



<b>Título:</b>	Processamento de PBMC interrede SOP v6.0		
<b>Data de origem:</b>	01 abril 2009	<b>Total de páginas:</b>	44
<b>Data de entrada em vigor:</b>	30 de abril de 2018	<b>Número SOP</b>	HANC-LAB-P0001 v6.0
<b>Escrito por:</b>	Cross-Network PBMC SOP Working Group	<b>Substitui SOP datado de:</b>	30 de agosto de 2014

	Network	Nome, Título	Assinatura	Data
<b>Aprovado por (Network):</b>	ACTG / IMPAACT	<b>Grace Aldrovandi, MD</b> Investigador principal do Laboratório da Rede ACTG / IMPAACT	 <u>Grace Aldrovandi (Apr 2, 2018)</u>	4/2/2018
	HPTN	<b>Estelle Piwowar-Manning, MT(ASCP)SI</b> HPTN Network Laboratory Diretor Interino	 <u>Estelle M Piwowar-Manning (Mar 27, 2018)</u>	3/27/2018
	HVTN	<b>John Hural, PhD</b> Diretor-associado HVTN para Operações Laboratoriais		4/23/2018
	MTN	<b>Edward Livant</b> Gerente de Pesquisa do Laboratório da Rede MTN		3/25/2018

<b>Histórico de revisão</b>	Para o histórico completo de revisões, ver Anexo H.
-----------------------------	---

	Nome, Título	Assinatura	Data
<b>Revisado por (Laboratório):</b>			

## Índice

1	Objetivo .....	3
2	Âmbito .....	3
3	Histórico .....	3
4	Autoridade e responsabilidade .....	3
5	Relatório de Resultados .....	3
6	Amostras .....	6
7	Equipamento .....	7
8	Descartáveis .....	8
9	Equipamento de Proteção Individual .....	9
10	Reagentes .....	9
11	Preparação do Reagente .....	11
12	Calibragem .....	13
13	Controle da qualidade .....	13
14	Processamento de PBMC Introdução e Diretrizes .....	14
15	Separação de Células e Diluição de Sangue por Tubo de Separação de Células com Barreira Porosa (CSTFB) com Reposição de Plasma .....	16
16	Separação de Células por Meio de Gradiente de Densidade Overlay ou Underlay e Diluição de Sangue por Separação Manual de Células por Gradiente de Densidade com Reposição de Plasma .....	20
17	Lavagem, Contagem, Ressuspensão, Concentração e Congelamento por Taxa-Controlada Overnight... ..	24
18	Armazenagem PBMC (Temporária ou no local) .....	28
19	Preenchimento do processamento de documentos .....	29
20	Cálculos .....	30
21	Limitações do Procedimento .....	30
22	Glossário de Termos .....	30
23	Referências .....	32
24	Documentos Adicionais (A serem mantidos pelo laboratório) .....	32
25	Anexos .....	32
	Anexo A: Planilha de Processamento HVTN PBMC .....	34
	Anexo B: Exemplo de Registro de Mudanças de Isopropanol NALGENE® Mr. Frosty .....	36
	Anexo C: Resolução de Problemas: Recuperação de PBMC na Ausência de Faixa PBMC Definida após Centrifugação de Gradiente de Densidade .....	37
	Anexo D: Unindo Camadas Leucoplaquetárias para Isolamento PBMC em Meio de Gradiente de Densidade .....	39
	Anexo E: Guia Rápido PBMC SOP — CSTFB .....	40
	Anexo F: Guia Rápido para PBMC SOP — Overlay Manual .....	41
	Anexo G: Exemplos de Reagentes e Suprimentos .....	42
	Anexo H: Histórico de revisão da versão 5.0 para 6.0 .....	43

\*O Anexo A também é fornecido na forma editável para download no website público da HANC em <http://www.hanc.info/labs/labresources/procedures/Pages/pbmcSop.aspx>.

## **1 Objetivo**

- 1.1 Este Procedimento Padrão de Operações (Standard Operating Procedure, SOP) descreve os procedimentos para o isolamento e criopreservação de Células Mononucleares de Sangue Periférico (Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMC) a partir de sangue total.

## **2 Âmbito**

- 2.1 Este procedimento deverá ser utilizado para o processamento de amostras de sangue para isolamento, criopreservação e armazenamento de amostras de PBMC. As instruções da Network para protocolo específico prevalecem sobre aquelas contidas neste SOP

## **3 Histórico**

- 3.1 PBMC coletadas frescas e criopreservadas são usadas para a avaliação de vacinas ou respostas imunológicas celulares induzidas por terapias antirretrovirais, mudanças na resposta imunológica associadas ao HIV e na recuperação de replicação de vírus competente. Esses ensaios requerem PBMC que tenham sido isoladas e criopreservadas sob condições estritas definidas que assegurem sua ótima recuperação, viabilidade e funcionalidade. Alguns estudos de validação indicam que é ideal para o sangue que seja processado e congelado em até 8 horas do momento de sua retirada para a manutenção de função máxima das células em ensaios de monitoração imunológica.

## **4 Autoridade e responsabilidade**

- 4.1 O Diretor de Laboratório Network (ou pessoa designada por ele) tem a autoridade para revisar e atualizar este procedimento.
- 4.2 O Coordenador da Network para HIV/AIDS (HIV/AIDS Network Coordination, HANC) é o responsável pela manutenção e controle de documentação de SOP.
- 4.3 O Diretor do Laboratório é o responsável pela implementação deste SOP HANC, ou por SOP de laboratório específico, e por assegurar que todo pessoal apropriado seja treinado. Um laboratório SOP precisa:
- Incluir, *sem modificação de procedimentos*, as partes da versão atual do PBMC para toda a rede para Processamento de SOP (Cross-Network PBMC Processing SOP) que seja utilizado em laboratório de centro afiliado à rede
  - Referenciar a versão atual do Cross-Network PBMC Processing SOP

**Observação:** Para laboratórios processando HVTN PBMCs, o laboratório terá que utilizar o SOP PBMC HANC tal como está redigido, ou a versão específica para HVTN do SOP HANC.

- 4.4 Todos os técnicos são responsáveis por ler e compreender este SOP antes de realizar os procedimentos descritos.

## **5 Relatório de Resultados**

- 5.1 O uso de uma Planilha de Procedimentos PBMC e o Sistema de Gerenciamento de Dados do Laboratório (Laboratory Data Management System, LDMS) é requerido para todas as redes para controlar o tempo de processamento, os cálculos e a documentação de problemas que surjam no processamento.

- 5.1.1 Requerimentos para todas as redes:

- Inserir dados no LDMS para a geração de etiquetas de frasco criogênico, documentação de localização de armazenamento e requisitos de manifesto de remessa. Ver a tabela abaixo para os detalhes dos requisitos.
- Enviar relatório de desvios de acordo com o protocolo de laboratório.

### 5.1.2 Requisitos para HVTN

É requerido o uso da Planilha de Processamento HVTN PBMC de modo completo. Se uma planilha específica para protocolo PBMC não for requerida nas “Instruções para Processamento de Protocolo Específico HVTN”, pode-se usar a planilha genérica do Anexo A e de <http://www.hanc.info/labs/labresources/procedures/Pages/pbmcSop.aspx>.

### 5.1.3 Requisitos para ACTG, IMPAACT, HPTN e MTN

- O laboratório pode usar a **Planilha de Processamento HVTN PBMC**, modificados para seguir os requisitos de rede correspondente e adequado para os procedimentos do laboratório. Se o laboratório decidir desenvolver sua própria Planilha de Processamento de PBMC e seus materiais de controle complementares (tais como as LDMS ou planilha ou registro em separado) o laboratório utilizará as diretrizes abaixo.
- As versões eletrônicas das Planilhas de Processamento PBMC editáveis e exemplos de materiais complementares para controle são fornecidas em <http://www.hanc.info/labs/labresources/procedures/Pages/pbmcSop.aspx> para download e modificação.

Diretrizes para Controlar o Processamento de PBMC		
Campo	Requisitos de Planilhas para ACTG, HPTN, IMPAACT, MTN* (HVTN: o uso completo da Planilha de Processamento HVTN PBMC é requerido.)	Requisitos LDMS para todas as Networks**
Laboratório de Processamento de Amostra	W	L
ID de participante	W	L
Número da consulta	W	L
Protocolo	W	L
ID Global de Amostras LDMS	W	[Automático]
Data/Hora do início do processamento	W	N
Processado por (técnico)	W	N
Método de contagem (nome do instrumento ou contagem manual)	W	
Contagem do volume de ressuspensão WDR (V)	W	
Contagem de concentração média de células (C)	W	
Número total de células (T) = C x V	W	N (opcional para HVTN)
Calcular o volume final de ressuspensão CPS (V <sub>f</sub> )	W	
Data e hora do congelamento	W	N

<b>Diretrizes para Controlar o Processamento de PBMC</b>		
<b>Campo</b>	<b>Requisitos de Planilhas para ACTG, HPTN, IMPAACT, MTN*</b> <small>(HVTN: o uso completo da Planilha de Processamento HVTN PBMC é requerido.)</small>	<b>Requisitos LDMS para todas as Networks**</b>
Comentários e Desvios de Protocolo, incluindo, mas não se limitando a: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Todas as condições não esperadas da amostra</li> <li>• Se o sangue estiver coagulado, número de tubos que contém coágulos, número total de tubos do lote PTID e detalhes do processamento de sangue coagulado</li> <li>• Fornecimento de células abaixo da faixa esperada</li> <li>• Anomalias de processamento</li> <li>• Passos tomados para resolução de problemas</li> <li>• Observar se o Tempo Total é &gt;8 horas</li> </ul>	W	O
Data/Hora da coleta	S	L
Reagentes (Fabricantes, Números de lote e Datas de validade para DMSO, FBS, WDR, CSTFB, meio de gradiente de densidade)	S	
CPS (Volume de DMSO e FBS)	S	
Tipo de tubo de amostra (NaHep/ACD/EDTA/outro)	S	L
Condições do sangue (p. ex.; SAT/HEM/CLT)	S	L
Volume de sangue total utilizável	S	L ("Volume")
Contagem de células	S	
Número real de células por recipiente	S	L
Número de frascos criogênicos congelados	S	L
Informação de armazenamento em freezer (Módulo de Armazenamento LDMS)	O	N
Confirmação de QC visual de reagentes (Técnico)	O	
Produção de células por mL de sangue total	O	
Volume de ressuspensão estimada CPS (V1)	O	
Confirmação de etiqueta QC LDMS para conteúdo/códigos de barra (Técnico)	O	
Confirmação de transferência de frascos criogênicos para local designado pelo LDMS para a caixa de armazenamento (Técnico)	O	
Data/hora em que frascos criogênicos foram transferidos do dispositivo de resfriamento lento para a caixa de armazenamento.	O	
Revisão Final revisor/data	O	

\* W = Requer controle em Planilha de Processamento PBMC

S = Controle requerido, mas materiais complementares de controle podem ser usados (tais como a LDMS ou outra planilha ou registro)

O = Controle em planilha ou em material complementar de controle é opcional

\*\* L = Campos obrigatórios em LDMS para amostras de rede

N = Controle na LDMS é requerido pelas redes

O = Controle na LDMS é opcional

## 6 Amostras

### 6.1 Preparação do paciente

Nenhuma

### 6.2 Tipo de amostra

Sangue total anticoagulado colhido em tubos de coleta de sangue

### 6.3 Volume Ótimo/Mínimo de Amostra

Volume de sangue requerido determinado por protocolo

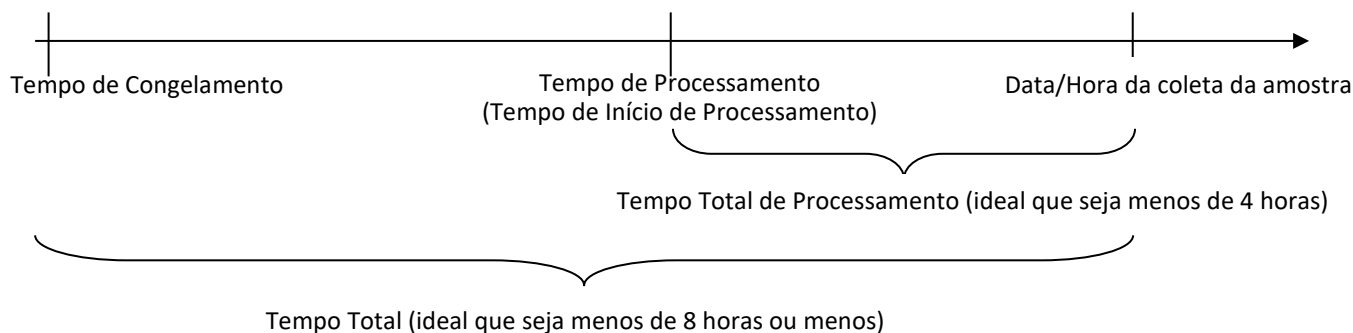
### 6.4 Condições de manuseio

6.4.1 Amostras de sangue fresco, total, anticoagulado devem ser armazenadas à temperatura ambiente (de 15 a 30°C) do momento da coleta até o envio à unidade de laboratório/processamento

6.4.2 Amostras de sangue fresco, anticoagulado, total devem ser enviadas à unidade de laboratório de processamento o quanto antes após a coleta para dar ao laboratório de processamento tempo suficiente para realizar os procedimentos de criopreservação.

6.4.3 Amostras de sangue fresco, anticoagulado, total devem ser processadas pela unidade de laboratório de processamento o quanto antes após o recebimento:

- Tempo de Processamento (tempo de início de processamento) é o tempo a partir da primeira abertura do tubo, ou sua colocação na centrífuga, o que ocorrer primeiro.
- Tempo de Congelamento é definido como o tempo em que:
  - O StrataCooler® Cryo, o NALGENE® Mr. Frosty ou o biocision® CoolCell é colocado num freezer a -80°C.
  - O programa de resfriamento do freezer de taxa controlada, tal como o CryoMed®, é iniciado.
- O Tempo Total é calculado a partir do Tempo de Coleta da Amostra e do Tempo de Congelamento; idealmente, esse tempo é de 8 horas ou menos, mas todas as amostras devem ser processadas independentemente do Tempo Total.
- O Tempo de Processamento Total é calculado a partir do Tempo de Processamento e do Tempo de Congelamento; recomenda-se menos de quatro horas.



6.4.4 Não refrigere ou congele sangue total.

### 6.5 Amostras Marginais

Documentar todas as condições e ações não esperadas de amostras de acordo com a rede e os requisitos de laboratório. Ver Capítulo 5 para detalhes.

