



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Adriane Wendling Leismann

**Otimização da produção de painéis liofilizados e de *Dried Tubes Specimen* (DTS), e
validação do painel de HBV para implementação na AEQ-TR e AEQ-CV do Programa
Nacional de Avaliação Externa da Qualidade**

Florianópolis

2024

Adriane Wendling Leismann

Otimização da produção de painéis liofilizados e de *Dried Tubes Specimen* (DTS), e validação do painel de HBV para implementação na AEQ-TR e AEQ-CV do Programa Nacional de Avaliação Externa da Qualidade

Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Bacharela em Ciências Biológicas.

Orientador(a): Prof^ª. Dra. Maria Luiza Bazzo.

Coorientador(a): Dra. Renata Cristina Messores Rudolf.

Florianópolis

2024

Leismann, Adriane Wendling

Otimização da produção de painéis liofilizados e de Dried Tubes Specimen (DTS), e validação do painel de HBV para implementação na AEQ-TR e AEQ-CV do Programa Nacional de Avaliação Externa da Qualidade / Adriane Wendling Leismann ; orientadora, Maria Luiza Bazzo, coorientadora, Renata Cristina Messores Rudolf, 2024.

124 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas,
Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

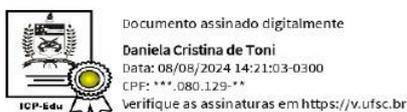
1. Ciências Biológicas. 2. Avaliação Externa da Qualidade. 3. Liofilização. 4. Trealose. 5. DTS. I. Bazzo, Maria Luiza. II. Rudolf, Renata Cristina Messores. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

Adriane Wendling Leismann

Otimização da produção de painéis liofilizados e de *Dried Tubes Specimen (DTS)*, e validação do painel de HBV para implementação na AEQ-TR e AEQ-CV do Programa Nacional de Avaliação Externa da Qualidade

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do título de Bacharela e aprovado em sua forma final pelo Curso Ciências Biológicas.

Florianópolis, 02 de agosto de 2024.

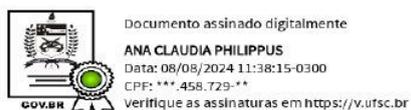


Prof.^a Daniela Cristina de Toni, Dra.
Coordenação do Curso

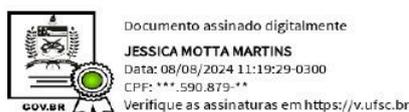
Banca examinadora



Prof.^a Maria Luiza Bazzo, Dr.(a)
Orientador(a)



Ana Claudia Philippus, Dr.(a)
Departamento de HIV/Aids, Tuberculose, Hepatites Virais e
Infecções Sexualmente Transmissíveis do Ministério da Saúde



Jéssica Motta Martins, Dr.(a)
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Florianópolis, 2024.

Dedico esse trabalho aos meus pais que me ensinaram sobre a vida
muito mais do que a biologia seria capaz.

AGRADECIMENTOS

Aos amores da minha vida, minha mãe Inês e meu pai José, tudo isso não seria possível sem vocês. Mesmo não tendo a oportunidade de continuar seus estudos, sempre priorizaram que eu e a Jo seguissemos por esse caminho e bom, já estamos colhendo os primeiros frutos. Obrigada por todo apoio emocional e financeiro durante esses 5 anos, obrigada por acreditarem em mim e sonharem comigo essa conquista, obrigada por sempre se fazerem presentes, mesmo estando a mais de 700 km de distância. Eu poderia passar horas agradecendo, mas nenhum tempo e palavra seriam suficientes para expressar tamanha gratidão. Espero um dia retribuir tudo que vocês fazem por mim, eu amo vocês! Não poderia deixar de agradecer à minha menina, vulgo minha irmã, Joana. Quando eu era pequena, sempre pedia pro pai e pra mãe, uma irmãzinha, mas não imaginava quanto eu poderia amar e querer cuidar de um serzinho desses (“serzinho”, hoje já está da minha altura). Obrigada por ser minha parceira e confidente, obrigada pelas longas conversas em chamadas de vídeo, por todas as risadas e carinho comigo. Sei como foi difícil no início quando saí de casa, mas lembro de um dia que você disse “não chorei quando você entrou no ônibus pra você conseguir ser forte, mas em casa eu chorei”, sério, dá vontade de amassar, obrigada por toda força que sempre me deu! Como eu sempre digo, eu e tu pra sempre, espero sua visita nas próximas férias, te amo! Para completar a família, não poderia deixar de agradecer a minha vózinha Anna, sem dúvidas seu amor, carinho e sua fé me guiaram e protegeram por todos esses anos. Adoro como você tem uma cabeça jovem, ativa e atualizada, que fez você ter contato com whatsapp e dessa forma, podemos matar a saudade diariamente. Você é incrível vó, te amo!

