

17.4.1 คำนวณปริมาตรที่แขวนลอยใหม่เพื่อการแช่แข็งของ CPS ที่กำหนดโดยการดำเนินการในขั้นตอนด้านล่างให้เสร็จสิ้นเพื่อให้ได้ความเข้มข้นของเซลล์ขั้นสุดท้ายที่เป็นเป้าหมาย

หมายเหตุ: ความเข้มข้นของเซลล์ขั้นสุดท้ายที่เป็นเป้าหมายแตกต่างกันไปตามเครือข่ายและโครงการวิจัย ดูข้อมูลความเข้มข้นของเซลล์ขั้นสุดท้ายที่เป็นเป้าหมายในระเบียบวิธีของโครงการวิจัย

17.4.2 คำนวณปริมาตรที่แขวนลอยใหม่เพื่อการแช่แข็งของ CPS ที่ประมาณไว้ (V1) ที่กำหนดโดยใช้ความเข้มข้นของเซลล์ขั้นสุดท้ายที่เป็นเป้าหมาย

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

T = จำนวนของเซลล์ทั้งหมด

N1 = ความเข้มข้นเซลล์ขั้นสุดท้ายที่เป็นเป้าหมาย

V2 = ปริมาตรของส่วนลงตัวขั้นสุดท้ายในหน่วย มล.

ปัด V1 ลงให้เป็นค่ามล. ในทศนิยมตำแหน่งที่หนึ่งที่ใกล้ที่สุดเพื่อหาปริมาตรที่แขวนลอยใหม่ของ CPS ที่แท้จริง (V_f)

หมายเหตุสำหรับ HVTN: ปัด V1 ลงให้เป็นค่ามล. เต็มที่ใกล้ที่สุด (ในหลักหน่วย) เพื่อหา V_f

หมายเหตุ: สำหรับบางเครือข่าย V2 จะเป็น 1 มล./หลอดสำหรับการแช่แข็ง ดังนั้นจำนวนของหลอดที่จะต้องใช้จะเท่ากับมิลลิลิตรของ CPS สำหรับ ACTG และ IMPAACT ปรับปริมาตรต่อหลอดสำหรับการแช่แข็งตามผังการดำเนินการของห้องปฏิบัติการหรือระเบียบวิธีของโgครงการวิจัย

หมายเหตุสำหรับ IMPAACT: โครงการวิจัยของ IMPAACT ส่วนใหญ่จะกำหนดให้มี PBMC ที่มีชีวิตที่ 10^7/มล. และ 5.0×10^6/หลอด และกำหนดให้ PBMC ที่เก็บมาได้ทั้งหมดถูกเก็บรักษาไว้ โดยทั่วไปแล้ว เมื่อ PBMC ที่เก็บมาได้น้อยกว่าจำนวนเป้าหมาย:

- เติมจำนวน PBMC ที่หลงเหลือที่น้อยกว่า 2×10^6 ลงไปในหลอดที่มีเซลล์ 5.0×10^6 เซลล์
- แบ่งส่วนจำนวนเซลล์ที่หลงเหลือที่มากกว่า 2×10^6 แต่น้อยกว่า 5×10^6 ลงในหลอดอีกหลอดหนึ่ง

ตัวอย่าง:

ข้อกำหนดของโครงการวิจัยของ IMPAACT	**จำนวนเซลล์ที่เก็บมาได้**	**การเตรียมส่วนลงตัว**
PBMC 10^7 เซลล์ในหลอด 2 หลอด	PBMC 9.3×10^6 เซลล์	เตรียมหลอดหลอดหนึ่งหลอดด้วย PBMC 5.0×10^6 เซลล์ และอีกหลอดหนึ่งด้วย PBMC 4.3×10^6 เซลล์
PBMC 20 ล้านเซลล์	PBMC 16.5×10^6 เซลล์	เตรียมหลอดสองหลอดที่มี PBMC 5×10^6 เซลล์ในแต่ละหลอด และหลอดหนึ่งหลอดที่มี PBMC 6.5×10^6 เซลล์

อย่าลืมบันทึกจำนวน PBMC ที่แท้จริง/หลอดใน LDMS

17.4.3 ***สำหรับ*** HVTN ***เท่านั้น:*** คำนวณจำนวนของเซลล์ที่แท้จริงต่อหลอด (N2) โดยใช้ปริมาตรการแช่แข็งของ CPS ที่แท้จริง (V_f) ที่หาได้ในการคำนวณก่อนหน้านี้

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

N2 = จำนวนของเซลล์ที่แท้จริงต่อหลอด

T = จำนวนของเซลล์ทั้งหมด

V2= ปริมาตรของส่วนลงตัวขั้นสุดท้ายในหน่วย มล.

17.5 การติดฉลาก

17.5.1 ดำเนินการพิมพ์และติดฉลากหลอดสำหรับการแช่แข็งให้เสร็จสิ้นก่อนการปั่นแยกขั้นสุดท้าย

หมายเหตุ: เป็นสิ่งสำคัญที่จะต้องลดเวลาที่เซลล์อยู่ในตะกอนให้เหลือน้อยที่สุด

17.5.2 ฉลากสำหรับหลอดสำหรับการแช่แข็งจะถูกสร้างขึ้นโดยใช้ระบบการจัดการข้อมูลทางห้องปฏิบัติการ (LDMS)

17.5.2.1 ปฏิบัติตามหลักปฏิบัติของห้องปฏิบัติการของเครือข่ายสำหรับการกรอกข้อมูลให้เสร็จสิ้น

17.5.2.2 ตรวจสอบชนิดของฉลากของหลอดสำหรับการแช่แข็งที่ได้มาแต่ละชนิดเพื่อหาความผิดพลาดในการกรอกข้อมูลโดยเปรียบเทียบกับตารางงานการเบิกวัสดุและการดำเนินการของการห้องปฏิบัติการก่อนที่จะติดฉลากหลอดสำหรับการแช่แข็ง

17.5.2.3 ตรวจสอบบาร์โค้ดของฉลากและบริเวณที่พิมพ์ด้วยสายตาเพื่อตรวจดูการจัดให้ตรงแนวและคุณภาพของการพิมพ์

17.5.2.4 แก้ไขความผิดพลาดในการกรอกข้อมูลใดๆ ใน LDMS และพิมพ์ฉลากใหม่ตามความจำเป็น (ดูแลให้แน่ใจว่าได้เลือกหมายเลขประจำตัวสำหรับทั่วโลกที่เหมาะสม)

17.5.3 ติดฉลากบนหลอดสำหรับการแช่แข็งในลักษณะที่ว่าข้อมูลสามารถจะถูกอ่านได้โดยง่ายและสามารถเห็นสารในหลอดได้อย่างชัดเจน

หมายเหตุสำหรับ HVTN: สแกนหลอดสำหรับการแช่แข็งเปล่าที่ติดฉลากไว้โดยปฏิบัติตามแนวทางของ HVTN ในปัจจุบันเพื่อให้แน่ใจว่าสามารถสแกนบาร์โค้ดได้

17.6 การปั่นแยกขั้นสุดท้าย

17.6.1 วางหลอดของเซลล์ที่เก็บมาในเครื่องปั่นแยก

หมายเหตุสำหรับ HVTN: QS สารแขวนลอยของเซลล์จนได้ 45 มล. ด้วย WDR ก่อนการปั่นแยก

17.6.2 ปั่นแยกเซลล์ที่ถูกเจือจางแล้วที่ 200 ถึง 400 x g เป็นเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิ 15 ถึง 30°ซ (อาจใช้เบรกหรือไม่ก็ได้)

17.6.3 ตรวจสอบยืนยันว่าหลอดสำหรับการแช่แข็งทั้งหมดได้รับการติดฉลากและสามารถเข้าถึงได้ง่าย

17.7 การแบ่งส่วนให้ลงตัวสำหรับการเก็บรักษาด้วยการแช่แข็ง

หมายเหตุ: ควรดำเนินการขั้นตอนต่อไปนี้อย่างรวดเร็วเพื่อรักษาความสมบูรณ์ของเซลล์ ขอแนะนำให้เก็บหลอดสำหรับการแช่แข็งให้เย็นบนน้ำแข็ง ห้ามปล่อยให้หลอดจมอยู่ในน้ำแข็งห้ามปล่อยให้มีความชื้นอยู่ใกล้กับฝาหลอด

17.7.1 เอาส่วนเหนือตะกอนที่เป็น WDR ออกและนำไปทิ้ง เก็บตะกอนไว้

หมายเหตุสำหรับ ACTG ***และ*** IMPAACT: หากเซลล์จะต้องถูกแช่แข็งในรูปตะกอน PBMC ที่ไม่มีชีวิต (PEL) ไม่แนะนำให้แขวนลอยเซลล์ใหม่ในตัวกลางเพื่อการแช่แข็ง (CPS) เนื่องจาก DMSO เป็นสารยับยั้ง PCR ที่มีฤทธิ์แรง หาก PBMC ได้สัมผัสกับ DMSO
(ต.ย. เช่น ตัวกลางเพื่อการแช่แข็ง) ล้าง PEL สองครั้งด้วย WDR ก่อนการเก็บรักษา ดู SOP สำหรับการดำเนินการกับสิ่งส่งตรวจที่
http://www.hanc.info/labs/labresources/procedures/Pages/actgImpaactLabManual.aspx

17.7.2 แขวนลอยตะกอนใหม่โดยใช้ปริมาตรของ CPS ที่เย็น (V_f) ที่ท่านหาไว้ในหัวข้อ 17.4

หมายเหตุ: อนุญาตให้ใช้หลอดที่ทำให้เย็นไว้ล่วงหน้าและ/หรือให้มีการดำเนินการบนน้ำแข็งได้

17.7.2.1 ***ค่อยๆ***แขวนลอยตะกอนเซลล์ใหม่ก่อนที่จะเติม CPS ด้วยการดีด การเขย่า หรือการใช้ปิเปต

17.7.2.2 ***ค่อยๆ*** เติม CPS ลงไปยังเซลล์ที่ถูกแขวนลอยใหม่โดยมีการหมุนหลอดเป็นวงกลมอย่างต่อเนื่อง

17.7.3 ดำเนินการ***อย่างรวดเร็วเมื่อ***เติม CPS แล้ว ห้ามปล่อยให้เซลล์อยู่ในสารละลายเพื่อการแช่แข็งนานกว่า 10 นาทีก่อนที่จะใส่ในตู้แช่แข็ง