#### 6.5.1 Amostras coaguladas

- 6.5.1.1 Todo sangue deve ser processado independente de estar ou não coagulado, exceto quando determinado de outra maneira pelo protocolo.
- 6.5.1.2 Remover coágulo e processar normalmente.
- 6.5.1.3 Se a produção de células é insuficiente para atingir as necessidades do protocolo, entre em contato com a clínica para possível substituição da amostra. Para HVTN, se a produção de células é  $\leq 0.4 \times 10^6$  células/mL, entre em contato com a clínica para possível substituição da amostra.
- 6.5.2 Amostras hemolisadas
  - 6.5.2.1 A hemólise pode afetar a qualidade das PBMCs.
  - 6.5.2.2 Processar normalmente.
  - 6.5.2.3 Se a produção de células é significativamente abaixo da faixa esperada, armazene PBMC com anotações apropriadas e entre em contato com a clínica para possível substituição da amostra. Para HVTN, se a produção de células é  $\leq 0.4 \times 10^6$  células/mL, entre em contato com a clínica para possível substituição de amostra
- 6.6 Amostras Inaceitáveis
  - 6.6.1 Amostras sem rótulo, ou rotuladas de modo errado serão rejeitadas.
  - 6.6.2 Amostras com vazamento

Notifique a clínica caso alguma das amostras estiver vazando e determine se as amostras são ou não utilizáveis.

## **7 Equipamento**

- 7.1 Preparação e Processamento
  - 7.1.1 Gabinete de biossegurança Classe II (biosafety cabinet, BSC) tal como instalado pelo laboratório (P2, P2.5 ou P3)
  - 7.1.2 Centrífuga, baixa rotação (capacidade de 300 a 1000 x g), com rotor balde, preferencialmente refrigerado, temperatura ambiente aceitável
  - 7.1.3 Micropipetas, variando de 20, 200, 1000 $\mu$ L
  - 7.1.4 Pipet-Aid (de preferência sem-fio) para pipetas sorológicas descartáveis.
  - 7.1.5 Refrigerador de 2 a 8°C
  - 7.1.6 Freezer de -20°C (ou menos) **sem** descongelamento automático (para armazenamento de FBS)
  - 7.1.7 Freezer de -80°C (-65 to -95°C); para armazenamento de PBMC em curto prazo
  - 7.1.8 Freezer mecânico de -150°C (para IMPAACT HPTN e MTN, se um freezer LN2 não estiver disponível para armazenamento de longo prazo)
  - 7.1.9 Banho de água de 37 a 56°C (para inativação por calor de FBS, caso necessário)
  - 7.1.10 Copo ou béquer para alvejante ou outro desinfetante, para enxágue de pipetas se requerido pela prática de segurança local
- 7.2 Equipamento de Nitrogênio Líquido (Liquid Nitrogen, LN2) (caso requerido pela rede)
  - 7.2.1 Tanque de estocagem de LN2 ( $\leq -140^\circ\text{C}$ )
  - 7.2.2 Transportador de LN2 seco aprovado pela IATA

- 7.3 Contagem de Células (selecionar uma das seguintes opções)
- 7.3.1 Contador de células automatizado capaz de enumerar células viáveis (Beckman-Coulter Vi-Cell, Guava PCA® ou equivalente).
- Observação para HVTN:** Métodos de contagem precisam ser revistos e pré-aprovados pelo HVTN.
- 7.3.2 Contador de células automatizado não capaz de distinguir células viáveis (Coulter Counter, Abbott Cell-Dyn®, Sysmex® ou equivalente).
- Observação:** Um contador automatizado de células não capaz de identificar células viáveis pode ser usado para obter uma contagem total de células sem distinguir células viáveis, exceto no caso de que as amostras tenham sido preparadas pelo Programa de Testagem Proficiente para Criopreservação PBMC IQA (IQA PBMC Cryopreservation Proficiency Testing Program) Se as amostras estão sendo preparadas para o Programa de Testagem Proficiente para Criopreservação IQA PBMC, é necessário o uso de azul de tripano para a obtenção de contagem de células viável.
- 7.3.3 Contagem de células manual em câmara (hemocítômetro) e microscópio de campo claro.
- Observação:** Se a câmara de contagem manual de células for usada com azul de tripano, as células viáveis precisam ser enumeradas e utilizadas para o cálculo de células. Se a violeta de genciana for utilizada, a contagem total de células pode ser usada para o cálculo de células. Se as amostras estiverem sendo preparadas para o Programa de Testagem Proficiente para Criopreservação IQA PBMC, o azul de tripano deve ser usado para se obter uma contagem de células viável.
- 7.4 Criopreservação
- Utilize uma das seguintes opções de acordo com as instruções do fabricante. Use, de preferência, StrataCooler® e biocision® CoolCell.
- Observação:** Se as instruções do fabricante não forem seguidas, uma validação do estudo precisa ser realizada.
- 7.4.1 Stratagene StrataCooler® Cryo
- StrataCooler® Cryo precisa estar entre 2 e 8°C antes de se iniciar o resfriamento dos frascos criogênicos. Não coloque frascos criogênicos em um StrataCooler® Cryo que esteja a uma temperatura inicial abaixo de 2°C.
- 7.4.2 biocision® CoolCell
- Certifique-se de que todas as partes do CoolCell, incluindo o anel central, retornem à temperatura ambiente entre as utilizações.
- 7.4.3 NALGENE® Mr. Frosty, recipiente de criocongelamento a 1°C/minute
- O Mr. Frosty deve ser armazenado à temperatura ambiente (15-30°C) entre os usos.
- O nível de isopropanol precisa ser corrigido e o isopropanol precisa ser completamente reabastecido antes do quinto ciclo de gelo-degelo. Um registro deve ser utilizado para controlar os ciclos gelo-degelo e as mudanças de reagente. Ver Anexo B.
- 7.4.4 Freezer de taxa controlada, como o CryoMed® Freezing Chamber (Gordinier)

## **8 Descartáveis**

### **8.1 Plásticos**



- 8.1.1 Pipetas sorológicas, descartáveis, 1, 5, 10, 25, 50 mL, estéreis.
- 8.1.2 Pontas de pipeta de precisão, 20, 100, 200, 1000 µL, estéreis
- 8.1.3 Tubos de centrifuga descartáveis de 15 e 50 mL, de fundo cônico, polipropileno graduado.
- 8.1.4 Frascos criogênicos , 1,8 a 2 mL, tampa rosqueada com anel, estéril, somente de polipropileno, independente, graduado, à prova de vazamento, formulado para preservação de LN2 em fase gasosa (aproximadamente - 140°C).

**Observação:** Nem todas as marcas de frascos criogênicos são adequadas para armazenamento de longo prazo em LN2. Ver Anexo G para exemplos que atendam a esses requisitos.

**Observação:** Se um protocolo requerer a coleta de plasma, então, tubos com ranhuras externas são preferíveis para o armazenamento de plasma.

**Observação:** Tubos com tampa de encaixar não podem ser usados. Além disso, os criotubos não devem ser cheios além da capacidade especificada pelo fabricante e não até o topo do tubo.

**Observação para ACTG e IMPAACT:** Apenas criotubos com roscas externas poderão ser usados.

- 8.1.5 **Opcional:** Frascos ou garrafas estéreis descartáveis, de gargalo com 45 mm e 250 a 500 mL para guardar retiradas de sangue total de grande volume antes da separação de PBMC.
- 8.1.6 **Opcional:** Pipetas de transferência estéreis de 5 mL, individualmente embaladas em plástico.
- 8.1.7 **Opcional:** Se os tubos de separação celular pré-preenchidos com barreiras porosas (cell separation tubes with rit barriers, CSTFB) são os mais usados, tubos CSTFB vazios (ver 9.2 para mais detalhes) ou tubos de centrifuga cônicos descartáveis de 15 e 50 mL serão requeridos tal como em 8.1.3. Ver Anexo G para exemplos que atendam a esses requisitos.

## 8.2 Marcadores

Marcadores para escrever nos tubos e frascos de processamento devem ter ponta fina e utilizar tinta indelével de secagem rápida. (Ver Anexo G para exemplos).

## 8.3 Etiquetas

Etiquetas criogênicas adequadas para -80°C e temperaturas de LN2. Ver Anexo G para exemplos que atendam a esses requisitos.

## 9 Equipamento de Proteção Individual

Equipamento de proteção individual adequado para uso com patógenos sanguíneos é necessário. Siga as diretrizes e práticas locais do laboratório para lidar com produtos sanguíneos.

- 9.1 Avental de laboratório
- 9.2 Proteção ocular
- 9.3 Luvas sem talco, nitrílicas ou equivalentes
- 9.4 Luvas criogênicas e proteção facial (com capa de queixo opcional) são necessárias se utilizar LN2

## 10 Reagentes

- 10.1 A aquisição de reagentes estéreis e o uso de técnicas assépticas são necessários.

- 10.1.1 Armazene frascos abertos sob a temperatura recomendada pelo fabricante até que seja utilizado ou até que chegue a data de validade da fabricação.
- 10.1.2 Descarte caso sinais visíveis de contaminação apareçam, tais como aparência nebulosa.
- 10.2 Reagentes Diluentes de Lavagem (Wash Diluent Reagents, WDR)
- Solução Salina Balanceada de Hank (Hanks' Balanced Salt Solution, HBSS\*) sem cálcio nem magnésio, pronta para uso.
- \*Alternativa: 1X Fosfato Tamponado Salino (Phosphate-Buffered Saline, PBS) sem cálcio nem magnésio, pronta para uso.
- 10.3 Tubo de Separação Celular com Barreira Porosa (Cell Separation Tube with Frit Barrier, CSTFB)
- Observação:** O laboratório pode usar um CSTFB ou pode usar um overlay/underlay manual com tubo cônico para centrífuga.
- Observação:** Se utilizar um CSTFB, siga o Capítulo 15. Se utilizar Overlay ou Underlay manual (sem barreira porosa), siga o Capítulo 16.
- 10.3.1 CSTFB pré-preenchido (meio de gradiente de densidade 1,077)
- A capacidade requerida do tubo dependerá do volume de sangue total (ver 15.4). Ver Anexo G para exemplos de CSTFB pré-preenchidos.
- Condições de armazenamento:
- Armazene em refrigerador (2 a 8°C)
  - Proteja da luz
  - Aparência nebulosa indica deterioração do produto.
  - Deixe que o CSTFB chegue à temperatura ambiente (de 15 a 30°C) antes de usar
- 10.3.2 Alternativas ao sistema CSTFB pré-preenchido:
- Combinação de um CSTFB seco com um meio de gradiente de densidade 1,077. Ver Anexo G para exemplos que atendam a esses requisitos.
- | Capacidade do tubo (mL) | Volume de meio de gradiente de densidade (mL) |
|-------------------------|---|
| 50 mL                   | 15 mL   |
| 15 mL                   | 6 mL  |
- Siga as recomendações de armazenamento do fabricante do meio de gradiente de densidade.
- 10.4 Reagentes de Congelamento
- 10.4.1 Soro Fetal Bovino (Fetal Bovine Serum, FBS), de preferência inativado por calor
- 10.4.1.1 *Checar com a(s) rede(s) aplicáveis para saber os fornecedores de preferência.* Nem todas as marcas de FBS são equivalentes. Questões quanto ao controle de qualidade, toxicidade, origem e transporte/importação precisam ser respondidas antes de resolver mudar de fornecedor.
- 10.4.1.2 Obtenha um certificado de análises do fornecedor para registro de controle de qualidade do laboratório.
- Observação:** Uma cópia do certificado de análises do FBS pode ser requisitada para exportar (ou importar) alíquotas de PBMC entre países.
- 10.4.1.3 FBS armazenado congelado ( $\leq -20^{\circ}\text{C}$ ) estará bom até a data de validade do fabricante.
- 10.4.1.4 FBS descongelado e armazenado entre 2 e 8°C é estável por um mês corrido.

10.4.2 Dimetilsulfóxido (DMSO), para cultura de células

- 10.4.2.1 Certifique-se de usar DMSO do tipo para cultura de células. Ver Anexo G para exemplos que atendam a esses requisitos.
- 10.4.2.2 Armazenar frascos não abertos à temperatura ambiente (15 a 30°C). Cheque a data de validade de cada frasco e descarte se estiver fora do prazo.
- 10.4.2.3 Após aberto, DMSO não diluído é estável à temperatura ambiente (15 a 30°C), quando protegido da luz e da umidade, por 6 meses.
- 10.4.2.4 Utilize uma técnica de assepsia ao remover o DMSO do frasco para evitar possível contaminação.
- 10.4.2.5 Descarte o frasco caso note sinais visíveis de contaminação.
- 10.4.2.6 O reagente pode estar separado em alíquotas pequenas para ajudar a preservar a esterilidade. Etiquete as alíquotas com “DMSO”, com a data de abertura da alíquota, sua data de validade (seis meses após a abertura) e as iniciais do técnico. Proteger as alíquotas da luz.

10.4.3 Desinfetante

- 10.4.3.1 Etanol desinfetante a 70% v/v, frasco borrifador
- 10.4.3.2 Alvejante a 10% v/v, copo ou béquer e frasco borrifador
- 10.4.3.3 Outros desinfetantes conforme especificação da política local do laboratório

10.5 Reagentes de Contagem de Células

Os requisitos para reagentes de contagem de células irão variar dependendo do método utilizado. Ver instruções para o método em uso.

10.5.1 Solução de azul de tripano a 0,4%

10.5.2 **Opcional:** Solução de violeta de genciana a 0,05% pode ser utilizada para tingir os núcleos das células de modo a identificar células mononucleares, e contá-las usando um hemacitômetro. Se for necessária a viabilidade, uma segunda contagem usando azul de tripano pode ser realizada.

A Solução de Violeta de Genciana de 0,05% contém:

- 0,05 g de violeta de genciana
- 2 mL de ácido acético glacial
- 98 mL de H<sub>2</sub>O destilada ou deionizada

## 11 Preparação do Reagente

11.1 FBS inativado por calor (Heat-Inactivated FBS, HI-FBS)

HI-FBS pode ser pedido do fabricante, ou pode-se pedir FBS do fabricante e inativar por calor no laboratório. Siga estas instruções para descongelar, para separar em alíquotas e para utilizar.

