






Titre :	SOP relative au traitement des PBMC inter-réseaux		
Date de création :	1er avril 2009	Pages totales :	62
Date d'entrée en vigueur :	3 fév 2012	Numéro de SOP	HANC-LAB-P0001v4
Rédigée par :	SOP relative aux PBMC inter-réseaux Groupe de travail	Remplace la SOP en date du :	07 juil 2009

	Réseau	Nom, titre	Signature	Date
Approuvée par (réseau) :	ACTG	Dr Robert W. Coombs, MD, PhD, FRCPC Investigateur principal du laboratoire du réseau ACTG		3/10/11
	HPTN	Estelle Piwovar-Manning, MT(ASCP)SI Directrice adjointe du laboratoire du réseau HPTN		3/10/11
	HVTN	Constance Ducar, MT-ASCP Responsable du programme des Opérations de laboratoire du HVTN		3/10/11
	IMPAACT	Dr Susan Fiscus, PhD Investigateur principal du laboratoire du réseau IMPAACT		3/10/11
	MTN	Dr Charlene Dezzutti, PhD Investigateur principal du laboratoire du réseau MTN		3/10/11

Historique des révisions	Pour l'historique complet des révisions, se reporter à l'annexe H.
---------------------------------	--

	Nom, titre	Signature	Date
Révisée par (laboratoire) :			

Table des matières

1	Objectif	3
2	Portée	3
3	Contexte	3
4	Autorité et responsabilité	3
5	Rapport des résultats	3
6	Échantillon	6
7	Équipement	7
8	Matériaux jetables	9
9	Équipement de protection individuel	9
10	Réactifs	10
11	Préparation du réactif	12
12	Calibrage	13
13	Contrôle qualité	14
14	Traitement des PBMC Présentation et directives	16
15	Séparation cellulaire et dilution du sang avec remplacement du plasma à l'aide d'un tube de séparation cellulaire avec barrière frittée (CSTFB)	17
16	Séparation cellulaire par la méthode d'application manuelle de milieu à gradient de densité sur ou sous couche et dilution du sang par séparation cellulaire manuelle en gradient de densité avec remplacement du plasma	21
17	Lavage, numération, resuspension, concentration et congélation à vitesse contrôlée pendant la nuit ..	25
18	Conservation temporaire sur place à une température de -70/-80°C	30
19	Conservation sur place dans de l'azote liquide (LN2)/un congélateur mécanique à -150 °C	32
20	Calculs	33
21	Limites de la procédure	33
22	Glossaire	33
23	Références	34
24	Documents supplémentaires (tenus à jour par le laboratoire)	35
25	Annexes	35
	Annexe A : Formulaire de traitement des PBMC requis pour le HVTN	37
	Annexe B : Exemple de journal des modifications de l'isopropanol pour Mr. Frosty® (NALGENE)	39
	Annexe C : Dépannage : Récupération des PBMC en l'absence de bande de PBMC définie après centrifugation en gradient de densité	40
	Annexe D : Rassemblement des couches leuco-plaquettaires pour isolation des PBMC par la méthode du milieu à gradient de densité	42
	Annexe E : Guide rapide de la SOP relative au traitement des PBMC - tubes CSTFB	44
	Annexe F : Guide rapide de la SOP relative au traitement des PBMC - Méthode manuelle d'application sur couche	46
	Annexe G : Exemples de réactifs et fournitures	48
	Annexe H : Historique des révisions	49

*L'annexe A est également disponible en version téléchargeable et révisable sur le site Internet public du HANC à l'adresse suivante : <http://www.hanc.info/labs/labresources/procedures/Pages/pbmcSop.aspx>

1 Objectif

- 1.1 Cette procédure opérationnelle standard (Standard Operating Procedure, SOP) décrit les procédures pour l'isolation et la cryoconservation de cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) à partir du sang total.

2 Portée

- 2.1 Cette procédure doit être utilisée pour le traitement des échantillons sanguins pour l'isolation, la cryoconservation et le stockage des échantillons de PBMC. Les instructions propres aux protocoles des réseaux remplacent celles qui sont fournies dans cette SOP.

3 Contexte

- 3.1 Les PBMC fraîchement prélevées ou cryoconservées sont utilisées pour l'évaluation de vaccins ou de réponses cellulaires immunitaires induites par thérapie antirétrovirale, des changements associés au VIH dans la réponse immunitaire et la récupération de virus aptes à la réplication. Ces tests nécessitent que les PBMC aient été isolées et cryoconservées dans des conditions strictement définies afin d'assurer une récupération, viabilité et fonctionnalité optimales. Certaines études de validation indiquent que les conditions optimales consistent à traiter et congeler le sang dans les huit heures suivant le prélèvement sanguin afin de maintenir la fonction maximale des cellules dans les tests de surveillance immunitaire.

4 Autorité et responsabilité

- 4.1 Le directeur du laboratoire du réseau (ou son délégué) détient l'autorité nécessaire pour établir, examiner et mettre à jour cette procédure.
- 4.2 Le bureau de coordination des réseaux sur le VIH SIDA (HIV/AIDS Network Coordination, HANC) est responsable de la maintenance et du contrôle des documents SOP.
- 4.3 Le directeur du laboratoire est responsable de la mise en application de la SOP du HANC ou de toute SOP propre au laboratoire et doit veiller à ce que tout le personnel concerné soit formé. Une SOP de laboratoire doit :
- inclure, *sans modification de procédure*, les parties de la version actuelle de la SOP relative au traitement des PBMC inter-réseaux qui sont utilisées au sein du laboratoire affilié au site du réseau
 - faire référence à la version actuelle de la SOP relative au traitement des PBMC inter-réseaux
- Remarque** : pour les laboratoires traitant des PBMC pour le HVTN, le laboratoire doit utiliser la SOP relative aux PBMC du HANC telle quelle ou la version de la SOP du HANC propre au HVTN.
- 4.4 Il est de la responsabilité de tous les techniciens de lire et comprendre cette SOP avant d'effectuer les procédures décrites.

5 Rapport des résultats

- 5.1 L'utilisation d'un formulaire de traitement des PBMC et du système de gestion des données de laboratoire (Laboratory Data Management System, LDMS) est requise pour tous les réseaux afin de suivre le temps de traitement, les calculs et la documentation de problèmes survenant durant le traitement.

5.1.1 Exigences pour tous les réseaux :

- Saisir les données dans le LDMS pour la génération d'étiquettes de tubes cryogéniques, la documentation de l'endroit de conservation et les exigences manifestes d'expédition. Se reporter au tableau ci-dessous pour plus de détails sur les exigences.
- Signaler les écarts conformément au protocole du laboratoire.

5.1.2 Exigences pour le HVTN

L'utilisation de l'intégralité du formulaire de traitement des PBMC est requise pour le HVTN. Si un formulaire de traitement des PBMC spécifique au protocole n'est pas requis dans les « Instructions de traitement propres au protocole du HVTN », le formulaire générique fourni à l'annexe A et à l'adresse

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

5.1.3 Exigences pour l'ACTG, l'IMPAACT, le HPTN et le MTN

- Le laboratoire peut utiliser le **formulaire de traitement des PBMC requis par le HVTN** ou le modifier pour l'adapter à ses procédures. Si le laboratoire décide d'élaborer son propre formulaire de traitement des PBMC et des supports de suivi supplémentaires (tels que le LDMS, un formulaire ou un journal distinct), il devra suivre les directives ci-dessous.
- Des formulaires de traitement des PBMC révisibles et des exemples de supports de suivi supplémentaires sont disponibles en version électronique téléchargeable et modifiable à l'adresse suivante :

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

Directives pour le suivi du traitement des PBMC		
Champ	Exigences relatives à l'utilisation du formulaire pour l'ACTG, le HPTN, l'IMPAACT et le MTN* (HVTN : l'utilisation de l'intégralité du formulaire de traitement des PBMC est requise pour le HVTN.)	Exigences relatives à l'utilisation du LDMS pour tous les réseaux**
Laboratoire de traitement des échantillons	F	L
ID du participant	F	L
Visite numéro	F	L
Protocole	F	L
Numéro LDMS de l'échantillon	F	[Automatique]
Date/heure du début du traitement	F	R
Traité par (tech.)	F	R
Méthode de numération (nom de l'instrument ou numération manuelle)	F	
Volume de resuspension du WDR pour la numération (V)	F	
Concentration moyenne de la numération cellulaire (C)	F	
Nombre total de cellules (T) = C x V	F	R
Calculer le volume final de la resuspension de CPS (V _f)	F	
Date et heure de la congélation	F	R

Directives pour le suivi du traitement des PBMC		
Champ	Exigences relatives à l'utilisation du formulaire pour l'ACTG, le HPTN, l'IMPAACT et le MTN* (HVTN : l'utilisation de l'intégralité du formulaire de traitement des PBMC est requise pour le HVTN.)	Exigences relatives à l'utilisation du LDMS pour tous les réseaux**
Commentaires et écarts au protocole, comprenant mais sans s'y limiter : <ul style="list-style-type: none"> tous les états inattendus de l'échantillon si le sang a coagulé, le nombre de tubes comportant des caillots, le nombre total de tubes du lot du PTID et les détails concernant le traitement du sang coagulé un rendement cellulaire en dessous de la fourchette attendue des anomalies de traitement les mesures de dépannage prises noter si le temps total est supérieur à 8 heures 	F	O
Date/heure du prélèvement	S	L
Réactifs (Fabricants, Numéros de lots et dates d'expiration pour le DMSO, le SVF, le WDR, le CSTFB et le milieu à gradient de densité)	S	
CPS (volume de DMSO et de SVF)	S	
Type de tube d'échantillon (NaHep/ACD/EDTA/autre)	S	L
État du sang (ex. : SAT/HÉMO/CAILLOTS)	S	L
Volume de sang total utilisable	S	L (« Volume »)
Numérations cellulaires	S	
Nombre réel de cellules par tube	S	L
Nombre de tubes cryogéniques congelés	S	L
Informations relatives à la conservation dans un congélateur (Module de conservation du LDMS)	O	R
Confirmation du contrôle qualité visuel des réactifs (tech.)	O	
Rendement cellulaire/ml de sang total	O	
Vol. estimé de la resuspension de CPS (V1)	O	
Confirmation du contrôle de la qualité du contenu/code-barres des étiquettes LDMS (tech.)	O	
Confirmation du transfert des tubes cryogéniques dans les emplacements de la boîte de conservation affectés par le LDMS (tech.)	O	
Date/heure auxquelles les tubes cryogéniques ont été transférés depuis le dispositif de refroidissement lent dans la boîte de conservation.	O	
Examineur/date de l'examen final	O	

* F = le suivi sur un formulaire de traitement des PBMC est requis.

S = le suivi est requis, mais des supports de suivi supplémentaires (tels que le LDMS, un autre formulaire ou journal) peuvent être utilisés

O = le suivi sur un formulaire ou un support de suivi supplémentaire est facultatif

** L = le suivi dans le LDMS est requis par le LDMS

R = le suivi dans le LDMS est requis par les réseaux

O = le suivi dans le LDMS est facultatif

6 Échantillon

6.1 Préparation du patient

Aucun

6.2 Type d'échantillon

Sang total anticoagulé prélevé dans des tubes de prélèvement

6.3 Volume optimal/minimal d'échantillon

Volume de sang requis déterminé par le protocole

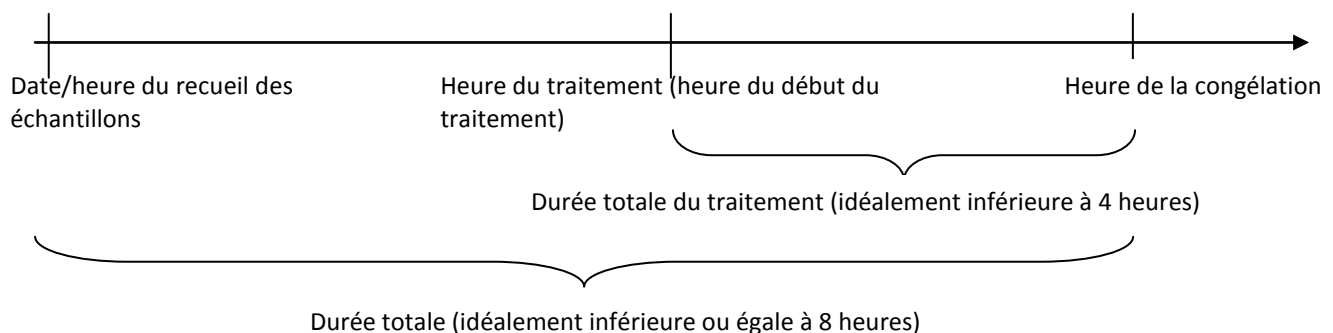
6.4 Conditions de manipulation

6.4.1 Les échantillons de sang total anticoagulé frais doivent être conservés à température ambiante (entre 15 et 30 °C) à partir du moment du prélèvement jusqu'à leur arrivée au laboratoire/à l'unité de traitement.

6.4.2 Les échantillons de sang total anticoagulé frais doivent être livrés à l'unité de traitement du laboratoire dès que possible après le prélèvement afin d'accorder au laboratoire suffisamment de temps pour réaliser les procédures de cryoconservation.

6.4.3 Les échantillons de sang total anticoagulé frais doivent être traités par l'unité de traitement du laboratoire dès que possible après réception :

- L'heure du traitement (heure du début du traitement) est l'heure à laquelle le tube est ouvert ou placé dans la centrifugeuse pour la première fois, quel que soit l'ordre dans lequel ces deux étapes sont exécutées.
- L'heure de la congélation est définie comme l'heure à laquelle :
 - StrataCooler® Cryo, Mr. Frosty® (NALGENE) ou CoolCell® (BioCision) est placé dans le congélateur à -80 °C.
 - Le programme de refroidissement du congélateur à vitesse contrôlée, tel que CryoMed®, est lancé.
- La durée totale est calculée d'après l'heure du recueil de l'échantillon et l'heure de la congélation ; idéalement, elle est inférieure ou égale à huit heures mais tous les échantillons doivent être traités quelle que soit la durée totale.
- La durée totale du traitement est calculée d'après l'heure du traitement et l'heure de la congélation ; il est recommandé que cette durée soit inférieure à quatre heures.



6.4.4 Ne pas réfrigérer ni congeler le sang total.

6.5 Échantillons marginaux

Documenter tous les états inattendus de l'échantillon ainsi que les mesures prises conformément aux exigences du réseau et laboratoire. Se reporter au chapitre 5 pour plus de détails.

- 6.5.1 Échantillons coagulés
 - 6.5.1.1 Tout le sang doit être traité, qu'il contienne des caillots ou non, sauf instructions contraires du protocole.
 - 6.5.1.2 Retirer les caillots et poursuivre le traitement selon la procédure habituelle.
 - 6.5.1.3 Si le rendement cellulaire est insuffisant pour satisfaire aux besoins du protocole, demander un éventuel remplacement de l'échantillon à l'hôpital. Pour le HVTN, si le rendement cellulaire est inférieur ou égal à $0,4 \times 10^6$ cellules/ml, demander un éventuel remplacement de l'échantillon à l'hôpital.
- 6.5.2 Échantillons hémolysés
 - 6.5.2.1 L'hémolyse peut affecter la qualité des PBMC.
 - 6.5.2.2 Suivre la procédure habituelle.
 - 6.5.2.3 Si le rendement cellulaire est significativement en dessous de la fourchette attendue, conserver les PBMC avec les notes appropriées et demander un éventuel remplacement de l'échantillon à l'hôpital. Pour le HVTN, si le rendement cellulaire est inférieur ou égal à $0,4 \times 10^6$ cellules/ml, demander un éventuel remplacement de l'échantillon à l'hôpital.

6.6 Échantillons inacceptables

- 6.6.1 Les échantillons non étiquetés ou mal étiquetés seront rejetés.
- 6.6.2 Échantillons présentant une fuite

Signaler à l'hôpital tout échantillon présentant une fuite et déterminer si l'échantillon est utilisable.

7 Équipement

7.1 Préparation et traitement

- 7.1.1 Poste de sécurité microbiologique (PSM) de type II, comme mis en place par le laboratoire (P2, P2,5 ou P3)
- 7.1.2 Centrifugeuse à basse vitesse (de 300 à 1 000 x g) munie d'un récipient de rotation à bascule, de préférence réfrigérée, à température ambiante acceptable
- 7.1.3 Micropipettes, gamme de 20, 200, 1 000µl
- 7.1.4 Pipet-Aid (de préférence sans fil) pour pipettes sérologiques jetables
- 7.1.5 Réfrigérateur à une température comprise entre 2 et 8 °C
- 7.1.6 Congélateur à -20 °C (ou à une température inférieure) *sans* dégivrage automatique (pour conserver du SVF)
- 7.1.7 Congélateur à -80 °C (entre -65 et -95 °C) ; pour la conservation à court terme des PBMC
- 7.1.8 Congélateur mécanique à -150 °C (uniquement pour l'IMPAACT, s'il n'y a pas de congélateur à azote liquide (LN2) disponible pour la conservation à long terme)
- 7.1.9 Bain-marie à une température comprise entre 37 et 56 °C (pour l'inactivation du SVF par la chaleur, le cas échéant)
- 7.1.10 Récipient ou bécet pour l'eau de Javel ou autre désinfectant, pour rincer les pipettes si requis par les pratiques de sécurité locales

7.2 Équipement à azote liquide (LN2) (si requis par le réseau)

- 7.2.1 Réservoir de stockage de LN2 (≤ -140 °C)
- 7.2.2 Conteneur de transport sec pour LN2 approuvé par l'IATA

7.3 Numération cellulaire (sélectionner l'une des options suivantes)

- 7.3.1 Compteur cellulaire automatisé capable d'énumérer les cellules viables (Beckman-Coulter Vi-Cell, Guava PCA® ou équivalent).

Remarque pour le HVTN : les méthodes de numération doivent être examinées et approuvées préalablement par le HVTN.

- 7.3.2 Compteur cellulaire automatisé ne permettant pas de distinguer les cellules viables (Coulter Coulter, Abbott Cell-Dyn®, Sysmex® ou équivalent).

Remarque : un compteur cellulaire automatisé ne permettant pas d'identifier les cellules viables peut être utilisé pour obtenir une numération cellulaire totale sans énumération des cellules viables, sauf si les échantillons sont en cours de préparation pour le programme de test de maîtrise de la cryoconservation des PBMC de l'IQA. Si des échantillons sont en cours de préparation pour le programme de test de maîtrise de la cryoconservation des PBMC de l'IQA, il est nécessaire d'utiliser une solution de bleu trypan pour obtenir une numération des cellules viables.

- 7.3.3 Chambre de numération cellulaire manuelle (hémacytomètre) et microscope à champ lumineux.

Remarque : si une chambre de numération cellulaire manuelle est utilisée avec une solution de bleu trypan, les cellules viables doit être énumérées et utilisées pour les calculs de cellules. Si une solution de cristal violet est utilisée, la numération cellulaire totale doit être utilisée pour les calculs de cellules. Si des échantillons sont en cours de préparation pour le programme de test de maîtrise de la cryoconservation des PBMC de l'IQA, il est nécessaire d'utiliser une solution de bleu trypan pour obtenir une numération des cellules viables.

7.4 Cryoconservation

Utiliser l'une des options suivantes conformément aux instructions du fabricant. Il est préférable d'utiliser StrataCooler® (Stratagene) ou CoolCell® (BioCision).

Remarque : si les instructions du fabricant ne sont pas respectées, une étude de validation doit être réalisée.