Ao amor que a vida me deu, Bruno, que sem dúvidas tem um papel crucial nesse trabalho, quase virou meu coautor de tantas vezes que me acompanhou na parte prática do TCC. Obrigada por me apoiar e tranquilizar durante a jornada do TCC, sempre confiando em mim (mais do que eu) e nunca deixando eu abaixar a cabeça. Obrigada também pelo amor, carinho, cumplicidade, alegria, calma e leveza que você trouxe, a vida é outra depois que você chegou, deixou a jornada muito mais tranquila e bonita. Costumamos nos chamar carinhosamente de “meu sol” e acredito fortemente que descreve bem o que você representa na minha vida, você é um antidepressivo natural, sua presença ilumina, traz energia, calor e ânimo pra viver! Que o amor, companheirismo e a felicidade sempre nos acompanhem, que possamos juntos comemorar vitórias e sermos conforto nos dias difíceis, te amo!

Aos meus amigos, que me ensinaram que família não é só aquela de sangue. Vou iniciar agradecendo por ordem cronológica.

As minhas amigas de longa data, Pati e Isa, o coração fica quentinho em saber que a gente sempre esteve aí uma para outra e que todos esses anos ou a distância que a vida adulta nos trouxe, não mudou o laço de amizade que cultivamos por todos esses anos. Vocês sabem todas as minhas histórias, não porque contei elas para vocês, mas porque viveram elas comigo. Pati, continuo torcendo e ficando feliz com suas conquistas, mesmo a mais de 700 km de distância, você foi minha primeira grande amiga e que seja pra sempre assim! Isa, ter você aqui pertinho de mim e realizarmos juntas o sonho de estudar na UFSC sempre me deixou imensamente feliz e tranquila de saber que eu sempre teria alguém que me acolhesse, e como sempre falamos “de Itap pro mundo!” Amo vocês!

Aos meus amigos da faculdade, Bia, Gabi e Gustavo, a biologia só teve graça por ter vocês! Obrigada por serem um ombro amigo e um poço de incentivo, sinto muito orgulho de vocês e fico tranquila em saber que o mundo está recebendo biólogos com tamanha capacidade. Bia e Gabi, obrigada pela amizade, pelo apoio, ajuda e por me aguentarem por esses anos. A noite das meninas sem dúvidas tornou essa jornada muito mais leve, com muito mais fofocas contadas, pitacos e conselhos dados, e dinheiro economizado com cortes de cabelo hahah amo vocês!

As minhas amigas que moraram comigo, Ste, Madu e novamente a Gabi, que além de colega de faculdade, se tornou minha irmã de casa, uma convivência tranquila e feliz, os meses que passamos juntas foram incríveis e fortaleceram ainda mais nossa amizade, obrigada! A Ste, minha primeira irmã de casa e de quarto inclusive, não sei se aguentaria aquela república se não tivesse feito do nosso quarto, o nosso mundinho. Você que presenciou meu primeiro dia de faculdade e vejamos só, num piscar de olhos estou escrevendo sobre nós no meu TCC e nossa amizade continua igual, só com uma pequena distância física. Sempre lembrarei com muita saudade das aventuras de 2019 e serei grata por ter continuado ao meu lado, torcendo por mim, se alegrando com minhas conquistas e sendo meu ombro amigo nos momentos difíceis, você é incrível. A Madu, que me acompanhou na volta apocalíptica para Floripa depois da pandemia, lá em 2022. Curtimos muito e apesar das nossas diferenças, sempre lembrarei com carinho da nossa parceria e mates com estudos. Amo todas vocês, obrigada por tornarem a nossa casa um lar quentinho!