11.1.1 Remova o FBS do freezer.

11.1.2 Descongele, de preferência, no refrigerador (2 a 8°C), ou por algumas horas à temperatura ambiente. Não permita que o FBS fique à temperatura ambiente por mais tempo que o necessário para completar o processo de descongelamento.

11.1.3 Mexa girando suavemente duas ou três vezes durante o período de descongelamento.

11.1.4 Se o FBS não foi inativado por calor pelo fabricante, siga estas instruções adicionais. Se o FBS foi inativado por calor pelo fabricante, vá para 11.1.5.

- 11.1.4.1 Coloque o FBS em banho-maria a 56°C (55 a 57°C). Monitore cuidadosamente a temperatura do banho-maria. **Temperaturas mais altas podem degradar os componentes do FBS.**
- 11.1.4.2 **Observação:** O nível de água no banho-maria deve cobrir o nível do FBS no frasco, mas não deve tocar a tampa do frasco. Isso ajuda a assegurar o aquecimento homogêneo do FBS e evitar a contaminação.
- 11.1.4.3 Quando a temperatura do banho-maria tiver chegado a 56°C (55 a 57°C), aqueça o FBS por 30 minutos, mexendo a cada 5 a 10 minutos. **Aquecer por períodos mais longos pode degradar os componentes do FBS.**
- 11.1.4.4 **Observação:** Caso a tampa do frasco tiver tido contato com o banho-maria, limpe a tampa do frasco com etanol a 70% v/v antes de abrir.
- 11.1.5 Misture o HI-FBS suave, mas consistentemente, usando técnica asséptica cuidadosa.
- 11.1.6 Separe em alíquotas de tubos cônicos de centrífuga de 50 mL, estéreis, etiquetados, ou alíquotas de outros tamanhos adequadas à carga de trabalho planejada.
- Observação:** As etiquetas devem identificar esses tubos como “HI-FBS” e devem incluir número de lote, data da alíquota, data de validade e iniciais do técnico. FBS é estável por 1 mês à temperatura de 2 a 8°C ou até a data de validade original do fabricante a -20°C.
- 11.1.7 Refrigere (2 a 8°C) o número de tubos de alíquota necessários à carga de trabalho esperada. Misture bem antes de usar. Os tubos de alíquota que não forem necessários imediatamente podem ser colocados no freezer e estarão estáveis até a data de validade original do fabricante.
- Observação:** Ciclos repetidos de congelar e descongelar terão um efeito adverso na qualidade do FBS. Não recongele alíquotas que tiverem sido armazenadas a temperaturas de refrigerador.
- 11.1.8 Para utilizar as alíquotas congeladas, descongele no refrigerador de um dia para o outro, de preferência, ou a temperatura ambiente por algumas horas. Mude a data de validade para um mês. Misture bem antes de usar.

### 11.2 Solução Fresca de Criopreservação (Fresh Cryopreservation Solution, CPS)

#### 11.2.1

Componentes	Porcentagem (v/v)
DMSO	10%
FBS (inativado por calor)	90%

#### 11.2.2 Preparação de CPS

Utilize um recipiente descartável, estéril, de 15 mL ou 50 mL, para preparar a CPS. A mistura de DMSO e FBS é uma reação exotérmica. A CPS precisa ser preparada de antemão e esfriada no refrigerador (2 a 8°C) por, pelo menos, 30 minutos antes do uso, ou em banho de gelo por, pelo menos, 15 minutos antes do uso.

**Observação:** A CPS pode ser armazenada de 2 a 8°C por uma jornada de trabalho (<18 horas).

- 11.2.3 Utilize a fórmula abaixo para fazer uma **estimativa** do volume de CPS a preparar para ressuspensão de PBMC. Exemplos também são apresentados.

$$\text{Sangue Total Utilizável (mL)} \times \text{Produção de Células (células/mL)} \times \text{Concentração de Redução de congelamento (mL/células)} = \text{CPS Estimada (mL)}$$

*Arredonde para cima para o próximo número inteiro de mL.*

**Observação:** O volume de sangue total utilizável é o volume de sangue total que será de fato processado. (O volume de sangue total utilizável pode não ser igual à capacidade do tubo.)

**Exemplos:** Sangue de adulto - Coleta de Sangue de Volume Grande

Sangue Total Utilizável x	Produção de Células x	Concentração de redução de Congelamento =	Estimativa de CPS a preparar
(140 mL) x	(1,5 x 10 <sup>6</sup> células/1 mL) x	(1 mL/15 x 10 <sup>6</sup> células) =	14 mL

**Exemplos:** Sangue Adolescente/Pediátrico - Coleta de Sangue de Volume Pequeno

Sangue Total Utilizável x	Produção de Células x	Concentração de redução de Congelamento =	Estimativa de CPS a preparar
(10 mL) x	(1,5 x 10 <sup>6</sup> células/1 mL) x	(0,5 mL/5 x 10 <sup>6</sup> células) =	1,5 mL

11.2.4 Use a seguinte fórmula para calcular as quantidades de DMSO e de FBS necessárias.

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

Exemplos:

Volume de CPS Estimado	Volume de DMSO = (.1)(volume de CPS)	Volume de HI-FBS = volume de CPS – volume de DMSO	Volume Total de CPS = volume de DMSO + volume de FBS
9 mL	0,9 mL	8,1 mL	9 mL

11.2.5 Registre os volumes de CPS, DMSO e FBS de acordo com os requisitos da rede e do laboratório. Ver Capítulo 5 para detalhes.

## 12 Calibragem

- 12.1 Não há calibragem necessária para as etapas de processamento.
- 12.2 Siga os procedimentos aplicáveis de calibragem do laboratório se utilizar um contador de células automatizado.

## 13 Controle da qualidade

### 13.1 Produção de Células

A produção de células é bastante consistente em populações saudáveis. Populações de crianças geralmente geram uma produção de linfócitos maior do que populações de adultos. De modo similar, pacientes com AIDS ou doença do HIV avançada podem estar linfopênicos. É importante estar consciente da recuperação esperada para a população de participantes para a qual o processamento está sendo realizado. Com base nessa consistência, a produção de células pode servir como marcador de controle de qualidade interno para cada rodada. Produções fora das faixas esperadas podem indicar erros de procedimento, deterioração de gentes, erro de contagem de células ou erro de cálculos. As recomendações oferecidas abaixo são para fornecer diretrizes para ajudar a identificar erros técnicos graves anteriores à criopreservação. Esses valores podem variar dependendo do anticoagulante utilizado.

13.1.1 Produções de Células **Esperadas** para populações saudáveis:

População	Faixa de Produção de Células Mononucleares (células/mL)
Adulto	(0,8 a 3,2) x 10 <sup>6</sup>
Pediátrico - menos de 6 meses	(3 a 10) x 10 <sup>6</sup>
Pediátrico - de 6 meses a 2 anos	(2 a 9) x 10 <sup>6</sup>
Pediátrico - 2 a 5 anos	(1 a 6) x 10 <sup>6</sup>
Pediátrico - mais de 5 anos	(0,8 a 4) x 10 <sup>6</sup>

População	Faixa de Produção de Células Mononucleares (células/mL)
Pediátrico - idade desconhecida	$(1 \text{ a } 10) \times 10^6$

### 13.1.2 Produções de Células Inesperadas

Se as produções de células estiverem fora da faixa esperada, reveja os esquemas de diluição, os cálculos, as técnicas de processamento (especialmente a mistura adequada de suspensões de contagem de células) e a história de PTID, se estiver disponível, para encontrar possíveis causas. Produções de células de pacientes infectados com HIV podem ser menores do que aquelas mostradas nas tabelas acima. Se erros de diluição ou de contagem forem suspeitados, faça uma diluição nova e recontagem.

### 13.1.3 Registre todos os resultados e qualquer problema que ocorra durante o processo e as ações tomadas de acordo com os requisitos da rede e do laboratório. Ver Capítulo 5 para detalhes.

**Observação para HVTN:** Registre quaisquer problemas e ações na Planilha de Processamento HVTN PBMC e na seção de comentários de produção de células do Programa Atlas HVTN PBMC.

## 13.2 Viabilidade Celular

A viabilidade de células PBMC frescas é bastante consistente. Processamento por longo tempo, técnica falha e, ocasionalmente, uma amostra participante em particular podem afetar a viabilidade adversamente. Se estiver contando células viáveis, calcule e registre a % de células viáveis de acordo com os requisitos do laboratório.

13.2.1 A viabilidade de PBMC isoladas frescas deve ser de >95%.

13.2.2 Se a viabilidade de PBMC frescas for <95%, reveja os resultados com o supervisor e documente de acordo com os requisitos da rede e do laboratório. Ver Capítulo 5 para detalhes.

**Observação:** Se as amostras estiverem sido preparadas para o Programa de Testagem Proficiente para Criopreservação PBMC IQA (IQA PBMC Cryopreservation Proficiency Testing Program)

## 14 Processamento de PBMC Introdução e Diretrizes

Estes são princípios padrão e etapas comuns a todos os procedimentos de processamento de PBMC. Existem variações dependendo da escolha de técnicas de separação (CSTFB pré-preenchida ou overlay manual), do tratamento do sangue (diluição com ou sem reposição de plasma ou coleta direta de plasma), concentração final de células e congelamento/armazenamento. Selecione as seções correspondentes para os procedimentos de separação de células e tratamento do sangue, e para congelamento e armazenamento de acordo com os requisitos da rede e do protocolo.

Capítulo Processamento PBMC	Uso para essas Networks
<p><b>Separação de Células e Tratamento de Sangue</b></p> <p>Capítulo 15: Separação de Células e Diluição de Sangue com Reposição de Plasma por Tubo de Separação de Células com Barreira Porosa (CSTFB)</p> <p><b>OU</b></p> <p>Capítulo 16: Separação Celular por Meio de Gradiente de Densidade Manual por Overlay ou Underlay e Diluição com Reposição de Plasma por Separação de Células por Gradiente de Densidade Manual.</p>	<p>Pode ser usado para todas as redes; cheque requisitos de protocolo e materiais disponíveis</p> <p>Pode ser usado para todas as redes; cheque requisitos de protocolo e materiais disponíveis</p>

<b><i>Lavagem, Contagem, Ressuspenção, Concentração e Congelamento por Taxa-Controlada Overnight</i></b>	
Capítulo 17	Todas as redes
<b><i>Armazenamento no local</i></b>	
Capítulo 18.2: Armazenamento Temporário Local a -70/-80°C	ACTG e HVTN
<b>OU</b>	
Capítulo 18.3: Armazenamento no Local em Nitrogênio Líquido (LN2) dewar ou congelador mecânico de -150°C.	IMPAACT, HPTN e MTN

## **15 Separação de Células e Diluição de Sangue por Tubo de Separação de Células com Barreira Porosa (CSTFB) com Reposição de Plasma**

**O Capítulo 15 pode ser usado por todas as redes; cheque requisitos de protocolo e materiais disponíveis. Para qualquer amostra dada, use o Capítulo 15 ou o Capítulo 16, mas nunca os dois.**

- 15.1 Separação de linfócitos de sangue periférico usando tubos de separação CSTFB pré-preenchidos.
  - 15.1.1 Realize toda pipetagem e mistura em um gabinete de segurança biológica (biological safety cabinet, BSC), de nível 2 ou mais alto.
  - 15.1.2 Borrife etanol 70% v/v, ou desinfetante equivalente, sobre todas as superfícies, prateleiras e frascos de reagentes antes de entrar e iniciar o uso do BSC.
  - 15.1.3 Exceto quando indicado de outro modo, o procedimento é realizado à temperatura ambiente (15 a 30°C).
  - 15.1.4 Utilize uma pipeta nova para cada número de identificação de participante (participant identification number, PTID) e para cada aditivo.
- 15.2 Prepare amostras de sangue total, reagentes e suprimentos.
  - 15.2.1 Antes de processar ou com antecedência suficiente antes de misturar com PBMC, prepare e esfrie o CPS (ver Capítulo 11, Preparação de Reagente).
  - 15.2.2 Certifique que os tubos estão à temperatura ambiente antes do processamento.
  - 15.2.3 Antes de adicionar o sangue, cheque visualmente o CSTFB para ver se o líquido está acima da barreira porosa. Se houver líquido acima da barreira, centrifugue o CSTFB a 1000 x g por 30 segundos. Se qualquer solução de gradiente de densidade permanecer acima da barreira após a centrifugação, ela deve ser aspirada.
  - 15.2.4 Cheque cuidadosamente o PTID em todos os tubos de sangue recebidos. Organize os tubos primários de modo a que não haja possibilidade de misturar tubos entre PTID ou anticoagulantes num grupo de PTID.

Sugestão: Colocar todos os tubos para PTID/anticoagulante em uma mesma prateleira. Prateleiras diferentes podem ser usadas para separar PTIDs ou tipos de tubos, e uma cor diferente de marcador pode ser usada para cada PTID para evitar confusão.
  - 15.2.5 Determine e registre uma medida precisa do volume de sangue total utilizável em medidas de 0,5 mL. O volume de sangue total utilizável não precisa ser igual ao tamanho do tubo.
- 15.3 Reposição de Plasma

Realize esta etapa de reposição de plasma *somente* se as alíquotas de plasma são necessárias por instrução de protocolo. Se as alíquotas não são necessárias, pular esta etapa e proceder à etapa 15.4.

  - 15.3.1 Tubos de coleta de sangue do mesmo PTID e com o mesmo anticoagulante podem ser processados individualmente ou em conjunto em tubos de centrifuga de 50 mL.
  - 15.3.2 Marque o volume de sangue total no menisco.
  - 15.3.3 Centrifugue sangue total de 200 a 400 x g por 10 minutos.
  - 15.3.4 Transfira o plasma para um tubo de centrifuga cônico etiquetado de 15 ou 50 mL para a segunda centrifugação e remova qualquer detrito celular.
  - 15.3.5 Adicione quantidade suficiente de WDR (ver seção 10.2) para trazer o sangue de volta ao seu volume original de sangue total, misture suavemente e continue o processamento de PBMC da etapa 15.4.



- 15.3.6 Complete o plasma processando por centrifugação o plasma coletado de 800 a 1200 x g por 10 minutos para obter alíquotas PL2, ou de acordo com as instruções específicas do protocolo para obter o derivado requerido pelo protocolo. Isso pode ser feito em momento posterior, quando a centrífuga não está em uso pelo processamento de PBMC.
- 15.3.7 Separe o plasma centrifugado em tubos de alíquotas etiquetados de acordo com a especificação do protocolo e descarte qualquer detrito celular no tubo de plasma centrifugado.