- 7.4.1 StrataCooler® Cryo (Stratagene)

StrataCooler® Cryo doit être à une température comprise entre 2 et 8 °C avant de commencer le refroidissement des tubes cryogéniques. Ne pas placer les tubes cryogéniques dans un StrataCooler® Cryo dont la température initiale est inférieure à 2 °C.

- 7.4.2 CoolCell® (BioCision)

S'assurer que toutes les parties du CoolCell®, y compris l'anneau central, reviennent à température ambiante entre chaque utilisation.

- 7.4.3 Mr. Frosty® (NALGENE), boîte de congélation progressive de 1 °C/minute

Mr. Frosty® doit être entreposé à température ambiante (entre 15 et 30°C) entre chaque utilisation.

Le niveau d'isopropanol doit être correct et il faut remplacer l'isopropanol tous les cinq cycles de congélation/décongélation. Un journal doit être tenu pour suivre les cycles de congélation/décongélation et les modifications du réactif. Se reporter à l'annexe B.

7.4.4 Congélateur à vitesse contrôlée, tel que la chambre de congélation CryoMed® (Gordinier)

8 Matériaux jetables

8.1 Plastiques

8.1.1 Pipettes sérologiques jetables de 1, 5, 10, 25, 50 ml, stériles

8.1.2 Pointes de précision pour pipettes, 20, 100, 200, 1 000 µl, stériles

8.1.3 Tubes à centrifuger jetables de 15 et 50 ml, stériles, à fond conique, en polypropylène gradué.

8.1.4 Tubes cryogéniques (cryotubes), de 1,8 à 2 ml, bouchon à visser avec joint torique, stériles, en polypropylène uniquement, autoportants, gradués, anti-fuites, formulés pour la conservation dans de l'azote liquide (LN2) en phase vapeur (approximativement à -140 °C).

Remarque : toutes les marques de tubes cryogéniques ne conviennent pas à la conservation à long terme dans du LN2. Se reporter à l'annexe G pour des exemples répondant aux exigences.

Remarque : si un protocole requiert la récolte de plasma, il est préférable alors d'utiliser des tubes à filetage externe pour la conservation du plasma.

8.1.5 *Facultatif* : bouteilles/flacons stériles, jetables, à col de 45 mm, de 250 à 500 ml pour rassembler des volumes importants de prélèvements de sang total avant la séparation des PBMC.

8.1.6 *Facultatif* : pipettes de transfert en plastique de 5 ml stériles, emballées individuellement

8.1.7 *Facultatif* : si des tubes de séparation cellulaire munis de barrières frittées (CSTFB) pré-remplis ne sont pas utilisés, des tubes CSTFB (se reporter à la section 9.2 pour plus de détails) ou des tubes à centrifuger jetables à fond conique de 15 et de 50 ml vides, comme indiqué dans la section 8.1.3, seront requis. Se reporter à l'annexe G pour des exemples répondant aux exigences.

8.2 Marqueurs

Les marqueurs pour écrire sur les tubes et les flacons de traitement doivent avoir une pointe fine et contenir une encre indélébile à séchage rapide. (Se reporter à l'annexe G pour des exemples.)

8.3 Étiquettes

Étiquettes cryogéniques convenant à une température de -80 °C et à l'azote liquide (LN2). Se reporter à l'annexe G pour des exemples répondant aux exigences.

9 Équipement de protection individuel

Un équipement de protection individuel convenant à la manipulation des agents pathogènes à diffusion hémotogène est requis. Suivre les directives et pratiques du laboratoire local pour la manipulation de produits sanguins.

9.1 Blouse de laboratoire

9.2 Protection oculaire

9.3 Gants en nitrile non poudrés ou équivalents

9.4 Des cryogants et écrans faciaux (avec protège-menton facultatif) sont nécessaires en cas d'utilisation de l'azote liquide (LN2)

10 Réactifs

10.1 L'acquisition de réactifs stériles et l'utilisation de techniques aseptiques sont requises.

- 10.1.1 Conserver les flacons ouverts à la température recommandée par le fabricant jusqu'à leur utilisation ou la date d'expiration du fabricant.
- 10.1.2 Jeter les flacons si des signes visibles de contamination, tels qu'un aspect trouble, apparaissent.

10.2 Réactifs diluants de lavage (WDR)

Solution saline équilibrée de Hank (HBSS*) sans calcium ni magnésium, prête à l'emploi.

*Alternative : 1X tampon phosphate salin (PBS) sans calcium ni magnésium, prêt à l'emploi.

**Alternative pour l'ACTG, l'IMPACT et le HPTN : milieu RPMI sans SVF ni antibiotiques.

10.3 Tube de séparation cellulaire avec barrière frittée (CSTFB)

Remarque : le laboratoire peut utiliser un tube CSTFB ou une méthode d'application manuelle sur ou sous couche avec un tube à centrifuger à fond conique.

Remarque : en cas d'utilisation de tubes CSTFB, se conformer au chapitre 15. en cas d'utilisation d'une méthode manuelle d'application sur ou sous couche (sans barrière frittée), se conformer au chapitre 16.

10.3.1 Tubes CSTFB pré-remplis (avec milieu à gradient de densité de 1,077)

La capacité requise pour le tube dépendra du volume de sang total (se reporter à la section 15.4). (Se reporter à l'annexe G pour des exemples de tubes CSTFB pré-remplis.)

Conditions de conservation :

- Conserver au réfrigérateur (à une température comprise entre 2 et 8 °C)
- Conserver à l'abri de la lumière
- Un aspect trouble indique la détérioration du produit
- Laisser les tubes CSTFB atteindre la température ambiante (entre 15 et 30 °C) avant utilisation

10.3.2 Alternatives au système de tubes CSTFB pré-remplis :

Combiner un tube CSTFB sec avec un milieu à gradient de densité de 1,077. Se reporter à l'annexe G pour des exemples répondant aux exigences.

Capacité du tube (ml)	Volume du milieu à gradient de densité (ml)
50 ml	15 ml
15 ml	6 ml

Respecter les recommandations de conservation du fabricant du milieu à gradient de densité.

10.4 Réactifs de congélation

10.4.1 Sérum foetal bovin (SVF), de préférence inactivé par la chaleur

- 10.4.1.1 *Vérifier avec le ou les réseaux concernés quels sont les fournisseurs préférés.* Toutes les marques de SVF ne sont pas équivalentes. Les problèmes concernant le contrôle qualité, la toxicité, le contexte et l'expédition/importation doivent être abordés avant de changer de fournisseurs.

- 10.4.1.2 Obtenir un certificat d'analyse de la part du fournisseur pour les dossiers de contrôle qualité du laboratoire local.
Remarque : une copie du certificat d'analyse du SVF peut être exigée pour l'exportation (ou l'importation) d'aliquotes de PBMC entre pays.
- 10.4.1.3 Le SVF conservé congelé ($\leq -20\text{ °C}$) est bon jusqu'à la date d'expiration du fabricant.
- 10.4.1.4 Le SVF décongelé et conservé à une température comprise entre 2 et 8 °C reste stable pendant un mois.
- 10.4.2 Diméthylsulfoxyde (DMSO) de qualité culture cellulaire
 - 10.4.2.1 Veiller à utiliser du DMSO de qualité culture cellulaire. Se reporter à l'annexe G pour des exemples répondant aux exigences.
 - 10.4.2.2 Conserver les flacons non ouverts à température ambiante (entre 15 et 30 °C). Vérifier la date d'expiration sur le flacon et jeter ce dernier si la date d'expiration est passée.
 - 10.4.2.3 Après ouverture du flacon, le DMSO non dilué reste stable à température ambiante (entre 15 et 30 °C) quand il est conservé à l'abri de la lumière et de l'humidité, pendant 6 mois.
 - 10.4.2.4 Utiliser une technique aseptique pour retirer le DMSO du flacon afin d'éviter une éventuelle contamination.
 - 10.4.2.5 Jeter tout flacon ouvert si des signes visibles de contamination sont observés.
 - 10.4.2.6 Le réactif peut être aliquoté en petites quantités afin d'aider à conserver sa stérilité. Des étiquettes doivent identifier les aliquotes comme étant du « DMSO » et comprendre la date d'ouverture/de l'aliquote, la date d'expiration (six mois après ouverture) et les initiales du technicien. Conserver les aliquotes à l'abri de la lumière.
- 10.4.3 Désinfectant
 - 10.4.3.1 Désinfectant éthanol à 70 % v/v, en pulvérisateur
 - 10.4.3.2 Eau de javel à 10 % v/v, récipient ou bécher et pulvérisateur
 - 10.4.3.3 Autre désinfectant, tel que spécifié par la politique du laboratoire local

10.5 Réactifs de numération cellulaire

Les exigences concernant les réactifs de numération dépendront de la méthode utilisée. Se reporter aux instructions pour la méthode utilisée.

- 10.5.1 Solution de bleu trypan à 0,4 %
- 10.5.2 *Facultatif* : une solution de cristal violet à 0,05 % peut être utilisée pour colorer le noyau cellulaire afin que les cellules mononucléées puissent être identifiées et comptées à l'aide d'un hémacytomètre. Si la viabilité est requise, une deuxième numération manuelle à l'aide d'une solution de bleu trypan peut être effectuée.
La solution de cristal violet à 0,05 % contient :
 - 0,05 g de cristal violet
 - 2 ml d'acide acétique glacial
 - 98 ml de H₂O distillée ou désionisée

11 Préparation du réactif

11.1 SVF inactivé par la chaleur (SVF-IC)

Le SVF-IC peut être commandé auprès du fabricant, ou le SVF peut être commandé auprès du fabricant et inactivé par la chaleur en laboratoire. Suivre ces instructions pour la décongélation, l'aliquotage et l'utilisation.

11.1.1 Retirer le SVF du congélateur.

11.1.2 Le décongeler de préférence dans le réfrigérateur (température comprise entre 2 et 8 °C) ou pendant plusieurs heures à température ambiante. Ne pas laisser le SVF à température ambiante plus longtemps qu'il n'est nécessaire pour terminer le processus de décongélation.

11.1.3 Le remuer délicatement deux ou trois fois durant la décongélation.

11.1.4 Si le SVF n'a pas été inactivé par la chaleur par le fabricant, suivre ces instructions supplémentaires. Si le SVF a été inactivé par la chaleur par le fabricant, passer à la section 11.1.5.

11.1.4.1 Placer le SVF dans un bain-marie à 56 °C (entre 55 et 57 °C). Surveiller attentivement la température du bain-marie. **Des températures plus élevées peuvent dégrader les composants du SVF.**

11.1.4.2 **Remarque** : le niveau d'eau dans le bain-marie doit couvrir le niveau du SVF dans le flacon mais ne doit pas toucher le bouchon du flacon. Cela permettra de chauffer le SVF de manière uniforme tout en évitant la contamination.

11.1.4.3 Une fois que l'eau du bain aura atteint la température de 56 °C (entre 55 et 57 °C), chauffer le SVF pendant 30 minutes en mélangeant toutes les 5 à 10 minutes. **Chauffer plus longtemps peut dégrader les composants du SVF.**

11.1.4.4 **Remarque** : si le haut du flacon entre en contact avec l'eau du bain, le tamponner avec de l'éthanol à 70 % v/v avant l'ouverture du flacon.

11.1.5 Mélanger délicatement, mais complètement le SVF-IC en utilisant une technique aseptique.

11.1.6 Aliquoter dans des tubes à centrifuger à fond conique de 50 ml, stériles et étiquetés, ou en d'autres volumes d'aliquotes appropriés au travail anticipé.

Remarque : des étiquettes doivent identifier ces tubes comme étant du « SVF-IC » et comprendre le numéro de lot, la date de l'aliquote, la date d'expiration et les initiales du technicien. Le SVF reste stable pendant un mois à une température comprise entre 2 et 8 °C, ou jusqu'à la date d'expiration originale du fabricant s'il est conservé à -20 °C.

11.1.7 Réfrigérer (à une température comprise entre 2 et 8 °C) le nombre de tubes d'aliquotes nécessaires pour le travail anticipé. Bien mélanger avant utilisation. Les tubes d'aliquotes qui ne sont pas utilisés immédiatement peuvent retourner dans le congélateur et restent stables jusqu'à la date d'expiration originale du fabricant.

Remarque : des cycles répétés de congélation/décongélation auront un effet indésirable sur la qualité du SVF. Ne pas congeler des aliquotes qui ont été conservées à des températures réfrigérées.

11.1.8 Pour utiliser les aliquotes congelées, les décongeler de préférence dans le réfrigérateur pendant la nuit, ou pendant plusieurs heures à température ambiante. Modifier la date d'expiration à un mois. Bien mélanger avant utilisation.

11.2 Solution de cryoconservation fraîche (Fresh Cryopreservation Solution, CPS)

11.2.1

Composants	Pourcentage (v/v)
DMSO	10 %
SVF (inactivé par la chaleur)	90 %

11.2.2 Préparation de la CPS

Utiliser un récipient jetable stérile de 15 ml ou de 50 ml pour préparer la CPS. Le mélange du DMSO et du SVF est une réaction exothermique. La CPS doit être préparée à l'avance et refroidie dans le réfrigérateur (à une température comprise entre 2 à 8 °C) pendant au moins 30 minutes ou dans un bain de glace pendant au moins 15 minutes avant utilisation.

Remarque : la CPS peut être conservée à une température comprise entre 2 et 8 °C pendant un jour ouvrable (< 18 heures).

11.2.3 Utiliser la formule ci-dessous pour **estimer** le volume de CPS à préparer pour la resuspension des PBMC. Des exemples sont également fournis.

$$\text{Sang total utilisable (ml)} \times \text{rendement cellulaire (cellules/ml)} \times \text{concentration de congélation (ml/cellules)} = \text{CPS estimée (ml)}$$

Arrondir au ml entier le plus proche.

Remarque : le volume de sang total utilisable est le volume de sang total qui est réellement traité. (Le volume de sang total utilisable peut ne pas être égal à la capacité du tube.)

Exemples : sang d'adulte — prélèvement d'un grand volume de sang

Sang total utilisable x	Rendement cellulaire x	Concentration de congélation =	CPS estimée à préparer
(140 ml) x	(1,5 x 10 ⁶ cellules/1 ml) x	(1 ml/15 x 10 ⁶ cellules) =	14 ml

Exemples : sang d'enfant/d'adolescent — prélèvement d'un petit volume de sang

Sang total utilisable x	Rendement cellulaire x	Concentration de congélation =	CPS estimée à préparer
(10 ml) x	(1,5 x 10 ⁶ cellules/1 ml) x	(0,5 ml/5 x 10 ⁶ cellules) =	1,5 ml

11.2.4 Utiliser les formules suivantes pour calculer les quantités de DMSO et de SVF nécessaires.

$$\text{CPS} = 1 \text{ volume de DMSO} + 9 \text{ volumes de SVF}$$

Exemples :

Volume de CPS estimé	Volume du DMSO = (0,1) (volume de la CPS)	Volume du SVF-IC = volume de la CPS – volume du DMSO	Volume total de la CPS = volume du DMSO + volume du SVF
9 ml	0,9 ml	8,1 ml	9 ml

11.2.5 Enregistrer les volumes de CPS, DMSO et SVF conformément aux exigences du réseau et laboratoire. Se reporter au chapitre 5 pour plus de détails.

12 Calibrage

12.1 Aucun calibrage n'est requis pour les étapes du traitement.

12.2 Suivre les procédures de calibrage de laboratoire appropriées si l'on utilise un compteur cellulaire automatisé.

13 Contrôle qualité

13.1 Rendements cellulaires

Les rendements cellulaires sont assez constants au sein des populations en bonne santé. Les populations de nourrissons génèrent habituellement des rendements lymphocytaires plus élevés que les populations adultes. De même, les patients atteints du sida ou d'une infection par le VIH à un stade avancé peuvent présenter une lymphopénie. Il est important de connaître la récupération attendue qui doit être obtenue pour la population de participants pour lesquels le traitement est effectué. En se fondant sur cette constance, les rendements cellulaires peuvent servir de marqueurs de contrôle internes de la qualité pour chaque analyse. Les rendements en dehors des fourchettes attendues peuvent indiquer une erreur de procédure, une détérioration du réactif, une erreur de numération cellulaire ou de calcul. Les recommandations ci-dessous sont destinées à fournir des directives pour permettre d'identifier des erreurs techniques flagrantes avant la cryoconservation. Ces valeurs peuvent varier en fonction de l'anticoagulant utilisé.

13.1.1 Rendements cellulaires **attendus** pour des populations en bonne santé :

Population	Fourchette de rendements de cellules mononucléées (cellules/ml)
Adulte	$(0,8 \text{ à } 3,2) \times 10^6$
Enfant – moins de 6 mois	$(3 \text{ à } 10) \times 10^6$
Enfant – de 6 mois à 2 ans	$(2 \text{ à } 9) \times 10^6$
Enfant – de 2 à 5 ans	$(1 \text{ à } 6) \times 10^6$
Enfant – plus de 5 ans	$(0,8 \text{ à } 4) \times 10^6$
Enfant – âge inconnu	$(1 \text{ à } 10) \times 10^6$

13.1.2 Rendements cellulaires inattendus

Si les rendements cellulaires sont en dehors des fourchettes attendues, examiner les schémas de dilution, les calculs, la technique de traitement (en particulier le mélange adéquat des suspensions de numération cellulaire) ainsi que les antécédents du PTID s'ils sont disponibles pour identifier les raisons possibles. Les rendements cellulaires de patients infectés par le VIH peuvent être inférieurs à ceux indiqués dans le tableau ci-dessus. Si la dilution cellulaire ou des erreurs de numération sont soupçonnées, préparer une dilution fraîche et effectuer de nouveau la numération.

13.1.3 Enregistrer tous les résultats ainsi que tous les problèmes survenant durant le traitement et les mesures prises conformément aux exigences du réseau et laboratoire. Se reporter au chapitre 5 pour plus de détails.

Remarque pour le HVTN : consigner tout problème rencontré et toute mesure prise sur le formulaire de traitement des PBMC requis par le HVTN et dans la rubrique des commentaires sur le rendement cellulaire du programme de traitement des PBMC Atlas du HVTN.

13.2 Viabilité des cellules

La viabilité des PBMC fraîches est assez constante. Un temps de traitement long, une mauvaise technique et, occasionnellement, un échantillon de participant spécifique peuvent affecter la viabilité de manière indésirable. Pour la numération de cellules viables, calculer et consigner le pourcentage de cellules viables conformément aux exigences du laboratoire.

13.2.1 La viabilité de PBMC fraîchement isolées doit être supérieure à 95 %.

13.2.2 Si la viabilité de PBMC fraîches est inférieure à 95 %, examiner les résultats avec le superviseur et les documenter conformément aux exigences du réseau et laboratoire. Se reporter au chapitre 5 pour plus de détails.

Remarque : Si des échantillons sont en cours de préparation pour le programme de test de maîtrise de la cryoconservation des PBMC de l'IQA, une numération des cellules viables est requise.

14 Traitement des PBMC Présentation et directives

Il existe des principes et étapes standard communs à toutes les procédures de traitement des PBMC. Des variantes ont lieu avec le choix des techniques de séparation (CSTFB pré-rempli par rapport à la technique manuelle d'application sur couche), le traitement du sang (dilution avec ou sans remplacement de plasma par rapport à la récolte de plasma), la concentration cellulaire finale et la congélation/conserver. Sélectionner les sections appropriées de la procédure pour la séparation cellulaire et le traitement du sang ainsi que pour la congélation et conservation en fonction des exigences du réseau et du protocole.