17.7.4 แบ่งส่วนให้ได้ 0.5 ถึง 1 มล. ต่อหลอดสำหรับการแช่แข็ง โดยขึ้นกับข้อกำหนดของเครือข่ายและโครงการวิจัย หากกำหนดให้มีโดยเครือข่ายหรือโครงการวิจัย เตรียมส่วนลงตัวที่ไม่เต็มส่วนส่วนสุดท้าย (final partial aliquot) ด้วยปริมาตรของสารแขวนลอยของเซลล์ที่มีมากเกินไปใดๆ ซึ่งอาจมีอยู่

หมายเหตุสำหรับ HVTN: แทนที่จะสร้างส่วนลงตัวที่ไม่เต็มส่วนส่วนสุดท้าย แบ่งปริมาตรที่มีมากเกินไปใดๆ ลงในหลอดสำหรับการแช่แข็งทั้งหมดเท่าๆ กันสำหรับ PTID นั้น

17.8 การแช่แข็งข้ามคืนที่มีอัตราการแช่แข็งที่ถูกควบคุม

17.8.1 หลังจากการดำเนินการและการนับแล้ว ควรแช่แข็งเซลล์ในทันที

17.8.2 เลือกวิธีการแช่แข็งที่จะใช้: StrataCooler® Cryo, NALGENE® Mr. Frosty, biocision® CoolCell หรือ CryoMed® ดูข้อมูลการเก็บรักษาและการบำรุงรักษาในส่วนที่ 7.4

17.8.3 ขนย้ายหลอดสำหรับการแช่แข็งทั้งหมดไปยังภาชนะบรรจุสำหรับการแช่แข็งที่มีอัตราการแช่แข็งที่ถูกควบคุมในทันที

สำหรับ NALGENE® Mr. Frosty, biocision® CoolCell และ StrataCooler® Cryo ปิดภาชนะบรรจุและวางไว้ในตู้แช่แข็งที่มีอุณหภูมิ -80°ซ (-65 ถึง -95°ซ) ในสถานที่ที่ไม่ถูกรบกวนจากการเข้าถึงตู้แช่แข็งซ้ำๆ (กล่าวคือ ห่างจากด้านหน้าหรือด้านบนของตู้แช่แข็งที่ใกล้กับประตูเปิด/ฝาเปิด) เป็นเวลาอย่างน้อย 4 ชั่วโมงสำหรับ Mr. Frosty และ CoolCell และข้ามคืนสำหรับ StrataCooler ® Cryo

สำหรับ CryoMed® หรือตู้แช่แข็งที่มีอัตราการแช่แข็งที่ถูกควบคุมอื่นๆ เริ่มโปรแกรมการทำความเย็นตาม SOP ของศูนย์วิจัยที่เหมาะสม

หมายเหตุ: นี่คือเวลาที่แช่แข็ง

17.9 ตรวจสอบให้แน่ใจว่ามีการบันทึกข้อมูลที่เหมาะสมทั้งหมดตามข้อกำหนดของเครือข่ายและห้องปฏิบัติการ ดูรายละเอียดในบทที่ 5

18 การจัดเก็บ PBMC (เก็บชั่วคราวหรือเก็บประจำที่แหล่งศึกษา)

18.1 จะต้องรักษาห่วงโซ่ความเย็นในระหว่างขั้นตอนการขนย้ายทั้งหมดเพื่อหลีกเลี่ยงความเสียหายที่จะเกิดกับเซลล์

หมายเหตุสำหรับ HVTN: ขนส่งด้วยน้ำแข็งแห้งไปยังสถานที่เก็บสิ่งส่งตรวจกลางภายใน 1 สัปดาห์หลังจากการเก็บนอกจากจะถูกกำหนดไว้เป็นอย่างอื่นโดย HVTN

หมายเหตุสำหรับ ACTG: ขนส่งด้วยน้ำแข็งแห้งภายใน 4 สัปดาห์นับจากวันที่เซลล์ถูกแช่แข็ง

หมายเหตุสำหรับ HVTN, IMPAACT, and MTN: ต้องย้าย PBMCs
จากระบบควบคุมอุณหภูมิเพื่อการแช่แข็งไปเก็บในถังไนโตรเจนเหลว (LN2 dewar) หรือ
ตู้แช่แข็งเชิงกล (Mechanical Freezer) ที่มีอุณหภูมิ -150°ซ ภายใน 72 ชั่วโมง (ดูขั้นตอนต่อไปที่ 18.3)

18.2 ขนย้าย PBMC ที่จะได้รับการจัดเก็บชั่วคราวที่แหล่งศึกษาไปไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -70/-80°ซ

18.2.1 ขนย้ายหลอดสำหรับการแช่แข็งจากระบบควบคุมอุณหภูมิเพื่อการแช่แข็งไปยังสถานที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -70/-80°ซ ตามที่กำหนดไว้ ต้องมั่นใจว่าตู้แช่แข็งที่ใช้สำหรับการเก็บรักษา PBMC
มีจุดตั้งอุณหภูมิเป็น -70°ซ โดยมีช่วงแจ้งเตือนเป็น -65°ซ ถึงอย่างน้อย -80°ซ

ขนย้ายหลอดสำหรับการแช่แข็งหลังจาก 4 ชั่วโมงเป็นอย่างน้อยสำหรับ NALGENE® Mr. Frosty และ biocision® CoolCell
และข้ามคืนสำหรับ StrataCooler ® Cryo หากใช้ CryoMed® เมื่อเสร็จสิ้นโปรแกรมแล้วให้ขนย้ายหลอดสำหรับการแช่แข็งไปยังตู้แช่แข็งที่มีอุณหภูมิ -70/-80°ซ

หมายเหตุ: ข้อกำหนดให้ดำเนินการสำหรับ HVTN ***และข้อแนะนำให้ดำเนินการสำหรับ*** ACTG: ใช้ถาดสำหรับการขนย้ายแบบใช้น้ำแข็งแห้ง ตรวจสอบให้แน่ใจว่ากล่องบรรจุหลอดสำหรับการแช่แข็งนั้น

ได้รับถูกโปะทับด้วยน้ำแข็งแห้งเป็นชั้นหนาในทุกด้าน ดำเนินการอย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพเพื่อลดโอกาสการสัมผัสของหลอดสำหรับการแช่แข็งกับอุณหภูมิปกติโดยรอบให้เหลือน้อยที่สุด

18.2.2 ***หมายเหตุ:*** ห้ามเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว (LN2) ให้เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -65 ถึง -95°ซ จนกว่าจะขนส่ง

18.2.3 ***หมายเหตุ: ข้อกำหนดให้ดำเนินการสำหรับ*** HVTN ***ข้อแนะนำให้ดำเนินการสำหรับ*** ACTG: รักษาห่วงโซ่ความเย็นในระหว่างการเตรียมการขนส่งด้วยการทำให้กล่องขนส่งแบบใช้น้ำแข็งแห้งเย็นไว้ล่วงหน้าและใช้ถาดสำหรับการขนย้ายแบบใช้น้ำแข็งแห้งในระหว่างขั้นตอนการบรรจุ ตรวจสอบให้แน่ใจว่ากล่องขนส่งแบบใช้น้ำแข็งแห้งนั้นมีน้ำแข็งแห้งอยู่เต็ม
ห้ามเก็บรักษาตัวอย่างไว้ใน LN2 เป็นการชั่วคราวเว้นแต่จะได้รับการสั่งให้ทำเช่นนั้นโดยเครือข่ายหรือโครงการวิจัย ห้ามขนย้ายตัวอย่างจาก LN2 กลับไปที่ตู้แช่แข็งที่มีอุณหภูมิ -70/-80°ซ เว้นแต่จะได้รับการสั่งให้ทำเช่นนั้นโดยเครือข่ายหรือคณะโครงการวิจัย

18.2.4 ติดต่อบุคลากรฝ่ายการปฏิบัติการทางห้องปฏิบัติการของเครือข่ายหากตัวอย่างไม่สามารถถูกส่งไปถึงจุดหมายปลายทางสุดท้ายภายในระยะเวลาที่กำหนดโดยเครือข่ายสำหรับการเก็บรักษาชั่วคราว หากไม่สามารถดำเนินการให้เป็นไปตามเงื่อนไขในการเก็บรักษาชั่วคราวและในการขนส่งได้ จะต้องดำเนินการขออนุญาตให้ย้ายตัวอย่างไปเก็บรักษาไว้ใน LN2

18.3 ภายใน 72 ชั่วโมงของการแช่แข็ง PBMC ด้วยระบบควบคุมอุณหภูมิเพื่อการแช่แข็ง ให้ทำการย้าย PBMC ไปเก็บไว้ในถังไนโตรเจนเหลว (LN2 dewar) หรือ ตู้แช่แข็งเชิงกล (Mechanical Freezer) ที่มีอุณหภูมิ -150°ซ

หมายเหตุสำหรับ HVTN: ตู้แช่แข็งเชิงกล ***-150***°ซ ไม่เป็นที่ยอมรับสำหรับการจัดเก็บ PBMC ของ HVTN

18.3.1 ***ภายใน*** 72 ***ชั่วโมงของการแช่แข็ง*** cryovials ***ด้วยระบบควบคุมอุณหภูมิ ให้ย้าย*** cryovials ***ด้วยน้ำแข็งแห้งไปเก็บไว้ในถัง*** LN2 dewar ***หรือ ตู้แช่แข็งเชิงกล*** (Mechanical Freezer) ***ที่มีอุณหภูมิ*** -150°***ซ***

18.3.2

ตัวอย่าง PBMC ที่แช่แข็งสามารถถูกเก็บรักษาไว้ในเฟสที่เป็นไอของ LN2 ได้นานอย่างไม่มีกำหนด ห้ามขนย้ายตัวอย่างจาก LN2 หรือ ตู้แช่แข็งที่มีอุณหภูมิ -150°ซ กลับไปเก็บที่ตู้แช่แข็งที่มีอุณหภูมิ -70°ซ หรือ -80° ซ เว้นแต่จะได้รับการสั่งให้ทำโดยเครือข่ายหรือคณะโครงการวิจัย

18.3.3 เมื่อตัวอย่างถูกเก็บไว้ใน LN2 การขนย้ายหรือการขนส่งทั้งหมดจะต้องดำเนินการด้วย LN2 (≤ -140°ซ) และตัวอ
ย่างไม่สามารถถูกขนส่งด้วยน้ำแข็งแห้งได้

ตัวอย่างที่ติดเชื้อทั้งหมดต้องได้รับการจัดส่งด้วยถังLN2 ที่ได้รับการอนุมัติใช้โดย IATA; ตรวจสอบข้อกำหนดของโครงการวิจัยเพื่อดูข้อยกเว้น

19 การจัดทำเอกสารที่ใช้ประกอบการดำเนินการให้เสร็จสมบูรณ์

19.1 ตรวจสอบให้แน่ใจว่ามีการบันทึกข้อมูลที่จำเป็นทั้งหมดตามข้อกำหนดของเครือข่ายและห้องปฏิบัติการและการคำนวณทั้งหมดถูกต้อง ดูรายละเอียดในบทที่ 5