### 15.4 Diluição de Sangue para separação CSTFB

**Observação:** A razão máxima de sangue para WDR deveria ser de aproximadamente 2:1. Utilize um tubo de 50 mL para cada 10 a 20 mL de sangue total (ou um tubo de 12 a 14 mL para cada 4 a 5 mL de sangue total). Utilize tantos CSTFB quantos necessários para distribuir todo o sangue para cada PTID.

**Observação:** O meio de gradiente de densidade é tóxico para as células; trabalhe rápida e eficientemente durante as etapas de separação.

- 15.4.1 Etiquete cada CSTFB com o PTID.
- 15.4.2 Se um tubo estiver coagulado, veja a seção 6.5 (Amostras Inaceitáveis).
- 15.4.3 Utilize uma pipeta estéril, adicione WDR a cada CSTFB:

Tamanho do CSTFB (mL)	Volume Aproximado de WDR (mL)
50	5
15	2

- 15.4.4 Misture sangue total suavemente e utilize uma pipeta estéril para transferir o sangue para um CSTFB etiquetado.

Tamanho do CSTFB (mL)	Volume de Sangue Aproximado (mL)*
50	12 a 22
15	4 a 5

- 15.4.5 **\*Observação:** Volumes de sangue menores, especialmente na presença de poucos hematócritos, podem fazer com que a camada leucoplaquetária chegue próxima à barreira, tornando a coleta difícil. Volumes maiores de sangue podem contribuir para aumento de detritos e sobras das amostras. Procure as diretrizes específicas do protocolo para retirada de volumes menores de sangue.
- 15.4.6 Utilizando uma pipeta estéril, enxágue cada tubo original de sangue anticoagulado com WDR, adicione volumes de enxágue ao CSTFB certificando-se de que não exceda o limite de volume total do tubo (WDR + Sangue Total).

Tamanho do CSTFB (mL)	Limite de Volume Total do Tubo (mL) (Sangue Total + WDR)
50	30
15	7,5

- 15.4.7 Tampe cuidadosamente o CSTFB.

### 15.5 Centrifugação de densidade e coleta de CSTFB

- 15.5.1 Posicione os tubos verticalmente e transfira-os suavemente para a centrífuga. Consulte o Capítulo 20, Cálculos, para converter g para rpm para o tamanho do seu rotor.
- 15.5.2 Centrifugue de 800 a 1000 x g por 15 minutos a de 15 a 30°C com o freio desligado (OFF).

**Observação:** A separação PBMC pode ser melhorada para algumas amostras centrifugando a 1000 x g.

**Observação:** Se o freio estiver ligado, haverá interferência nas camadas.

15.5.3 Prepare o mesmo número de tubos de centrifuga cônica novos e estéreis que os usados para CSTFB na etapa de separação por centrifugação.

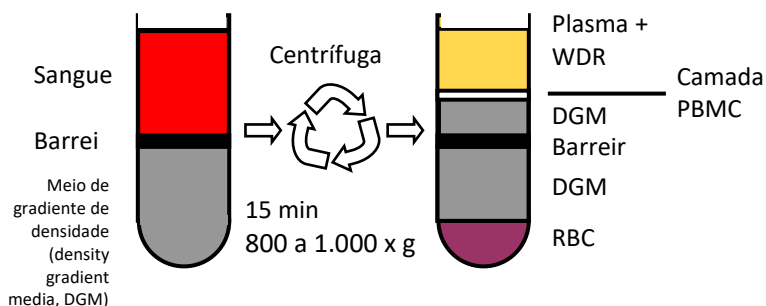
Tamanho do CSTFB (mL)	Tamanho de Tubo de Cônico de Centrifuga (mL)
50	50
15	15

15.5.4 Etiquete cada tubo com o PTID. Use esses novos tubos para a lavagem seguinte.

15.5.5 Remova suavemente o CSTFB da centrifuga de modo a não perturbar as camadas.

15.5.6 Os resultados da centrifugação no conteúdo do tubo dividem-se em seis camadas distintas, incluindo a barreira. Do alto para baixo do tubo, são elas:

- Plasma + WDR
- Camada PBMC
- Meio de densidade de gradiente de densidade (density gradient media, DGM)
- Barreira porosa
- Meio de densidade de gradiente de densidade (density gradient media, DGM)
- Hemácias (red blood cells, RBC) aglutinadas e granulócitos



15.5.7 Inspeção os tubos para verificar se há algum dos seguintes problemas possíveis. Documente as observações e qualquer ação de acompanhamento tomada de acordo com os requisitos da rede e do laboratório.

- Hemólise no Plasma + camada WDR
- Coágulos visíveis na barreira porosa após a centrifugação.
- Camadas PBMC mal definidas devido a erro na centrifugação, como velocidade, tempo ou freio. Camada PBMC aparece menor e indistinta, enquanto a camada Plasma + WDR pode estar levemente anuviada. Ver Anexo C para resolução de problemas.
- Camada PBMC formada na barreira devido à baixa contagem de hemácias ou ao baixo volume de hematócritos.

15.5.8 Usando uma pipeta nova e estéril (pipeta para transferência ou sorológica) para cada PTID, remova reduzindo a fração amarelada de plasma-WDR até aproximadamente 1 a 2 cm da faixa anuviada branca de PBMC localizada na interface entre a fração plasma-WDR (amarelada) e a solução de separação de meio transparente. Descarte a fração de plasma-WDR de acordo com a política do laboratório.

**Observação:** Uma alternativa é deixar a fração de plasma WDR e remover a faixa branca anuviada de PBMC inserindo cuidadosamente a pipeta através da camada superior até a faixa de PBMC.

15.5.9 Usando uma pipeta sorológica ou de transferência estéril, colete todas as células na interface branca anuviada acima da barreira. Tome cuidado para não aspirar quantidade maior da solução de separação de meio do que necessário.

15.5.10 Transfira as células coletadas de um CSTFB para um tubo cônico de centrifuga estéril individual correspondente, pré-etiquetado. Os tubos podem ser pré-preenchidos com WDR para ganhar tempo.

Tamanho do CSTFB (mL)	Tamanho de Tubo de Cônico de Centrifuga (mL)	Volume de WDR Pré-preenchido (mL)
50	50	25
15	15	5

15.5.11 Tampe novamente o CSTFB contendo as hemácias restantes e o meio de separação. Descarte o CSTFB como resíduo de risco biológico de acordo com a política do laboratório.

15.6 Certifique-se de que toda informação apropriada esteja documentada de acordo com os requisitos da rede e do laboratório. Ver Capítulo 5 para detalhes.

**Pular o Capítulo 16 e proceder ao Capítulo 17.**

## 16 Separação de Células por Meio de Gradiente de Densidade Overlay ou Underlay e Diluição de Sangue por Separação Manual de Células por Gradiente de Densidade com Reposição de Plasma

**O Capítulo 16 pode ser usado por todas as redes; cheque requisitos de protocolo e materiais disponíveis. Para qualquer amostra dada, use o Capítulo 15 ou o Capítulo 16, mas nunca os dois.**

- 16.1 Separação de linfócitos de sangue periférico usando o Método de Meio de Gradiente de Densidade de Overlay.
- 16.1.1 Realize toda pipetagem e mistura em um gabinete de segurança biológica (biological safety cabinet, BSC), de nível 2 ou mais alto.
  - 16.1.2 Borrife etanol 70% v/v, ou desinfetante equivalente, sobre todas as superfícies, prateleiras e frascos de reagentes antes de entrar e iniciar o uso do BSC.
  - 16.1.3 Exceto quando indicado de outro modo, o procedimento é realizado à temperatura ambiente (15 a 30°C).
  - 16.1.4 Utilize uma pipeta nova para cada número de identificação de participante (participant identification number, PTID) e para cada aditivo.
- 16.2 Prepare amostras de sangue total, reagentes e suprimentos.
- 16.2.1 Antes de processar ou com antecedência suficiente antes de misturar com PBMC, prepare e esfrie o CPS (ver Capítulo 11, Preparação de Reagente).
  - 16.2.2 Se os tubos de amostra estiverem frios ao toque (devido a condições ambientais frias como o transporte em meses mais frios), deixe os tubos atingirem a temperatura ambiente (15 a 30°C) antes de processar.
  - 16.2.3 Deixe que o meio de gradiente de densidade chegue à temperatura ambiente (15 a 30°C). Ver Capítulo 10 Reagentes para mais informações.
  - 16.2.4 Cheque cuidadosamente o PTID em todos os tubos de sangue recebidos. Organize os tubos primários de modo a que não haja possibilidade de misturar tubos entre PTID ou anticoagulantes num grupo de PTID.  
  
Sugestão: Colocar todos os tubos para PTID/anticoagulante em uma mesma prateleira. Prateleiras diferentes podem ser usadas para separar PTIDs ou tipos de tubos, e uma cor diferente de marcador pode ser usada para cada PTID para evitar confusão.
  - 16.2.5 Determine e registre uma medida precisa do volume de sangue total utilizável em medidas de 0,5 mL. O volume de sangue total utilizável não precisa ser igual ao tamanho do tubo.
- 16.3 Reposição de Plasma
- Realize esta etapa de reposição de plasma somente se as alíquotas de plasma são necessárias por instrução de protocolo. Se as alíquotas não são necessárias, pular esta etapa e proceder à etapa 16.4.
- 16.3.1 Tubos de coleta de sangue podem ser processados individualmente de acordo com as instruções abaixo ou a técnica de reunião da camada leucoplaquetária pode ser usada tal como delineada no Anexo D.
  - 16.3.2 Marque o volume de sangue total em cada tubo no menisco.
  - 16.3.3 Centrifugue sangue total de 200 a 400 x g por 10 minutos.
  - 16.3.4 Transfira o plasma para um tubo cônico de centrífuga de 15 a 50 mL para uma segunda centrifugação para remover qualquer detrito celular.

- 16.3.5 Adicione a quantidade suficiente de WDR (ver seção 10.2) para trazer o sangue de volta ao seu volume inicial de sangue total, misture suavemente e continue o processamento do PBMC na etapa 16.4.
- 16.3.6 Complete o plasma processando por centrifugação o plasma coletado de 800 a 1200 x g por 10 minutos para obter alíquotas PL2, ou de acordo com as instruções específicas do protocolo para obter o derivado requerido pelo protocolo. Isso pode ser feito em momento posterior, quando a centrífuga não está em uso pelo processamento de PBMC.
- 16.3.7 Separe o plasma centrifugado em tubos de alíquotas etiquetados de acordo com a especificação do protocolo e descarte qualquer detrito celular no tubo de plasma centrifugado.
- 16.4 Diluição de Sangue e Separação Manual de Células por Gradiente de Densidade
- 16.4.1 Destampe os tubos de sangue anticoagulado.
- 16.4.2 Se o um tubo estiver grandemente coagulado, ver seção 6.5 (Amostras Marginais).
- 16.4.3 **Observação:** Para coletas de volume de sangue maior, é permitido unir camadas leucoplaquetárias de acordo com as diretrizes do Anexo D: Unindo Camadas Leucoplaquetárias para Isolamento PBMC em Meio de Gradiente de Densidade. Unindo Camadas Leucoplaquetárias para Isolamento PBMC em Meio de Gradiente de Densidade Para unir camadas leucoplaquetárias, substitua os passos 16.4.4 e 16.4.5 pelas instruções dadas no Anexo D.
- 16.4.4 Etiquete cada tubo cônico de centrífuga com o PTID.

Tamanho de Tubo de Cônico de Centrífuga (mL)	Volume aproximado de sangue (mL)*
50	12 a 22
15	4 a 5

- 16.4.5 Transfira o sangue para um tubo cônico de centrífuga estéril, etiquetado, de 15 ou 50 mL, e adicione volume suficiente de WDR para diluir o sangue de acordo com a inserção do pacote de meio de gradiente de densidade (a razão máxima de sangue para diluente deve ser de 2:1).
- Opcional: A adição de WDR e sua mistura podem ocorrer no tubo inicial de sangue, se houver volume suficiente disponível.
- 16.4.6 Para Separação de Células por Gradiente de Densidade:
- Em qualquer amostra, utilize ou o Método de Overlay (16.4.6.1), ou o Método de Underlay (16.4.6.2), mas nunca os dois.

16.4.6.1 Método de **Overlay:**

Prepare um tubo de centrífuga cônico estéril etiquetado para cada tubo contendo sangue diluído.

Adicione de modo asséptico o volume apropriado de meio de gradiente de densidade aos tubos de centrífuga cônicos estéreis vazios. O volume do meio de gradiente de densidade dependerá da razão do meio de gradiente de densidade para sangue diluído recomendada pelo fabricante.

Pipete cuidadosa e vagarosamente o sangue diluído sobre o meio de gradiente de densidade.

**Sugestão:** Deixe a mistura de sangue diluído com WDR fluir suavemente pelo lado do tubo e se juntar sobre a superfície do meio de gradiente de densidade sem romper o plano da superfície.

16.4.6.2 Método **Underlay**:

Misture suave e totalmente para reduzir aglutinações das células durante a separação.

**Opcional:** Tanto para sangue total, quanto para sangue WDR, adicione outro volume de WDR igual ao total volume de sangue total.

Com base no volume de sangue diluído em WDR, determine o volume do meio de gradiente de densidade para cada tubo. O volume do meio de gradiente de densidade dependerá da razão do meio de gradiente de densidade para sangue diluído recomendada pelo fabricante.

Pipete cuidadosa e vagorosamente o meio de gradiente de densidade SOB o sangue WDR.

16.4.6.3 Tampe os tubos cuidadosamente.

16.5 Centrifugação de densidade e coleta de linfócitos

16.5.1 Posicione os tubos verticalmente e transfira-os suavemente para a centrífuga.

16.5.2 Centrifugue a 400 x g por 30 minutos a de 15 a 30°C com o freio desligado (OFF), do modo descrito no encarte do pacote que acompanha o meio de gradiente.

**Observação:** Se o freio estiver ligado, haverá interferência nas camadas. O freio da centrífuga precisa ser DESLIGADO para que a separação seja limpa e para maximizar a captação de PBMCs. Consulte o Capítulo 20, Cálculos, para converter g para rpm para o tamanho do seu rotor.

16.5.3 Prepare o mesmo número de tubos de centrífuga cônicos novos e estéreis que os usados na etapa de separação por centrifugação.