Aos meus amigos do LBMMS. Primeiramente, agradeço a professora e minha orientadora Maria Luiza por todo o conhecimento passado e por ter me aceito no laboratório, permitido me encontrar na profissão, sabe aquele velho ditado de que se você trabalha com o que ama, você nunca irá trabalhar na vida? O significado deste ditado encontrei no LBMMS. Segundamente, a minha coorientadora Renata, sem você esse TCC nunca teria saído, obrigada

por todo auxílio, paciência e conhecimento que me passou, além de ter se tornado uma grande amiga e confidente. Tenho orgulho de ter sido orientada por duas mulheres incríveis, fortes, inteligentes e uma grande referência na qual me inspiro. A Jéssica e Damaris, pela amizade, fofocas e risadas no café da tarde, o trabalho sempre se tornou um lugar mais feliz com vocês. Ao Fernando, que sempre me auxiliou na liofilização e nos testes do gene, independente do dia. Aos demais amigos do lab Bianca, Chris, Cida, Felipe, Julia, Henrique, Jonathan, Rafa, Manu e Marcos pela parceria, conhecimentos e ajuda. Enfim, esses dois anos no laboratório me transformaram em outra Adri, fizeram eu me encontrar e adquirir uma bagagem de conhecimento enorme, foram dias leves e muito bem aproveitados, sempre lembrarei com carinho!

Ao Ministério da Saúde por fornecerem um projeto incrível, pela doação de kits e insumos, obrigada por auxílio e disponibilidade. A FAPEU pelo projeto de extensão que me permitiu a permanência e aprendizagem no laboratório.

Por fim, mas não menos importante, a UFSC. Desde muitos anos, meu sonho foi estudar na UFSC em Florianópolis e bom, deu certo! Já me peguei pensando muitas vezes que nem parece real tudo isso, mas sim, eu consegui! Um sonho de anos está terminando de se concretizar, obrigada UFSC pela oportunidade, pelo corpo docente composto de profissionais tão bem qualificados e pelo ensino público, gratuito e de qualidade! Sempre terei orgulho dessa instituição e por ter passado por aqui, espero que possa escrever mais capítulos juntos a ela.

A tudo e a todos que contribuíram e passaram na minha vida durante esses anos, meu muito obrigada!