19.2 เก็บรักษาเอกสารที่ใช้ประกอบการดำเนินการแยก PBMC และเอกสารกำกับการปฏิบัติงานอื่นๆ ตามนโยบายของห้องปฏิบัติการ ดูรายละเอียดในบทที่ 5

นี่เป็นการสิ้นสุดการดำเนินการและการเก็บรักษา
ให้ปฏิบัติตามขั้นตอนทางห้องปฏิบัติการที่เหมาะสมสำหรับการจัดเตรียมและการดำเนินการขนส่ง

20 การคำนวณ

20.1 โดยปกติแล้ว RPM จะถูกอ่านจากผังโนโมแกรม ผังโนโมแกรมมักถูกรวมไว้ในคู่มือการบำรุงรักษาเครื่องปั่นแยก ดูแลให้แน่ใจว่าได้ใช้ผังที่จำเพาะต่อเครื่องปั่นแยกและโรเตอร์

20.2 ขอแนะนำให้ติดการเปลี่ยนจาก g ไปเป็น RPM ไว้ที่เครื่องปั่นแยกของท่านเพื่อจะได้ทำการอ้างอิงได้โดยง่าย

20.3 หากไม่มีผังโนโมแกรม สามารถเปลี่ยนแรง g ไปเป็น RPM โดยใช้สูตรต่อไปนี้

$$RPM = \sqrt{\frac{g}{1.18r \times 10^{-5}}}$$

r = รัศมีของโรเตอร์ในหน่วยเซนติเมตร

g = แรงเหวี่ยงหนีศูนย์กลางสัมพัทธ์ (relative centrifugal force) ที่แสดงในหน่วยของแรงโน้มถ่วง

RPM = รอบต่อนาที (revolutions per minute)

21 ข้อจำกัดของขั้นตอน

21.1 เวลาในการดำเนินการที่เหมาะสมที่สุดนับจากการเก็บจนถึงการแช่แข็งเลือดใหม่สำหรับ PBMC คือ <8 ชั่วโมงนับจากเวลาที่เก็บ การทำหน้าที่ของเซลล์อาจลดลงในสิ่งส่งตรวจที่เก่ากว่า

21.2 เวลาในการดำเนินการที่เหมาะสมที่สุดสำหรับ PBMC คือ <3 ชั่วโมงนับจากเวลาที่เติมเลือดลงในหลอดสำหรับการแยกเซลล์ (Accuspin™ หรือสิ่งที่เทียบเท่ากัน) จนถึงการเริ่มรอบการแช่แข็งที่มีอัตราการแช่แข็งที่ถูกควบคุม

21.3 การศึกษาต่างๆ บ่งบอกว่าสิ่งส่งตรวจที่เก็บมาในสารต้านการแข็งตัวของเลือดที่เป็น EDTA นั้นให้เซลล์ที่ได้ที่ต่ำกว่าเมื่อเวลาผ่านไป

21.4 หลีกเลี่ยงการนำเอาปริมาณที่มากเกินไปของตัวกลางสำหรับการแยกออกพร้อมกับแถบ PBMC เนื่องจากการทำเช่นนั้นสามารถเพิ่มการปนเปื้อนด้วยแกรนูโลไซต์ได้

21.5 หลีกเลี่ยงการนำเอาส่วนเหนือตะกอนที่มีมากเกินไปออกพร้อมกับแถบ PBMC เพื่อจำกัดการปนเปื้อนจากโปรตีนในพลาสมา

22 อภิธานศัพท์

คำศัพท์	คำจำกัดความ
ACTG	กลุ่มการทดลองทางคลินิกเกี่ยวกับเอดส์ (AIDS Clinical Trials Group)
อุณหภูมิของการปั่นแยก	15 ถึง 30°ซ
มีการจับตัวเป็นลิ่มเป็นจำนวนมาก	มากกว่า 3/4 ของมวลของเลือดครบส่วนมีการจับตัวเป็นลิ่ม และมีเลือดครบส่วนที่เป็นอิสระเหลือเพียงเล็กน้อย
ลิ่มเลือดขนาดเล็ก	มักจะไม่เห็นลิ่มเลือดขนาดเล็กในหลอดของเลือดครบส่วน แต่สามารถเห็นได้บนฟริตของหลอดสำหรับการแยกหลังจากการปั่นแยก
CPS	สารละลายสำหรับการเก็บรักษาด้วยการแช่แข็ง (Cryopreservation Solution)
CSR	ที่เก็บสิ่งส่งตรวจกลาง (Central Specimen Repository)
CSTFB	หลอดสำหรับการแยกเซลล์ที่มีตัวกั้นแบบฟริต (Cell Separation Tube with Frit Barrier)
ตัวกลางที่มี DG	ตัวกลางสำหรับการทำเกรเดียนต์ของความหนาแน่น (density gradient media)
FBS	ซีรัมจากตัวอ่อนวัว (Fetal Bovine Serum)
HBSS	สารละลายเกลือแบบสมดุลของแฮงส์ (Hanks' Balanced Salt Solution)

คำศัพท์	คำจำกัดความ
การแตกของเม็ดเลือดแดง (Hemolysis)	การมีสีชมพูจนถึงสีแดงของซีรัมหรือพลาสมาเนื่องจากการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดง การแตกของเม็ดเลือดแดงจะถูกประเมินระดับและรายงานตามมาตรการประเมินต่อไปนี้: 1+ สีออกชมพูจาง- แดงในซีรัมหรือพลาสมา สามารถอ่านตัวอักษรในหนังสือพิมพ์ที่วางไว้ด้านหลังหลอดเลือดได้อย่างชัดเจน 2+ สีออกชมพู- แดงในซีรัมหรือพลาสมา สามารถอ่านตัวอักษรในหนังสือพิมพ์ได้แต่ไม่คมชัดเท่า 3+ สีชมพูเข้ม-แดงในซีรัมหรือพลาสมา ตัวอักษรในหนังสือพิมพ์ปรากฏไม่ชัด 4+ สีมะฮอกกานีแดงเข้มในซีรัมหรือพลาสมา ไม่สามารถอ่านตัวอักษรในหนังสือพิมพ์ได้ ***หมายเหตุ:*** เซลล์เม็ดเลือดแดงที่แตกทำให้ซีรัมหรือพลาสมามีลักษณะที่มีสีแต่ใสในขณะที่การปนเปื้อนด้วยเม็ดเลือดแดงทำให้ซีรัมหรือพลาสมามีลักษณะขุ่น
HI-FBS	ซีรั่มจากตัวอ่อนวัวที่ทำให้หมดฤทธิ์ด้วยความร้อน (Heat Inactivated Fetal Bovine Serum)
HPTN	เครือข่ายการทดลองการป้องกัน HIV (HIV Prevention Trials Network)
HVTN	เครือข่ายการทดลองวัคซีนสำหรับ HIV (HIV Vaccine Trials Network)
มีลักษณะของดีซ่าน (Icteric)	พลาสมาที่มีสีออกเขียวหรือส้มซึ่งบ่งบอกว่ามีบิลิรูบินที่เพิ่มขึ้น
IMPAACT	เครือข่ายการทดลองทางคลินิกสากลเกี่ยวกับเอดส์ในมารดา เด็ก และวัยรุ่น (International Maternal Pediatric Adolescent AIDS Clinical Trials Network)
LDMS	ระบบการจัดการข้อมูลทางห้องปฏิบัติการ (Laboratory Data Management System)
MTN	เครือข่ายการทดลองสารฆ่าจุลชีพ (Microbicide Trials Network)
PBMC	เซลล์เม็ดเลือดชนิดนิวเคลียสเดียว (Peripheral Blood Mononuclear Cells)
PBS	น้ำเกลือที่มีฟอสเฟตเป็นบัฟเฟอร์ (Phosphate-buffered saline)
PTID/PID	หมายเลขประจำตัวผู้เข้าร่วมโครงการ (Participation Identification Number)
QS	ทำให้มีปริมาณที่เพียงพอ (Quantity Sufficient)— เติมปริมาณที่เพียงพอของของเหลวเพื่อให้ได้ปริมาตรที่กำหนด
อุณหภูมิห้อง (Room Temperature, RT)	15 ถึง 30°ซ
ปริมาตรของเลือดครบส่วนที่ใช้ได้	ปริมาตรของเลือดครบส่วนที่ถูกดำเนินการจริง (ปริมาตรของเลือดครบส่วนที่ใช้ได้อาจไม่เท่ากับความจุของหลอด)
สถานที่เก็บรักษาในเฟสที่เป็นไอระเหย	สถานที่เก็บรักษาในเฟสที่เป็นไอระเหยของไนโตรเจนเหลว (LN2) คือพื้นที่ว่างในถังเก็บรักษาที่อยู่เหนือของเหลว LN2 ที่ด้านล่างของถัง
WDR	สารทำปฏิกิริยาสำหรับการล้างและการเจือจาง (Wash Diluent Reagent) (HBSS หรือ PBS)

23 เอกสารอ้างอิง

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

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

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

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

23.5 Immunovirology Research Network (IVRN) Laboratory Manual: Separation and storage of serum, plasma and PBMCs. IVRN. Dec 12 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., and Casimiro B.R. Enhanced rates and magnitude of immune responses detected against an HIV vaccine: effect of using an optimized process for isolating PBMC. AIDS Res Hum Retroviruses 23:86-92 (2007).

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, Dated 2003-09.

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

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, and Tustin NB. Optimization of storage and shipment of cryopreserved peripheral blood mononuclear cells from HIV-infected and uninfected individuals for ELISPOT assays. J Immunol Methods. 363(1):42-50 (2010).