16.5.4 Etiquete cada tubo com o PTID/anticoagulante. Use esses novos tubos para a lavagem seguinte.

16.5.5 Remova os tubos da centrífuga.

16.5.6 Se a camada de células não for visível, confirme se a centrífuga está operando corretamente. Corrija qualquer problema encontrado. Recentrifugue o tubo. Documente o problema e qualquer ação tomada de acordo com os requisitos da rede e do laboratório.

**Observação:** Se a camada de células ainda não estiver visível após a recentrifugação, documente, remova e descarte o WDR sobrenadante e continue.

**Observação:** Se o plasma estiver muito anuviado, pode ser difícil ver a interface com o meio de gradiente de densidade. Se for possível, para melhorar a coleta de linfócitos, remova a maior parte do plasma acima da interface com uma pipeta de 10 mL, deixando somente 0,5 cm restantes. Isso permitirá um melhor posicionamento da ponta da pipeta para a coleta das células.

16.5.7 Inspeção os tubos buscando hemólises ou pequenos coágulos visíveis na interface das células que não tenham sido notados antes e os documente.

**Observação:** Procure por hemólises, ou coágulos, após a centrifugação. Gradue as hemólises de +1 e +4, com base na descrição dada no glossário. Registre suas observações.

16.5.8 Usando uma pipeta nova e estéril (pipeta para transferência ou sorológica) para cada PTID, remova reduzindo a fração amarelada de plasma WDR até aproximadamente 1 a 2 cm da faixa anuviada branca de PBMC localizada na interface entre a fração plasma WDR (amarelada) e a solução de separação de meio transparente. Descarte a fração de plasma-WDR de acordo com a política do laboratório.

**Observação:** Uma alternativa é deixar a fração de plasma WDR e remover a faixa branca anuviada de PBMC inserindo cuidadosamente a pipeta através da camada superior até a faixa de PBMC.

16.5.9 Usando uma pipeta sorológica ou de transferência estéril, colete todas as células na interface branca anuviada. Tome cuidado para não aspirar quantidade maior da solução de separação de meio do que necessário.

16.5.10 Transfira as células coletadas do tubo cônico de centrifuga para uma tubo cônico de centrifuga estéril, pré-etiquetado único correspondente. Os tubos podem ser pré-preenchidos com WDR para ganhar tempo.

Tamanho de Tubo de Cônico de Centrifuga (mL)	Volume de WDR Pré-preenchido (mL)
50	25
15	5

16.5.11 Tampe novamente o tubo cônico de centrifuga contendo o restante das hemácias e meio de separação e descarte o tubo como resíduo de risco biológico de acordo com a política do laboratório.

16.6 Certifique-se de que toda informação apropriada esteja documentada de acordo com os requisitos da rede e do laboratório. Ver Capítulo 5 para detalhes.

**Prossiga para o Capítulo 17.**

## 17 Lavagem, Contagem, Ressuspensão, Concentração e Congelamento por Taxa-Controlada Overnight

### Use o Capítulo 17 para todas as redes.

#### 17.1 Lavagem 1:

- 17.1.1 Adicione WDR para aumentar a Quantidade Suficiente (QS) de fração de PBMC para aproximadamente 10 mL (para tubos cônicos de centrífuga de 15 mL) ou 45 mL (para tubos cônicos de centrífuga de 50 mL). Misture suavemente.
- 17.1.2 Tampe novamente todos os tubos de células coletadas.
- 17.1.3 Centrifugue as células diluídas de 200 a 400 x g por 10 minutos de 15 a 30°C (freio opcional).
- 17.1.4 Remova os tubos da centrífuga e procure células sedimentadas.

Se não houver células agregadas visíveis, confirme que a centrífuga está operando corretamente. Corrija qualquer problema encontrado. Recentrifugue o tubo. Documente o problema e qualquer ação tomada de acordo com os requisitos da rede e do laboratório. Se o agregado de células ainda não estiver visível após recentrifugar o tubo, documente isso.

- 17.1.5 Remova e descarte o sobrenadante sem perturbar o agregado de células.

#### 17.2 Lavagem 2:

- 17.2.1 Ressuspenda cada agregado em uma mistura de pouco volume de WDR, de modo suave, mas completo, em uma suspensão homogênea de células.

Tamanho de Tubo (mL)	Volume de Ressuspensão de WDR (mL)
50	≤ 5
15	≤ 3

- 17.2.2 Combine as suspensões de agregado do mesmo PTID/anticoagulante. Este é o tubo de células coletadas.

Tamanho de Tubo (mL)	Número de Suspensões de Agregados a Combinar	Volume Total (mL)
50	≤ 4	≤ 20
15	≤ 2	≤ 6

- 17.2.3 Utilize um pequeno volume de WDR para enxaguar os tubos dos quais os agregados foram transferidos. Colete o enxágue de WDR nos tubos de células coletadas.

- 17.2.4 Adicione WDR à fração de PBMC para a QS e misture suavemente.

Tamanho de Tubo (mL)	Volume de QS (mL)
50	≤ 45
15	≤ 10

- 17.2.5 Tampe novamente os tubos e coloque-os na centrífuga.
- 17.2.6 Centrifugue as células diluídas de 200 a 400 x g por 10 minutos de 15 a 30°C (freio opcional).
- 17.2.7 Remova os tubos da centrífuga e procure células sedimentadas.

**Observação:** Se não houver células agregadas visíveis, confirme que a centrífuga está operando corretamente. Corrija qualquer problema e centrifugue o tubo novamente. Documente o problema e qualquer ação tomada de acordo com os requisitos da rede e do laboratório. Se o agregado de células ainda não estiver visível após recentrifugar o tubo, documente isso.

- 17.2.8 Remova e descarte o sobrenadante sem perturbar o agregado de células.



**17.3 Contagem de Células PBMC**

17.3.1 Determine e registre o volume (V) de ressuspensão de contagem de WDR com precisão de 0,1 mL. V é importante pois este é o volume no qual a contagem de células é baseado.

**Observação:** Geralmente, V é aproximadamente 20% do sangue total utilizável arredondado para o mL mais próximo. Entretanto, V pode variar dependendo do tamanho do agregado de células e do método de contagem de células. Também pode ser ajustado para permitir uma medição conveniente ou ressuspensão. Sendo assim, V pode variar entre 10% e 50% do volume de sangue total utilizável. Consulte o método de contagem de células aprovado pelo laboratório para obter direcionamento.

17.3.2 Se houver mais de um agregado no mesmo PTID/anticoagulante, use uma pequena quantidade de WDR para suavemente ressuspender e combinar dos dois agregados em um só tubo. Utilizando o volume remanescente, enxágue os tubos com os quais as células foram transferidas. Adicione esse enxágue ao tubo de células coletadas.

17.3.3 Realize a contagem de células utilizando o SOP para o método de contagem aprovado no laboratório. Para um exemplo de contagem manual de células SOP, ver <http://www.hanc.info/labs/labresources/procedures/Pages/pbmcSop.aspx>.

17.3.4 Misture suavemente as células, mas de modo completo, antes de retirar amostras para a contagem de células.

17.3.5 Transfira um volume pequeno de ressuspensão para um tubo pequeno para a contagem.

**Observação:** Caso sejam necessárias contagens repetidas, minimize o volume de amostra necessário.

17.3.6 Siga o SOP para o método de contagem de células aprovado no laboratório de processamento para determinar a concentração de células x 10<sup>6</sup> por mL.

**Observação:** Células a 10<sup>3</sup>/μL = células a 10<sup>6</sup>/mL.

**Observação:** Contagens automáticas podem ser feitas apenas uma vez. Contagens manuais devem realizar a contagem de, pelo menos, quatro quadrados grandes (1 mm<sup>2</sup>).

17.3.7 Calcule o número total de células utilizando a seguinte fórmula:

$$T = C \times V$$

T = Número total de células

C = Concentração (10<sup>6</sup>/mL) determinada pelo método de contagem

V = Conte o volume de ressuspensão de WDR em mL

17.3.8 Calcule a produção de células em células/mL de sangue total utilizável usando a fórmula abaixo.

$$\text{Produção de Células (10}^6 \text{ células/mL)} = T / \text{Volume de Sangue Total Utilizável}$$

**Observação:** A produção de células só é calculada para propósitos de qualidade. Veja no Capítulo 13 Controle de Qualidade para as faixas de produção de células esperadas. Se a produção de células estiver fora da faixa esperada, siga as diretrizes de resolução de problemas do Capítulo 13 Controle de Qualidade. Redilua e reconte se necessário.

**17.4 Cálculo do volume de ressuspensão**

17.4.1 Calcule o volume da ressuspensão de congelamento reduzido de CPS requerido realizando as etapas a seguir para a concentração de células alvo final.

**Observação:** A concentração de células alvo final varia por rede e por protocolo. Veja o protocolo para obter informações sobre a concentração de células alvo final.

- 17.4.2 Calcule o volume da ressuspensão de congelamento reduzido de CPS (V1) requerido utilizando a concentração de células alvo final.

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

T = Número total de células

N1 = Concentração de células alvo final

V2 = volume final de alíquota em mL

Arredonde V1 para baixo ao 0,1 mL mais próximo para determinar o Volume real de ressuspensão CPS (V<sub>f</sub>).

**Observação para HVTN:** Arredonde V1 para baixo ao 0,1 mL mais próximo para determinar V<sub>f</sub>.

**Observação:** Para algumas redes, V2 será 1 mL/frasco criogênico, portanto o número de recipientes requerido será igual ao de mililitros de CPS. Para ACTG e IMPAACT, ajuste o volume por frasco criogênico de acordo com a tabela ou o protocolo de processamento do laboratório.

**Observação para IMPAACT:** A maior parte dos protocolos IMPAACT vão requerer PBMCs viáveis a 10<sup>7</sup>/mL e 5.0 x 10<sup>6</sup>/frasco e requerer que todas as PBMCs recuperadas sejam armazenadas. Em geral, quando as PBMCs recuperadas são menores do que um número alvo:

- Adicione quantidades de PBMC residual menores que 2 x 10<sup>6</sup> para tubos com 5,0 x 10<sup>6</sup> células
- Separe em alíquotas quantidades de células residuais maiores que 2 x 10<sup>6</sup>, mas menores que 5 x 10<sup>6</sup> em frasco em separado.

Exemplos:

Requisitos do Protocolo IMPAACT	Recuperação	Preparação de Alíquotas
10 <sup>7</sup> PBMCs em 2 frascos	9,3 x 10 <sup>6</sup> PBMCs	Prepare um frasco com 5,0 x10 <sup>6</sup> PBMCs e outro frasco com 4,3 x10 <sup>6</sup> PBMCs
20 milhões de PBMCs	16,5 x 10 <sup>6</sup> PBMCs	Prepare dois frascos com 5 x 10 <sup>6</sup> PBMCs cada e um frasco com 6,5 x 10 <sup>6</sup> PBMCs

Lembre-se de registrar os números por frasco de PBMC reais na LDMS.

- 17.4.3 **Somente para HVTN:** Calcule o número real de células por frasco (N2) usando o volume real de CPS de congelamento reduzido (V<sub>f</sub>) determinado no cálculo anterior.

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

N2 = Número real de células por frasco

T = Número total de células

V2 = volume total de alíquota em mL

### 17.5 Etiquetagem

- 17.5.1 Realize a impressão e etiquetagem de frascos criogênicos ANTES da centrifugação final.

**Observação:** É importante, para minimizar o tempo, que as células permaneçam em um agregado.

- 17.5.2 As etiquetas de frascos criogênicos serão geradas usando o Sistema de Gerenciamento de Dados do Laboratório (Laboratory Data Management System, LDMS).

17.5.2.1 Siga a prática de laboratório da rede para preencher os dados inseridos.

- 17.5.2.2 ANTES de etiquetar cada frasco criogênico, cheque com as requisições do laboratório e a planilha de processamento para encontrar qualquer erro de registro de dados nas etiquetas de frasco criogênico de tipo de derivado.
- 17.5.2.3 Inspeccione visualmente o código de barras da etiqueta e da área de impressão para verificar o alinhamento e a qualidade de impressão.
- 17.5.2.4 Corrija qualquer erro de registro de dados nas LDMS e imprima novamente as etiquetas conforme necessário (certificando-se de que as IDs globais apropriadas foram selecionadas).
- 17.5.3 Aplique as etiquetas aos frascos criogênicos de modo que a informação possa ser facilmente lida e que os conteúdos dos tubos possam ser vistos claramente.
- Observação para HVTN:** Faça a leitura dos frascos criogênicos etiquetados seguindo as diretrizes atuais do HVTN para se assegurar de que os códigos de barras possam ser lidos.
- 17.6 Centrifugação Final
- 17.6.1 Posicione o tubo de células coletadas na centrífuga.
- Observação para HVTN:** Complemente a WDR até a QS de 45 mL antes da centrifugação.
- 17.6.2 Centrifugue as células diluídas de 200 a 400 x g por 10 minutos de 15 a 30°C (freio opcional).
- 17.6.3 Verifique que todos os frascos criogênicos estão etiquetados e facilmente acessíveis.
- 17.7 Separando alíquotas para criopreservação
- Observação:** As etapas seguintes podem ser realizadas rapidamente para preservar a integridade das células. Recomenda-se que os frascos criogênicos sejam mantidos resfriados em gelo molhado. Não deixe que os frascos fiquem submersos no gelo molhado. Não deixe que umidade chegue próxima às tampas dos frascos.
- 17.7.1 Remova e descarte o WDR sobrenadante. Retenha o agregado.
- Observação para ACTG e IMPAACT:** Se as células tiverem que ser congeladas como agregados PBMC não viáveis (PEL), a ressuspensão de células em meio congelado (CPS) não é recomendada porque o DMSO é um potente inibidor de PCR. Se os PBMCs estiveram em contato com DMSO (p. ex., meio congelante), lave o PEL duas vezes com o WDR antes do armazenamento. Veja o SOP de processamento de amostras (Specimen Processing SOP) em <http://www.hanc.info/labs/labresources/procedures/Pages/actgImpaactLabManual.aspx>.
- 17.7.2 Realize a ressuspensão do agregado utilizando o volume de CPS frio ( $V_f$ ) determinado em 17.4.
- Observação:** O pré-resfriamento dos frascos e/ou o trabalho com gelo molhado são permitidos.
- 17.7.2.1 **Suavemente**, ressuspensa o agregado de células agitando, sacudindo ou pipetando antes de adicionar o CPS.
- 17.7.2.2 **Suavemente** mexendo e girando, adicione o CPS às células ressuspensas.
- 17.7.3 **Trabalhe rapidamente após a adição do CPS.** Não deixe as células repousarem em solução de congelamento por mais de 10 minutos antes de colocá-las no freezer.
- 17.7.4 Separe alíquotas e 0,5 a 1 mL por frasco criogênico, dependendo dos requisitos da rede e do protocolo. Caso seja requerido pela rede ou pelo protocolo, prepare uma alíquota parcial final com qualquer excesso de volume de células em suspensão que possa apresentar-se.
- Observação para HVTN:** Em vez de criar uma alíquota final parcial, distribua igualmente qualquer volume de excesso entre todos os frascos criogênicos para aquele PTID.