Chapitre du traitement des PBMC	Utiliser pour ces réseaux
<p><i>Séparation cellulaire et traitement du sang</i></p> <p>Chapitre 15 : séparation cellulaire et dilution du sang avec remplacement du plasma à l'aide d'un tube de séparation cellulaire avec barrière frittée (CSTFB)</p> <p style="text-align: center;">OU</p> <p>Chapitre 16 : séparation cellulaire par la méthode d'application manuelle de milieu à gradient de densité sur ou sous couche et dilution du sang par séparation cellulaire manuelle en gradient de densité avec remplacement du plasma</p>	<p>Peut être utilisé pour tous les réseaux ; vérifier les exigences du protocole et le matériel disponible</p> <p>Peut être utilisé pour tous les réseaux ; vérifier les exigences du protocole et le matériel disponible</p>
<p><i>Lavage, numération, resuspension, concentration et congélation à vitesse contrôlée pendant la nuit</i></p> <p>Chapitre 17</p>	<p>Tous les réseaux</p>
<p><i>Conservation sur place</i></p> <p>Chapitre 18 : Conservation temporaire sur place à une température de -70/-80 °C</p> <p style="text-align: center;">OU</p> <p>Chapitre 19 : Conservation sur place dans de l'azote liquide (LN2)/un congélateur mécanique à -150 °C</p>	<p>ACTG et HVTN</p> <p>IMPAACT, HPTN et MTN</p>

15 Séparation cellulaire et dilution du sang avec remplacement du plasma à l'aide d'un tube de séparation cellulaire avec barrière frittée (CSTFB)

Le chapitre 15 peut être consulté par tous les réseaux ; vérifier les exigences du protocole et le matériel disponible. Pour tout échantillon donné, se conformer soit au chapitre 15, soit au chapitre 16, mais pas aux deux.

15.1 Séparation des lymphocytes du sang périphérique à l'aide de tubes de séparation CSTFB pré-remplis

- 15.1.1 Tout le pipetage et mélange ont lieu dans un poste de sécurité microbiologique (PSM) de type II ou supérieur.
- 15.1.2 Pulvériser sur toutes les surfaces, tous les plateaux et flacons de réactifs de l'éthanol à 70 % v/v ou d'un désinfectant équivalent avant d'entrer dans le PSM et de l'utiliser.
- 15.1.3 Sauf indication contraire, la procédure est effectuée à température ambiante (entre 15 et 30 °C).
- 15.1.4 Utiliser une nouvelle pipette pour chaque numéro d'identification de participant (PTID) et additif.

15.2 Préparer les échantillons de sang total, réactifs et fournitures.

- 15.2.1 Avant le traitement ou suffisamment de temps avant le mélange avec les PBMC, préparer et refroidir la CPS (se reporter au chapitre 11 Préparation du réactif).
- 15.2.2 S'assurer que les tubes sont à température ambiante avant le traitement.
- 15.2.3 Avant d'ajouter le sang, vérifier visuellement les tubes CSTFB pour voir s'il y a du liquide au-dessus de la barrière frittée. S'il y a du liquide au-dessus de la barrière frittée, centrifuger les tubes CSTFB à une vitesse de 1 000 x g pendant 30 secondes. Si de la solution à gradient de densité reste au-dessus de la barrière frittée après la centrifugation, elle doit être aspirée.
- 15.2.4 Vérifier soigneusement le PTID sur tous les tubes de sang reçus. Organiser les tubes principaux de telle manière qu'il ne puisse y avoir aucune possibilité de les mélanger entre PTID ou anticoagulants dans un lot PTID.

Suggestion : placer tous les tubes pour chaque PTID/anticoagulant sur un seul plateau. Différents plateaux peuvent être utilisés pour séparer les PTID ou les types de tubes, et une couleur de marqueur différente peut être utilisée pour chaque PTID afin d'éviter toute confusion.

- 15.2.5 Déterminer et consigner une mesure précise du volume de sang total utilisable dans 0,5 ml. Le volume de sang total utilisable n'est pas forcément égal à la capacité du tube.

15.3 Remplacement du plasma

Ne réaliser cette étape de remplacement du plasma que *si* des aliquotes de plasma sont requises selon les instructions du protocole. Si des aliquotes de plasma ne sont pas requises, sauter cette étape et passer à l'étape 15.4.

- 15.3.1 Les tubes de prélèvements sanguins provenant du même PTID et anticoagulant peuvent être traités individuellement ou rassemblés dans des tubes à centrifuger à fond conique de 50 ml.
- 15.3.2 Inscrire le volume de sang total au niveau du ménisque.
- 15.3.3 Centrifuger le sang total à une vitesse comprise entre 200 et 400 x g pendant 10 minutes.

- 15.3.4 Transférer le plasma dans un tube à centrifuger à fond conique étiqueté de 15 ou 50ml pour une deuxième centrifugation afin d'éliminer tout débris cellulaire.
- 15.3.5 Ajouter une quantité suffisante de WDR (se reporter à la section 10.2) pour ramener le sang total à son volume d'origine, mélanger délicatement et continuer le traitement des PBMC à l'étape 15.4.
- 15.3.6 Terminer le traitement du plasma en centrifugeant le plasma recueilli à une vitesse comprise entre 800 et 1 200 x g pendant 10 minutes afin d'obtenir des aliquotes de plasma PL2 ou en suivant les instructions propres au protocole afin d'obtenir le produit dérivé requis dans le protocole. Cela peut s'effectuer plus tard, lorsque la centrifugeuse n'est pas utilisée pour le traitement des PBMC.
- 15.3.7 Aliquoter le plasma centrifugé dans des tubes d'aliquotes étiquetés, comme spécifié dans le protocole et éliminer tout débris cellulaire dans le tube de plasma centrifugé.

15.4 Dilution du sang pour la séparation CSTFB

Remarque : le rapport maximal entre le sang et le WDR doit être approximativement de 2 : 1. Utiliser un tube de 50 ml pour chaque 10 à 20 ml de sang total (ou un tube de 12 à 14 ml pour chaque 4 à 5 ml de sang total). Utiliser autant de tubes CSTFB que nécessaire pour répartir tout le sang de chaque PTID.

Remarque : le milieu à gradient de densité est toxique pour les cellules ; travailler rapidement et efficacement durant les étapes de la séparation.

- 15.4.1 Étiqueter chaque tube CSTFB avec le PTID.
- 15.4.2 Si un tube comporte des caillots, se reporter à la section 6.5 (Échantillons inacceptables).
- 15.4.3 À l'aide d'une pipette stérile, ajouter du WDR à chaque tube CSTFB :

Capacité du tube CSTFB (ml)	Volume approximatif de WDR (ml)
50	5
15	2

- 15.4.4 Mélanger délicatement le sang total puis utiliser une pipette stérile pour transférer le sang dans les tubes CSTFB étiquetés.

Capacité du tube CSTFB (ml)	Volume de sang approximatif (ml)*
50	12 à 22
15	4 à 5

- 15.4.5 ***Remarque** : Des volumes de sang plus faibles, surtout en cas de faible volume d'hématocrites, peuvent causer un abaissement de la couche leuco-plaquettaire près de/sur la barrière frittée, rendant sa récolte difficile. Des volumes de sang plus élevés peuvent contribuer à l'augmentation du bruit/la formation de débris dans les échantillons. Se conformer aux directives propres au protocole pour les faibles volumes de sang prélevés.
- 15.4.6 À l'aide d'une pipette stérile, rincer chaque tube original de sang anticoagulé avec du WDR, ajouter les volumes de rinçage aux tubes CSTFB en veillant à ne pas dépasser la limite du volume total du tube (WDR + sang total).

Capacité du tube CSTFB (ml)	Limite du volume total du tube (ml) (sang total + WDR)
50	30
15	7.5

- 15.4.7 Boucher soigneusement les tubes CSTFB.

15.5 Centrifugation en gradient de densité des tubes CSTFB et prélèvement

15.5.1 Tenir les tubes en position verticale et les transférer délicatement dans la centrifugeuse. Se conformer au chapitre 20 Calculs pour convertir les g en tr/min pour la longueur de rotation.

15.5.2 Centrifuger à une vitesse comprise entre 800 et 1 000 x g pendant 15 minutes à une température comprise entre 15 et 30 °C avec le frein en position ARRÊT.

Remarque : la séparation des PBMC peut être améliorée pour certains échantillons en centrifugeant à une vitesse de 1 000 x g.

Remarque : si le frein est en marche, cela perturbera les couches.

15.5.3 Préparer le même nombre de nouveaux tubes à centrifuger à fond conique stériles que de tubes CSTFB utilisés pour l'étape de séparation par centrifugation.

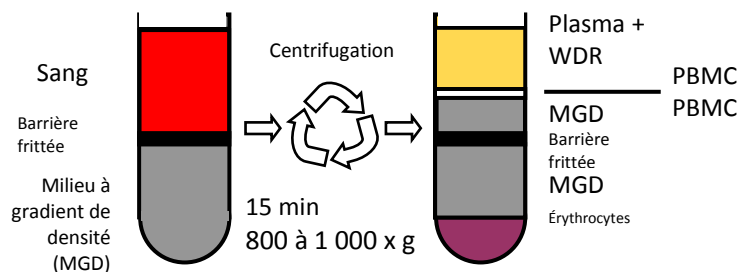
Capacité du tube CSTFB (ml)	Capacité du tube à centrifuger à fond conique (ml)
50	50
15	15

15.5.4 Étiqueter chaque tube avec le PTID. Utiliser ces nouveaux tubes pour le lavage suivant.

15.5.5 Retirer délicatement les tubes CSTFB de la centrifugeuse afin de ne pas perturber les couches.

15.5.6 La centrifugation entraîne la division du contenu du tube en six couches distinctes, dont la barrière frittée. En partant de la partie supérieure du tube, celles-ci sont les suivantes :

- Plasma + WDR
- Couche de PBMC
- Milieu à gradient de densité
- Barrière frittée
- Milieu à gradient de densité
- Agrégats d'érythrocytes et de granulocytes



15.5.7 Inspecter les tubes pour déceler les problèmes éventuels suivants : Documenter les observations et toute mesure de suivi prise conformément aux exigences du réseau et laboratoire.

- Hémolyse dans la couche plasmatique + WDR.
- Caillots visibles sur la barrière frittée après centrifugation.
- Faible couche de PBMC en raison d'une erreur de centrifugation, telle que la vitesse, la durée ou le freinage. La couche de PBMC apparaîtra petite et indistincte alors que la couche plasmatique + WDR pourra être légèrement trouble. Consulter l'annexe C pour le dépannage.
- Couche de PBMC formée sur la barrière frittée en raison d'une faible numération d'érythrocytes ou du faible volume d'hématocrites.

15.5.8 À l'aide d'une nouvelle pipette stérile (pipette sérologique ou de transfert), pour chaque PTID, retirer la fraction supérieure jaunâtre de plasma-WDR jusqu'à approximativement 1 à

2 cm de la bande de PBMC blanc trouble située à l'interface entre la fraction de plasma-WDR (jaunâtre) et la phase claire du milieu de séparation. Éliminer la fraction de plasma-WDR selon la politique du laboratoire.

Remarque : alternativement, la fraction supérieure de plasma-WDR peut être laissée en place et la bande de PBMC blanc trouble peut être retirée en insérant avec précaution la pipette à travers la couche supérieure jusqu'à la bande de PBMC.

15.5.9 À l'aide d'une pipette sérologique ou de transfert stérile, recueillir toutes les cellules à l'interface blanc trouble située au-dessus de la barrière frittée. Prendre soin de ne pas aspirer plus de milieu de séparation que nécessaire.

15.5.10 Transférer les cellules recueillies d'un tube CSTFB dans un tube unique à centrifuger à fond conique correspondant, qui doit être stérile et pré-étiqueté. Les tubes peuvent être pré-remplis avec du WDR pour gagner du temps.

Capacité du tube CSTFB (ml)	Capacité du tube à centrifuger à fond conique (ml)	Volume de WDR pré-rempli (ml)
50	50	25
15	15	5

15.5.11 Reboucher le tube CSTFB contenant les érythrocytes et le milieu de séparation restants. Jeter le tube CSTFB en tant que déchet biologique à risque selon la politique du laboratoire.

15.6 S'assurer que toutes les informations appropriées sont documentées conformément aux exigences du réseau et laboratoire. Se reporter au chapitre 5 pour plus de détails.

Sauter le chapitre 16 et passer au chapitre 17.

16 Séparation cellulaire par la méthode d'application manuelle de milieu à gradient de densité sur ou sous couche et dilution du sang par séparation cellulaire manuelle en gradient de densité avec remplacement du plasma

Le chapitre 16 peut être consulté par tous les réseaux ; vérifier les exigences du protocole et le matériel disponible. Pour tout échantillon donné, se conformer soit au chapitre 15, soit au chapitre 16, mais pas aux deux.

16.1 Séparation des lymphocytes du sang périphérique à l'aide de la méthode d'application manuelle du milieu à gradient de densité sur couche

- 16.1.1 Tout le pipetage et mélange ont lieu dans un poste de sécurité microbiologique (PSM) de type II ou supérieur.
- 16.1.2 Pulvériser sur toutes les surfaces, tous les plateaux et flacons de réactifs de l'éthanol à 70 % v/v avant d'entrer dans le PSM et de l'utiliser.
- 16.1.3 Sauf indication contraire, la procédure est effectuée à température ambiante (entre 15 et 30 °C).
- 16.1.4 Utiliser une nouvelle pipette pour chaque numéro d'identification de participant (PTID) et additif.

16.2 Préparer les échantillons de sang total, réactifs et fournitures.

- 16.2.1 Avant le traitement ou suffisamment de temps avant le mélange avec les PBMC, préparer et refroidir la CPS (se reporter au chapitre 11 Préparation du réactif).
- 16.2.2 Si les tubes d'échantillon sont froids au toucher (en raison de conditions ambiantes froides telles que le transport dans des glacières), laisser les tubes atteindre la température ambiante (entre 15 et 30 °C) avant le traitement.
- 16.2.3 Laisser le milieu à gradient de densité atteindre la température ambiante (entre 15 et 30 °C). Se reporter au chapitre 10 Réactifs pour plus d'informations.
- 16.2.4 Vérifier soigneusement le PTID sur tous les tubes de sang reçus. Organiser les tubes principaux de telle manière qu'il ne puisse y avoir aucune possibilité de les mélanger entre PTID ou anticoagulants dans un lot PTID.

Suggestion : placer tous les tubes pour chaque PTID/anticoagulant sur un seul plateau. Différents plateaux peuvent être utilisés pour séparer les PTID ou les types de tubes, et une couleur de marqueur différente peut être utilisée pour chaque PTID afin d'éviter toute confusion.
- 16.2.5 Déterminer et consigner une mesure précise du volume de sang total utilisable dans 0,5 ml. Le volume de sang total utilisable n'est pas forcément égal à la capacité du tube.

16.3 Remplacement du plasma

Ne réaliser cette étape de remplacement du plasma que si des aliquotes de plasma sont requises selon les instructions du protocole. Si des aliquotes de plasma ne sont pas requises, sauter cette étape et passer à l'étape 16.4.

- 16.3.1 Les tubes de prélèvements sanguins peuvent être traités individuellement selon les instructions énumérées ci-dessous ou une technique de rassemblement des couches leuco-plaquettaires peut être utilisée comme indiqué dans l'annexe D.
- 16.3.2 Inscrire le volume de sang total au niveau du ménisque pour chaque tube.

- 16.3.3 Centrifuger le sang total à une vitesse comprise entre 200 et 400 x g pendant 10 minutes.
- 16.3.4 Transférer le plasma dans un tube à centrifuger à fond conique étiqueté de 15 ou 50 ml pour une deuxième centrifugation afin d'éliminer tout débris cellulaire.
- 16.3.5 Ajouter une quantité suffisante de WDR (se reporter à la section 10.2) pour ramener le sang total à son volume d'origine, mélanger délicatement et continuer le traitement des PBMC à l'étape 16.4.
- 16.3.6 Terminer le traitement du plasma en centrifugeant le plasma recueilli à une vitesse comprise entre 800 et 1 200 x g pendant 10 minutes afin d'obtenir des aliquotes de plasma PL2 ou en suivant les instructions propres au protocole afin d'obtenir le produit dérivé requis dans le protocole. Cela peut s'effectuer plus tard, lorsque la centrifugeuse n'est pas utilisée pour le traitement des PBMC.
- 16.3.7 Aliquoter le plasma centrifugé dans des tubes d'aliquotes étiquetés, comme spécifié dans le protocole et éliminer tout débris cellulaire dans le tube de plasma centrifugé.

16.4 Dilution du sang et séparation cellulaire manuelle en gradient de densité

- 16.4.1 Déboucher les tubes de sang anticoagulé.
- 16.4.2 Si un tube comporte des gros caillots, se reporter à la section 6.5 (Échantillons marginaux).
- 16.4.3 *Remarque* : Pour des volumes de prélèvements sanguins plus importants, le rassemblement des couches leuco-plaquettaires est autorisé conformément aux directives fournies dans l'annexe D : Rassemblement des couches leuco-plaquettaires pour isolation des PBMC par la méthode du milieu à gradient de densité. Pour rassembler les couches leuco-plaquettaires, remplacer les étapes de la section 16.4.4 et 16.4.5 par les instructions fournies dans l'annexe D.
- 16.4.4 Étiqueter chaque tube à fond conique avec le PTID.

Capacité du tube à centrifuger à fond conique (ml)	Volume de sang approximatif (ml)*
50	12 à 22
15	4 à 5

- 16.4.5 **Remarque* : Des volumes de sang plus faibles, surtout en cas de faible volume d'hématocrites, peuvent causer un abaissement de la couche leuco-plaquettaire près de/sur la barrière frittée, rendant sa récolte difficile. Des volumes de sang plus élevés peuvent contribuer à l'augmentation du bruit/la formation de débris dans les échantillons. Se conformer aux directives propres au protocole pour les faibles volumes de sang prélevés.
- 16.4.6 Transférer le sang dans un tube à centrifuger à fond conique stérile et étiqueté de 15 ou 50 ml et ajouter un volume suffisant de WDR pour diluer le sang conformément à la notice du milieu de séparation (le rapport maximal entre le sang et le diluant doit être de 2 : 1).

Facultatif : l'ajout de WDR et le mélange peuvent avoir lieu dans le tube de sang initial, s'il y a suffisamment de volume.
- 16.4.7 Pour la séparation cellulaire en gradient de densité :

Sur un échantillon donné, utiliser soit la méthode d'application sur couche (16.4.7.1) ou sous couche (16.4.7.2), mais pas les deux.

16.4.7.1 Méthode d'application sur couche :

Préparer un tube à centrifuger à fond conique stérile et étiqueté pour chaque tube contenant du sang dilué.

Ajouter de manière aseptique le volume approprié de milieu à gradient de densité dans les tubes à centrifuger à fond conique stériles vides. Le volume de milieu à gradient de densité dépendra du rapport entre le milieu à gradient de densité et le sang dilué recommandé par le fabricant.

Pipeter soigneusement et lentement le sang dilué sur le gradient de densité.

Suggestion : laisser le mélange de sang dilué avec du WDR couler doucement le long du tube et se déposer à la surface du milieu à gradient de densité sans briser la surface plane.

16.4.7.2 Méthode d'application sous couche :

Mélanger délicatement et complètement pour diminuer l'agrégat de cellules durant la séparation.

Facultatif : pour le sang total ou sang dilué avec du WDR, ajouter un autre volume de WDR égal au volume de sang total.

En fonction du volume de sang dilué avec du WDR, déterminer le volume de milieu à gradient de densité requis pour chaque tube. Le volume de milieu à gradient de densité dépendra du rapport entre le milieu à gradient de densité et le sang dilué recommandé par le fabricant.