24 เอกสารเพิ่มเติม (เพื่อเก็บรักษาโดยห้องปฏิบัติการ)

24.1 เอกสารกำกับสำหรับ FBS และหนังสือรับรองการวิเคราะห์

24.2 เอกสารกำกับสำหรับ WDR (HBSS หรือ PBS)

24.3 เอกสารกำกับสำหรับตัวกลางสำหรับการทำเกรเดียนต์ของความหนาแน่น

24.4 เอกสารกำกับสำหรับหลอดสำหรับการแยกเซลล์ที่มีตัวกั้นแบบฟริต

25 ภาคผนวก

25.1 ภาคผนวก ก: ตารางงานสำหรับการดำเนินการกับ PBMC ที่กำหนดให้มีโดย HVTN

นอกจากนี้ยังได้จัดให้มีภาคผนวก ก ในรูปแบบที่ดาวน์โหลดได้และแก้ไขได้บนเว็บไซต์สาธารณะของ HANCที่ http://www.hanc.info/labs/Pages/PBMCSOP.aspx

25.2 ภาคผนวก ข: บันทึกการเปลี่ยนไอโซโพรพานอลของ NALGENE® Mr. Frosty ที่ให้ไว้เป็นตัวอย่าง

25.3 ภาคผนวก ค: การแก้ปัญหา: การเก็บ PBMC ในกรณีที่ไม่มีแถบ PBMC ที่ชัดเจนหลังจากการปั่นแยกเกรเดียนต์ของความหนาแน่น

25.4 ภาคผนวก ง: การรวมชั้นบัฟฟี่โค้ตสำหรับการแยก PBMC ด้วยตัวกลางสำหรับการทำเกรเดียนต์ของความหนาแน่น

25.5 ภาคผนวก จ: คู่มือฉบับย่อสำหรับ SOP สำหรับ PBMC แบบข้ามเครือข่าย—CSTFB

25.6 ภาคผนวก ฉ: คู่มือฉบับย่อสำหรับ SOP สำหรับ PBMC แบบข้ามเครือข่าย—วิธีการใส่ด้านบนด้วยมือ

25.7 ภาคผนวก ซ: สารทำปฏิกิริยาที่ให้ไว้เป็นตัวอย่าง

25.8 ภาคผนวก ซ: ประวัติการแก้ไข

ภาคผนวก ก: ตารางงานสำหรับการดำเนินการกับ PBMC *ของ* HVTN

ห้องปฏิบัติการที่ดำเนินการกับสิ่งส่งตรวจ:

หมายเลขประจำตัวผู้เข้าร่วมโครงการ (PTID): การนัดตรวจ: โครงการวิจัย:

วันที่เก็บ: เวลา:

วันที่เริ่มการดำเนินการ: เวลา: ดำเนินการโดย:

สารทำปฏิกิริยา/บริษัทผู้ผลิต	หมายเลขชุดที่ผลิต			วันหมดอายุ
DMSO (บริษัทผู้ผลิต:_____)				
FBS (บริษัทผู้ผลิต.:_____)				
HBSS หรือ WDR อื่นๆ (บริษัทผู้ผลิต.:_____)				
หลอดสำหรับการแยกเซลล์ (บริษัทผู้ผลิต.:_____)				
ตัวกลางสำหรับการทำเกรเดียนต์ของความหนาแน่น (บริษัทผู้ผลิต.:_____)				
	ปริมาตรในหน่วย มล.			
CPS	CPS	DMSO	FBS	1 วันทำการ

ข้อมูลที่จะเก็บในระหว่างการดำเนินการ	ตัวอย่าง
ชนิดของหลอดเก็บตัวอย่าง (วงกลมหนึ่งอย่าง)	NaHep / ACD / EDTA อื่นๆ: _____
สภาวะของเลือด (วงกลมหนึ่งอย่างหรือมากกว่านั้น)	ปกติ/เม็ดเลือดแดงแตก/ จับตัวเป็นลิ่ม
หากมีการระบุไว้ในคำแนะนำของโครงการวิจัยหรือคำแนะนำในการดำเนินการ เก็บพลาสมาก่อนที่จะดำเนินการกับ PBMC แทนที่ปริมาตรของพลาสมาด้วย HBSS/WDR ระบุว่ามีการเก็บ	มี ไม่มี
ปริมาตรของเลือดครบส่วนที่ใช้ได้	มล.
ระบุวิธีการดำเนินการ: ตัวกั้นแบบฟริต การใส่ด้านบน/การใส่ด้านล่างด้วยมือ หรือการรวมบัฟฟี่โค้ต	
วิธีการนับ (ชื่อของเครื่องมือหรือการนับด้วยมือ)	
ปริมาตรที่แขวนลอยใหม่เพื่อการนับของ HBSS (หรือ WDR อื่นๆ) (V)	มล.
ความเข้มข้นเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ (C)	x 10^6 เซลล์/มล.
จำนวนเซลล์ทั้งหมด (T) = C x V	x 10^6 เซลล์
คำนวณเซลล์ที่ได้/มล. ของเลือดครบส่วน (การตรวจสอบคุณภาพ)= (T/ปริมาตรของเลือดครบส่วนที่ใช้ได้)	x 10^6 เซลล์/มล.
คำนวณปริมาตรที่แขวนลอยใหม่ของ CPS ที่ประมาณไว้ ***(V1)=(T/15x10^6 เซลล์/มล.)(1 มล.)***	มล.
คำนวณปริมาตรที่แขวนลอยใหม่ของ CPS ขั้นสุดท้าย (V_f), ปัดลงให้เป็นค่ามล. เต็มที่ใกล้ที่สุด	มล.
คำนวณจำนวนของเซลล์ที่แท้จริงต่อหลอด N***2*** = (T/V_f) x V2, (v2=1 มล. สำหรับโครงการวิจัยของ HVTN ส่วนใหญ่)	x 10^6 เซลล์/หลอด
วันที่และเวลาที่แช่แข็ง (อธิบายในส่วนความคิดเห็นหากไม่อยู่ภายใน 4 ชั่วโมงหลังจากเวลาที่เริ่มการดำเนินการ)	
พิมพ์และตรวจสอบคุณภาพเนื้อหา/บาร์โค้ดของฉลากของ LDMS (ชื่อย่อของบุคคลที่ดำเนินการตรวจสอบคุณภาพ)	
จำนวนของหลอดสำหรับการแช่แข็งที่แช่แข็งจริง ***หมายเหตุ:*** ควรเท่ากับปริมาตรที่แขวนลอยใหม่เพื่อการแช่แข็งสำหรับส่วนลงตัวที่เป็น 1 มล.	

กรอกข้อมูลใน LDMS ที่เหลือให้เสร็จสิ้น ซึ่งรวมถึงจำนวนเซลล์ทั้งหมดและเวลาที่แช่แข็ง	

ภาคผนวก ก: ตารางงานสำหรับการดำเนินการกับ PBMC *ของ* HVTN

ห้องปฏิบัติการที่ดำเนินการกับสิ่งส่งตรวจ:

PTID:

จำนวนของหลอดสำหรับการแช่แข็งที่แช่แข็งจริง	
บุคคลที่ขนย้ายหลอดสำหรับการแช่แข็งไปยังสถานที่เก็บกล่องสำหรับการเก็บรักษาที่กำหนดโดย LDMS	
วันที่ (วว/ดด/ปปป)/เวลาที่หลอดสำหรับการแช่แข็งถูกขนย้ายจากอุปกรณ์ทำความเย็นในอัตราช้าๆ ไปยังกล่องสำหรับการเก็บรักษา (ตัวอย่างจะต้องถูกรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -70/-80°ซ ในระหว่างการขนย้าย)	
ผู้ตรวจสอบที่ดำเนินการตรวจสอบขั้นสุดท้าย (ผู้ตรวจสอบ/วันที่)	

การนับด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์	จำนวนทั้งหมด	เซลล์ที่มีชีวิต	ที่ไม่มีชีวิต	
สี่เหลี่ยมจัตุรัส #1 (เซลล์/มม.^{2})				
สี่เหลี่ยมจัตุรัส #2 (เซลล์/มม.^{2})				
สี่เหลี่ยมจัตุรัส #3 (เซลล์/มม.^{2})				
สี่เหลี่ยมจัตุรัส #4 (เซลล์/มม.^{2})				
จำนวนเซลล์เฉลี่ยต่อสี่เหลี่ยมจัตุรัส (เซลล์/มม.^{2})				
แฟคเตอร์ในการเจือจาง PBMC (PBMC Dilution Factor) (1:DF*)				
แฟคเตอร์ของฮีมาไซโตมิเตอร์สำหรับเซลล์/มล.	10^4	10^4	10^4	
ความเข้มข้นของจำนวนเซลล์ (C) = (เซลล์เฉลี่ย/มม.2)(DF)(10^4) เปลี่ยนไปเป็น 10^6 เซลล์/มล.	x 10^6เซลล์/มล.	x 10^6เซลล์/มล.	x 10^6เซลล์/มล.	
% ความมีชีวิต = (เซลล์ที่มีชีวิต/เซลล์ทั้งหมด)(100)	ไม่เกี่ยวข้อง		ไม่เกี่ยวข้อง	ไม่เกี่ยวข้อง

การนับเซลล์อัตโนมัติ (103/µl=106/มล.)	การนับ #1			
จำนวนเซลล์ (C) ในรูปเซลล์ x 10^6/มล.				
แฟคเตอร์ในการเจือจาง PBMC (1:DF*)				
ความเข้มข้นของเซลล์ = (C)(DF)	x 10^6เซลล์/มล.			

****หมายเหตุ:*** แฟคเตอร์ในการเจือจาง (DF) = (ส่วนของเซลล์ + ส่วนของของเหลวสำหรับการเจือจาง)/ ส่วนของเซลล์

ความคิดเห็นและการเบี่ยงเบนจากระเบียบวิธีของโครงการวิจัย

ภาคผนวก ข: บันทึกการเปลี่ยนไอโซโพรพานอลของ NALGENE® Mr. Frosty *ที่ให้ไว้เป็นตัวอย่าง*

<u>จะต้องเปลี่ยนไอโซโพรพานอลทุกรอบที่ห้าของรอบของการแช่แข็ง/การละลาย</u>

วันที่ใช้	การเปลี่ยนไอโซโพรพานอล (มี/ไม่มี)	ชื่อย่อ	วันที่ใช้	การเปลี่ยนไอโซโพรพานอล (มี/ไม่มี)	ชื่อย่อ

ภาคผนวก ค: การแก้ปัญหา: การเก็บ PBMC *ในกรณีที่ไม่มีแถบ* PBMC *ที่ชัดเจนหลังจากการปั่นแยกเกรเดียนต์ของความหนาแน่น*

ค.1 ที่มา:

หากมีบางสิ่งผิดไปในระหว่างการปั่นแยกเกรเดียนต์ของความหนาแน่นของเลือด ตัวกลางสำหรับการทำเกรเดียนต์ของความหนาแน่นและชั้นของพลาสมาจะไม่แยกกันอย่างชัดเจนและท่านอาจไม่เห็นชั้น PBMC อย่าตกใจ การเก็บ PBMC บางส่วนสามารถทำได้ด้วยขั้นตอนเพิ่มเติม

ค.2 ระบุปัญหา:

ค.2.1 นำหลอดออกจากเครื่องปั่นแยกและย้ายไปยังชั้นวาง

ค.2.2 พยายามระบุว่าเพราะเหตุใดจึงไม่มีชั้น PBMC ที่ชัดเจน สาเหตุที่เป็นไปได้ถูกแสดงไว้ด้านล่าง:

ค.2.2.1 หลอดถูกทำตกหรือถูกกระแทก
ค.2.2.2 เบรกเปิดอยู่
ค.2.2.3 ความเร็วในการปั่นแยกสูงเกินไป ตรวจสอบยืนยันว่าการตั้งค่า rpm นั้นถูกต้องสำหรับขั้นตอนที่ใช้ (CSTFB หรือการแยกเซลล์ด้วยมือโดยใช้เกรเดียนต์ของความหนาแน่น) ด้วยการตรวจสอบผัง RCF/rpm สำหรับโรเตอร์ เครื่องปั่นแยกบางเครื่องจำเป็นต้องมีการตั้งค่าบนเครื่องปั่นแยกที่ตรงกับชนิดของถ้วยใส่หลอดที่ใช้ หากการตั้งค่าไม่ถูกต้อง เครื่องปั่นแยกอาจคำนวณความเร็วของมันผิดไป
ค.2.2.4 เครื่องปั่นแยกหยุดเนื่องจากมีการหยุดจ่ายไฟ
ค.2.2.5 ฟริตหลุดออกจากที่ (การเป็นเช่นนี้มักจะเกิดขึ้นเนื่องจากความเร็วในการปั่นแยกสูงเกินไป แต่บางครั้งก็มีหลอดที่ชำรุดอยู่ในชุด)
ค.2.2.6 เครื่องปั่นแยกไม่สมดุล
ค.2.2.7 ผู้ให้เลือดมีจำนวนลิมโฟไซต์ เม็ดเลือดขาว หรือฮีมาโตคริตต่ำ

ค.3

จากสาเหตุข้างต้น สาเหตุห้าประการแรกนั้นแก้ไขได้โดยง่าย หากสาเหตุมาจากเครื่องปั่นแยกที่ไม่สมดุล หาว่าเพราะเหตุใดเครื่องปั่นแยกจึงไม่สมดุล ตรวจสอบสิ่งต่อไปนี้:

ค.3.1 ตรวจสอบว่าหลอดสมดุลหรือไม่

ค.3.2 ตรวจสอบว่าถ้วยใส่หลอดของเครื่องปั่นแยกสมดุลหรือไม่

ค.3.3 ตรวจสอบว่าแขนและถ้วยใส่หลอดของเครื่องปั่นแยกได้รับการใส่จาระบีและน้ำมันอย่างเหมาะสม

หมายเหตุ: หากมีความไม่แน่ใจเกี่ยวกับเครื่องปั่นแยกเครื่องใดเครื่องหนึ่ง ให้ใช้เครื่องอื่น

ค.4 โดยถือว่าปัญหาได้รับการแก้ไขแล้ว ปั่นแยกตัวอย่างใหม่ดังนี้:

ค.4.1 สารทำปฏิกิริยา:

ค.4.1.1 ตัวกลางสำหรับการทำเกรเดียนต์ของความหนาแน่น
ค.4.1.2 หลอดขนาด 50 มล.
ค.4.1.3 ปิเปต

ค.4.2 วิธีการ:

หมายเหตุ: ตัวกลางสำหรับการทำเกรเดียนต์ของความหนาแน่นเป็นพิษต่อเซลล์ ดังนั้นให้ดำเนินการอย่างมีประสิทธิภาพ

ค.4.2.1 เติมตัวกลางสำหรับการทำเกรเดียนต์ของความหนาแน่น 15 มล. ลงไปในหลอดขนาด 50 มล. ที่ปราศจากเชื้อ (ที่ไม่ใช่ CSTFB)

ค.4.2.2 ปล่อยให้ตัวกลางสำหรับการทำเกรเดียนต์ของความหนาแน่นอุ่นขึ้นจนถึงอุณหภูมิห้องในขณะที่ดำเนินการกับตัวอย่าง

ค.4.2.3 สำหรับหลอดที่ผสมแล้วแต่ละหลอด ติดฉลาก PTID ใส่หลอดขนาด 50 มล. ใช้ปิเปตนำเอาส่วนของตัวอย่างที่ผสมแล้วออกจากการแยกหรือ
CSTFB อย่างช้าๆ (โดยทั่วไป ฟริตของ CSTFB จะหลุดออกจากที่)

ค.4.2.4 ถ่ายตัวอย่างที่ผสมแล้วเป็นปริมาตรไม่เกิน 30 มล. ไปยังหลอดที่มีตัวกลางสำหรับการทำเกรเดียนต์ของความหนาแน่น

ค.4.2.5 ดำเนินการในขั้นตอนนี้ซ้ำสำหรับตัวอย่างที่ผสมแล้วทั้งหมด

ค.4.2.6 วางหลอดลงในเครื่องปั่นแยก โดยตรวจสอบให้แน่ใจว่าหลอดสมดุล

ค.4.2.7 ปั่นแยกเป็นเวลา 30 ถึง 40 นาทีที่ 400 x g โดยปิดเบรก ที่อุณหภูมิ 15 ถึง 30°ซ

ค.4.2.8 ขณะนี้ควรมองเห็นชั้น PBMC ได้ (บ่อยครั้งจะมีการสูญเสียเซลล์บางส่วนไป ดังนั้นชั้นดังกล่าวอาจจะบางได้)

ค.4.2.9 ชั้นบนสุด ซึ่งเป็นพลาสมาที่มีแนวโน้มจะถูกปนเปื้อนด้วยตัวกลางสำหรับการทำเกรเดียนต์ของความหนาแน่น
อาจถูกเก็บมาในขั้นนี้และดำเนินการดังในส่วนของ 'การแยก PBMC และพลาสมา' และ 'การเก็บรักษาพลาสมา' ของระเบียบวิธีของโครงการวิจัยหลัก อย่างไรก็ตาม จะต้องกรอกข้อมูลที่ว่าตัวอย่างพลาสมานี้มีแนวโน้มที่จะถูกปนเปื้อนด้วยตัวกลางสำหรับการทำเกรเดียนต์ของความหนาแน่นในส่วนของความคิดเห็นสำหรับตัวอย่างนี้ใน LDMS

ค.4.2.10 ถ่ายชั้น PBMC อย่างระมัดระวังไปยังหลอดสำหรับการปั่นแยกที่มีก้นรูปกรวยขนาด 50 มล. ที่ติดฉลากไว้ด้วยตัวระบุ PTID ใช้หลอดใหม่หนึ่งหลอดสำหรับหลอดของตัวกลางสำหรับการทำเกรเดียนต์ของความหนาแน่นทุกหลอด

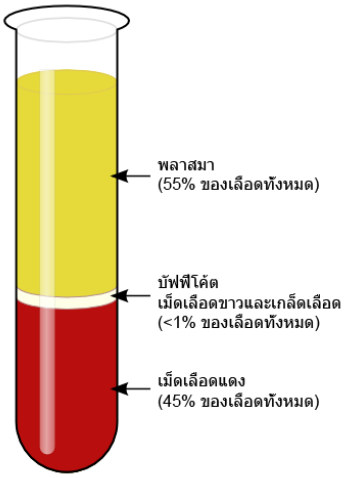
ค.4.2.11 ปิดฝาหลอดของตัวกลางสำหรับการทำเกรเดียนต์ของความหนาแน่นอีกครั้ง

ค.4.2.12 กลับไปที่บทที่ 15 ของระเบียบวิธีของโครงการวิจัยหลัก

หมายเหตุ: ในส่วนของ “ความคิดเห็นและการเบี่ยงเบนไปจากระเบียบวิธีของโครงการวิจัย” ของ**ตารางงานสำหรับการดำเนินการกับ** PBMC บันทึกรายละเอียดของการเบี่ยงเบนไปจาก SOP (กล่าวคือ ที่ได้ดำเนินการขั้นตอนจาก “ภาคผนวก ข” เพื่อเก็บ PBMC เนื่องจากไม่มีชั้น PBMC หลังจากการปั่นแยกเกรเดียนต์ของความหนาแน่น) นอกจากนี้ บันทึกว่าใช้เวลาในการปั่นแยกอีกครั้งนานเท่าใด เพื่อจะได้ประมาณว่าเซลล์อยู่ในตัวกลางสำหรับการทำเกรเดียนต์ของความหนาแน่นนานเท่าใด อีกทั้งบันทึกไว้ด้วยว่าตัวอย่างพลาสมาที่เก็บมาได้นั้นมีแนวโน้มที่จะถูกปนเปื้อนด้วยตัวกลางสำหรับการทำเกรเดียนต์ของความหนาแน่นใน**ตารางงานสำหรับการดำเนินการกับ** PBMC และในส่วนของความคิดเห็นของการกรอกข้อมูลใน LDMS สำหรับสิ่งส่งตรวจที่เป็นพลาสมา

ภาคผนวก ง: การรวมชั้นบัฟฟีโค้ตสำหรับการแยก PBMC *ด้วยตัวกลางสำหรับการทำเกรเดียนต์ของความหนาแน่น*

สามารถใช้ขั้นตอนนี้เมื่อแยก PBMC จากหลอดเลือดหลายหลอดของ PTID-
สารต้านการแข็งตัวของเลือดชุดเดียวกัน ขั้นตอนนี้ทำให้เราสามารถรวมชั้นบัฟฟีโค้ตเข้าด้วยกันเพื่อลดการใช้สารทำปฏิกิริยาและสิ่งที่ใช้แล้วหมดไป เพิ่มจำนวนเซลล์ที่เก็บมาได้ และลดการปนเปื้อน
บัฟฟีโค้ตคือส่วนของเลือดครบส่วนที่ใส่สารต้านการแข็งตัวของเลือดซึ่งมีเซลล์เม็ดเลือดขาว (white blood cells, WBC) และเกล็ดเลือด และเกิดขึ้นหลังจากการปั่นแยกตรงรอยต่อระหว่างชั้นพลาสมาและชั้นเซลล์เม็ดเลือดแดง พบ WBC
ส่วนใหญ่ในชั้นเคลือบบัฟฟี โดยมีเพียงส่วนที่น้อยมาก (ทั้งหมด <1 ล้านเซลล์)
เหลืออยู่ในแพคเซลล์เม็ดเลือดแดงหลังจากเก็บชั้นเคลือบบัฟฟี
ที่ยังคงอยู่ในเซลล์เม็ดเลือดแดงที่อัดแน่นหลังจากการเก็บบัฟฟีโค้ตไปแล้ว ชั้นบัฟฟีโค้ตจะถูกเก็บพร้อมกับพลาสมาและเซลล์เม็ดเลือดแดงในปริมาณเล็กน้อย
(ประมาณ 1.5 มล.) และจากนั้นจะถูกเจือจางก่อนที่จะนำไปใส่ด้านบนตัวกลางสำหรับการทำเกรเดียนต์เพื่อการแยกลิมโฟไซต์
<u>ขั้นตอน:</u>