17.8 Congelamento controlado Overnight

17.8.1 Em seguida ao processamento e à contagem, as células devem ser congeladas imediatamente.

17.8.2 Selecione o método de congelamento a ser utilizado: StrataCooler® Cryo, NALGENE® Mr. Frosty, biocision® CoolCell ou CryoMed®. Ver a seção 7.4 para informações de armazenamento e manutenção.

17.8.3 Transfira imediatamente todos os frascos criogênicos para o recipiente de congelamento controlado.

NALGENE® Mr. Frosty, biocision® CoolCell e StrataCooler® Cryo, feche o recipiente e coloque-o em freezer de -80°C (-65 a -95°C), em local não perturbado por acesso repetido ao freezer (ou seja, longe da parte da frente ou de cima do freezer, que esteja próximo da abertura da porta/tampa) por um mínimo de 4 horas para Mr. Frosty e CoolCell; e de um dia para o outro (overnight) para StrataCooler® Cryo.

Para CryoMed® ou outro freezer controlado, inicie o programa de resfriamento conforme o SOP local apropriado.

**Observação:** Este é o Tempo de Congelamento.

17.9 Certifique-se de que toda informação apropriada esteja documentada de acordo com os requisitos da rede e do laboratório. Ver Capítulo 5 para detalhes.

## 18 Armazenagem PBMC (Temporária ou no local)

18.1 A cadeia de frio precisa ser mantida durante todas as etapas de transferência para evitar danos às células.

**Observação para HVTN:** Envie em gelo seco para o repositório central de amostras em até **uma semana da coleta**, exceto se orientado de outra forma pelo HVTN.

**Observação para ACTG:** Envie em gelo seco em até 4 semanas da data do congelamento.

**Observação para HVTN, IMPAACT e MTN:** PBMCs devem ser transferidos para um dewar LN2 ou -150°C congelador mecânico dentro de 72 horas de colocá-los no congelador taxa controlada. Continuar a 18.3.

18.2 Transferir PBMCs que serão armazenados temporariamente no local em freezer a temperatura de -70/-80°C.

18.2.1 Transfira os frascos criogênicos do sistema de resfriamento controlado para o local designado ao armazenamento a -70/-80°C. Certifique-se de que o freezer usado para o armazenamento de PBMC tem um ponto de ajuste de -70 °C com uma faixa de alarme de -65 °C a pelo menos -80 °C.

Transfira os frascos criogênicos após um mínimo de 4 horas para NALGENE® Mr. Frosty e biocision® CoolCell e de um dia para o outro (overnight) para StrataCooler® Cryo. Se o CryoMed® estiver sendo usado, transfira os frascos criogênicos para o freezer de -70/-80°C após o término do programa.

**Observação: Requerido para HVTN, recomendado para ACTG:** Use um recipiente de gelo seco para transferência. Verifique se a caixa de criotubos do congelador está completamente coberta em todas as suas laterais por gelo seco. Trabalhe rápida e eficientemente para minimizar a exposição do frasco criogênico à temperatura ambiente.

18.2.2 **Observação:** Não armazene em nitrogênio líquido (LN2). Armazene entre -65 a -95°C até o envio.

18.2.3 **Observação: Requerido para HVTN, recomendado para ACTG:** Mantenha a cadeia de frio durante a preparação para o envio pré-esfriando o transportador de gelo seco e utilizando um recipiente de

gelo seco de transferência durante as etapas de empacotamento. Certifique-se de que o transportador de gelo seco esteja completamente cheio de gelo seco. NÃO armazene temporariamente as amostras em LN2, exceto se instruído a isso pela rede ou pelo protocolo. NÃO transfira amostras do LN2 de volta aos freezers de -70/-80°C, exceto se orientado a fazer assim pela equipe da rede ou do protocolo.

- 18.2.4 Entre em contato com o pessoal de operações de laboratório da rede caso as amostras não chegarão ao destino final dentro do tempo de armazenamento temporário estabelecido pela rede. É necessário obter permissão para mover amostras do armazenamento em LN2, e enviar em transportadores de LN2, caso necessário, se o armazenamento temporário e as condições de envio não possam ser atingidos.
- 18.3 Transferir PBMCs que serão armazenados no LN2 dewar ou -150°C congelador mecânico.
- Observação para HVTN:** Freezers mecânicos a temperatura de -150°C não são aceitos para armazenagem de HVTN PBMC.
- 18.3.1 Dentro de 72 horas de congelamento a cryovials no sistema de arrefecimento controlado-taxa, transferência em gelo seco para o local de armazenamento designado no sistema de armazenamento LN2 dewar ou -150°C.
- 18.3.2 Amostras PBMC congeladas podem ser armazenadas em LN2 fase gasosa indefinidamente com segurança. NÃO transfira amostras do LN2 ou -150°C de volta a freezers de -70/-80°C, exceto se orientado a fazer assim pela equipe da rede ou do protocolo.
- 18.3.3 Depois que as amostras estiverem armazenadas em LN2, todas as transferências ou transportes precisam ser mantidos em LN2 ( $\leq -140^\circ\text{C}$ ) e as amostras não podem ser enviadas em gelo seco.
- Todas as amostras de materiais infecciosos precisam ser enviadas em transportadores de LN2 aprovados pela IATA; verifique os requisitos do protocolo para ver exceções.

## 19 Preenchimento do processamento de documentos

- 19.1 Certifique-se de que toda informação apropriada está documentada de acordo com os requisitos da rede e do laboratório, bem como que todos os cálculos estão corretos. Ver Capítulo 5 para detalhes.
- 19.2 Arquive a Planilha de Processamento PBMC, e qualquer outro documento de controle, de acordo com a política do laboratório. Ver Capítulo 5 para detalhes.

**Isto marca o final do processamento e armazenamento.  
Siga os procedimentos apropriados para a preparação e processamento dos envios.**

## 20 Cálculos

- 20.1 O valor de RPM é, geralmente, encontrado em uma tabela de nomograma. Tabelas de nomograma são, em geral, encontradas no manual de manutenção da centrífuga. Certifique-se de utilizar as tabelas específicas das centrífugas e dos rotores.
- 20.2 É recomendado que a conversão apropriada de g a RPM seja afixada em sua centrífuga facilitar a consulta.
- 20.3 Se uma tabela de nomograma não estiver disponível, as forças g podem ser convertidas para RPMs usando a seguinte fórmula.

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

r = raio do rotor em centímetros

g = força centrífuga relativa expressa em unidade de gravidade

RPM = revoluções por minuto

## 21 Limitações do Procedimento

- 21.1 O tempo de processamento ideal desde a coleta até o congelamento de sangue fresco para PBMC é <8 horas, a partir do momento da coleta. A função celular pode cair para amostras mais velhas.
- 21.2 O tempo de processamento ideal para PBMC é de <3 horas desde o momento da adição de sangue aos tubos de separação de células (Accuspin™ ou equivalente) até o início do ciclo de congelamento controlado.
- 21.3 Estudos indicam que amostras coletadas em anticoagulante EDTA fornecem produções menores com o tempo.
- 21.4 Evite remover quantidades excessivas do meio de separação com a faixa de PBMC, pois isso pode aumentar a contaminação de granulócitos.
- 21.5 Evite remover excesso de sobrenadante com a faixa de PBMC para limitar a contaminação das proteínas de plasma.

## 22 Glossário de Termos

Termo	Definição
ACTG	Grupo de ensaios clínicos de AIDS (AIDS Clinical Trials Group)
Temperatura de Centrífuga	15 a 30°C
Coagulado, grandemente	Mais de ¾ da massa de sangue total está coagulada e há muito pouco sangue total livre sobrando.
Coágulo, pequeno	Pequenos coágulos não serão vistos normalmente no tubo de sangue total, mas podem ser vistos na barreira de separação do tubo após a centrifugação.
CPS	Solução Criopreservadora (Cryopreservation Solution)
CSR	Repositório Central de Amostras (Central Specimen Repository)
CSTFB	Tubo de Separação Celular com Barreira Porosa (Cell Separation Tube with Frit Barrier)
DG Média	Meio de Gradiente de Densidade (Density Gradient Media)
FBS	Soro Fetal Bovino (Fetal Bovine Serum)

Termo	Definição
<i>HBSS</i>	Solução Salina Balanceada de Hank (Hanks' Balanced Salt Solution)
<i>Hemólise</i>	Uma coloração de rosada a vermelha no soro ou plasma devido à lise das hemácias. A hemólise é graduada e relatada de acordo com a seguinte escala: 1+ Cor rosada-vermelha pálida em soro ou plasma; pode-se ler claramente texto de jornal colocado atrás do tubo de sangue. 2+ Cor rosada-vermelha em soro ou plasma; texto de jornal é legível, mas não tanto. 3+ Cor rosada-vermelha escura em soro ou plasma; texto de jornal aparece obscurecido. 4+ Cor vermelho mogno em soro ou plasma; não se é capaz de ler texto de jornal. <b>Observação:</b> Hemácias que sofreram lise dão ao soro ou plasma uma característica colorida, mas transparente, já a contaminação de hemácias dá ao soro ou plasma uma característica anuviada.
<i>HI-FBS</i>	Soro Fetal Bovino Inativado por Calor (Heat Inactivated Fetal Bovine Serum)
<i>HPTN</i>	Rede de ensaios para a prevenção do vírus da imunodeficiência humana (HIV Prevention Trials Network)
<i>HVTN</i>	Rede de ensaios de vacinas para o vírus da imunodeficiência humana (HIV Vaccine Trials Network)
<i>Ictérico</i>	Plasma com cor verde ou alaranjada sugerindo a presença de bilirrubina aumentada.
<i>IMPAACT</i>	Ensaio clínicos internacionais da AIDS em pacientes maternos, pediátricos e adolescentes (International Maternal Pediatric Adolescent AIDS Clinical Trials)
<i>LDMS</i>	Sistema de gerenciamento de dados laboratoriais (Laboratory Data Management System)
<i>MTN</i>	Rede de ensaios de microbicida (Microbicide Trials Network)
<i>PBMC</i>	Células sanguíneas periféricas mononucleares (Peripheral Blood Mononuclear Cells)
<i>PBS</i>	Fosfato Tamponado Salino (Phosphate-Buffered Saline)
<i>PTID/PID</i>	Número de Identificação de Paciente (Participant Identification Number)
<i>QS</i>	Quantidade Suficiente — adicionar quantidade suficiente de líquido para completar volume especificado.
<i>Temperatura Ambiente</i>	15 a 30°C
<i>Volume de sangue total utilizável</i>	O volume de sangue total que é realmente processado (O volume de sangue total utilizável pode não ser igual à capacidade do tubo.)
<i>Armazenamento em fase gasosa</i>	Armazenamento em Nitrogênio Líquido (Liquid nitrogen, LN2) em fase gasosa é o espaço de tanque de armazenamento que está acima do LN2 líquido da parte inferior do tanque.
<i>WDR</i>	Reagente Diluente de Lavagem (Wash Diluent Reagent) (HBSS ou PBS)

## 23 Referências

- 23.1 Bull M., Lee B., Stucky J., Chiu Y.L., Rubin A., Horton H., e 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., e 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., e 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., e 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., e 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, e Tustin NB. Optimization of storage and shipment of cryopreserved peripheral blood mononuclear cells from HIV-infected and uninfected individuals for ELISPOT assays. *J Immunol Methods.* 363(1):42-50 (2010).

## 24 Documentos Adicionais (A serem mantidos pelo laboratório)

- 24.1 Encarte de Pacote de FBS e Certificado de Análise
- 24.2 WDR (HBSS ou PBS) encarte de pacote
- 24.3 Encarte de pacote de Meio de Densidade de Gradiente
- 24.4 Encarte de pacote de Tubo de separação celular com barreira porosa

## 25 Anexos

- 25.1 Anexo A: Planilha de Processamento PBMC requerido por HVTN

Anexo A também é fornecido através de download e de formulários editáveis no website público da HANC em <http://www.hanc.info/labs/Pages/PBMCSOP.aspx>.



- 25.2 Anexo B: Exemplo de Registro de Mudanças de Isopropanol NALGENE® Mr. Frosty
- 25.3 Anexo C: Resolução de Problemas: Recuperação de PBMC na Ausência de Faixa PBMC Definida após Centrifugação de Gradiente de Densidade
- 25.4 Anexo D: Unindo Camadas Leucoplaquetárias para Isolamento PBMC em Meio de Gradiente de Densidade
- 25.5 Anexo E: Guia Rápido CSTFB para PBMC SOP em toda Network
- 25.6 Anexo F: Guia Rápido CSTFB para PBMC SOP em toda Rede — Método de Overlay Manual
- 25.7 Anexo G: Exemplos de Reagentes
- 25.8 Anexo H: Histórico de revisão

**Anexo A: Planilha de Processamento HVTN PBMC**

Laboratório de Processamento de Amostras:

ID de Participante (PTID):		Consulta:		Protocolo:	
Data da Coleta:		Hora:			
Data de Início do Processamento:		Hora:		Processado por:	
Reagentes/Fabricante		Número de Lote			Prazo de Validade
DMSO (Fabric.: _____)					
FBS (Fabric.: _____)					
HBSS ou outro WDR (Fabric.: _____)					
Tubo de Separação de Células (Fabric.: _____)					
Meio de Gradiente de Densidade (Fabric.: _____)					
		Volume em mL			
CPS		CPS	DMSO	FBS	1 dia de trabalho
Dados a serem Captados Durante o Processamento					Amostra
Tipo de tubo de amostra (faça um círculo em um)					NaHep / ACD / EDTA Outro: _____
Condições do sangue (faça um círculo em um ou mais)					NORM / HEMO/ COAGUL
Caso indicado no protocolo ou nas instruções de processamento, colete o plasma antes do processamento PBMC. Reponha o volume de plasma com HBSS/WDR. Indique a coleta					Sim          Não
Volume de sangue total utilizável					mL
Indique o método de processamento: Barreira Porosa, Overlay/Underlay Manual ou Reunião da Camada Leucoplaquetária					
Método de contagem (nome do instrumento ou contagem manual)					
Volume de ressuspensão contínua de HBSS (ou outro WDR) (V)					mL
Contagem de concentração média de células (C)					x 10 <sup>6</sup> células/mL
Número total de células (T) = C x V					x 10 <sup>6</sup> células
Cálculo de produção de células/mL de sangue total (Checagem QC)= (T/Volume de Sangue Total Utilizável)					x 10 <sup>6</sup> células/mL
Cálculo de volume de ressuspensão estimada CPS (V1)=(T/15x10 <sup>6</sup> células/ml)(1 mL)					mL
Cálculo do volume de ressuspensão de CPS final (Vf), arredondado PARA BAIXO ao mL inteiro mais próximo					mL
Calcular o número real de células por recipiente <b>N2 = (T/Vf) x V2;</b> (v2=1 mL para a maioria dos protocolos HVTN).					x 10 <sup>6</sup> células/frasco
Data e hora do congelamento (Explique na seção para comentários caso não seja antes de 4 horas após a hora de início do processamento)					
Impressão e conteúdo/código de barras da etiqueta QC LDMS (iniciais da pessoa realizando o QC)					
Número de frascos criogênicos de fato congelados <b>Observação:</b> Deve ser igual ao volume de ressuspensão de congelamento reduzido para alíquotas de 1 mL.					
Preencha os espaços LDMS restantes, incluindo a contagem de células total e a hora de congelamento.					