RESUMO

As infecções sexualmente transmissíveis (ISTs), como sífilis, hepatites virais e a infecção pelo HIV, representam um grande desafio para a saúde pública mundial. Reúnem-se esforços de vários âmbitos para diminuição dessa problemática, entre eles o cuidado com a aquisição de testes diagnósticos e o treinamento dos profissionais executantes. Além do treinamento, é essencial a participação em ensaios de proficiência que avaliam o conhecimento e prática do profissional, por exemplo, no Programa Nacional de Avaliação Externa da Qualidade (AEQ), uma parceria do DATHI/MS e do LBMMS/UFSC. Os painéis de amostras enviados neste Programa, sofrem constantes melhorias e otimização dos processos de produção devido ao aumento da demanda de participantes e preocupação em garantir a qualidade dos elementos dos painéis AEQ. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi o aprimoramento do processo de liofilização de amostras de plasma e otimização da produção de painéis *DTS*, juntamente com a validação de amostras reativas para HBV para implementação em ambos os painéis. No capítulo 1, apresentamos os resultados da validação do painel de HBV na AEQ-CV. Com o intuito de verificar a estabilidade da carga viral, as amostras foram liofilizadas e submetidas ao armazenamento em geladeira (2 a 8°C), a temperatura ambiente (20 a 26°C), a 35°C e a 45°C por 42 dias e posteriormente, quantificadas no equipamento Cepheid – GeneXpert®. O painel de HBV apresentou bons resultados, mantendo carga viral estável na maioria das condições às quais foi submetido, a exceção foi a 45°C em que a amostra teve problemas de dissolução. A possível recuperação da amostra nesta temperatura será testada com a adição da trealose. O painel de HBV foi validado e passará a fazer parte da AEQ-CV. No capítulo 2, visando melhorar a estabilidade e diminuir a queda da carga viral das amostras para testar a carga viral de HIV, HCV e HBV liofilizadas, adicionou-se 10% de trealose. Após o processo de liofilização, as amostras puras e com trealose foram armazenadas em geladeira, a temperatura ambiente, a 35°C e a 45°C durante 42 dias e testadas no equipamento Cepheid – GeneXpert® para avaliação da sua estabilidade. Os resultados demonstram que as amostras desses agravos quando adicionadas de trealose apresentaram melhor dissolução do liofilizado e estabilidade, na carga viral das amostras liofilizadas, no decorrer dos 42 dias, quando comparadas com amostras puras (sem trealose). Portanto, devido a proteção gerada pela trealose nas amostras, aumentando sua estabilidade e garantindo sua dissolução, este aditivo será incorporado no preparo dos painéis da AEQ-CV. No capítulo 3, realizou-se a validação do painel do marcador HBsAg na AEQ-TR, aplicando-se a metodologia *DTS*. Os painéis *DTS* foram armazenados em ambientes úmidos e secos, e levados à geladeira, à temperatura ambiente, à estufa 35°C e à estufa 45°C. O painel de AEQ-TR-HBV apresentou bons resultados, com reatividade até o 40º dia em ambiente seco submetido à geladeira, temperatura ambiente e estufa 35°C, e até 30 dias em estufa 45°C. As amostras submetidas a ambiente úmido tiveram seus resultados e dissolução das amostras afetados, permanecendo reagentes apenas quando armazenados em geladeira e temperatura ambiente durante os 40 dias. Como os testes com o painel *DTS* de HBsAg apresentaram resultados reagentes, relativamente boa dissolução em ambiente seco e em larga escala de temperaturas, este foi validado e será incluído na AEQ-TR. No capítulo 4, foi otimizada a produção dos painéis da AEQ-TR. Amostras *DTS* foram congeladas por até 180 dias em freezer -20°C e -80°C e testadas por 30 dias após o descongelamento. Com exceção das amostras *DTS* para sífilis que tiveram sua estabilidade afetadas pelo congelamento, as demais amostras reagentes para HIV, HCV e HBsAg apresentaram bons resultados mesmo após 180 dias de congelamento em ambas as temperatura (-20°C e -80°C), com pouco ou nenhum enfraquecimento da intensidade da cor da linha de teste. Dessa forma, essa metodologia será implementada na produção dos painéis, otimizando o processo e melhorando a rotina laboratorial.

Palavras-chave: Liofilização; Trealose; HIV; Sífilis; Hepatites B e C.