D1. ตรวจสอบให้แน่ใจว่าท่านได้ดำเนินการในขั้นตอน 16.4.1 จนถึง 16.4.3 แล้ว

D2. ปั่นแยกเลือดครบส่วนที่ 200 ถึง 400 x g เป็นเวลา 10 นาที

D3. เก็บพลาสมา (และเก็บรักษาไว้ตามความจำเป็น - ดู 16.3.4 ถึง 16.3.7) จากแต่ละหลอดจนถึงภายในประมาณ 5 มม. จากชั้นบัฟฟีโค้ต
(ซึ่งจะเห็นได้อย่างชัดเจนในผู้ป่วยส่วนใหญ่ นอกเสียจากว่าผู้ป่วยมีภาวะนิวโทรฟิล/ลิมโฟไซต์ต่ำอย่างรุนแรง)

D4. หาความจุและจำนวนของหลอดสำหรับการปั่นแยกที่มีก้นรูปกรวยที่จะต้องใช้สำหรับ
PTID-สารต้านการแข็งตัวของเลือดแต่ละชุด ห้ามรวมตัวอย่างจาก PTID/
สารต้านการแข็งตัวของเลือดที่แตกต่างกัน โดยทั่วไปแล้ว:

- บัฟฟีโค้ตจากหลอดเก็บเลือดขนาด 10 มล. สองหลอดสามารถรวมกันลงในหลอดสำหรับการปั่นแยกที่มีก้นรูปกรวยขนาด 15 มล. หนึ่งหลอดได้
- บัฟฟีโค้ตจากหลอดเก็บเลือดขนาด 10 มล. ไม่เกินหกหลอดสามารถรวมกันลงในหลอดสำหรับการปั่นแยกที่มีก้นรูปกรวยขนาด 50 มล. หนึ่งหลอดได้

D5. ทำฉลาก PTID ใส่ หลอดสำหรับการปั่นแยกที่มีก้นรูปกรวยแต่ละหลอด

D6. เติม WDR ลงไปยังหลอดสำหรับการปั่นแยกที่มีก้นรูปกรวยที่ปราศจากเชื้อแต่ละหลอด

ความจุของหลอดสำหรับการปั่นแยกที่มีก้นรูปกรวย (มล.)	**ปริมาตรของ** WDR **(มล.)**
15	3
50	10-15

D7. จับหลอดที่ถูกนำพลาสมาออกแล้ว (ซึ่งขณะนี้มีพลาสมาที่หลงเหลือเล็กน้อยและเซลล์ที่อัดแน่น) ให้ทำมุมประมาณ 30° องศา

D8. ใช้ปิเปตโพลีโพรพิลีนแบบใช้แล้วทิ้งที่ปราศจากเชื้อขนาด 2.5 มล. ซึ่งมีรูกว้างเพื่อเก็บบัฟฟีโค้ต ดูดบัฟฟีโค้ตโดยขยับด้านล่างของหลอดให้ต่ำลง ดูดพลาสมาช้าๆ ตามด้วยบัฟฟีโค้ตซึ่งจะ "เลื่อน" ลงไปตามชั้นเซลล์เม็ดเลือดแดงที่อัดแน่น (สิ่งที่ดูดได้ประมาณ 1.5 มล.) ถ่ายบัฟฟีโค้ตไปยังหลอดที่มี WDR ล้างปิเปต 2 ถึง 3 ครั้งด้วยสารแขวนลอยของ WDR/เซลล์

D9. เก็บและรวมบัฟฟีโค้ตจากหลอดที่เหลือสำหรับชุด PTID-สารต้านการแข็งตัวของเลือดนั้น

D10. Q.S. สารแขวนลอยของ WDR/เซลล์ด้วย WDR เพิ่มเติมจนได้ปริมาตรที่ต้องการสำหรับการดำเนินการแยกเซลล์โดยใช้เกรเดียนต์ของความหนาแน่น ค่อยๆ ผสมบัฟฟีโค้ตที่รวมกัน 3 ถึง 4 ครั้งด้วยปิเปต

D11. ดำเนินการแยกเซลล์โดยใช้เกรเดียนต์ของความหนาแน่นต่อที่ขั้นตอน 16.4.6 ของ SOP สำหรับ 16.4.6 คำว่า “ เลือดที่ถูกเจือจางแล้ว” หมายถึง “บัฟฟีโค้ต”

<u>วัสดุเพิ่มเติมที่จำเป็น:</u> ปิเปตโพลีโพรพิลีนที่ปราศจากเชื้อขนาด 2.5 มล. ซึ่งมีรูกว้าง

ภาคผนวก จ: คู่มือฉบับย่อสำหรับ SOP *สำหรับ* PBMC—CSTFB

กำหนดให้มีการใช้**ตารางงานสำหรับการดำเนินการกับ** PBMC และ LDMS ***สำหรับเครือข่ายทั้งหมด*** (ดูรายละเอียดในบทที่ 5) ก่อนที่จะใช้คู่มือฉบับย่อนี้เป็นครั้งแรก ให้แน่ใจว่าได้ทบทวนหมายเหตุและรายละเอียดที่สำคัญ และแนวทางที่จำเพาะต่อเครือข่ายใน SOP สำหรับ PBMC ฉบับสมบูรณ์แล้ว

ขั้นตอน (ปริมาณสำหรับปริมาตรตัวอย่างที่น้อยกว่าจะถูกทำให้เป็น*ตัวเอียง*)	**การอ้างอิงกับ** SOP
1. เตรียมและทำให้ CPS เย็น	11.2
2. เตรียมตัวอย่างเลือดครบส่วน สารทำปฏิกิริยา และวัสดุภัณฑ์	15.2
3. หากกำหนดให้มีพลาสมาในรูปส่วนลงตัวตามคำแนะนำของโครงการวิจัย: a. ปั่นแยกเลือดครบส่วนที่ 200 ถึง 400 x g เป็นเวลา 10 นาที b. ทำเครื่องหมายปริมาตรของเลือดทั้งหมดตรงกับพื้นผิวด้านบนสุดของเลือด จากนั้นถ่ายพลาสมาไปยังหลอดสำหรับการปั่นแยกที่มีก้นรูปกรวยขนาด 15 มล. หรือ 50 มล. สำหรับการดำเนินการต่อไป (800 ถึง 1200 x g เป็นเวลา 10 นาที อาจใช้เบรกหรือไม่ก็ได้) c. เติม WDR ในปริมาณที่เพียงพอเพื่อทำให้เลือดกลับคืนมามีปริมาตรของเลือดครบส่วนเดิม ผสมเบาๆ และดำเนินการกับ PBMC ต่อไป	15.3
4. เติม WDR 5 มล. (*2 มล.)* ลงไปใน CSTFB แต่ละหลอด 5. ถ่ายเลือด 12 ถึง 22 มล. (*4 ถึง 5 มล.*) ใส่ใน CSTFB ที่ติดฉลากไว้แล้ว 6. เติม WDR ที่ใช้ล้างหลอดและ WDR สุดท้ายลงไปใน CSTFB จนได้ไม่เกิน 30 มล. (*7.5 มล.*) (WDR + เลือดครบส่วน)	15.4
7. ปั่นแยกที่ 800 ถึง 1000 x g เป็นเวลา 15 นาทีที่อุณหภูมิ 15 ถึง 30°ซ โดย<u>ปิดเบรก</u> 8. ตรวจสอบหลอดเพื่อดูว่ามีปัญหาที่อาจเกิดขึ้นได้หรือไม่ 9. เก็บบัฟฟี่โค้ตจาก CSTFB แต่ละหลอดไปใส่ในหลอดสำหรับการปั่นแยกที่มีก้นรูปกรวยขนาด 50 มล.(*15 มล.*) หนึ่งหลอดที่เข้าคู่กัน	15.5
10. เติม WDR เพื่อ QS ให้ได้ปริมาตรทั้งหมด 45 มล. (*10 มล.*) และผสมเบาๆ 11. การล้างครั้งที่ #1—ปั่นแยกที่ 200 ถึง 400 x g เป็นเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิ 15 ถึง 30°ซ (อาจใช้เบรกหรือไม่ก็ได้) 12. ตรวจสอบหาตะกอนเซลล์! 13. ค่อยๆ เอาส่วนเหนือตะกอนออกโดยไม่ให้รบกวนตะกอนเซลล์	17.1
14. แขวนลอยตะกอนเซลล์ใหม่ใน WDR ในปริมาณเล็กน้อยเพื่อทำให้ได้เป็นสารแขวนลอยของเซลล์ที่เป็นเนื้อเดียว 15. รวมสารแขวนลอยของตะกอนไม่เกิน 4 ชุดลงในหลอดสำหรับการปั่นแยกที่มีก้นรูปกรวยขนาด 50 มล. (*2 ชุดลงในหลอดขนาด 15 มล.*) หนึ่งหลอด 16. เติม WDR ที่ใช้ล้างหลอดและ WDR สุดท้ายที่มีปริมาตร 45 มล. (*10 มล.*) ลงไปในหลอดของเซลล์ 17. การล้างครั้งที่ #2—ปั่นแยกที่ 200 ถึง 400 x g เป็นเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิ 15 ถึง 30°ซ (อาจใช้เบรกหรือไม่ก็ได้) 18. ตรวจสอบหาตะกอนเซลล์! 19. ค่อยๆ เอาส่วนเหนือตะกอนออกโดยไม่ให้รบกวนตะกอนเซลล์	17.2
20. คำนวณปริมาตรที่แขวนลอยใหม่เพื่อการนับของ WDR (V) 21. รวมตะกอนเซลล์ลงในหลอดเดียวโดยใช้ WDR ในปริมาตรที่แขวนลอยใหม่ นี่เป็นปริมาตรซึ่งเป็นพื้นฐานของจำนวนเซลล์ 22. นับและคำนวณจำนวนของเซลล์ทั้งหมด 23. คำนวณเซลล์ที่ได้ในหน่วยเซลล์/มล. ของเลือดครบส่วนที่ใช้ได้	17.3
24. คำนวณปริมาตรที่แขวนลอยใหม่ของ CPS ขั้นสุดท้าย ตรวจสอบการคำนวณ	17.4
25. ดำเนินการพิมพ์ การติดฉลาก และการตรวจสอบคุณภาพหลอดสำหรับการแช่แข็งให้เสร็จสิ้นก่อนการปั่นแยกขั้นสุดท้าย	17.5
26. ปั่นแยกที่ 200 ถึง 400 x g เป็นเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิ 15 ถึง 30°ซ (อาจใช้เบรกหรือไม่ก็ได้)	17.6