Pipeter soigneusement et lentement le milieu à gradient de densité SOUS le sang dilué avec du WDR.

16.4.7.3 Boucher soigneusement les tubes.

16.5 Centrifugation en gradient de densité des lymphocytes et prélèvement

16.5.1 Tenir les tubes en position verticale et les transférer délicatement dans la centrifugeuse.

16.5.2 Centrifuger à une vitesse de 400 x g pendant 30 minutes à une température comprise entre 15 et 30 °C avec le frein en position ARRÊT, comme indiqué dans la notice fournie avec le milieu à gradient de densité.

Remarque : si le frein est en marche, cela perturbera les couches. Le frein de la centrifugeuse doit être en position ARRÊT pour que la séparation soit nette et optimiser la récupération des PBMC. Se conformer au chapitre 20 Calculs pour convertir les g en tr/min pour la longueur de rotation.

16.5.3 Préparer le même nombre de nouveaux tubes à centrifuger à fond conique stériles que de tubes à centrifuger à fond conique utilisés pour l'étape de séparation par centrifugation.

16.5.4 Étiqueter chaque tube avec le PTID/l'anticoagulant. Utiliser ces nouveaux tubes pour le lavage suivant.

16.5.5 Retirer les tubes de la centrifugeuse.

- 16.5.6 Si la couche cellulaire n'est pas visible, confirmer que la centrifugeuse fonctionne correctement. Corriger tous les problèmes rencontrés. Centrifuger de nouveau le tube. Documenter le problème rencontré et les mesures prises conformément aux exigences du réseau et laboratoire.

Remarque : s'il n'y a toujours pas de couche cellulaire visible après la nouvelle centrifugation, documenter le problème, retirer et éliminer le WDR surnageant et continuer.

Remarque : si le plasma est très trouble, il peut être difficile de voir l'interface du milieu à gradient de densité. Il est possible d'améliorer le recueil des lymphocytes en retirant la majeure partie du plasma situé au-dessus de l'interface avec une pipette de 10 ml, en n'en laissant que 0,5 cm. Cela permet un meilleur positionnement de la pointe de la pipette pour le recueil des cellules.

- 16.5.7 Inspecter les tubes pour déceler toute hémolyse ou de petits caillots visibles à l'interface des cellules qui n'auraient pas été notés précédemment et les documenter.

Remarque : chercher un signe d'hémolyse ou de caillots après la centrifugation. Évaluer l'hémolyse sur une échelle de +1 à +4 selon la description donnée dans le glossaire. Consigner les observations.

- 16.5.8 À l'aide d'une nouvelle pipette stérile (pipette sérologique ou de transfert), pour chaque PTID, retirer la fraction supérieure jaunâtre de plasma-WDR jusqu'à approximativement 1 à 2 cm de la bande de PBMC blanc trouble située à l'interface entre la fraction de plasma-WDR (jaunâtre) et la phase claire du milieu de séparation. Éliminer la fraction de plasma-WDR selon la politique du laboratoire.

Remarque : alternativement, la fraction supérieure de plasma-WDR peut être laissée en place et la bande de PBMC blanc trouble peut être retirée en insérant avec précaution la pipette à travers la couche supérieure jusqu'à la bande de PBMC.

- 16.5.9 À l'aide d'une pipette sérologique ou de transfert stérile, recueillir toutes les cellules à l'interface blanc trouble. Prendre soin de ne pas aspirer plus de milieu de séparation que nécessaire.

- 16.5.10 Transférer les cellules recueillies d'un tube à centrifuger à fond conique dans un tube unique à centrifuger à fond conique correspondant, qui doit être stérile et pré-étiqueté. Les tubes peuvent être pré-remplis avec du WDR pour gagner du temps.

Capacité du tube à centrifuger à fond conique (ml)	Volume de WDR pré-rempli (ml)
50	25
15	5

- 16.5.11 Reboucher le tube à centrifuger à fond conique contenant les érythrocytes/le milieu de séparation restant(s) et jeter le tube en tant que déchet biologique à risque selon la politique du laboratoire.

- 16.6 S'assurer que toutes les informations appropriées sont documentées conformément aux exigences du réseau et laboratoire. Se reporter au chapitre 5 pour plus de détails.**

Passer au chapitre 17.

17 Lavage, numération, resuspension, concentration et congélation à vitesse contrôlée pendant la nuit

Tous les réseaux doivent se conformer au chapitre 17.

17.1 Lavage 1 :

17.1.1 QS la fraction de PBMC à approximativement 10 ml (pour les tubes à centrifuger à fond conique de 15 ml) ou à 45 ml (pour les tubes à centrifuger à fond conique de 50 ml) en ajoutant du WDR. Mélanger délicatement.

17.1.2 Reboucher tous les tubes de cellules récoltées.

17.1.3 Centrifuger les cellules diluées à une vitesse comprise entre 200 et 400 x g pendant 10 minutes à une température comprise entre 15 et 30 °C (frein facultatif).

17.1.4 Retirer les tubes de la centrifugeuse et vérifier la présence d'un culot cellulaire.

Si le culot cellulaire n'est pas visible, confirmer que la centrifugeuse fonctionne correctement. Corriger tous les problèmes rencontrés. Centrifuger de nouveau le tube. Documenter le problème rencontré et les mesures prises conformément aux exigences du réseau et laboratoire. S'il n'y a toujours pas de culot cellulaire visible après avoir de nouveau centrifugé le tube, documenter le problème.

17.1.5 Retirer et éliminer le surnageant sans toucher au culot cellulaire.

17.2 Lavage 2 :

17.2.1 Suspendre de nouveau chaque culot cellulaire dans un petit volume de WDR en mélangeant délicatement, mais complètement, pour obtenir une suspension de cellules homogène.

Capacité du tube (ml)	Volume de resuspension du WDR (ml)
50	≤ 5
15	≤ 3

17.2.2 Combiner les suspensions de culots cellulaires pour le même PTID/anticoagulant. Il s'agit du tube de cellules récoltées.

Capacité du tube (ml)	Nombre de suspensions de culots cellulaires à combiner	Volume total (ml)
50	≤ 4	≤ 20
15	≤ 2	≤ 6

17.2.3 Rincer les tubes à partir desquels les culots cellulaires ont été transférés avec un petit volume de WDR. Recueillir le rinçage de WDR dans le tube de cellules récoltées.

17.2.4 QS la fraction de PBMC en ajoutant du WDR et en mélangeant délicatement.

Capacité du tube (ml)	Volume QS (ml)
50	≤ 45
15	≤ 10

17.2.5 Reboucher les tubes et les placer dans la centrifugeuse.

17.2.6 Centrifuger les cellules diluées à une vitesse comprise entre 200 et 400 x g pendant 10 minutes à une température comprise entre 15 et 30 °C (frein facultatif).

17.2.7 Retirer les tubes de la centrifugeuse et vérifier la présence d'un culot cellulaire.

Remarque : si le culot cellulaire n'est pas visible, confirmer que la centrifugeuse fonctionne correctement. Corriger tout problème éventuel et centrifuger de nouveau le tube. Documenter le problème rencontré et les mesures prises conformément aux exigences du réseau et laboratoire. S'il n'y a toujours pas de culot cellulaire visible après avoir de nouveau centrifugé le tube, documenter le problème.

17.2.8 Retirer et éliminer le surnageant sans toucher au culot cellulaire.

17.3 Numération cellulaire des PBMC

17.3.1 Déterminer et consigner le volume de resuspension de WDR (V) pour la numération cellulaire, avec une précision de 0,1 ml. V est important car il s'agit du volume sur lequel la numération cellulaire est basée.

Remarque : en général, V doit être approximativement de 20 % du volume de sang total utilisable arrondi au ml le plus proche. Toutefois, V peut varier en fonction de la taille du culot cellulaire et de la méthode de numération cellulaire. Il peut aussi être ajusté pour faciliter la mesure ou la resuspension. Par conséquent, V peut représenter de 10 % à 50 % du volume de sang total utilisable. Se conformer à la méthode de numération cellulaire approuvée au laboratoire pour plus d'indications.

17.3.2 Si l'on dispose de plus d'un culot cellulaire pour le même PTID/anticoagulant, utiliser une petite quantité de WDR pour resuspendre délicatement et combiner les culots cellulaires dans un seul tube. Rincer les tubes à partir desquels les cellules ont été transférées avec le volume restant. Ajouter le rinçage au tube de cellules récoltées.

17.3.3 Réaliser la numération cellulaire à l'aide de la SOP correspondant à la méthode de numération cellulaire approuvée au laboratoire. Pour un exemple de SOP relative à la numération cellulaire manuelle, consulter l'adresse <http://www.hanc.info/labs/labresources/procedures/Pages/pbmcSop.aspx>.

17.3.4 Mélanger les cellules délicatement, mais complètement, avant de prélever un échantillon pour la numération cellulaire.

17.3.5 Transférer une petite quantité de la resuspension dans un petit tube pour la numération.

Remarque : si des numérations répétées sont nécessaires, diminuer le volume d'échantillon nécessaire.

17.3.6 Suivre la SOP correspondant à la méthode de numération cellulaire approuvée au laboratoire pour déterminer la concentration cellulaire x 10⁶ par ml.

Remarque : cellules à 10³/µL = cellules à 10⁶/ml.

Remarque : les numérations automatiques ne peuvent être effectuées qu'une fois. Les numérations manuelles doivent compter au moins quatre grands carrés (1 mm²).

17.3.7 Calculer le nombre total de cellules en utilisant la formule suivante :

$$T = C \times V$$

T = nombre total de cellules

C = concentration (10⁶/ml) déterminée dans la méthode de numération

V = volume de resuspension de WDR pour la numération en ml

- 17.3.8 Calculer le rendement cellulaire en cellules/ml de sang total utilisable à l'aide de la formule ci-dessous.

$$\text{Rendement cellulaire (10}^6 \text{ cellules/ml)} = T / \text{volume de sang total utilisable}$$

Remarque : le rendement cellulaire est calculé uniquement à des fins de qualité. Se conformer au chapitre 13 Contrôle qualité pour la fourchette de rendements cellulaires attendue. Si le rendement cellulaire se trouve en dehors de la fourchette de valeurs attendue, suivre les directives de dépannage du chapitre 13 Contrôle qualité. Diluer de nouveau et recompter si nécessaire.

17.4 Calcul du volume de resuspension final

- 17.4.1 Calculer le volume de resuspension de la CPS congelée requis en suivant les étapes décrites ci-dessous pour la concentration cellulaire finale ciblée.

Remarque : la concentration cellulaire finale ciblée varie selon le réseau et protocole. Consulter le protocole pour plus d'informations sur la concentration cellulaire finale ciblée.

- 17.4.2 Calculer le volume estimé de resuspension de CPS congelée (V1) requis en utilisant la concentration cellulaire finale ciblée.

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

T = nombre total de cellules

N1 = concentration cellulaire finale ciblée

V2 = volume d'aliquote final en ml

Arrondir V1 au 0,1 ml inférieur le plus proche afin de déterminer le volume réel de resuspension de la CPS (V_f).

Remarque pour le HVTN : arrondir V1 au ml entier inférieur (1,0) le plus proche afin de déterminer V_f.

Remarque : pour certains réseaux, V2 sera de 1 ml/tube cryogénique pour que le nombre de tubes requis soit égal aux millilitres de la CPS. Pour l'ACTG et l'IMPAACT, ajuster le volume par tube cryogénique conformément au LPC ou protocole.

Remarque pour l'IMPAACT : dans la plupart des protocoles de l'IMPAACT, on exigera des concentrations de PBMC viables de 10⁷/ml et de 5,0 x 10⁶/tube ainsi que la conservation de toutes les PBMC récupérées. En général, lorsque les récupérations de PBMC sont inférieures au nombre ciblé :

Ajouter les PBMC résiduelles d'un nombre inférieur à 2 x 10⁶ à un tube contenant 5,0 x 10⁶ cellules

- Aliquoter les cellules résiduelles d'un nombre supérieur à 2 x 10⁶ mais inférieur à 5 x 10⁶ dans un tube distinct.

Exemples :

Exigence du protocole de l'IMPAACT	Récupération	Préparation de l'aliquote
10 ⁷ PBMC dans 2 tubes	9,3 x 10 ⁶ PBMC	Préparer un tube contenant 5,0 x 10 ⁶ PBMC et un autre tube contenant 4,3 x 10 ⁶ PBMC
20 millions de PBMC	16,5 x 10 ⁶ PBMC	Préparer deux tubes contenant 5 x 10 ⁶ PBMC chacun et un tube contenant 6,5 x 10 ⁶ PBMC

Ne pas oublier de consigner le nombre réel de PBMC/flacon dans le LDMS.

- 17.4.3 **Pour le HVTN uniquement** : Calculer le nombre réel de cellules par tube (N2) en utilisant le volume réel de CPS congelée (V_f) déterminé dans les calculs précédents.

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

N2 = nombre réel de cellules par tube

T = nombre total de cellules

V2 = volume d'aliquote final en ml

17.5 Étiquetage

- 17.5.1 Imprimer et coller les étiquettes sur les tubes cryogéniques AVANT la centrifugation finale.

Remarque : il est important de veiller à ce que les cellules ne restent pas sous forme de culot cellulaire pendant une trop longue période.

- 17.5.2 Les étiquettes des tubes cryogéniques seront générées à l'aide du système de gestion des données de laboratoire (LDMS).

17.5.2.1 Suivre les pratiques de laboratoire du réseau pour réaliser la saisie des données.

17.5.2.2 Comparer chaque type dérivé d'étiquette de tube cryogénique avec les données du formulaire de demande d'analyse de laboratoire et de traitement AVANT d'étiqueter le tube cryogénique afin de détecter d'éventuelles erreurs de saisie.

17.5.2.3 Inspecter visuellement le code-barres de l'étiquette et la zone d'impression pour vérifier l'alignement et la qualité de l'impression

17.5.2.4 Corriger toutes les erreurs de saisie de données dans le LDMS et imprimer de nouveau les étiquettes, le cas échéant (en veillant à ce que les ID globaux appropriés soient sélectionnés.)

- 17.5.3 Appliquer les étiquettes sur les tubes cryogéniques de manière à ce que les renseignements puissent être lus aisément et que le contenu du tube puisse être clairement vu.

Remarque pour le HVTN : scanner les tubes cryogéniques étiquetés et vides en se conformant aux directives en vigueur du HVTN afin de s'assurer que le code-barres peut être scanné.

17.6 Centrifugation finale

- 17.6.1 Placer le tube de cellules récoltées dans la centrifugeuse.

Remarque pour le HVTN : QS la suspension cellulaire à 45 ml avec du WDR avant la centrifugation.

- 17.6.2 Centrifuger les cellules diluées à une vitesse comprise entre 200 et 400 x g pendant 10 minutes à une température comprise entre 15 et 30 °C (frein facultatif).

- 17.6.3 Vérifier que tous les tubes cryogéniques sont étiquetés et facilement accessibles.

17.7 Aliquotage pour la cryoconservation

Remarque : les étapes suivantes doivent être effectuées rapidement afin de préserver l'intégrité des cellules. Il est recommandé de garder les tubes cryogéniques au frais sur de la glace humide. Ne pas laisser la glace humide recouvrir les tubes. Ne pas laisser les bouchons des tubes en contact avec de l'humidité.

17.7.1 Retirer et éliminer le WDR surnageant. Garder le culot cellulaire.

Remarque pour l'ACTG et l'IMPACT : si les cellules doivent être congelées sous forme de culots de PBMC non viables, la resuspension des cellules dans un milieu congelé (CPS) n'est pas recommandée car le DMSO est un puissant inhibiteur de la PCR. Si les PBMC ont été en contact avec du DMSO (par exemple, milieu congelé), laver deux fois le culot de PBMC non viables avec du WDR avant la conservation. Consulter la SOP relative au traitement de l'échantillon à l'adresse suivante :

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

17.7.2 Suspendre de nouveau le culot cellulaire en utilisant le volume de CPS froide (V_f) déterminé à l'étape 17.4.

Remarque : Le pré-refroidissement des tubes et/ou le travail sur glace humide est autorisé.

17.7.2.1 Suspendre de nouveau **délicatement** le culot cellulaire avant d'ajouter la CPS en tapotant, raclant ou pipetant.

17.7.2.2 Ajouter **délicatement** la CPS aux cellules resuspendues en remuant constamment.

17.7.3 Travailler **rapidement** une fois que la CPS a été ajoutée. Ne pas laisser les cellules dans la solution congelée pendant plus de 10 minutes avant de les placer dans le congélateur.

17.7.4 Aliquoter de 0,5 à 1 ml par tube cryogénique, selon les exigences du réseau et protocole. Si le réseau ou protocole l'exige, préparer une aliquote partielle finale avec tout éventuel volume excédentaire de suspension cellulaire.

Remarque pour le HVTN : au lieu de créer une aliquote partielle finale, répartir de façon égale tout volume excédentaire entre tous les tubes cryogéniques pour ce PTID.

17.8 Congélation à vitesse contrôlée pendant la nuit

17.8.1 Suite au traitement et à la numération, les cellules doivent être immédiatement congelées.

17.8.2 Sélectionner la méthode de congélation à utiliser : StrataCooler® Cryo, Mr. Frosty® (NALGENE), CoolCell® (BioCision) ou CryoMed®. Se reporter à la section 7.4 pour plus d'informations sur la conservation et l'entretien.

17.8.3 Transférer immédiatement tous les tubes cryogéniques dans la boîte de congélation à vitesse contrôlée.

Pour Mr. Frosty® (NALGENE), CoolCell® (BioCision) et StrataCooler® Cryo, fermer la boîte et la placer dans un congélateur à une température de -80 °C (entre -65 et -95 °C), dans un endroit qui n'est pas dérangé par des accès répétés au congélateur (c'est-à-dire, loin de l'ouverture ou dans la partie supérieure du congélateur près de la porte/du couvercle d'ouverture) pendant au moins quatre heures pour Mr. Frosty® et CoolCell® et toute la nuit pour StrataCooler® Cryo.

Pour CryoMed® ou tout autre congélateur à vitesse contrôlée, lancer le programme de refroidissement conformément à la SOP appropriée disponible sur place.

Remarque : il s'agit du temps de congélation.

17.9 **S'assurer que toutes les informations appropriées sont documentées conformément aux exigences du réseau et laboratoire. Se reporter au chapitre 5 pour plus de détails.**

Passer au chapitre 18 (pour l'ACTG et le HVTN) ou au chapitre 19 (pour le HPTN, l'IMPACT et le MTN).

18 Conservation temporaire sur place à une température de -70/-80°C

Se conformer au chapitre 18 uniquement pour les PBMC qui sont traitées pour l'ACTG ou le HVTN.

18.1 Il est nécessaire de respecter la chaîne du froid tout au long des étapes de transfert afin d'éviter la détérioration des cellules.

18.2 Transférer les tubes cryogéniques de PBMC dans un congélateur à -70/-80 °C

18.2.1 Transférer les tubes cryogéniques du système de refroidissement à vitesse contrôlée dans l'emplacement de conservation désigné à -70/-80 °C.

Transférer les tubes cryogéniques après un minimum de quatre heures pour Mr. Frosty® (NALGENE) et CoolCell® (BioCision) et après une nuit pour StrataCooler® Cryo. Si CryoMed® est utilisé, transférer les tubes cryogéniques dès la fin du programme dans un congélateur à -70/-80 °C.

Requis pour le HVTN, recommandé pour l'ACTG : utiliser un plateau de transfert de glace carbonique. S'assurer que la boîte de congélation des tubes cryogéniques est recouverte de toutes parts d'une couche épaisse de glace carbonique. Travailler rapidement et efficacement afin de minimiser l'exposition des tubes cryogéniques aux températures ambiantes.