**Anexo A: Planilha de Processamento HVTN PBMC**

Laboratório de Processamento de Amostras:

PTID:

Transferência de Frascos Criogênicos para Armazenamento em Freezer	
Pessoa que transferiu os frascos criogênicos para local designado pelo LDMS para a caixa de armazenamento	
Data (ddmmaaa)/hora em que os frascos criogênicos foram transferidos do aparelho de resfriamento lento controlado para a caixa de armazenamento. (A amostra precisa ser mantida a -70/-80°C durante a transferência)	
Revisão Final (Revisor/data)	

Contagem do Hemacitômetro	Contagem Total	Células Viáveis	Não Viáveis	
Quadrado N° 1 (células/mm <sup>2</sup> )				
Quadrado N° 2 (células/mm <sup>2</sup> )				
Quadrado N° 3 (células/mm <sup>2</sup> )				
Quadrado N° 4 (células/mm <sup>2</sup> )				
Contagem Média de Células por Quadrado (células/mm <sup>2</sup> )				
Fator de Diluição PBMC (1:DF*)				
Fator de Hemacitômetro para células/mL	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	
Concentração de Contagem de Células (C) = (Média de Células/mm <sup>2</sup> )(DF)(10 <sup>4</sup> ); converta para 10 <sup>6</sup> células/ml	x 10 <sup>6</sup> células/ml	x 10 <sup>6</sup> células/ml	x 10 <sup>6</sup> células/ml	
% viabilidade = (células viáveis/total de células)(100)	Não aplicável		Não aplicável	Não aplicável

Contagem automática de células (10 <sup>3</sup> /μl=10 <sup>6</sup> /mL)	Contagem N° 1			
Contagem de Células (C) como células x 10 <sup>6</sup> /mL				
Fator de Diluição PBMC (1:DF*)				
Concentração de Células = (C)(DF)	x 10 <sup>6</sup> células/ml			

**\*Observação:** Fator de Diluição (DF) = (partes de células + partes de fluido de diluição)/partes de células

Comentários e Desvios do Protocolo:



**Anexo C: Resolução de Problemas: Recuperação de PBMC na Ausência de Faixa PBMC Definida após Centrifugação de Gradiente de Densidade**

**C.1 Cenário:**

Se algo deu errado durante a centrifugação de gradiente de densidade do sangue, o meio de gradiente de densidade e a camada de plasma não vão se separar de modo limpo e a camada de PBMC poderá não ser vista. Não entre em pânico. Podem-se recuperar as PBMC parcialmente através das seguintes etapas.

**C.2 Identifique o problema:**

C.2.1 Remova os tubos da centrífuga e transfira-os para uma prateleira.

C.2.2 Tente identificar por que não há uma camada clara de PBMC. Algumas possíveis causas estão relacionadas abaixo:

C.2.2.1 O tubo sofreu queda ou solavanco.

C.2.2.2 O freio estava ligado.

C.2.2.3 A velocidade da centrífuga estava alta demais. Verifique se o ajuste de rpm estava correto para o procedimento utilizado (CSTFB ou separação de células manual por gradiente de densidade) checando a tabela de RCF/rpm para o rotor. Algumas centrífugas requerem que os ajustes da centrífuga sejam feitos de acordo com o balde usado. Se os ajustes não estiverem corretos, então a centrífuga pode ter calculado a velocidade errado.

C.2.2.4 A centrífuga parou devido à descontinuidade no suprimento de energia elétrica.

C.2.2.5 A barreira porosa foi deslocada. (Isso frequentemente ocorre devido à velocidade de centrifugação ser alta demais, mas ocasionalmente existe um tubo defeituoso no lote)

C.2.2.6 A centrífuga estava desequilibrada.

C.2.2.7 O doador possui contagens baixas de linfócitos, glóbulos brancos ou hematócritos.

**C.3 Das causas acima, as primeiras cinco causas são as mais fáceis de corrigir. Se a causa for devido a uma centrífuga desequilibrada, determine por que a centrífuga está fora de equilíbrio.**

**Cheque o seguinte:**

C.3.1 Cheque se os tubos estão equilibrados.

C.3.2 Cheque se os baldes da centrífuga estão equilibrados.

C.3.3 Cheque se os braços e baldes da centrífuga estão lubrificados corretamente

**Observação:** Sempre que houver dúvidas sobre uma centrífuga, utilize outra.

**C.4 Assumindo que o problema tenha sido corrigido, recentrifugue as amostras como segue:**

C.4.1 Reagentes:

C.4.1.1 Meio de gradiente de densidade

C.4.1.2 Tubos de 50 mL

C.4.1.3 Pipetas

C.4.2 Método:

**Observação:** O meio de gradiente de densidade é tóxico para as células, portanto, trabalhe eficientemente

- C.4.2.1 Adicione 15 mL de meio de gradiente de densidade a tubos estéreis de 50 mL (não CSTFB).
- C.4.2.2 Deixe o meio de gradiente de densidade aquecer até a temperatura ambiente enquanto trabalha com a amostra.
- C.4.2.3 Para cada tubo misturado, etiquete tubos de 50 mL com o PTID do sujeito. Use uma pipeta para remover vagarosamente o conteúdo da amostra misturada da separação ou CSTFB. (Tipicamente, a barreira do CSTFB estará deslocada)
- C.4.2.4 Transfira até 30 mL da amostra misturada ao tubo contendo o meio de gradiente de densidade.
- C.4.2.5 Repita isso para todas as amostras misturadas.
- C.4.2.6 Coloque os tubos na centrifuga, checando que os tubos estejam equilibrados.
- C.4.2.7 Centrifugue por 30 a 40 minutos a 400 x g com os freios DESLIGADOS e entre 15 e 30°C
- C.4.2.8 Uma camada de PBMC deverá agora aparecer. (Frequentemente, algumas células terão se perdido, então a camada pode ser fina).
- C.4.2.9 A camada superior, na qual se encontra o plasma potencialmente contaminado com meio de gradiente de densidade, pode ser coletada nesta fase e processada conforme descrito nas Seções 'PBMC e Isolamento do Plasma' e 'Armazenamento de Plasma' do protocolo de plasma. Entretanto, a informação de que essa amostra de plasma está potencialmente contaminada com meio de gradiente de densidade precisa ser registrada na seção de comentários para essa amostra no LDMS.
- C.4.2.10 Transfira cuidadosamente a camada de PBMC para um tubo cônico de centrifuga etiquetado com o identificador PTID. Use um tubo novo para cada tubo de meio de gradiente de densidade.
- C.4.2.11 Tampe novamente o tubo de meio de gradiente de densidade.
- C.4.2.12 Volte ao Capítulo 15 do protocolo principal.

**Observação:** Na Seção “Comentários e Desvios de Protocolo” da **Planilha de Processamento PBMC**, registre os detalhes do desvio do SOP (ou seja, que etapas do “Anexo B” foram tomadas para recuperar o PBMC devido a ausência de uma faixa de PBMC definida após a centrifugação do gradiente de densidade). Além disso, observe quanto tempo a recentrifugação tomou, de modo a fornecer uma estimativa de quanto tempo as células estiveram em meio de gradiente de densidade. Anote, também, que a amostra de plasma recuperada foi potencialmente contaminada com o meio de gradiente de densidade na **Planilha de Processamento PBMC** e na seção de comentários do LDMS para amostras de plasma.

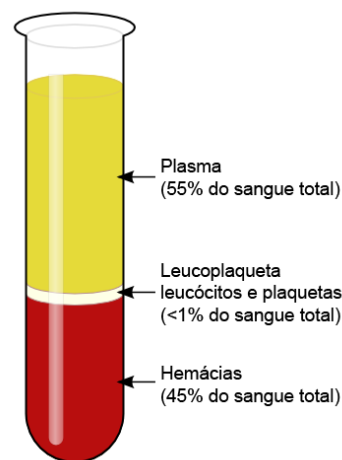
**Anexo D: Unindo Camadas Leucoplaquetárias para Isolamento PBMC em Meio de Gradiente de Densidade**

Este procedimento pode ser utilizado ao isolar PBMCs de múltiplos tubos de sangue da mesma combinação PTID-anticoagulante. Este procedimento permite que se consolidem as camadas leucoplaquetárias para reduzir o uso de reagentes e suprimentos, aumentar a recuperação e diminuir a contaminação.

A camada leucoplaquetária é a fração de sangue total anticoagulado que contém glóbulos brancos (white blood cells, WBCs) e plaquetas, e ocorre após a centrifugação na interface entre as camadas de plasma e de hemácias. A maioria das WBCs encontrada na camada de células brancas com apenas uma pequena fração (< 1 milhão ao total) permanecem no pacote de hemácias após a coleta da camada de células brancas. A camada leucoplaquetária é coletada com uma pequena fração de plasma e hemácias (aproximadamente 1,5 mL) e então diluída antes de sobrepor a um meio de gradiente para separação de linfócitos.

**Procedimento:**

- D1. Certifique-se de que as etapas 16.4.1 a 16.4.3 foram realizadas.
- D2. Centrifugue sangue total de 200 a 400 x g por 10 minutos.
- D3. Colete o plasma (e guarde de acordo com o necessário - ver 16.3.4 a 16.3.7) de cada tubo do interior de aproximadamente 5 mm da camada leucoplaquetária (que é bastante óbvia na maior parte dos casos, exceto se o paciente estiver gravemente neutropênico ou linfopênico).
- D4. Determine a capacidade e número de tubos cônicos de centrífuga que serão necessários para cada combinação PTID-anticoagulante. Não reúna amostras de PTIDs/anticoagulantes diferentes. Em geral:
  - Leucoplaquetas de dois tubos de coleta de sangue de 10 mL podem ser combinadas em um tubo cônico de centrífuga de 15 mL
  - Leucoplaquetas de tubos de coleta de sangue de até 10 mL podem ser combinadas em um tubo cônico de centrífuga de 50 mL.
- D5. Etiquete cada tubo cônico de centrífuga com o PTID.
- D6. Adicione WDR a cada tubo cônico de centrífuga estéril.



Capacidade do Tubo Cônico de Centrífuga (mL)	Volume WDR (mL)
15	3
50	10-15

- D7. Posicione o tubo de plasma depletado (que agora contém uma quantidade pequena de resíduo de plasma e células aglutinadas) a um ângulo aproximado de 30°.
- D8. Utilize uma pipeta de bitola larga, de 2,5 mL, descartável, de polipropileno para coletar as leucoplaquetas. Aspire as leucoplaquetas abaixando a parte de baixo do tubo. Retire vagarosamente o plasma seguido pela camada leucoplaquetária, que “escorregará” pela camada de hemácias (aproximadamente 1,5 mL de aspirado). Transfira as leucoplaquetas para o tubo contendo WDR, enxaguando a pipeta 2 a 3 vezes com a suspensão de WDR/células.
- D9. Colete e junte as leucoplaquetas dos tubos remanescentes para aquela combinação PTID-anticoagulante.
- D10. Adicione WDR à suspensão de WDR/células à QS de volume desejado para realizar a separação de células por densidade de gradiente. Misture suavemente o total de leucoplaquetas de 3 a 4 vezes com uma pipeta.
- D11. Prossiga com a separação de células por densidade de gradiente da etapa 16.4.6 do SOP. Para 16.4.6, “sangue diluído” significa “leucoplaquetas”.

**Materiais adicionais necessários:** Pipeta de polipropileno de bitola larga, de 2,5 mL, estéril.

### Anexo E: Guia Rápido PBMC SOP — CSTFB

O uso de uma **Planilha de Processamento PBMC** do LDMS são *requeridos por todas as redes* (ver Capítulo 5 para detalhes). Antes de utilizar este guia rápido pela primeira vez, certifique-se de revisar o PBMC SOP completo para observações importantes e detalhes, e para diretrizes específicas da rede.