ขั้นตอน (ปริมาณสำหรับปริมาตรตัวอย่างที่น้อยกว่าจะถูกทำให้เป็น*ตัวเอียง*)	**การอ้างอิงกับ** SOP
27. ค่อยๆ เอาส่วนเหนือตะกอนออกโดยไม่ให้รบกวนตะกอนเซลล์ 28. ค่อยๆ แขวนตะกอนใหม่ใน CPS **ที่เย็น** (V_f) ในขณะที่หมุนหลอดเป็นวงกลมเพื่อให้มีการกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ ขอแนะนำให้ดำเนินการบนน้ำแข็ง 29. ค่อยๆ แบ่งให้ได้ CPS-เซลล์ในรูปส่วนลงตัว	17.7
30. ขนย้ายหลอดสำหรับการแช่แข็งทั้งหมดไปยังอุปกรณ์แช่แข็งที่มีอัตราการแช่แข็งที่ถูกควบคุมในทันที (≤10 นาที) และเริ่มการแช่แข็ง	17.8
31. หลังจากระยะเวลาที่เหมาะสม ขนย้ายหลอดสำหรับการแช่แข็งไปยังอุปกรณ์เก็บรักษาที่ศูนย์วิจัย และขนส่งภายในระยะเวลาที่กำหนดไว้โดยเครือข่าย	18
32. สำหรับ HVTN ตรวจสอบตารางงานสำหรับการดำเนินการกับ PBMC เพื่อดูความสมบูรณ์และความถูกต้อง	19.1

ภาคผนวก ฉ: คู่มือฉบับย่อสำหรับ SOP *สำหรับ* PBMC—*การใส่ด้านบนด้วยมือ*

กำหนดให้มีการใช้**ตารางงานสำหรับการดำเนินการกับ** PBMC และ LDMS ***สำหรับเครือข่ายทั้งหมด*** (ดูรายละเอียดในบทที่ 5) ก่อนที่จะใช้คู่มือฉบับย่อนี้เป็นครั้งแรก ให้แน่ใจว่าได้ทบทวนหมายเหตุและรายละเอียดที่สำคัญ และแนวทางที่จำเพาะต่อเครือข่ายใน SOP สำหรับ PBMC ฉบับสมบูรณ์แล้ว

ขั้นตอน (ปริมาณสำหรับปริมาตรตัวอย่างที่น้อยกว่าจะถูกทำให้เป็น*ตัวเอียง*)	**การอ้างอิงกับ** SOP
1. เตรียมและทำให้ CPS เย็น	11.2
2. เตรียมตัวอย่างเลือดครบส่วน สารทำปฏิกิริยา และวัสดุภัณฑ์	16.2
3. หากกำหนดให้มีพลาสมาในรูปส่วนลงตัวตามคำแนะนำของโครงการวิจัย: a. ปั่นแยกเลือดครบส่วนที่ 200 ถึง 400 x g เป็นเวลา 10 นาที b. ทำเครื่องหมายปริมาตรของเลือดทั้งหมดตรงกับพื้นผิวด้านบนสุดของเลือด จากนั้นถ่ายพลาสมาไปยังหลอดสำหรับการปั่นแยกที่มีก้นรูปกรวยขนาด 15 มล. หรือ 50 มล. สำหรับการดำเนินการต่อไป (800 ถึง 1200 x g เป็นเวลา 10 นาที อาจใช้เบรกหรือไม่ก็ได้) c. เติม WDR ในปริมาณที่เพียงพอเพื่อทำให้เลือดกลับคืนมามีปริมาตรของเลือดครบส่วนเดิม ผสมเบาๆ และดำเนินการกับ PBMC ต่อไป	16.3
4. ย้ายเลือดครบส่วนไปยังหลอดสำหรับการปั่นแยกที่มีก้นรูปกรวยขนาด 50 มล. (*15 มล.*) และเจือจางด้วย WDR ตามความจำเป็น 5. ใส่เลือดลงด้านบนของตัวกลางสำหรับการทำเกรเดียนต์ของความหนาแน่นอย่างระมัดระวังและอย่างช้าๆ (วิธีการใส่ด้านล่างเป็นทางเลือกหนึ่งที่ได้รับการอนุมัติ)	16.4
6. ปั่นแยกที่ 400xg เป็นเวลา 30 นาที โดยปิดเบรก 7. ตรวจสอบหลอดสำหรับการปั่นแยกที่มีก้นรูปกรวยแต่ละหลอดเพื่อดูว่ามีปัญหาที่อาจเกิดขึ้นได้หรือไม่ 8. เก็บบัฟฟีโค้ตจากแต่ละหลอดไปใส่ในหลอดสำหรับการปั่นแยกที่มีก้นรูปกรวยขนาด 50 มล.(*15 มล.*) หนึ่งหลอดที่เข้าคู่กัน	16.5
9. เติม WDR เพื่อ QS ให้ได้ปริมาตรทั้งหมด 45 มล. (*10 มล.*) และผสมเบาๆ 10. การล้างครั้งที่ #1—ปั่นแยกที่ 200 ถึง 400 x g เป็นเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิ 15 ถึง 30°ซ (อาจใช้เบรกหรือไม่ก็ได้) 11. ตรวจสอบหาตะกอนเซลล์! 12. ค่อยๆ เอาส่วนเหนือตะกอนออกโดยไม่ให้รบกวนตะกอนเซลล์	17.1
13. แขวนลอยตะกอนเซลล์ใหม่ใน WDR ในปริมาณเล็กน้อยเพื่อทำให้ได้เป็นสารแขวนลอยของเซลล์ที่เป็นเนื้อเดียว 14. รวมสารแขวนลอยของตะกอนไม่เกิน 4 ชุดลงในหลอดสำหรับการปั่นแยกที่มีก้นรูปกรวยขนาด 50 มล. (*2 ชุดลงในหลอดขนาด 15 มล.*) หนึ่งหลอด 15. เติม WDR ที่ใช้ล้างหลอดและ WDR สุดท้ายที่มีปริมาตร 45 มล. (*10 มล.*) ลงไปในหลอดของเซลล์ 16. การล้างครั้งที่ #2—ปั่นแยกที่ 200 ถึง 400 x g เป็นเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิ 15 ถึง 30°ซ (อาจใช้เบรกหรือไม่ก็ได้)	17.2

ขั้นตอน (ปริมาณสำหรับปริมาตรตัวอย่างที่น้อยกว่าจะถูกทำให้เป็น*ตัวเอียง*)	**การอ้างอิงกับ** SOP
17. ตรวจสอบหาตะกอนเซลล์! 18. ค่อยๆ เอาส่วนเหนือตะกอนออกโดยไม่ให้รบกวนตะกอนเซลล์	
19. คำนวณปริมาตรที่แขวนลอยใหม่เพื่อการนับของ WDR (V) 20. รวมตะกอนเซลล์ลงในหลอดเดียวโดยใช้ WDR ในปริมาตรที่แขวนลอยใหม่ นี่เป็นปริมาตรซึ่งเป็นพื้นฐานของจำนวนเซลล์ 21. นับและคำนวณจำนวนของเซลล์ทั้งหมด 22. คำนวณเซลล์ที่ได้ในหน่วยเซลล์/มล. ของเลือดครบส่วนที่ใช้ได้	17.3
23. คำนวณปริมาตรที่แขวนลอยใหม่ของ CPS ขั้นสุดท้าย ตรวจสอบการคำนวณ	17.4
24. ดำเนินการพิมพ์ การติดฉลาก และการตรวจสอบคุณภาพหลอดสำหรับการแช่แข็งให้เสร็จสิ้นก่อนการปั่นแยกขั้นสุดท้าย	17.5
25. ปั่นแยกที่ 200 ถึง 400 x g เป็นเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิ 15 ถึง 30°ซ (อาจใช้เบรกหรือไม่ก็ได้)	17.6
26. ค่อยๆ เอาส่วนเหนือตะกอนออกโดยไม่ให้รบกวนตะกอนเซลล์ 27. ค่อยๆ แขวนตะกอนใหม่ใน CPS **ที่เย็น** (V_f) ในขณะที่หมุนหลอดเป็นวงกลมเพื่อให้มีการกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ ขอแนะนำให้ดำเนินการบนน้ำแข็ง 28. ค่อยๆ แบ่งให้ได้ CPS-เซลล์ในรูปส่วนลงตัว	17.7
29. ขนย้ายหลอดสำหรับการแช่แข็งทั้งหมดไปยังอุปกรณ์แช่แข็งที่มีอัตราการแช่แข็งที่ถูกควบคุมในทันที (≤10 นาที) และเริ่มการแช่แข็ง	17.8
30. หลังจากระยะเวลาที่เหมาะสม ขนย้ายหลอดสำหรับการแช่แข็งไปยังอุปกรณ์เก็บรักษาที่ศูนย์วิจัย และขนส่งภายในระยะเวลาที่กำหนดไว้โดยเครือข่าย	18
31. สำหรับ HVTN ตรวจสอบตารางงานสำหรับการดำเนินการกับ PBMC เพื่อดูความสมบูรณ์และความถูกต้อง	19.1

ภาคผนวก ช: สารทำปฏิกิริยาและวัสดุภัณฑ์ที่ให้ไว้เป็นตัวอย่าง

หมายเหตุ: **จะต้องจัดซื้อสารทำปฏิกิริยาทั้งหมดในรูปที่ปราศจากเชื้อและกำหนดให้มีการใช้เทคนิคที่ปราศจากเชื้อ**