18.2.2 **Remarque** : ne pas conserver dans de l'azote liquide (LN2). Conserver à une température comprise entre -65 et -95 °C jusqu'au moment de l'expédition.

Requis pour le HVTN, recommandé pour l'ACTG : maintenir la chaîne du froid pendant la préparation de l'expédition en refroidissant à l'avance l'emballage d'expédition pour glace carbonique et en utilisant un plateau de transfert de glace carbonique durant les étapes d'emballage. S'assurer que l'emballage d'expédition est entièrement rempli de glace carbonique.

Remarque pour le HVTN : expédier sur de la glace carbonique au dépôt central d'échantillons dans la semaine suivant le recueil, sauf indication contraire du HVTN.

Remarque pour l'ACTG : expédier sur de la glace carbonique dans les 4 semaines suivant la date de congélation.

18.2.3 Ne PAS conserver temporairement les échantillons dans du LN2 sauf instructions contraires du réseau ou du protocole. Ne PAS transférer de nouveau les échantillons du LN2 dans des congélateurs à -70/-80 °C, sauf instructions contraires du réseau ou de l'équipe du protocole.

18.2.4 S'adresser au personnel des opérations de laboratoire du réseau si des échantillons ne peuvent pas atteindre leur destination finale pendant la période de conservation temporaire allouée par le réseau. Il est nécessaire d'obtenir l'autorisation de passage des échantillons à une conservation dans l'azote liquide (LN2) et de les expédier dans des emballages d'expédition pour LN2 si la conservation temporaire et les conditions d'expédition ne peuvent pas être satisfaites.

18.3 S'assurer que toutes les informations appropriées sont documentées conformément aux exigences du réseau et du laboratoire et que tous les calculs sont exacts. Se reporter au chapitre 5 pour plus de détails.

Requis pour le HVTN uniquement : demander à un deuxième examinateur de vérifier que le formulaire est complet et exact, puis de parapher et dater le **formulaire de traitement des PBMC** dans les deux jours suivant le traitement.

- 18.4** Conserver le formulaire de traitement des PBMC et tout autre document de suivi selon la politique du laboratoire. Se reporter au chapitre 5 pour plus de détails.

Cela marque la fin du traitement et de la conservation.

Suivre les procédures de laboratoire appropriées pour la préparation et le traitement des expéditions.

19 Conservation sur place dans de l'azote liquide (LN2)/un congélateur mécanique à -150 °C

Se conformer au chapitre 19 uniquement pour les PBMC qui sont traitées pour le HPTN, l'IMPAACT ou le MTN.

Remarque pour le HPTN et le MTN : les échantillons peuvent être conservés uniquement dans du LN2.

Remarque pour l'IMPAACT : les échantillons peuvent être conservés dans du LN2 ou un congélateur mécanique à -150 °C.

19.1 Transfert/conservation des tubes cryogéniques de PBMC dans du LN2/un congélateur mécanique à -150 °C

- 19.1.1 Le jour ouvrable suivant, transférer les tubes cryogéniques du système de refroidissement à vitesse contrôlée sur de la glace carbonique à l'emplacement de conservation désigné dans le système de conservation au LN2/à -150 °C.
- 19.1.2 Les échantillons de PBMC congelés peuvent être conservés indéfiniment et en toute sécurité dans du LN2 en phase vapeur.
- 19.1.3 Une fois que les échantillons ont été conservés dans du LN2, tous les transferts ou toutes les expéditions doivent être maintenus dans du LN2 (≤ -140 °C) ; les échantillons ne peuvent pas être expédiés sur de la glace carbonique.

Remarque pour l'IMPAACT : les échantillons doivent être expédiés dans des emballages d'expédition pour LN2 approuvés par l'IATA ; vérifier les exigences du protocole pour les exceptions.

- 19.1.4 Ne pas conserver temporairement les échantillons dans du LN2.
 - 19.1.5 Ne PAS transférer de nouveau les échantillons du LN2/à -150 °C dans des congélateurs à -70 ou -80 °C, sauf indications contraires du réseau ou de l'équipe du protocole.
- 19.2 S'assurer que toutes les informations appropriées sont documentées conformément aux exigences du réseau et du laboratoire et que tous les calculs sont exacts. Se reporter au chapitre 5 pour plus de détails.**
- 19.3 Conserver le formulaire de traitement des PBMC et tout autre document de suivi selon la politique du laboratoire. Se reporter au chapitre 5 pour plus de détails.**

Cela marque la fin du traitement et de la conservation.

Suivre les procédures de laboratoire appropriées pour la préparation et le traitement des expéditions.

20 Calculs

- 20.1 Les tr/min sont généralement lus à partir d'un graphique nomogramme. Les graphiques nomogrammes sont souvent inclus dans le manuel d'entretien de la centrifugeuse. Veiller à utiliser les graphiques propres à la centrifugeuse et au rotor.
- 20.2 Il est recommandé que la conversion g en tr/min appropriée soit affichée sur la centrifugeuse pour pouvoir s'y reporter facilement.
- 20.3 Si un graphique nomogramme n'est pas disponible, les forces g peuvent être converties en tr/min à l'aide de la formule suivante.

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

r = rayon du rotor en centimètres

g = force centrifuge relative exprimée en unités de gravité

tr/min = révolutions par minute

21 Limites de la procédure

- 21.1 La durée de traitement optimale entre le prélèvement et la congélation de sang frais pour les PBMC est inférieure à huit heures à partir du moment du prélèvement. La fonction cellulaire peut diminuer pour les échantillons plus anciens.
- 21.2 La durée de traitement optimale pour les PBMC est inférieure à trois heures entre le moment de l'ajout de sang dans les tubes de séparation cellulaire (Accuspin™ ou équivalent) et l'initiation du cycle de congélation à vitesse contrôlée.
- 21.3 Des études indiquent que les échantillons prélevés dans un anticoagulant EDTA génèrent des rendements plus faibles avec le temps.
- 21.4 Éviter de retirer les quantités excédentaires de milieu de séparation avec la bande de PBMC, car cela peut augmenter la contamination des granulocytes.
- 21.5 Éviter de retirer le surnageant excédentaire avec la bande de PBMC afin de limiter la contamination par des protéines plasmatiques.

22 Glossaire

Terme	Définition
ACTG	Groupe des essais cliniques sur le sida
Température de centrifugation	entre 15 et 30 °C
Caillots, gros	Plus des trois quarts de la masse de sang total comportent des caillots et il reste très peu de sang total libre.
Caillots, petits	Les petits caillots ne seront généralement pas vus dans le tube de sang total, mais peuvent être observés sur le tube de séparation à barrière frittée après centrifugation.
CPS	Solution de cryoconservation
CSR	Dépôt central des échantillons
CSTFB	Tube de séparation cellulaire avec barrière frittée

Terme	Définition
<i>Milieu GD</i>	Milieu à gradient de densité
<i>SVF</i>	Sérum fœtal bovin
<i>HBSS</i>	Solution saline équilibrée de Hank
<i>Hémolyse</i>	<p>Une coloration du sérum ou du plasma de rose à rouge due à la lyse des érythrocytes. L'hémolyse est évaluée et rapportée conformément à l'échelle suivante :</p> <p>1+ couleur rose-rouge pâle du sérum ou plasma, possibilité de lire clairement des caractères d'imprimerie à travers le tube de sang</p> <p>2+ couleur rose-rouge du sérum ou plasma, les caractères d'imprimerie peuvent être lus à travers le tube, mais pas aussi clairement</p> <p>3+ couleur rose-rouge foncé du sérum ou plasma, les caractères d'imprimerie sont obscurcis</p> <p>4+ couleur rouge acajou foncé du sérum ou plasma, impossibilité de lire les caractères d'imprimerie</p> <p>Remarque : les érythrocytes lysés colorent le sérum ou le plasma qui reste clair alors que la contamination des érythrocytes donne au sérum ou plasma une qualité trouble.</p>
<i>SVF-IC</i>	Sérum fœtal bovin inactivé par la chaleur
<i>HPTN</i>	Réseau d'essais pour la prévention du VIH
<i>HVTN</i>	Réseau d'essais du vaccin contre le VIH
<i>Ictérique</i>	Un plasma teinté en vert ou orange, laissant présumer la présence d'une augmentation de la bilirubine.
<i>IMPAACT</i>	Réseau international d'essais portant sur la transmission du sida par voie fœto-maternelle aux enfants et adolescents
<i>LDMS</i>	Système de gestion des données de laboratoire
<i>MTN</i>	Réseau d'essais sur les microbicides
<i>PBMC</i>	Cellules mononucléées de sang périphérique
<i>PBS</i>	Tampon phosphate salin
<i>PTID/PID</i>	Numéro d'identification du participant
<i>QS</i>	Quantité suffisante - ajouter une quantité suffisante de liquide pour atteindre le volume spécifié
<i>Température ambiante (TA)</i>	entre 15 et 30 °C
<i>Volume de sang total utilisable</i>	Le volume de sang total qui est réellement traité (Le volume de sang total utilisable peut ne pas être égal à la capacité du tube.)
<i>Conservation en phase vapeur</i>	La conservation dans l'azote liquide (LN2) en phase vapeur est la conservation dans l'espace du réservoir de stockage qui se situe au-dessus de l'azote liquide situé, lui, au fond du réservoir.
<i>WDR</i>	Réactif diluant de lavage (HBSS, PBS ou RPMI ; le RPMI ne peut être utilisé que pour les réseaux ACTG/IMPAACT)

23 Références

- 23.1 Bull M., Lee B., Stucky J., Chiu Y.L., Rubin A., Horton H. et McElrath MJ. Définition des paramètres du traitement sanguin pour la détection optimale des réponses spécifiques à des antigènes cryoconservés pour les essais sur le vaccin contre le VIH. *J. Immunol. Methods* 322:57-69 (2007).
- 23.2 SOP CHAVI pour l'isolation et la cryoconservation des PBMC, CHAVI-A0001, v5, 3 nov. 2008.

- 23.3 Cox J.H., DeSouza M., Ratto-Kim S., Ferrari G., Weinhold K.J. et Bix B.L. Essais sur l'immunité cellulaire pour l'évaluation de l'efficacité d'un vaccin dans les pays en voie de développement. *Manual of Clinical laboratory Immunology*. Rose N.R., Hamilton R.G., Detrick B. (éds.) (6ème éd.) p.301-315 (2002).
- 23.4 Islam B., Lindbert A. et Christensen B. La préparation des cellules de sang périphérique influence le niveau d'expression de la surface cellulaire des leucocytes comme évalué avec la cytométrie en flux multicouleurs. *Cytometry* 22:128-134 (1995).
- 23.5 Manuel de laboratoire du réseau de recherche en immunovirologie (IVRN) : séparation et conservation du sérum, du plasma et des PBMC. IVRN. 12 déc. 2007.
- 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. et Casimiro B.R. Augmentation des taux et de l'amplitude des réponses immunitaires détectées contre un vaccin contre le VIH : effet de l'utilisation d'une procédure optimisée pour l'isolation des 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 ; Groupe des essais cliniques pédiatriques sur le sida. Sous-ensembles lymphocytaires chez des enfants sains depuis la naissance jusqu'à 18 ans : étude P1009 du Groupe des essais cliniques pédiatriques sur le sida. *J Allergy Clin Immunol.* 112(5):973-80 (2003).
- 23.8 Système Sigma-Aldrich Accuspin™ -Histopaque®-1077, procédure numéro A6929/A7054/A0561, datée de septembre 2003.
- 23.9 Weinberg A., Betensky R., Zhang L. et Ray G. Effet de l'expédition, de la conservation, de l'anticoagulant et de la séparation cellulaire sur la prolifération des lymphocytes chez les patients infectés par le virus de l'immunodéficience humaine. *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 et Tustin NB. Optimisation de la conservation et de l'expédition de cellules mononucléées du sang périphérique cryoconservées issues de patients infectés et non infectés par le VIH pour les dosages ELISPOT. *J Immunol Methods.* 363(1):42-50 (2010).

24 Documents supplémentaires (tenus à jour par le laboratoire)

- 24.1 Notice du SVF et certificat d'analyse
- 24.2 Notice du WDR (HBSS, PBS ou RPMI)
- 24.3 Notice du milieu à gradient de densité
- 24.4 Notice des tubes de séparation cellulaire avec barrière frittée

25 Annexes

- 25.1 **Annexe A : Formulaire de traitement des PBMC requis par le HVTN**
L'annexe A est également disponible en version téléchargeable et révisable sur le site Internet public du HANC à l'adresse <http://www.hanc.info/labs/Pages/PBMCSOP.aspx>
- 25.2 **Annexe B : Exemple de journal des modifications de l'isopropanol pour Mr. Frosty® (NALGENE)**
- 25.3 **Annexe C : Dépannage : Récupération des PBMC en l'absence de bande de PBMC définie après centrifugation en gradient de densité**

- 25.4 Annexe D : Rassemblement des couches leuco-plaquettaires pour isolation des PBMC par la méthode du milieu à gradient de densité**
- 25.5 Annexe E : Guide rapide de la SOP relative au traitement des PBMC inter-réseaux - tubes CSTFB**
- 25.6 Annexe F : Guide rapide de la SOP relative au traitement des PBMC inter-réseaux - Méthode manuelle d'application sur couche**
- 25.7 Annexe G : Exemples de réactifs**
- 25.8 Annexe H : Historique des révisions**

Annexe A : Formulaire de traitement des PBMC requis pour le HVTN

Laboratoire de traitement des échantillons :

ID du participant (PTID) :		Visite :		Protocole :	
Date du prélèvement :		Heure :			
Date du début du traitement :		Heure :		Traité par :	
Réactifs/Fabricant		Numéro du lot			Date d'expiration
DMSO (Fabricant : _____)					
SVF (Fabricant : _____)					
HBSS ou autre WDR (Fabricant : _____)					
Tube de séparation cellulaire (Fabricant : _____)					
Milieu à gradient de densité (Fabricant : _____)					
		Volume en ml			
CPS		CPS	DMSO	SVF	1 jour ouvrable
Données à saisir durant le traitement					Échantillon
Type de tube d'échantillon (entourer une réponse)					NaHep / ACD / EDTA Autre : _____
État du sang (entourer une ou plusieurs réponses)					NORM/HÉMO/CAILLOTS
Si indiqué dans le protocole ou les instructions de traitement, récolter le plasma avant le traitement des PBMC. Remplacer le volume de plasma avec du HBSS/WDR. Indiquer si la récolte a eu lieu.					Oui Non
Volume de sang total utilisable					ml
Indiquer la méthode de traitement : Barrière frittée, application manuelle sur ou sous couche ou rassemblement des couches leuco-plaquettaires					
Méthode de numération (nom de l'instrument ou numération manuelle)					
Volume de resuspension du HBSS (ou autre WDR) pour la numération (V)					ml
Concentration moyenne de la numération cellulaire (C)					x 10 ⁶ cellules/ml
Nombre total de cellules (T) = C x V					x 10 ⁶ cellules
Calculer le rendement cellulaire/ml de sang total (vérification du contrôle qualité) = (T/volume de sang total utilisable)					x 10 ⁶ cellules/ml
Calculer le vol. estimé de la resuspension de CPS (V1)=(T/15x10 ⁶ cellules/ml) (1 ml)					ml
Calculer le volume final de la resuspension de CPS (Vf), arrondi au ml entier INFÉRIEUR le plus proche					ml
Calculer le nombre réel de cellules par tube N2 = (T/Vf) x V2 ; (v2 = 1 ml pour la plupart des protocoles du HVTN).					x 10 ⁶ cellules/tube
Date et heure de la congélation (Noter dans la partie réservée aux commentaires si plus de quatre heures après le début du traitement)					
Imprimer et contrôler la qualité du contenu/code-barres des étiquettes LDMS (initiales de la personne effectuant le contrôle qualité)					

Annexe A : Formulaire de traitement des PBMC requis pour le HVTN

Laboratoire de traitement des échantillons :

PTID :

Nombre de tubes cryogéniques réellement congelés Remarque : doit être égal au volume congelé de la resuspension pour des aliquotes de 1 ml.	
Pour le HVTN, saisir les données restantes dans le LDMS, y compris la numération cellulaire totale et la durée de congélation.	
Transfert des tubes cryogéniques dans le congélateur de conservation	
Personne qui a transféré les tubes cryogéniques dans les emplacements de la boîte de conservation affectés par le LDMS	
Date (jjmmaaaa)/heure auxquelles les tubes cryogéniques ont été transférés du dispositif de refroidissement lent à la boîte de conservation. (L'échantillon doit être conservé à une température de -70/-80 °C durant le transfert)	
Examen final	
Examineur/date	

Numérations à l'hémacytomètre	Numération totale	Cellules viables	Non viables	
Carré n° 1 (cellules/mm ²)				
Carré n° 2 (cellules/mm ²)				
Carré n° 3 (cellules/mm ²)				
Carré n° 4 (cellules/mm ²)				
Numération cellulaire moyenne par carré (cellules/mm ²)				
Facteur de dilution des PBMC (1 : DF*)				
Facteur hémacytomètre pour cellules/ml	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	
Concentration de la numération cellulaire (C) = (Numération cellulaire moyenne/mm ²)(DF)(10 ⁴) ; convertir à 10 ⁶ cellules/ml	x 10 ⁶ cellules/ml	x 10 ⁶ cellules/ml	x 10 ⁶ cellules/ml	
% viabilité = (cellules viables/total des cellules) (100)	Sans objet		Sans objet	Sans objet
Numérations cellulaires automatisées (10 ³ /µl = 10 ⁶ /ml)	Numération n° 1			
Numération cellulaire (C) par cellules x 10 ⁶ /ml				
Facteur de dilution des PBMC (1 : DF*)				
Concentration cellulaire = (C) (DF)	x 10 ⁶ cellules/ml			

***Remarque** : facteur de dilution (DF) = (parties cellules + parties liquides de dilution)/parties cellules

Commentaires et écarts au protocole :

Annexe C : Dépannage : Récupération des PBMC en l'absence de bande de PBMC définie après centrifugation en gradient de densité

C.1 Contexte :

Si quelque chose a mal fonctionné durant la centrifugation du sang en gradient de densité, les couches de milieu à gradient de densité et de plasma ne se sépareront pas de manière nette et la couche de PBMC pourra ne pas être visible. Ne pas paniquer. Les PBMC peuvent être partiellement récupérées à l'aide d'étapes supplémentaires.

C.2 Identifier le problème :

C.2.1 Retirer les tubes de la centrifugeuse et les transférer sur un plateau.

C.2.2 Essayer d'identifier la cause à l'origine de l'absence de couche de PBMC claire. Les causes possibles sont indiquées ci-dessous :

C.2.2.1 Le tube est tombé ou s'est brisé.

C.2.2.2 Le frein est resté en marche.

C.2.2.3 La vitesse de centrifugation était trop élevée. Vérifier que le réglage en tr/min était correct pour la procédure utilisée (tube CSTFB ou séparation cellulaire manuelle en gradient de densité) en vérifiant le graphique RCF/tr/min pour le rotor. Certaines centrifugeuses nécessitent que leurs réglages correspondent au type de récipient utilisé. Si les réglages ne sont pas corrects, il est possible que la centrifugeuse calcule mal sa vitesse.

C.2.2.4 La centrifugeuse s'est arrêtée en raison d'une coupure de l'alimentation électrique.

C.2.2.5 La barrière frittée s'est déplacée. (Cela est souvent dû à une vitesse trop élevée de la centrifugeuse, mais il peut arriver occasionnellement qu'un tube du lot soit défectueux).

C.2.2.6 La centrifugeuse était mal équilibrée.