<b>Etapas</b> (Quantidades para volumes menores de amostras estão <i>em itálico</i> .)	<b>Use o SOP como referência.</b>
1. Prepare e esfrie o CPS.	11.2
2. Prepare amostras de sangue total, reagentes e suprimentos.	15.2
3. Se alíquotas de plasma <b>forem</b> requeridas por instrução do protocolo: <ol style="list-style-type: none"> <li>Centrifugue sangue total de 200 a 400 x g por 10 minutos.</li> <li>Marque o volume total de sangue no menisco e transfira o plasma para um tubo cônico de centrífuga de 15 ou 50 mL para continuar o processamento (800 a 1200 x g por 10 minutos, freio opcional)</li> <li>Adicione quantidade suficiente de WDR para trazer o sangue de volta ao seu volume original de sangue total, misture suavemente e continue o processamento do PBMC.</li> </ol>	15.3
4. Adicione 5 mL ( <i>2 mL</i> ) de WDR a cada CSTFB.	15.4
5. Transfira de 12 a 22 mL ( <i>4 a 5 mL</i> ) de sangue para CSTFBs etiquetados.	
6. Adicione enxágue de tubo WDR e WDR final ao CSTFB até 30 mL ( <i>7,5 mL</i> ) (WDR + Sangue Total).	
7. Centrifugue de 800 a 1000 x g por 15 minutos a de 15 a 30°C com o <u>freio desligado (OFF)</u> .	15.5
8. Inspeccione os tubos procurando possíveis problemas.	
9. Colete cada camada leucoplaquetária CSTFB em um único tubo cônico de centrífuga correspondente de 50 mL ( <i>15 mL</i> ).	
10. Adicione WDR até QS para um volume total de 45 mL ( <i>10 mL</i> ) e misture suavemente.	17.1
11. Lavagem N° 1 — centrifugue de 200 a 400 x g por 10 minutos entre 15 e 30°C (freio opcional).	
12. Cheque se há agregados de células!	
13. Remova suavemente o sobrenadante sem perturbar o agregado de células.	
14. Ressuspenda o agregado de células em pequena quantidade de WDR fazendo uma suspensão de células homogênea.	17.2
15. Combine até 4 suspensões de agregados em um tubo cônico de centrífuga de 50 mL ( <i>2 em tubo de 15 mL</i> ).	
16. Adicione enxágue de tubo WDR e WDR final de 45 mL ( <i>10 mL</i> ) ao tubo de células.	
17. Lavagem N° 2 - Centrifugue de 200 a 400 x g por 10 minutos entre 15 e 30°C (freio opcional).	
18. Cheque se há agregados de células!	
19. Remova suavemente o sobrenadante sem perturbar o agregado de células.	
20. Calcule o volume de WDR de ressuspensão de contagem (V).	17.3
21. Combine agregados de células em um tubo usando volume de WDR de ressuspensão. Esse é o volume no qual a contagem de células é baseada.	
22. Conte e calcule o número total de células.	
23. Calcule a produção de células em células/mL de sangue total utilizável.	
24. Calcule o volume final de CPS. Cheque os cálculos.	17.4
25. Execute a impressão, etiquetagem e QC de frascos criogênicos ANTES da centrifugação final.	17.5
26. Centrifugue de 200 a 400 x g por 10 minutos entre 15 e 30°C (freio opcional).	17.6
27. Remova suavemente o sobrenadante sem perturbar o agregado de células.	17.7
28. Ressuspenda suavemente o agregado em CPS <b>frio</b> ( $V_f$ ) enquanto gira o tubo para obter distribuição por igual. Recomenda-se trabalhar em gelo molhado.	
29. Separe suavemente alíquotas de CPS-células.	
30. Transfira imediatamente ( $\leq 10$ minutos) todos os frascos criogênicos para o equipamento de congelamento controlado e inicie o congelamento.	17.8
31. Após o período de tempo apropriado, transfira os frascos criogênicos para o equipamento de armazenamento local e envie dentro do período de tempo determinado pela rede.	18
32. Complete a <b>Planilha PBMC de processamento</b> como dirigido pela rede.	19.1



**Anexo F: Guia Rápido para PBMC SOP — Overlay Manual**

O uso de uma **Planilha de Processamento PBMC** do LDMS são **requeridos por todas as redes** (ver Capítulo 5 para detalhes). Antes de utilizar este guia rápido pela primeira vez, certifique-se de revisar o PBMC SOP completo para observações importantes e detalhes, e para diretrizes específicas da rede.

<b>Etapas</b> (Quantidades para volumes menores de amostras estão <i>em itálico</i> .)	<b>Use o SOP como referência.</b>
1. Prepare e esfrie o CPS.	11.2
2. Prepare amostras de sangue total, reagentes e suprimentos.	16.2
3. Se alíquotas de plasma <b>forem</b> requeridas por instrução do protocolo: a. Centrifugue sangue total de 200 a 400 x g por 10 minutos. b. Marque o volume total de sangue no menisco e transfira o plasma para um tubo cônico de centrifuga de 15 ou 50 mL para continuar o processamento (800 a 1200 x g por 10 minutos, freio opcional) c. Adicione quantidade suficiente de WDR para trazer o sangue de volta ao seu volume original de sangue total, misture suavemente e continue o processamento do PBMC.	16.3
4. Transfira o sangue total para um tubo cônico de centrifuga estéril, de 50 mL ( <i>15 mL</i> ) e dilua com WDR conforme necessidade.	16.4
5. De modo cuidadoso e vagaroso, sobreponha sangue sobre o meio de gradiente de densidade. (O método Underlay é uma alternativa aprovada).	
6. Centrifugue a 400 x g por 30 minutos com o <u>freio DESLIGADO</u> .	16.5
7. Cheque cada tubo cônico de centrifuga para possíveis problemas.	
8. Colete cada camada leucoplaquetária em um tubo cônico de centrifuga correspondente, de 50 mL ( <i>15 mL</i> ).	
9. Adicione WDR até QS para um volume total de 45 mL ( <i>10 mL</i> ) e misture suavemente.	17.1
10. Lavagem N° 1 — centrifugue de 200 a 400 x g por 10 minutos entre 15 e 30°C (freio opcional).	
11. Cheque se há agregados de células!	
12. Remova suavemente o sobrenadante sem perturbar o agregado de células.	
13. Ressuspenda o agregado de células em pequena quantidade de WDR fazendo uma suspensão de células homogênea.	17.2
14. Combine até 4 suspensões de agregados em um tubo cônico de centrifuga de 50 mL ( <i>2 em tubo de 15 mL</i> ).	
15. Adicione enxágue de tubo WDR e WDR final de 45 mL ( <i>10 mL</i> ) ao tubo de células.	
16. Lavagem N° 2 - Centrifugue de 200 a 400 x g por 10 minutos entre 15 e 30°C (freio opcional).	
17. Cheque se há agregados de células!	
18. Remova suavemente o sobrenadante sem perturbar o agregado de células.	
19. Calcule o volume de WDR de ressuspensão de contagem (V).	17.3
20. Combine agregados de células em um tubo usando volume de WDR de ressuspensão. Esse é o volume no qual a contagem de células é baseada.	
21. Conte e calcule o número total de células.	
22. Calcule a produção de células em células/mL de sangue total utilizável.	
23. Calcule o volume final de CPS. Cheque os cálculos.	17.4
24. Execute a impressão, etiquetagem e QC de frascos criogênicos ANTES da centrifugação final.	17.5
25. Centrifugue de 200 a 400 x g por 10 minutos entre 15 e 30°C (freio opcional).	17.6
26. Remova suavemente o sobrenadante sem perturbar o agregado de células.	17.7
27. Ressuspenda suavemente o agregado em CPS <b>frio</b> (V <sub>f</sub> ) enquanto gira o tubo para obter distribuição por igual. Recomenda-se trabalhar em gelo molhado.	
28. Separe suavemente alíquotas de CPS-células.	
29. Transfira imediatamente ( $\leq$ 10 minutos) todos os frascos criogênicos para o equipamento de congelamento controlado e inicie o congelamento.	17.8
30. Após o período de tempo apropriado, transfira os frascos criogênicos para o equipamento de armazenamento local e envie dentro do período de tempo determinado pela rede.	18
31. Complete a <b>Planilha PBMC de processamento</b> como dirigido pela rede.	19.1

**Anexo G: Exemplos de Reagentes e Suprimentos**

**Observação: Todos os reagentes precisam ser adquiridos estéreis e o uso de técnica de assepsia é requerido.**

Reagente/Suprimento	Exemplo(s)	Opcional/Requerido
Tubos de separação de células pré-preenchidos com barreiras porosas (CSTFB) com meio de gradiente de densidade de 1,077.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Accuspin™ System Histopaque®-1077</li> <li>• Ficoll-Paque™ PLUS</li> </ul>	Opcional
CSTFB seco	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tubos de separação Accuspin™</li> <li>• Tubos de separação Leucosep®</li> </ul>	Opcional
Meio de Gradiente de Densidade 1,077	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ficoll-Paque PLUS e PREMIUM</li> <li>• Lymphoprep™</li> <li>• Meio de Separação de Linfócitos – LSM™</li> </ul>	Opcional
Dimetilsulfóxido (DMSO), para cultura de células	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hybrimax, Sigma-Aldrich cat# D2650, testado para endotoxinas, testado para hibridoma</li> </ul>	Opcional
Soro Fetal Bovino (FBS)		<p><b>ACTG, IMPAACT e HPTN:</b> Ver informação sobre lotes atuais validados IQA.</p> <p><b>HVTN e MTN:</b> Use lotes HVTN validados; se não for possível ter acesso ou importar lotes especificados de HVTN, cheque com HVTN/MTN por outras opções.</p>
Frascos Criogênicos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Corning® 2mL recipiente criogênico de polipropileno de rosca externa, auto-suporte de fundo redondo (external thread polypropylene cryogenic vial, self-standing with round bottom) #430659</li> <li>• Nunc CryoTubes™, rosca interna, tubos e tampa de polipropileno (PP) (internal thread, polypropylene (PP) tubes and screw cap) #377267</li> <li>• WHEATON Cryule® Recipientes Criogênicos de Plástico, rosca externa, (Plastic Cryogenic Vials, external thread) #985742</li> <li>• SARSTEDT Tampa rosqueada de micro tubo, rosca externa (Screw cap micro tube, external thread) #72.694.006</li> </ul>	<p>Opcional</p> <p>Observação para o microtubo com tampa rosqueada SARSTEDT: O fabricante só oferece aprovação por escrito para o armazenamento a frio até -86°C, mas a Networks possui diversos dados históricos que validam a integridade mantida usando esses tubos para a criopreservação de células mononucleares do sangue periférico (PBMC). Sendo assim, esses tubos ainda são aprovados para a criopreservação de PBMC.</p>
Etiquetas criogênicas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cryo-Tags® e Cryo-Babies® Brady B461 ou B490</li> <li>• Etiquetas de freezer Shamrock (Shamrock freezer labels).</li> </ul>	Opcional
Marcadores permanentes	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fisherband* Marking Pens #13-379 (marcadores permanentes)</li> <li>• Nalgene® Lab Pen/Lab Marker #6310/#6311 I (caneta de laboratório/marcador)</li> </ul>	Opcional

**Anexo H: Histórico de revisão da versão 5.0 para 6.0**

Versão Data de Efetivação da (dd/mmm/yy)	Observações	
6.0 30 de abril de 2018	Aprovações	Grace Aldrovandi substituiu Bob Coombs para autorização de ACTG. John Hural substituiu Constance Ducar para autorização de HVTN. Edward Livant substituiu Charlene Dezzutti para autorização de MTN.
	8.1.4	Adicionou os requisitos adicionais capturados no memorando de 7 de outubro de 2016 para laboratórios ACTG e IMPAACT apenas. Também adicionou requisitos extras relacionados a criotubos para todas as redes.
	18.2.1	Adicionou diretrizes extras para as temperaturas de ponto de ajuste do freezer.
	Anexo D	Alterou "A maioria das WBCs..." para "A maioria das WBCs..."
	Anexo G	Adicionou informações à seção Criotubo relacionadas ao uso do microtubo de tampa de rosquear SARSTEDT.
5.2 22 de setembro de 2014	5.1.3	Alterado " O laboratório pode usar a <b>Planilha de Processamento HVTN PBMC</b> , ou modificá-la para adequação aos procedimentos de laboratório " para "O laboratório pode usar a <b>Planilha de Processamento HVTN PBMC</b> , modificados para seguir os requisitos de rede correspondente e adequado para os procedimentos do laboratório"
5.1 30 de julho de 2014	5.1.3	Orientações para acompanhamento de PBMC processamento gráfico:- Total, número de celular: "(optional for HVTN)" foi adicionado ao lado N
	16.4.5	Nota foi omitida, desde que não há nenhum frit nos tubos cônicos quando fazendo sobreposição manual ou subjacência
	16.4.6	Referências sobre o método de sobreposição foi alterado para 16.4.6.1 e Underlay método para 16.4.6.2
	18.1	Diretrizes HPTN, IMPAACT e MTN para tempo de armazenamento/ transferência adicionadas.
	14, 18.1, 18.3, 18.3.1	Alterados "LN2 /-150°C congelador mecânico " para "LN2 dewar ou -150°C congelador mecânico"
	18.3	Linguagem simplificada para PBMCs armazenados no LN2 dewar ou -150°C congelador mecânico e excluída a estipulação de "mais de 4 semanas".
	18.3.1-18.3.2	Diretriz para tempode transferência exigida alterada de "no próximo dia útil" para "Dentro de 72 horas"
	18.3.1	Alterado "LN2 /-150°C" para "LN2 ou -150°C "
	22, 24.2	RPMI como opção foi suprimida
	Anexo E, F	Referência de SOP alterado passo 31 de "11.3" para "11.2"
	Anexo E	Referência de SOP alterado passo 31 de "18 ou 19" para "18"
	Anexo E	Referência de SOP alterado passo 32 de "19.2" para "19.1"
	Anexo E	Declaração de passo 32 alterada para "Completar a <b>planilha de processamento PBMC</b> como dirigido pela rede."
	Anexo F	Passos 9 a 12: alterado "16.1" para "17.1"
	Anexo F	Passos 9 a 12: alterado "16.2" para "17.2"
Anexo F	Passos 9 a 12: alterado "16.3" para "17.3"	
Anexo F	Referência de SOP alterado passo 30 de "18 ou 19" para "18"	
Anexo F	Referência de SOP alterado passo 31 de "19.2" para "19.1"	

	Anexo F	Declaração de passo 32 alterada para "Completar a <b>planilha de processamento PBMC</b> como dirigido pela rede."
5.0 1 de maio de 2014	Aprovações	Grace Aldrovandi substituiu Susan Fiscus para Autorização IMPAACT
	5.1.3	Tabela de diretrizes para controlar o processamento de PBMC: Instruções: "L = Controle na LDMS é requerido pela LDMS" foi alterado para "L = Campo obrigatório na LDMS para amostras de rede"
	5.1.3	Tabela de diretrizes para controlar o processamento de PBMC-: "Número de Amostra LDMS" foi alterado para "ID Global de Amostras LDMS"
	5.1.3	Células preenchidas em cinza para indicar que a informação não é necessária foram alteradas para preto.
	7.1.8	HPTN e MTN adicionados
	10.2	Alternativa do uso de RMPI como substituto foi excluída
	14	Mudanças de formatação
	18 e 19	As instruções combinadas de armazenagem temporária e no local mudaram de duas seções para uma, a Seção 18.
	19	O idioma de preenchimento do processamento de documentos repetido na Seção 18 e 19 foi separado e agora possui sua própria seção.
	Anexo H	O histórico de alterações das demais versões foi apagado, permanecendo apenas as alterações da versão atual que são apropriadas para este documento.