สารทำปฏิกิริยา/วัสดุภัณฑ์	**ตัวอย่าง**	**อาจเลือกใช้ได้/กำหนดให้มี**
หลอดสำหรับการแยกเซลล์ที่มีตัวกั้นแบบฟริต (CSTFB) ซึ่งมีการเติมสารไว้ล่วงหน้าที่มีตัวกลางสำหรับการทำเกรเดียนต์ของความหนาแน่น 1.077	• Accuspin™ System Histopaque®-1077 • Ficoll-Paque™ PLUS	อาจเลือกใช้ได้
CSTFB ที่แห้ง	• หลอดสำหรับการแยก Accuspin™ • หลอดสำหรับการแยก Leucosep®	อาจเลือกใช้ได้
ตัวกลางสำหรับการทำเกรเดียนต์ของความหนาแน่น 1.077	• Ficoll-Paque PLUS และ PREMIUM • Lymphoprep™ • ตัวกลางสำหรับการแยกลิมโฟไซต์ (Lymphocyte Separation Media) – LSM ™	อาจเลือกใช้ได้
ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) เกรดสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์	• Hybrimax, Sigma-Aldrich ประเภท# D2650 ที่ผ่านการทดสอบชีวพิษภายในตัว (endotoxin) และการทดสอบไฮบริโดมา (hybridoma)	อาจเลือกใช้ได้
ซีรัมจากตัวอ่อนวัว (FBS)		ACTG, IMPAACT ***และ***HPTN: ดูข้อมูลเกี่ยวกับชุดที่ผลิตที่รับรองความเที่ยงตรงโดย IQA ในปัจจุบัน HVTN ***และ***MTN: ใช้ชุดที่ผลิตที่รับรองความเที่ยงตรงโดย HVTN หากไม่สามารถเข้าถึงหรือนำเข้าชุดที่ผลิตที่ระบุโดย HVTN ตรวจสอบกับ HVTN/MTN เพื่อหาทางเลือกอื่นๆ
หลอดสำหรับการแช่แข็ง	• หลอดสำหรับการแช่แข็งโพลีโพรพิลีน Corning® ที่มีเกลียวอยู่ภายนอกขนาด 2 มล. ตั้งได้และมีก้นหลอดโค้งมน #430659 • หลอดโพลีโพรพิลีน (PP) Nunc CryoTubes™ ที่มีเกลียวอยู่ภายในและมีฝาเกลียว #377267 • หลอดสำหรับการแช่แข็งพลาสติก WHEATON Cryule® ที่มีเกลียวอยู่ภายนอก #985742 • หลอดขนาดเล็กแบบฝาเกลียว SARSTEDT ที่มีเกลียวอยู่ภายนอก #72.694.006	อาจเลือกใช้ได้ หมายเหตุสำหรับหลอดไมโครทิวป์ฝาเกลียว SARSTEDT: ผู้ผลิตให้การอนุมัติเป็นลายลักษณ์อักษรสำหรับการเก็บรักษาในที่เย็นสูงสุดถึง -86°ซ เท่านั้น แต่เครือข่ายมีข้อมูลประวัติเพียงพอที่พิสูจน์ยืนยันได้ว่าการใช้หลอดเหล่านี้สำหรับการถนอมรักษาด้วยการแช่แข็งของ PBMC ยังคงรักษาสภาวะปกติไว้ได้ ดังนั้น หลอดเหล่านี้ยังคงได้รับอนุมัติสำหรับการถนอมรักษาด้วยการแช่แข็งของ PBMC
ฉลากสำหรับการแช่แข็ง	• Cryo-Tags® และ Cryo-Babies® Brady B461 หรือ B490	อาจเลือกใช้ได้

	• ฉลากสำหรับตู้แช่แข็ง Shamrock	
ปากกาทำเครื่องหมาย	• ปากกาทำเครื่องหมาย Fisherband* #13-379 • Nalgene® ปากกาสำหรับห้องปฏิบัติการ/ปากกาทำเครื่องหมายสำหรับห้องปฏิบัติการ #6310/#6311	อาจเลือกใช้ได้

ภาคผนวก ซ: ประวัติการแก้ไข จากเวอร์ชั่น 5.0 ไปเป็น 6.0

เวอร์ชั่น วันที่มีผลบังคับใช้ (วว/ดด/ปป)	ความคิดเห็น	
6.0 30 เมษายน 2018	การอนุมัติ	Grace Aldrovandi ทำหน้าที่แทน Bob Coombs สำหรับการอนุญาต ACTG John Hural ทำหน้าที่แทน Constance Ducar สำหรับการอนุญาต HVTN Edward Livant ทำหน้าที่แทน Charlene Dezzutti สำหรับการอนุญาต MTN
	8.1.4	มีการเพิ่มเพียงข้อกำหนดเพิ่มเติมที่ได้รับในบันทึกเมื่อวันที่ 7 ตุลาคม 2016 สำหรับห้องปฏิบัติการของ ACTG และ IMPAACT เท่านั้น อีกทั้ง มีการเพิ่มข้อกำหนดที่เกี่ยวข้องกับขวดแช่แข็งเพิ่มเติมสำหรับเครือข่ายทั้งหมดด้วย
	18.2.1	มีการเพิ่มแนวทางเพิ่มเติมที่เกี่ยวข้องกับจุดตั้งอุณหภูมิแช่แข็งของตู้แช่แข็ง
	ภาคผนวก D	เปลี่ยน “WBC ส่วนมาก…” เป็น “WBC ส่วนใหญ่…”
	ภาคผนวก G	เพิ่มข้อมูลเพิ่มเติมในส่วนขวดแช่แข็งที่เกี่ยวข้องกับการใช้หลอดไมโครทิวป์ฝาเกลียว SARSTEDT
5.2 22 กันยายน 2014	5.1.3	เปลี่ยน"ห้องปฏิบัติการอาจใช้**ตารางงานสำหรับการดำเนินการกับ** PBMC **ของ** HVTN หรือปรับตารางงานดังกล่าวให้เหมาะสมกับขั้นตอนของห้องปฏิบัติการนั้น หากห้องปฏิบัติการเลือกที่จะสร้างตารางงานสำหรับการดำเนินการกับ PBMC และวัสดุในการติดตามเสริม(เช่น LDMS หรือตารางงานหรือบันทึกแยกต่างหาก) ของตนเองขึ้นมา ห้องปฏิบัติการจะใช้แนวทางด้านล่าง " เป็น " ห้องปฏิบัติการอาจใช้ HVTN PBMC ประมวลผลข้อมูลปรับเปลี่ยนไปตามข้อกำหนดของเครือข่ายที่สอดคล้อง และเหมาะสมสำหรับกระบวนงานของห้องปฏิบัติการ ถ้าเลือกห้องปฏิบัติการเพื่อพัฒนาตัวเองแผ่นแปรรูป PBMC และติดตามเสริมวัสดุ (เช่น LDMS หรือแผ่นงานที่แยกต่างหาก หรือล็อก) ห้องปฏิบัติการจะใช้แนวทางด้านล่าง"
5.1 30 กรกฎาคม 2014	5.1.3	แนวทางการติดตาม PBMC ประมวลผลแผนภูมิ-: รวมเซลล์หมายเลข: "(ไม่จำเป็นสำหรับ HVTN) " เข้ามาติดกับ N
	16.4.5	หมายเหตุถูกละเว้นเนื่องจากมีเป็นไม่ frit ในท่อทรงกรวยเมื่อทำการซ้อนทับด้วยตนเอง หรือ underlay
	16.4.6	ข้อมูลอ้างอิงสำหรับวิธีการโอเวอร์เลย์ถูกเปลี่ยน 16.4.6.1 และวิธี Underlay 16.4.6.2
	18.1	เพิ่มเวลาการเก็บและการย้ายสำหรับ HPTN, IMPAACT และ MTN.
	14, 18.1, 18.3, 18.3.1	เปลี่ยน "LN2 /-150° ซ กลแช่แข็ง" เป็น "LN2 dewar หรือ ตู้แช่แข็งเชิงกล (Mechanical Freezer) ที่มีอุณหภูมิ -150° ซ"
	18.3	ปรับภาษาการเก็บ PBMCs ในถัง LN2 dewar หรือตู้แช่แข็งเชิงกล (Mechanical Freezer) ที่มีอุณหภูมิ -150°ซ และยกเลิก "นานกว่า 4 สัปดาห์"
	18.3.1-18.3.2	เปลี่ยนเวลาการย้าย PBMC จาก "วันทำงานถัดไป" เป็น "ภายใน 72 ชั่วโมง"
	18.3.1	เปลี่ยน “LN2 /-150° ซ” เป็น “LN2 หรือ -150° ซ"
	22, 24.2	เลือก RPMI ถูกลบ
	ภาคผนวก E, F	การอ้างอิงขั้นตอน 1 SOP “11.3” การ “11.2”
	ภาคผนวก E	การอ้างอิงขั้นตอน 31 SOP “18 หรือ 19” การ “18”
	ภาคผนวก E	ขั้นตอนเปลี่ยนแปลง 32 SOP อ้างอิงจาก "19.2" ถึง "19.1"
	ภาคผนวก E	เปลี่ยนแปลงงบ 32 ขั้นตอนการ "กรอกข้อมูลประมวลผล PBMC โดยเครือข่าย"
	ภาคผนวก F	ขั้นตอน 9-12: เปลี่ยน “16.1” ถึง “17.1”

	ภาคผนวก F	ขั้นตอน 13-18: เปลี่ยน “16.2” ถึง“17.2”
	ภาคผนวก F	ขั้นตอน 19-22: เปลี่ยน “16.3” ถึง“17.3”
	ภาคผนวก F	การอ้างอิงขั้นตอน 30 SOP “18 หรือ 19” ถึง “18”
	ภาคผนวก F	ขั้นตอนเปลี่ยนแปลง 31 อ้างอิงจาก "19.2" ถึง "19.1"
	ภาคผนวก F	เปลี่ยนแปลงงบ 32 ขั้นตอนการ "กรอกข้อมูลประมวลผล PBMC โดยเครือข่าย"
5.0 1 พฤษภาคม 2014	การอนุมัติ	Grace Aldrovandi แทนที่ Susan Fiscus สำหรับการอนุญาต IMPAACT
	5.1.3	ผังแนวทางสำหรับการติดตามการดำเนินการกับ PBMC: คำแนะนำ: “L = กำหนดให้มีการติดตามใน LDMS โดย LDMS” เปลี่ยนเป็น “L= ฟิลด์ที่ต้องระบุใน LDMS สำหรับสิ่งส่งตรวจในเครือข่าย”
	5.1.3	ตารางแนวทางสำหรับการติดตามการดำเนินการกับ PBMC: “หมายเลขสิ่งส่งตรวจ LDMS” เปลี่ยนเป็น “ID สำหรับใช้ทั่วโลกของสิ่งส่งตรวจใน LDMS”
	5.1.3	ช่องที่เติมสีเทาเพื่อระบุว่าข้อมูลไม่จำเป็นต้องใช้นั้นเปลี่ยนจากสีเทาเป็นสีดำ
	7.1.8	เพิ่ม HPTN และ MTN
	10.2	ทางเลือกสำหรับการใช้ RMPI เป็นสิ่งทดแทนนั้นถูกเอาออก
	14	การเปลี่ยนแปลงการจัดรูปแบบ
	18 และ 19	รวมคำแนะนำเรื่องการจัดเก็บชั่วคราวหรือเก็บประจำที่แหล่งศึกษาจากสองส่วนให้เป็นหนึ่งส่วน ซึ่งคือส่วนที่ 18
	19	คำและประโยคที่ใช้อธิบายการดำเนินการที่ซ้ำกันในในส่วนที่ 18 และส่วนที่ 19 ถูกแยกและแยกเป็นส่วนเดียวโดดๆ
	ภาคผนวก ซ:	ลบการเปลี่ยนแปลงอื่นๆ ในประวัติเวอร์ชั่น เหลือเพียงการเปลี่ยนแปลงในเวอร์ชั่นปัจจุบันที่เหมาะสมกับเอกสารนี้เท่านั้น