C.2.2.7 Le donneur présentait une faible numération de lymphocytes, de leucocytes ou d'hématocrites.

C.3 Parmi toutes les causes mentionnées ci-dessus, les cinq premières peuvent être facilement réglées. Si la cause est due à une centrifugeuse mal équilibrée, déterminer la raison de ce déséquilibre.

Vérifier ce qui suit :

C.3.1 Vérifier que les tubes étaient équilibrés.

C.3.2 Vérifier que les récipients de la centrifugeuse étaient équilibrés.

C.3.3 Vérifier que les bras et récipients de la centrifugeuse étaient correctement graissés et huilés.

Remarque : en cas de doute sur une centrifugeuse, en utiliser une autre.

C.4 En supposant que le problème a été réglé, centrifuger de nouveau les échantillons comme suit :

C.4.1 Réactifs :

C.4.1.1 Milieu à gradient de densité

C.4.1.2 tubes de 50 ml

C.4.1.3 Pipettes

C.4.2 Méthode :

Remarque : le milieu à gradient de densité est toxique pour les cellules ; travailler par conséquent de manière efficace.

- C.4.2.1 Ajouter 15 ml de milieu à gradient de densité dans des tubes stériles de 50 ml (pas de tubes CSTFB).
- C.4.2.2 Laisser le milieu à gradient de densité se réchauffer à température ambiante pendant la manipulation de l'échantillon.
- C.4.2.3 Pour chaque tube mélangé, étiqueter les tubes de 50 ml avec le PTID du sujet. Utiliser une pipette pour retirer lentement le contenu de l'échantillon mélangé du tube de séparation ou tube CSTFB. (Généralement, la barrière frittée du tube CSTFB se sera déplacée.)
- C.4.2.4 Transférer jusqu'à 30 ml d'échantillon mélangé dans le tube contenant le milieu à gradient de densité.
- C.4.2.5 Répéter cette étape pour tous les échantillons mélangés.
- C.4.2.6 Placer les tubes dans la centrifugeuse en vérifiant que les tubes sont équilibrés.
- C.4.2.7 Centrifuger pendant 30 à 40 minutes à une vitesse de 400 x g avec le frein en position ARRÊT, à une température comprise entre 15 et 30 °C
- C.4.2.8 Une couche de PBMC devrait maintenant être visible. (Souvent, certaines cellules auront été perdues, la couche pourrait alors être fine.)
- C.4.2.9 La couche supérieure, qui correspond à du plasma potentiellement contaminé par le milieu à gradient de densité, peut être recueillie à ce stade et traitée comme indiqué aux sections « Isolation des PBMC et du plasma » et « Conservation du plasma » du protocole principal. Toutefois, les informations relatives à la potentielle contamination de l'échantillon plasmatique par le milieu à gradient de densité doivent être saisies dans la rubrique des commentaires du LDMS pour cet échantillon.
- C.4.2.10 Transférer soigneusement la couche de PBMC dans un tube à centrifuger à fond conique de 50 ml étiqueté avec l'identifiant PTID. Utiliser un nouveau tube pour chaque tube de milieu à gradient de densité.
- C.4.2.11 Reboucher le tube de milieu à gradient de densité.
- C.4.2.12 Retourner au chapitre 15 du protocole principal.

Remarque : dans la rubrique « Commentaires et écarts au protocole » du **formulaire de traitement des PBMC**, consigner les détails de l'écart par rapport à la SOP (c'est-à-dire que les étapes de « l'annexe B » ont été suivies pour récupérer les PBMC en raison de l'absence d'une bande de PBMC définie après la centrifugation en gradient de densité). En outre, noter la durée de la deuxième centrifugation, afin de fournir une estimation de la durée durant laquelle les cellules sont restées dans le milieu à gradient de densité. De plus, noter que l'échantillon plasmatique récupéré a été potentiellement contaminé par le milieu à gradient de densité sur le **formulaire de traitement des PBMC** et dans la rubrique de saisie des commentaires du LDMS pour les échantillons plasmatiques.

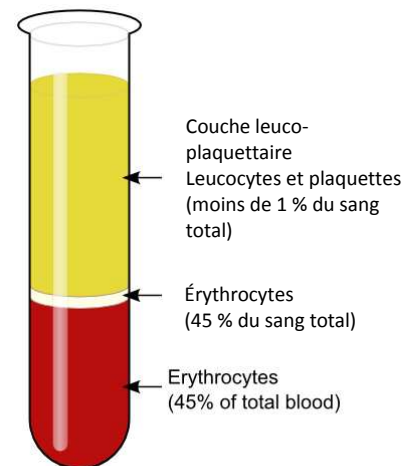
Annexe D : Rassemblement des couches leuco-plaquettaires pour isolation des PBMC par la méthode du milieu à gradient de densité

La procédure peut être utilisée lors de l'isolation de PBMC issues de multiples tubes de sang de la même combinaison PTID-anticoagulant. Cette procédure permet de consolider les couches leuco-plaquettaires afin de réduire la consommation de réactifs et consommables, d'augmenter la récupération et de réduire la contamination.

La couche leuco-plaquettaire est la fraction de sang total anticoagulé qui contient les leucocytes et les plaquettes et qui se forme à l'interface de la couche plasmatique et de la couche érythrocytaire après centrifugation. La majeure partie des leucocytes se trouve dans la couche leuco-plaquettaire et seule une petite fraction (moins de 1 million au total) reste dans l'agrégat d'érythrocytes après la récolte de la couche leuco-plaquettaire. La couche leuco-plaquettaire est récoltée avec une petite fraction de plasma et d'érythrocytes (environ 1,5 ml) et est ensuite diluée avant l'application d'un milieu à gradient de densité sur couche pour la séparation des lymphocytes.

Procédure :

- D1. S'assurer d'avoir réalisé les étapes 16.4.1 à 16.4.3.
- D2. Centrifuger le sang total à une vitesse comprise entre 200 et 400 x g pendant 10 minutes.
- D3. Récolter le plasma (et le conserver selon les besoins - consulter les sections 16.3.4 à 16.3.7) de chaque tube jusqu'à environ 5 mm de la couche leuco-plaquettaire (qui est nette dans la plupart des cas sauf si le patient présente une neutropénie/lymphopénie sévère).
- D4. Déterminer la capacité et le nombre de tubes à centrifuger à fond conique nécessaires pour chaque combinaison PTID-anticoagulant. Ne pas rassembler d'échantillons de différents PTID/anticoagulants. En général :
 - les couches leuco-plaquettaires de deux tubes de 10 ml peuvent être combinées dans un tube à centrifuger à fond conique de 15 ml.
 - les couches leuco-plaquettaires de deux tubes de 10 ml peuvent être combinées dans un tube à centrifuger à fond conique de 50 ml.
- D5. Étiqueter chaque tube à fond conique avec le PTID.
- D6. Ajouter du WDR à chaque tube à fond conique stérile.



Capacité du tube à centrifuger à fond conique (ml)	Volume de WDR (ml)
15	3
50	10-15

- D7. Tenir le tube de plasma déplété (qui contient à présent une faible quantité de plasma et de cellules agglutinées résiduels) à un angle d'environ 30°
- D8. Utiliser une pipette jetable de 2,5 ml stérile en polypropylène à grand diamètre pour récolter la couche leuco-plaquettaire. Aspirer la couche leuco-plaquettaire en baissant la partie inférieure du tube. Aspirer doucement le plasma suivi de la couche leuco-plaquettaire qui « glissera » au fond de la couche d'érythrocytes agglutinés (environ 1,5 ml de liquide aspiré). Transférer la couche leuco-plaquettaire dans le tube contenant le WDR, en rinçant deux ou trois fois la pipette contenant la suspension de WDR/cellules.
- D9. Récolter et rassembler les couches leuco-plaquettaires de(s) tube(s) restant(s) pour cette combinaison PTID-anticoagulant.
- D10. QS la suspension de WDR/cellules avec du WDR supplémentaire pour atteindre le volume désiré nécessaire à la réalisation de la séparation cellulaire en gradient de densité. Mélanger délicatement trois ou quatre fois les couches leuco-plaquettaires rassemblées avec une pipette.

- D11. Poursuivre la séparation cellulaire en gradient de densité à l'étape 16.4.6 de la SOP. Pour l'étape 16.4.6, le terme « sang dilué » signifie « couche leuco-plaquettaire ».

Matériel supplémentaire nécessaire : une pipette de 2,5 ml stérile en polypropylène à grand diamètre.

Annexe E : Guide rapide de la SOP relative au traitement des PBMC - tubes CSTFB

L'utilisation du **formulaire de traitement des PBMC** et du LDMS est **requise pour tous les réseaux** (se reporter au chapitre 5 pour plus de détails). Avant d'utiliser ce guide rapide pour la première fois, veiller à examiner l'intégralité de la SOP relative aux PBMC pour les remarques et détails importants ainsi que les directives propres aux réseaux.

Étapes (Les quantités pour des volumes plus petits sont en <i>italique</i> .)	Se reporter à la SOP
1. Préparer et refroidir la CPS.	11.3
2. Préparer les échantillons de sang total, réactifs et fournitures.	15.2
3. Si des aliquotes de plasma sont requises selon les instructions du protocole : a. Centrifuger le sang total à une vitesse comprise entre 200 et 400 x g pendant 10 minutes. b. Marquer le volume total de sang au niveau du ménisque puis transférer le plasma dans un tube à centrifuger à fond conique de 15 ou 50 ml pour la suite du traitement (vitesse comprise entre 800 et 1 200 x g pendant 10 minutes, frein facultatif). c. Ajouter une quantité suffisante de WDR pour ramener le sang total à son volume d'origine, mélanger délicatement et continuer le traitement des PBMC.	15.3
4. Ajouter 5 ml (<i>2 ml</i>) de WDR à chaque tube CSTFB. 5. Transférer entre 12 et 22 ml (<i>entre 4 et 5 ml</i>) de sang dans les tubes CSTFB étiquetés. 6. Ajouter le WDR de rinçage du tube et le WDR final dans les tubes CSTFB jusqu'à 30 ml (<i>7,5 ml</i>) (WDR + sang total).	15.4
7. Centrifuger à une vitesse comprise entre 800 et 1 000 x g pendant 15 minutes à une température comprise entre 15 et 30 °C avec le <u>frein en position ARRÊT</u> . 8. Inspecter les tubes pour déceler d'éventuels problèmes. 9. Récolter chaque couche leuco-plaquettaire des tubes CSTFB dans un unique tube à centrifuger à fond conique correspondant de 50 ml (<i>15 ml</i>).	15.5
10. Ajouter du WDR pour QS jusqu'à atteindre un volume total de 45 ml (<i>10 ml</i>) et mélanger délicatement. 11. Lavage n° 1 – centrifuger à une vitesse comprise entre 200 et 400 x g pendant 10 minutes, à une température comprise entre 15 et 30 °C (frein facultatif). 12. Vérifier la présence de culots cellulaires ! 13. Retirer délicatement le surnageant sans toucher au culot cellulaire.	17.1
14. Suspendre de nouveau le culot cellulaire dans un petit volume de WDR pour obtenir une suspension de cellules homogène. 15. Combiner jusqu'à quatre suspensions de culots cellulaires dans un tube à centrifuger à fond conique de 50 ml (<i>deux dans un tube de 15 ml</i>). 16. Ajouter le WDR de rinçage du tube et le WDR final de 45 ml (<i>10 ml</i>) au tube de cellules. 17. Lavage n° 2 – centrifuger à une vitesse comprise entre 200 et 400 x g pendant 10 minutes, à une température comprise entre 15 et 30 °C (frein facultatif). 18. Vérifier la présence de culots cellulaires ! 19. Retirer délicatement le surnageant sans toucher au culot cellulaire.	17.2
20. Calculer le volume de resuspension du WDR pour la numération (V). 21. Combiner les culots cellulaires dans un tube en utilisant le volume de resuspension du WDR. Il s'agit du volume sur lequel la numération cellulaire est basée. 22. Compter et calculer le nombre total de cellules. 23. Calculer le rendement cellulaire en cellules/ml de sang total utilisable.	17.3
24. Calculer le volume final de la resuspension de CPS. Vérifier les calculs.	17.4
25. Réaliser l'impression des étiquettes, l'étiquetage et le contrôle qualité des tubes cryogéniques AVANT la centrifugation finale.	17.5
26. Centrifuger à une vitesse comprise entre 200 et 400 x g pendant 10 minutes, à une	17.6

	Se reporter à la SOP
Étapes (Les quantités pour des volumes plus petits sont en <i>italique</i> .)	
température comprise entre 15 et 30 °C (frein facultatif).	
27. Retirer délicatement le surnageant sans toucher au culot cellulaire. 28. Suspendre à nouveau délicatement le culot cellulaire dans de la CPS froide (V_f) tout en remuant le tube pour obtenir une distribution homogène. Il est recommandé de travailler sur de la glace humide. 29. Réaliser délicatement les aliquotes de CPS-cellules.	17.7
30. Transférer immédiatement (≤ 10 minutes) tous les tubes cryogéniques dans l'appareil de congélation à vitesse contrôlée et commencer la congélation.	17.8
31. Après la durée appropriée, transférer les tubes cryogéniques dans l'appareil de conservation disponible sur place et les expédier dans le délai imposé par le réseau.	18 ou 19
32. Pour le HVTN, examiner le formulaire de traitement des PBMC afin de s'assurer qu'il est complet et exact.	19.2

Annexe F : Guide rapide de la SOP relative au traitement des PBMC - Méthode manuelle d'application sur couche

L'utilisation du **formulaire de traitement des PBMC** et du LDMS est **requisse pour tous les réseaux** (se reporter au chapitre 5 pour plus de détails). Avant d'utiliser ce guide rapide pour la première fois, veiller à examiner l'intégralité de la SOP relative aux PBMC pour les remarques et détails importants ainsi que les directives propres aux réseaux.

Étapes (Les quantités pour des volumes plus petits sont en <i>italique</i> .)	Se reporter à la SOP
1. Préparer et refroidir la CPS.	11.3
2. Préparer les échantillons de sang total, réactifs et fournitures.	16.2
3. Si des aliquotes de plasma sont requises selon les instructions du protocole : a. Centrifuger le sang total à une vitesse comprise entre 200 et 400 x g pendant 10 minutes. b. Marquer le volume total de sang au niveau du ménisque puis transférer le plasma dans un tube à centrifuger à fond conique de 15 ou 50 ml pour la suite du traitement (vitesse comprise entre 800 et 1 200 x g pendant 10 minutes, frein facultatif) c. Ajouter une quantité suffisante de WDR pour ramener le sang total à son volume d'origine, mélanger délicatement et continuer le traitement des PBMC.	16.3
4. Transférer le sang total dans un tube à centrifuger stérile de 50 ml (<i>15 ml</i>) et diluer avec du WDR, comme il convient. 5. Appliquer soigneusement et lentement le sang sur le milieu à gradient de densité. (La méthode d'application sous couche est une alternative approuvée.)	16.4
6. Centrifuger à une vitesse de 400 x g pendant 30 minutes avec le <u>frein en position ARRÊT</u> . 7. Vérifier chaque tube à centrifuger à fond conique pour déceler d'éventuels problèmes. 8. Récolter chaque couche leuco-plaquettaire dans un unique tube à centrifuger à fond conique correspondant de 50 ml (<i>15 ml</i>).	16.5
9. Ajouter du WDR pour QS jusqu'à atteindre un volume total de 45 ml (<i>10 ml</i>) et mélanger délicatement. 10. Lavage n° 1 – centrifuger à une vitesse comprise entre 200 et 400 x g pendant 10 minutes, à une température comprise entre 15 et 30 °C (frein facultatif). 11. Vérifier la présence de culots cellulaires ! 12. Retirer délicatement le surnageant sans toucher au culot cellulaire.	16.1
13. Suspendre de nouveau le culot cellulaire dans un petit volume de WDR pour obtenir une suspension de cellules homogène. 14. Combiner jusqu'à quatre suspensions de culots cellulaires dans un tube à centrifuger à fond conique de 50 ml (<i>deux dans un tube de 15 ml</i>). 15. Ajouter le WDR de rinçage du tube et le WDR final de 45 ml (<i>10 ml</i>) au tube de cellules. 16. Lavage n° 2 – centrifuger à une vitesse comprise entre 200 et 400 x g pendant 10 minutes, à une température comprise entre 15 et 30 °C (frein facultatif). 17. Vérifier la présence de culots cellulaires ! 18. Retirer délicatement le surnageant sans toucher au culot cellulaire.	16.2
19. Calculer le volume de resuspension du WDR pour la numération (V). 20. Combiner les culots cellulaires dans un tube en utilisant le volume de resuspension du WDR. Il s'agit du volume sur lequel la numération cellulaire est basée. 21. Compter et calculer le nombre total de cellules. 22. Calculer le rendement cellulaire en cellules/ml de sang total utilisable.	16.3
23. Calculer le volume final de la resuspension de CPS. Vérifier les calculs.	17.4
24. Réaliser l'impression des étiquettes, l'étiquetage et le contrôle qualité des tubes cryogéniques AVANT la centrifugation finale.	17.5

	Se reporter à la SOP
Étapes (Les quantités pour des volumes plus petits sont en <i>italique</i> .)	
25. Centrifuger à une vitesse comprise entre 200 et 400 x g pendant 10 minutes, à une température comprise entre 15 et 30 °C (frein facultatif).	17.6
26. Retirer délicatement le surnageant sans toucher au culot cellulaire. 27. Suspendre à nouveau délicatement le culot cellulaire dans de la CPS froide (V_f) tout en remuant le tube pour obtenir une distribution homogène. Il est recommandé de travailler sur de la glace humide. 28. Réaliser délicatement les aliquotes de CPS-cellules.	17.7
29. Transférer immédiatement (≤ 10 minutes) tous les tubes cryogéniques dans l'appareil de congélation à vitesse contrôlée et commencer la congélation.	17.8
30. Après la durée appropriée, transférer les tubes cryogéniques dans l'appareil de conservation disponible sur place et les expédier dans le délai imposé par le réseau.	18 ou 19
31. Pour le HVTN, examiner le formulaire de traitement des PBMC afin de s'assurer qu'il est complet et exact.	19.2

Annexe G : Exemples de réactifs et fournitures

Remarque : tous les réactifs doivent être achetés stériles et l'utilisation de techniques aseptiques est requise.

Réactif/Fourniture	Exemple(s)	Facultatif/Requis
Tube de séparation cellulaire avec barrière frittée (CSTFB) pré-remplis avec du milieu à gradient de densité de 1,077	<ul style="list-style-type: none"> • Système Sigma-Aldrich Accuspin™ - Histopaque®-1077 • Ficoll-Paque™ PLUS 	Facultatif
Tube CSTFB sec	<ul style="list-style-type: none"> • Tubes de séparation Accuspin™ • Tubes de séparation Leucosep® 	Facultatif
Milieu à gradient de densité de 1,077	<ul style="list-style-type: none"> • Ficoll-Paque™ PLUS et PREMIUM • Lymphoprep™ • Milieu de séparation des lymphocytes – LSM™ 	Facultatif
Diméthylsulfoxyde (DMSO) de qualité culture cellulaire	<ul style="list-style-type: none"> • Hybrimax, Sigma-Aldrich référence catalogue n° D2650, testé pour les endotoxines et les hybridomes 	Facultatif
Sérum foetal bovin (SVF)		<p>ACTG, IMPAACT et HPTN : Consulter les informations concernant les lots actuellement validés par l'IQA.</p> <p>HVTN et MTN : Utiliser les lots validés par le HVTN ; s'il est impossible de se procurer ou d'importer des lots désignés par le HVTN, consulter le HVTN/MTN pour d'autres possibilités.</p>
Tubes cryogéniques	<ul style="list-style-type: none"> • Tube cryogénique Corning® de 2 ml en polypropylène, à filetage externe, autoportant et à fond rond, réf. 430659 • Tubes Nunc CryoTubes™ en polypropylène (PP), à filetage interne et muni d'un bouchon à visser, réf. 377267 • Tubes cryogéniques WHEATON Cryule® en plastique, à filetage externe, réf. 985742 • Microtube SARSTEDT à filetage externe et muni d'un bouchon à visser, réf. 72.694.006 	Facultatif
Étiquettes cryogéniques	<ul style="list-style-type: none"> • Cryo-Tags® et Cryo-Babies® Brady B461 ou B490 • Étiquettes pour congélateur Shamrock. 	Facultatif
Marqueurs	<ul style="list-style-type: none"> • Marqueurs Fisherband* réf. 13-379 • Crayon/marqueur de laboratoire Nalgene® réf. 6310/6311 	Facultatif

Annexe H : Historique des révisions

Version Date d'entrée en vigueur (jj/mm/aa)	Commentaires	
1.0 01/04/09	Initial	
2.0 01/07/09	Section	Modification
	Dans toute la SOP	« HBSS » et « PBS » remplacés par « WDR » (Wash Diluent Reagent).
	Dans toute la SOP	« entre 18 et 26 °C » remplacé par « entre 15 et 30 °C »
	Page de garde	Suppression de la section Examen annuel de la SOP.
	3.1	Remplacé par : Certaines études de validation indiquent que les conditions optimales consistent à traiter et congeler le sang dans les huit heures suivant le prélèvement sanguin afin de maintenir la fonction maximale des cellules dans les tests de surveillance immunitaire. Le HVTN exige que la durée totale entre le prélèvement et la congélation soit inférieure ou égale à huit heures. Pour les autres réseaux, la limite de temps peut varier ; consulter les documents appropriés du protocole.
	5.4.3	Remplacé par : Le HVTN exige que la durée totale entre le prélèvement et la congélation soit inférieure ou égale à huit heures. Pour les autres réseaux, la limite de temps peut varier ; consulter les documents appropriés du protocole. Consigner l'heure du prélèvement sur le formulaire de traitement des PBMC et/ou dans le LDMS.
	6.1.9	Remplacé par : Récipient ou béccher pour l'eau de Javel ou autre désinfectant pour rincer les pipettes si requis par les pratiques de sécurité locales.
	6.3.3	Remplacé par : Remarque pour le HVTN : un compteur cellulaire automatisé ne permettant pas d'identifier les cellules viables peut être utilisé pour obtenir une numération cellulaire totale sans énumération des cellules viables.
	6.3.3	Remplacé par : Remarque pour les laboratoires participant au programme de test de maîtrise de la cryoconservation des PBMC de l'IQA : L'évaluation de la viabilité est requise.
	6.4.1 et dans toute la SOP	« StrataCooler® » remplacé par « StrataCooler® Cryo ».
6.4.2	Remplacé par : Mr. Frosty® (NALGENE), boîte de congélation progressive de 1 °C/minute Mr. Frosty® doit être conservé à température ambiante (entre 15 et 30 °C). Remarque : remplacer l'isopropanol tous les cinq cycles de congélation/décongélation. Un journal doit être tenu pour suivre les cycles de congélation/décongélation et les modifications du réactif. Se reporter à l'annexe B.	
7.1.4	Les tubes cryogéniques peuvent être à filetage interne ou externe	

Version Date d'entrée en vigueur (jj/mm/aa)	Commentaires	
	7.1.7	Remplacé par : Facultatif : Si des tubes de séparation cellulaire munis de barrières frittées (CSTFB) pré-remplis ne sont pas utilisés, des tubes CSTFB (se reporter à la section 9.2 pour plus de détails) ou des tubes à centrifuger jetables de 15 et de 50 ml vides, comme indiqué dans la section 7.1.3, seront requis.
	8.3	Les gants poudrés ne sont pas acceptables ; tous les gants doivent être non poudrés.
	9	Aucun fournisseur n'est recommandé.
	9.1	« réactifs de séparation sanguine » remplacé par « réactifs diluants de lavage »
	9.1	Une solution de lavage alternative pour l'ACTG et l'IMPACT est le milieu RPMI sans SVF ou antibiotiques.
	9.2	« Vérifier la date d'expiration du fabricant » remplacé par « Utiliser avant la date d'expiration du fabricant ».
	9.2	Remarque remplacée par : en cas d'utilisation de tubes CSTFB, se conformer au chapitre 14 . en cas d'utilisation d'une méthode manuelle d'application sur ou sous couche (sans barrière frittée), se conformer au chapitre 15 .
	9.3.3.2	Remplacé par : Eau de javel à 10 % v/v, récipient ou bécher et pulvérisateur
	10.1.2	Remplacé par : Le décongeler de préférence dans le réfrigérateur (température comprise entre 2 et 8 °C) ou pendant plusieurs heures à température ambiante. Ne pas laisser le SVF-IC à température ambiante plus longtemps qu'il n'est nécessaire pour terminer le processus de décongélation.
	10.1.4	Sections 10.1.4 et 10.1.5 combinées et réorganisées pour plus de clarté.
	10.2.2	Remplacé par : Le décongeler de préférence dans le réfrigérateur (température comprise entre 2 et 8 °C) ou pendant plusieurs heures à température ambiante. Ne pas laisser le SVF-IC à température ambiante plus longtemps qu'il n'est nécessaire pour terminer le processus de décongélation.
	12.1.1	« Fourchette de rendement cellulaire » remplacé par « Fourchette de rendements de cellules mononucléées »
	12.3	Remplacé par : Les durées de manipulation peuvent affecter la récupération cellulaire et la viabilité de manière indésirable. L'heure du prélèvement, de la manipulation et du traitement est consignée sur le formulaire de traitement des PBMC et/ou dans le LDMS.

Version Date d'entrée en vigueur (jj/mm/aa)	Commentaires	
	12.3.1	Remplacé par : <ul style="list-style-type: none"> Le HVTN exige que la durée totale entre le prélèvement et la congélation soit inférieure ou égale à huit heures. Pour les autres réseaux, la limite de temps peut varier. Le HVTN exige que la durée réelle de traitement entre l'introduction de sang frais dans les tubes contenant le milieu à gradient de densité et le début de la congélation à vitesse contrôlée soit comprise entre 2 et 3 heures pour maximiser l'intégrité des cellules. Pour les autres réseaux, la limite de temps peut varier.
	12.3.2	Remplacé par : Examiner toute durée de traitement longue avec les superviseurs et la documenter sur le formulaire de traitement des PBMC et/ou le LDMS.
	14 à 16	Inclusion de quantités alternatives pour l'utilisation avec des échantillons plus petits (d'enfants).
	14	Instructions remplacées par : le chapitre 14 peut être consulté par tous les réseaux ; vérifier les exigences du protocole et le matériel disponible. Pour tout échantillon donné, se conformer soit au chapitre 14, soit au chapitre 15, mais pas aux deux.
	14.1.4	Remplacé par : Utiliser une nouvelle pipette pour chaque numéro d'identification de participant (PTID) et additif.
	14.2.1	Avant le traitement ou suffisamment de temps avant le mélange avec les PBMC, préparer et refroidir la CPS (se reporter au chapitre 10 Préparation du réactif).
	14.2.3	Remplacé par : Consigner sur le formulaire de traitement des PBMC (ou équivalent) : le PTID, le numéro de visite, le protocole, la date/heure du prélèvement, la date/heure du début du traitement, les numéros de lots et les dates d'expiration de tous les réactifs, ainsi que les volumes de CPS, DMSO et de SVF.
	14.2.5	Remplacé par : Vérifier soigneusement le PTID sur tous les tubes de sang reçus. Organiser les tubes principaux de telle manière qu'il ne puisse y avoir aucune possibilité de les mélanger entre PTID ou anticoagulants dans un lot PTID. Suggestion : placer tous les tubes pour chaque PTID/anticoagulant sur un seul plateau. Différents plateaux peuvent être utilisés pour séparer les PTID ou les types de tubes, et une couleur de marqueur différente peut être utilisée pour chaque PTID afin d'éviter toute confusion.
	14.3	Le remplacement du plasma est requis pour l'IMPAACT.
	14.3.1	Remplacé par : Les tubes de prélèvements sanguins provenant du même PTID et du même anticoagulant peuvent être traités individuellement ou rassemblés dans des tubes à fond conique de 50 ml.
	14.4	Remplacé par : Remarque : le rapport maximal entre le sang et le WDR doit être approximativement de 2 : 1. Utiliser un tube de 50 ml pour chaque 10 à 20 ml de sang total d'adulte (ou un tube de 12 à 14 ml pour chaque 4 à 5 ml de sang total d'enfant). Utiliser autant de tubes CSTFB que nécessaire pour répartir tout le sang de chaque PTID.

Version Date d'entrée en vigueur (jj/mm/aa)	Commentaires	
	14.4.6	Remplacé par : À l'aide d'une pipette stérile, rincer chaque tube original de sang anticoagulé avec du WDR, ajouter les volumes de rinçage aux tubes CSTFB en veillant à ne pas dépasser le volume total du tube de 30 ml (WDR + sang total).
	14.5.2	Remplacé par : Centrifuger à une vitesse comprise entre 800 et 1 000 x g pendant 15 minutes à une température comprise entre 15 et 30 °C avec le frein en position ARRÊT.
	14.5.7	Remplacé par : Faible couche de PBMC en raison d'une erreur de centrifugation, telle que la vitesse, la durée ou le freinage. La couche de PBMC apparaîtra petite et indistincte alors que la couche plasmatique pourra être légèrement trouble. Consulter l'annexe C pour le dépannage.
	14.5.9	Remplacé par : À l'aide d'une pipette sérologique ou de transfert stérile, recueillir toutes les cellules à l'interface blanc trouble située au-dessus de la barrière frittée. Prendre soin de ne pas aspirer plus de milieu de séparation que nécessaire.
	15	Instructions remplacées par : Le chapitre 15 peut être consulté par tous les réseaux ; vérifier les exigences du protocole et le matériel disponible. Pour tout échantillon donné, se conformer soit au chapitre 14, soit au chapitre 15, mais pas aux deux.
	15.1.4	Remplacé par : Utiliser une nouvelle pipette pour chaque numéro d'identification de participant (PTID) et additif.
	15.2.1	Remplacé par : Avant le traitement ou suffisamment de temps avant le mélange avec les PBMC, préparer et refroidir la CPS (se reporter au chapitre 10 Préparation du réactif).
	15.2.5	Remplacé par : Vérifier soigneusement le PTID sur tous les tubes de sang reçus. Organiser les tubes principaux de telle manière qu'il ne puisse y avoir aucune possibilité de les mélanger entre PTID ou anticoagulants dans un lot PTID. Suggestion : placer tous les tubes pour chaque PTID/anticoagulant sur un seul plateau. Différents plateaux peuvent être utilisés pour séparer les PTID ou les types de tubes, et une couleur de marqueur différente peut être utilisée pour chaque PTID afin d'éviter toute confusion.
	15.3	Le remplacement du plasma est requis pour l'IMPAACT.
	15.4	Remplacé par : Remarque pour le HVTN : une mesure précise du volume de sang total utilisable doit être déterminée et consignée.
	15.4	Remplacé par : Remarque pour l'ACTG, l'IMPAACT et le HPTN : pour des volumes de prélèvements sanguins plus importants, le rassemblement des couches leuco-plaquettaires est autorisé (se reporter à l'annexe D : Rassemblement des couches leuco-plaquettaires pour isolation des PBMC par la méthode du Ficoll).
	15.4	Remplacé par : Remarque : la dilution du sang avec du WDR peut permettre une meilleure séparation (se reporter à l'annexe D).
	15.4.1	Remplacé par : Étiqueter chaque tube à centrifuger de 15 et 50 ml avec le PTID. Utiliser un tube de 50 ml pour chaque 15 à 20 ml de sang total d'adulte (ou un tube de 15 ml pour chaque 4 à 5 ml de sang total d'enfant).

Version Date d'entrée en vigueur (jj/mm/aa)	Commentaires	
	15.4.9	Instructions supplémentaires pour l'ajout de Ficoll® aux tubes et reformulation/reformatage des instructions pour plus de clarté.
	15.5.2	Remplacé par : Centrifuger à une vitesse de 400 x g pendant 30 minutes, à une température comprise entre 15 et 30 °C.
	15.5.9	Remplacé par : À l'aide d'une pipette sérologique ou de transfert stérile, recueillir toutes les cellules à l'interface blanc trouble. Prendre soin de ne pas aspirer plus de milieu de séparation que nécessaire.
	15.5.10	Remplacé par : Les tubes peuvent être pré-remplis à 5 ml ou 25 ml avec du WDR pour gagner du temps.
	16.1.3	Remplacé par : Centrifuger les cellules diluées à une vitesse comprise entre 200 et 400 x g pendant 10 minutes à une température comprise entre 15 et 30 °C (frein facultatif).
	16.2.1	Remplacé par : Pour les tubes à fond conique de 15 et de 50 ml, suspendre de nouveau chaque culot cellulaire dans un petit volume (pas plus de 10 ml au total) de WDR en mélangeant délicatement, mais complètement, pour obtenir une suspension de cellules homogène.
	16.2.2	Remplacé par : Pour les tubes à fond conique de 50 ml, combiner jusqu'à quatre suspensions de culots cellulaires (< 20 ml au total) issus du même donneur. Pour les tubes à fond conique de 15 ml, combiner jusqu'à quatre suspensions de culots cellulaires (< 10 ml au total) issus du même donneur. Il s'agit du tube de cellules récoltées. QS la fraction de PBMC à approximativement 10 ml (pour les tubes à fond conique de 15 ml) ou à 45 ml (pour les tubes à fond conique de 50 ml) en ajoutant du WDR. Mélanger délicatement.
	16.2.6	Remplacé par : Centrifuger les cellules diluées à une vitesse comprise entre 200 et 400 x g pendant 10 minutes à une température comprise entre 15 et 30 °C (frein facultatif).
	16.3.3	Remplacé par : Si l'on dispose de plus d'un culot cellulaire, utiliser une petite quantité de WDR pour resuspendre délicatement et combiner les culots cellulaires dans un seul tube. Rincer les tubes à partir desquels les cellules ont été transférées avec le volume restant. Ajouter le rinçage au tube de cellules récoltées.
	16.4.1	Remarque remplacée par : pour certains réseaux, V2 sera de 1 ml/tube cryogénique pour que le nombre de tubes requis soit égal aux millilitres de la CPS. Pour l'ACTG et l'IMPACT, ajuster le volume par tube cryogénique conformément au LPC ou au protocole.
	16.5.3	Remplacé par : Remarque pour le HVTN : scanner les tubes cryogéniques étiquetés et vides en se conformant aux directives en vigueur du HVTN.
	16.6.1	Facultatif pour le HVTN : QS la suspension cellulaire à 45 ml avec du WDR avant la centrifugation.
	16.6.2	Remplacé par : Centrifuger les cellules diluées à une vitesse comprise entre 200 et 400 x g pendant 10 minutes à une température comprise entre 15 et 30 °C (frein facultatif).
	16.6.3	Remplacé par : Vérifier que tous les tubes cryogéniques sont étiquetés et facilement accessibles.

Version Date d'entrée en vigueur (jj/mm/aa)	Commentaires	
	16.7	Remarque modifiée : les étapes suivantes doivent être effectuées rapidement afin de préserver l'intégrité des cellules. Il est recommandé de garder les tubes cryogéniques au frais sur de la glace humide. Ne pas laisser la glace humide recouvrir les tubes. Ne pas laisser les bouchons des tubes en contact avec de l'humidité.
	16.7.2	Remplacé par : Suspendre de nouveau délicatement le culot cellulaire avant d'ajouter la CPS en tapotant, raclant ou pipetant.
	16.7.2	Remplacé par : Le pré-refroidissement des tubes et/ou le travail sur glace humide est autorisé.
	16.8.2	Remplacé par : Sélectionner la méthode de congélation à utiliser : StrataCooler® Cryo, Mr. Frosty® (NALGENE) ou CryoMed®. Remarque : StrataCooler® Cryo doit être conservé à une température comprise entre 2 et 8 °C avant chaque utilisation. Remarque : idéalement, laisser Mr. Frosty® (NALGENE) revenir à une température comprise entre 2 et 8 °C dans un réfrigérateur antidéflagrant avant chaque utilisation. S'il n'y a pas de réfrigérateur antidéflagrant disponible, laisser Mr. Frosty® (NALGENE) revenir à la température ambiante avant chaque utilisation. Le niveau d'isopropanol doit être correct et il faut remplacer l'isopropanol tous les cinq cycles de congélation/décongélation. Suivre la SOP appropriée disponible sur place pour l'utilisation d'un congélateur à vitesse contrôlée, tel que CryoMed®.
	16.8.3	Remplacé par : Transférer immédiatement tous les tubes cryogéniques dans la boîte de congélation à vitesse contrôlée. Pour Mr. Frosty® (NALGENE) et StrataCooler® Cryo, fermer la boîte et la placer dans un congélateur à une température de -80 °C (entre -65 et -95 °C), dans un endroit qui n'est pas dérangé par des accès répétés au congélateur (c'est-à-dire, loin de l'ouverture ou dans la partie supérieure du congélateur près de la porte/couvercle d'ouverture) pendant au moins quatre heures pour Mr. Frosty® et toute la nuit pour StrataCooler® Cryo. Pour CryoMed®, lancer le programme de refroidissement.
	17.1.1	Remplacé par : Transférer les tubes cryogéniques après un minimum de quatre heures pour Mr. Frosty® et après une nuit pour StrataCooler® Cryo
	17.1.1	La remarque concernant l'équilibrage du StrataCooler® Cryo et du Mr Frosty® (NALGENE) a été supprimée.
	17.1.5	Remplacé par : Ne PAS conserver temporairement les échantillons dans du LN2 sauf instructions contraires du réseau ou du protocole. Ne PAS transférer de nouveau les échantillons du LN2 dans des congélateurs à -70/-80 °C, sauf instructions contraires du réseau ou de l'équipe du protocole.
	17.2.2	Remarque remplacée par : le HVTN exige que tous les examens soient réalisés dans les deux jours suivant le traitement.
	18.1.7	Remplacé par : Ne PAS transférer de nouveau les échantillons du LN2 dans des congélateurs à -70 ou -80 °C, sauf indications contraires du réseau ou de l'équipe du protocole.

Version Date d'entrée en vigueur (jj/mm/aa)	Commentaires	
	19	Remplacé par : 19.1 Le formulaire de traitement des PBMC rempli n'est requis que pour le HVTN. 19.2 Exigences pour tous les réseaux : 19.2.1 Les données sont saisies dans le système de gestion des données de laboratoire pour la génération d'étiquettes de tubes cryogéniques, la documentation de l'endroit de conservation et les exigences manifestes d'expédition. 19.2.2 Les écarts sont signalés conformément au protocole du laboratoire.
	21.1	Remplacé par : La durée de traitement optimale entre le prélèvement et la congélation de sang frais pour les PBMC est inférieure à huit heures à partir du moment du prélèvement. La fonction cellulaire peut diminuer pour les échantillons plus anciens.
	22.3	Suppression de « Modification de la vitesse de centrifugation... »
	23	Remplacé par : Caillots, gros = plus des trois quarts de la masse de sang total comportent des caillots et il reste très peu de sang total libre.
	23	Remplacé par : Température de centrifugation = entre 15 et 30 °C
	23	Remplacé par : PBS = tampon phosphate salin ; WDR = réactif diluant de lavage (HBSS, PBS ou RPMI ; le RPMI ne peut être utilisé que pour les réseaux ACTG/IMPAACT).
	25.2	Remplacé par : Notice du WDR (HBSS, PBS ou RPMI)
	Annexes	Insertion de l'annexe B : Exemple de journal des modifications de l'isopropanol pour Mr. Frosty® (NALGENE) et de l'annexe D : Rassemblement des couches leuco-plaquettaires pour isolation des PBMC par la méthode du Ficoll et mise à jour des lettres correspondantes aux autres annexes en conséquence.
	Annexes	Remplacement des guides rapides propres au réseau par des guides rapides pour l'utilisation des tubes CSTFB et de la méthode d'application manuelle sur couche qui ne sont pas spécifiques au réseau.
	Annexe A	Ajout d'un espace pour écrire dans les fabricants de réactifs
	Annexe A	Remplacement de « HBSS » par « HBSS (ou autre WDR) »
	Annexe A	Remplacé par : Calculer le nombre réel de cellules par tube $N_2 = (\text{volume de l'aliquote} * T) / (V_f)$; le volume de l'aliquote est égal à 1 ml pour le HVTN.
	Annexe A	Remplacé par : Nombre de tubes cryogéniques réellement congelés Remarque : doit être égal au volume congelé de la resuspension pour des aliquotes de 1 ml.
	C.2	Renumérotation
	C.2.5	Remplacé par : La vitesse de centrifugation était trop élevée. Vérifier que le réglage en tr/min était correct pour le tube CSTFB en vérifiant le graphique RCF/tr/min pour le rotor. Certaines centrifugeuses nécessitent que leurs réglages correspondent au type de récipient utilisé. Si les réglages ne sont pas corrects, il est possible que la centrifugeuse calcule mal sa vitesse.

Version Date d'entrée en vigueur (jj/mm/aa)	Commentaires	
3.0 19 août 2011	Section	Modification
	Page de titre	Remplacement du titre de Constance Ducar par Responsable du programme des Opérations de laboratoire.
	Dans toute la SOP	Mise à jour du lien de la page contenant la SOP relative aux PBMC sur le site Internet public du HANC : http://www.hanc.info/labs/labresources/procedures/Pages/pbmcSop.aspx
	Dans toute la SOP	Remplacement de « Ficoll® » par « milieu à gradient de densité » le cas échéant.
	Dans toute la SOP	Ajustement des références aux numéros de sections le cas échéant.
	2	Ajout : Les instructions propres aux protocoles des réseaux remplacent celles qui sont fournies dans cette SOP.
	3	Suppression : Le HVTN exige que la durée totale entre le prélèvement et la congélation soit inférieure ou égale à huit heures. Pour les autres réseaux, la limite de temps peut varier ; consulter les documents appropriés du protocole.
	4.3	Clarification des exigences concernant la responsabilité et l'élaboration d'une SOP de laboratoire.
	Rapport des résultats	Déplacement au chapitre 5. Ajout d'informations concernant les nouvelles exigences pour l'utilisation du formulaire de traitement des PBMC et du LDMS.
	Dans toute la SOP	Suppression des instructions propres aux étapes pour le remplissage du formulaire de traitement des PBMC et la saisie des données dans le LDMS.
	Dans toute la SOP	Ajout de rappels à la fin de chaque chapitre pour s'assurer que le formulaire de traitement des PBMC, le LDMS ou tout autre support de suivi supplémentaire soit rempli.
	5.1.2	Si un formulaire de traitement des PBMC spécifique au protocole n'est pas requis dans les « Instructions de traitement propres au protocole du HVTN », le formulaire générique fourni à l'annexe A et à l'adresse http://www.hanc.info/labs/labresources/procedures/Pages/pbmcSop.aspx peut être utilisé.
	6.4.3	Ajout et clarification d'informations concernant les exigences pour la durée du traitement.
	6.5	Mise à jour et clarification des exigences pour les échantillons marginaux.
	6.6	Mise à jour et clarification des exigences pour les échantillons inacceptables.
	7	Les fournisseurs et l'équipement recommandés ne sont plus listés.
	7.1.1	« Poste de sécurité microbiologique à flux laminaire » remplacé par « poste de sécurité microbiologique (PSM) de type II ».
7.1.8	Clarification Un bain-marie à une température comprise entre 37 et 56 °C n'est nécessaire que pour l'inactivation du SVF par la chaleur.	
7.3	Mise à jour et clarification des exigences concernant l'équipement de numération cellulaire.	
7.4	Ajout du CoolCell® de BioCision à la liste de choix des équipements de cryoconservation et clarification des exigences.	

Version Date d'entrée en vigueur (jj/mm/aa)	Commentaires	
	8	Ajout de références à l'annexe G pour des exemples de matériaux jetables répondant aux exigences.
	8.1.4	Remarque : si un protocole requiert la récolte de plasma, il est préférable alors d'utiliser des tubes à filetage externe pour la conservation du plasma.
	8.1.5	Facultatif : bouteilles/flacons stériles, jetables, à col de 45 mm, de 250 à 500 ml pour rassembler des volumes importants de prélèvements de sang total avant la séparation des PBMC.
	8.2	Les marqueurs pour écrire sur les tubes et flacons de traitement doivent avoir une pointe fine et contenir une encre indélébile à séchage rapide.
	10	Ajout de références à l'annexe G pour des exemples de matériaux jetables répondant aux exigences.
	10.1	Clarification des exigences concernant la stérilité des réactifs et l'utilisation de techniques aseptiques.
	10.2	Le milieu RPMI sans SVF ou antibiotiques est un réactif diluant de lavage (WDR) acceptable pour le HPTN.
	10.3	Clarification des exigences et instructions pour l'utilisation des tubes CSTFB.
	10.4	Clarification des exigences et instructions pour l'utilisation du SVF et DMSO.
	10.5	Ajout : Les exigences concernant les réactifs de numération dépendront de la méthode utilisée. Se reporter aux instructions pour la méthode utilisée.
	10.5	Ajout d'informations concernant les réactifs de numération cellulaire prises ailleurs dans la SOP.
	11	Température du congélateur non précisée. (Le SVF peut être conservé congelé à une température ≤ -20 °C.)
	11.1	Simplification des instructions pour la préparation du SVF-IC.
	11.3	Pour tous les réseaux, la CPS peut être conservée à une température comprise entre 2 et 8 °C pendant un jour ouvrable au maximum (< 18 heures).
	11.3.3	Simplification des exemples. Remarque : le volume de sang total utilisable est le volume de sang total qui est réellement traité. (Le volume de sang total utilisable peut ne pas être égal à la capacité du tube.)
	13.1.1	La fourchette de rendement cellulaire attendue pour des adultes sains a été remplacée par $(0,87 \text{ à } 3,2) \times 10^6$ cellules/ml.
	13.1.2	Remarque pour le HVTN : consigner tout problème rencontré et toute mesure prise dans la rubrique des commentaires sur le rendement cellulaire du programme de traitement des PBMC Atlas du HVTN.
	13.1.3	Remarque pour le HVTN : consigner tout problème rencontré et toute mesure prise sur le formulaire de traitement des PBMC requis par le HVTN et dans la rubrique des commentaires sur le rendement cellulaire du programme de traitement des PBMC Atlas du HVTN.

Version Date d'entrée en vigueur (jj/mm/aa)	Commentaires	
	13.2	La viabilité des PBMC fraîches est assez constante. Un temps de traitement long, une mauvaise technique et, occasionnellement, un échantillon de participant spécifique peuvent affecter la viabilité de manière indésirable. Pour la numération de cellules viables, calculer et consigner le pourcentage de cellules viables conformément aux exigences du laboratoire.
	15	Suppression de « facultatif » dans « remplacement facultatif du plasma ». (Effectuer l'étape de remplacement du plasma si les instructions du protocole la prévoient.)
	15.2.2	S'assurer que les tubes sont à température ambiante avant le traitement.
	15.2.5	Déterminer et consigner une mesure précise du volume de sang total utilisable dans 0,5 ml. Le volume de sang total utilisable n'est pas forcément égal à la capacité du tube.
	15.3	Suppression : Remarque pour l'IMPAACT : le remplacement du plasma est requis. (Effectuer l'étape de remplacement du plasma si les instructions du protocole la prévoient.)
	15.3.6	Terminer le traitement du plasma en centrifugeant le plasma recueilli à une vitesse comprise entre 800 et 1 200 x g pendant 10 minutes afin d'obtenir des aliquotes de plasma PL2 ou en suivant les instructions propres au protocole afin d'obtenir le produit dérivé requis dans le protocole. Cela peut s'effectuer plus tard, lorsque la centrifugeuse n'est pas utilisée pour le traitement des PBMC.
	15.4	Suppression des remarques concernant la détermination du volume de sang total utilisable.
	15.4 et 15.5	Clarification des exigences et instructions pour le volume des tubes CSTFB, du WDR et du sang.
	15.4.2	Si un tube comporte des gros caillots, se reporter à la section 6.5 (Échantillons inacceptables). Ne pas jeter les échantillons coagulés.
	15.5.7	Documenter les observations et toute mesure de suivi prise conformément aux exigences du réseau et laboratoire.
	15.6	S'assurer que toutes les informations appropriées sont documentées conformément aux exigences du réseau et laboratoire. Se reporter au chapitre 5 pour plus de détails.
	16.2.5	Déterminer et consigner une mesure précise du volume de sang total utilisable dans 0,5 ml. Le volume de sang total utilisable n'est pas forcément égal à la capacité du tube.
	16.3	Suppression : Remarque pour l'IMPAACT : le remplacement du plasma est requis. (Effectuer l'étape de remplacement du plasma si les instructions du protocole la prévoient.)
	16.3.1	Les tubes de prélèvements sanguins peuvent être traités individuellement selon les instructions énumérées ci-dessous ou une technique de rassemblement des couches leuco-plaquettaires peut être utilisée comme indiqué dans l'annexe D.

Version Date d'entrée en vigueur (jj/mm/aa)	Commentaires	
	16.3.6	Terminer le traitement du plasma en centrifugeant le plasma recueilli à une vitesse comprise entre 800 et 1 200 x g pendant 10 minutes afin d'obtenir des aliquotes de plasma PL2 ou en suivant les instructions propres au protocole afin d'obtenir le produit dérivé requis dans le protocole. Cela peut s'effectuer plus tard, lorsque la centrifugeuse n'est pas utilisée pour le traitement des PBMC.
	16.4	Le rassemblement des couches leuco-plaquettaires conformément aux directives fournies dans l'annexe D est désormais autorisé pour tous les réseaux.
	16.4	Cette section a été réorganisée et reformulée pour plus de clarté.
	16.4	Les spécifications de volume pour les échantillons « d'adultes » et « d'enfants » ont été remplacées par des spécifications de volume basées sur le volume de prélèvement sanguin.
	16.4 et 16.5	Clarification des exigences et instructions pour le volume des tubes CSTFB, du WDR et du sang.
	16.4.3	Si un tube comporte des gros caillots, se reporter à la section 6.5 (Échantillons inacceptables). Ne pas jeter les échantillons coagulés.
	16.4.5.1	Reformulé pour plus de clarté.
	16.4.5.2	Reformulé pour plus de clarté.
	16.4.6.1 et 16.4.6.2	Remarque : le rapport entre le milieu à gradient de densité et le sang total peut varier selon les recommandations du fabricant.
	16.5	Les spécifications de volume pour les échantillons « d'adultes » et « d'enfants » ont été remplacées par des spécifications de volume basées sur le volume de prélèvement sanguin.
	16.5.6	Remarque : si le plasma est très trouble, il peut être difficile de voir l'interface du milieu à gradient de densité. Il est possible d'améliorer le recueil des lymphocytes en retirant la majeure partie du plasma situé au-dessus de l'interface avec une pipette de 10 ml, en n'en laissant que 0,5 cm
	16.6	S'assurer que toutes les informations appropriées sont documentées conformément aux exigences du réseau et laboratoire. Se reporter au chapitre 5 pour plus de détails.
	17.2	Réorganisée et reformulée pour plus de clarté.
	17.3.1	Reformulé pour plus de clarté.
	17.3.2	Clarification des instructions portant sur la combinaison des culots cellulaires.
	17.3.3	Ajout d'un lien vers des exemples de SOP relatives à la numération cellulaire.
	17.4.1	Suppression du tableau des concentrations cellulaires finales ciblées. Ajout d'instructions conseillant de consulter le protocole pour plus d'informations sur la concentration cellulaire finale ciblée.
	17.4.2	Calculer le volume estimé de resuspension de CPS congelée (V1) requis en utilisant la concentration cellulaire finale ciblée.
	17.4.2	N1 = concentration cellulaire finale ciblée
	17.4.2	Ajout d'une remarque pour l'IMPAACT.

Version Date d'entrée en vigueur (jj/mm/aa)	Commentaires	
	17.4.3	Cette remarque ne s'applique désormais qu'au HVTN.
	17.5.1	Imprimer et coller les étiquettes sur les tubes cryogéniques AVANT la centrifugation finale. Remarque : il est important de s'assurer que les cellules ne restent pas dans le culot cellulaire pendant une durée prolongée.
	17.5.3	Remarque pour le HVTN : scanner les tubes cryogéniques étiquetés et vides en se conformant aux directives en vigueur du HVTN afin de s'assurer que le code-barres peut être scanné.
	17.6.1	Ajout d'une référence à la SOP relative au traitement des échantillons pour l'ACTG et l'IMPAACT.
	17.7.1	Ajout d'une référence à la SOP relative au traitement des échantillons.
	17.7.4	17.7.4 Aliquoter de 0,5 à 1 ml par tube cryogénique, selon les exigences du réseau et protocole. Si le réseau ou le protocole l'exige, préparer une aliquote partielle finale avec tout éventuel volume excédentaire de suspension cellulaire causé par la taille du culot cellulaire. Remarque pour le HVTN : au lieu de créer une aliquote partielle finale, répartir de façon égale tout volume excédentaire entre tous les tubes cryogéniques pour ce PTID.
	17.8	Suppression des informations concernant la conservation et l'entretien des échantillons cryoconservés et ajout d'une référence à la section 7.4
	17.8.3	Ajout du CoolCell® (BioCision).
	17.9	S'assurer que toutes les informations appropriées sont documentées conformément aux exigences du réseau et laboratoire. Se reporter au chapitre 5 pour plus de détails.
	18	Remplacé par « Conservation temporaire sur place à une température de -70/-80 °C »
	18.1	Il est nécessaire de respecter la chaîne du froid tout au long des étapes de transfert afin d'éviter la détérioration des cellules.
	18.2.1	Ajout d'instructions pour l'utilisation du CoolCell® (BioCision).
	18.2.1	Requis pour le HVTN, recommandé pour l'ACTG : utiliser un plateau de transfert de glace carbonique. S'assurer que la boîte de congélation des tubes cryogéniques est recouverte de toutes parts d'une couche épaisse de glace carbonique. Travailler rapidement et efficacement afin de minimiser l'exposition des tubes cryogéniques aux températures ambiantes.
	18.2.2	Requis pour le HVTN, recommandé pour l'ACTG : maintenir la chaîne du froid pendant la préparation de l'expédition en refroidissant à l'avance l'emballage d'expédition pour glace carbonique et en utilisant un plateau de transfert de glace carbonique durant les étapes d'emballage. S'assurer que l'emballage d'expédition est entièrement rempli de glace carbonique.
	18.2.2	Remarque pour le HVTN : expédier sur de la glace carbonique au dépôt central d'échantillons dans la semaine suivant le recueil, sauf indication contraire du HVTN. Remarque pour l'ACTG : expédier sur de la glace carbonique dans les 4 semaines suivant la date de congélation.

Version Date d'entrée en vigueur (jj/mm/aa)	Commentaires	
	18.3	<p>S'assurer que toutes les informations appropriées sont documentées conformément aux exigences du réseau et laboratoire et que tous les calculs sont exacts.</p> <p>Requis pour le HVTN uniquement : demander à un deuxième examinateur de vérifier que le formulaire est complet et exact, puis de parapher et dater le formulaire de traitement des PBMC dans les deux jours suivant le traitement.</p>
	18.4	<p>Conserver le formulaire de traitement des PBMC et tout autre document de suivi selon la politique du laboratoire. Se reporter au chapitre 5 pour plus de détails.</p>
	19	<p>Les échantillons de l'IMPAACT peuvent désormais être conservés dans des congélateurs mécaniques à -150 °C.</p>
	19.1.1	<p>Le jour ouvrable suivant, transférer les tubes cryogéniques du système de refroidissement à vitesse contrôlée sur de la glace carbonique à l'emplacement de conservation désigné dans le système de conservation au LN2.</p>
	19.1.2	<p>Les échantillons de PBMC congelés peuvent être conservés indéfiniment et en toute sécurité dans du LN2 en phase vapeur.</p>
	19.2	<p>S'assurer que toutes les informations appropriées sont documentées conformément aux exigences du réseau et laboratoire et que tous les calculs sont exacts.</p> <p>Requis pour le HVTN uniquement : demander à un deuxième examinateur de vérifier que le formulaire est complet et exact, puis de parapher et dater le formulaire de traitement des PBMC dans les deux jours suivant le traitement.</p>
	19.3	<p>Conserver le formulaire de traitement des PBMC et tout autre document de suivi selon la politique du laboratoire. Se reporter au chapitre 5 pour plus de détails.</p>
	Remarques procédurales	<p>Anciennement section 22 ; les remarques procédurales ont été incorporées dans la SOP principale.</p>
	22 Glossaire	<p>Volume de sang total utilisable : le volume de sang total utilisable qui est réellement traité (Le volume de sang total utilisable peut ne pas être égal à la capacité du tube.)</p> <p>Conservation en phase vapeur : La conservation dans l'azote liquide (LN2) en phase vapeur est la conservation dans l'espace du réservoir de stockage qui se situe au-dessus de l'azote liquide situé, lui, au fond du réservoir.</p>
	23 Références	<p>Ajout de 23.10, Weinberg et al. 2010.</p>
	Annexe A	<p>Inclusion d'un rappel pour récolter le plasma si le protocole l'exige.</p>
	Annexe A	<p>Calculer le vol. estimé de la resuspension de CPS $(V1)=(T/15 \times 10^6 \text{ cellules/ml}) (1 \text{ ml})$</p>
	Annexe A	<p>Calculer le nombre réel de cellules par tube $N2 = (T/V_f) \times V2$; (v2 = 1 ml pour la plupart des protocoles du HVTN).</p>
	Annexe A	<p>Date et <u>heure</u> de la congélation (Noter dans la partie réservée aux commentaires si plus de quatre heures après le début du traitement)</p>

Version Date d'entrée en vigueur (jj/mm/aa)	Commentaires	
	Annexe A	Mise à jour du formulaire de traitement des PBMC requis pour le HVTN pour tenir compte de la politique actuelle du HVTN.
	Annexe C	Reformulé pour plus de clarté Ajout de C.2.2.7 : Le donneur présentait une faible numération de lymphocytes, de leucocytes ou d'hématocrites.
	Annexe D	Reformulé pour plus de clarté.
	Annexe E	Mise à jour des instructions.
	Annexe F	Mise à jour des instructions.
	Annexe G	Ajout de l'annexe G : Exemples de réactifs
4.0 3 oct. 2011	16.4.7	Correction des références aux instructions relatives à l'application sur et sous couche.
	19.1.3	Remarque pour l'IMPAACT : les échantillons doivent être expédiés dans des emballages d'expédition pour LN2 approuvés par l'IATA ; vérifier les exigences du protocole pour les exceptions.