ABSTRACT

Sexually transmitted infections (STIs), such as syphilis, viral hepatitis and HIV infection, represent a major challenge for global public health. Efforts are being made from various areas to reduce this problem, including criteria for the acquisition of diagnostic tests and the training of professionals. In addition to training, it is essential to participate in proficiency tests that evaluate the professional's knowledge and practice, for example, in the National Program for External Quality Assessment (EQA), a partnership between DATHI/MS and LBMMS/UFSC. The panels sent in this Program undergo constant improvements and optimization of production processes due to the increase in demand from participants and the concern to guarantee the quality of the elements of the EAQ panels. Therefore, the objective of this study was to improve the freeze-drying process of plasma samples and optimize the production of DTS panels, besides the validation of reactive samples for HBV for implementation in both panels. In chapter 1, we present the results of the validation of the HBV panel in the EQA-VL. In order to verify the stability of the viral load, the samples were freeze-dried and subjected to storage in a refrigerator (2 to 8°C), at room temperature (20 to 26°C), at 35°C and 45°C for 42 days and subsequently quantified in the equipment: Cepheid – GeneXpert®. The HBV panel showed good results, maintaining a stable viral load in most of the conditions, the exception was at 45°C where the sample had dissolution problems. The possible recovery of the sample at this temperature will be tested with the addition of trehalose. The HBV panel has been validated and will become part of the EQA-VL. In chapter 2, in order to improve stability and reduce the drop in the viral load of samples lyophilized for HIV, HCV and HBV, 10% trehalose was added. After the freeze-drying process, the pure samples and those with trehalose were stored in a refrigerator, at room temperature, at 35°C and 45°C for 42 days and tested on the Cepheid – GeneXpert® equipment to evaluate their stability. The results demonstrate that samples with trehalose showed better dissolution of the lyophilisate and stability, in the viral load over the 42 days, when compared to pure samples (without trehalose). Therefore, due to the protection generated by trehalose in the samples, increasing their stability and ensuring their dissolution, this additive will be incorporated in the preparation of the EQA-VL panels. In chapter 3, the HBsAg panel was validated in the EQA-RT, applying the DTS methodology. The DTS panels were stored in humid and dry environments, and placed in the refrigerator, at room temperature, at 35°C and at 45°C. The EQA-HbsAg panel showed good results, with reactivity up to the 40th day in a dry environment subjected to the refrigerator, room temperature and at 35°C, and up to 30 days at 45°C. Samples submitted to a humid environment had their results and sample dissolution affected, remaining reactive only when stored in a refrigerator, at room temperature for 40 days. As tests with the HBsAg DTS panel showed reactive results, relatively good dissolution in a dry environment and over a wide range of temperatures, it was validated and will be included in the EQA-RT. In chapter 4, the production of EQA-RT panels was optimized. DTS samples were frozen for up to 180 days in a -20°C and -80°C freezer and tested for 30 days after thawing. With the exception of the DTS samples for syphilis, which had their stability affected by freezing, the other reactive samples for HIV, HCV and HBsAg showed good results even after 180 days of freezing at both temperatures (-20°C and -80°C), with poor no weakening in the color intensity of test line. This methodology will be implemented in the production of panels, optimizing the process and improving the laboratory routine.

Keywords: Freeze drying; trehalose; HIV; Syphilis; Hepatitis B and C

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Painel AEQ-CV convencional.....	31
Figura 2 - Painel AEQ-CV rápida.....	32
Figura 3 - Amostras agrupadas e envoltas por plástico filme.....	34
Figura 4 - Amostras com HBV liofilizadas.....	36
Figura 5 - Amostras com HBV armazenadas a 45°C.....	38
Figura 6 - Preparação das amostras de HCV pura (sem trealose), com trealose laboratorial e com trealose alimentícia.....	47
Figura 7 - Preparo de amostras puras e com trealose para CV de HIV, HCV e HBV.....	48
Figura 8 - Amostras agrupadas e envoltas por plástico filme.....	49
Figura 9 - Comparação de amostras hidratadas que foram armazenadas a 45°C.....	55
Figura 10 - Amostras puras e com trealose armazenadas a 45°C.....	56
Figura 11 - Gráfico das amostras com HIV puro.....	57
Figura 12 - Gráfico das amostras de HIV com trealose.....	60
Figura 13 - Gráfico das amostras com HCV puro.....	63
Figura 14 - Gráfico das amostras de HCV com trealose.....	65
Figura 15 - Gráfico das amostras com HBV puro.....	69
Figura 16 - Painel AEQ-TR.....	79
Figura 17 - Criotubos com amostra reagentes para HBsAg preparados pela a metodologia DTS.....	81
Figura 18 - Caixas preparadas para simulação dos diferentes ambientes.....	82
Figura 19 - Escala de enfraquecimento da linha de teste.....	83
Figura 20 - Painel DTS de HBsAg submetido a ambiente úmido ao longo de 1 a 40 dias mantidas em ambiente úmido em diversas temperaturas.....	85
Figura 21 - Painel DTS de HBV submetido a ambiente seco ao longo de 1 a 40 dias mantidas em ambiente seco em diversas temperaturas.....	85
Figura 22 - Amostras DTS de HBV armazenadas em geladeira.....	86
Figura 23 - Amostras DTS de HBV armazenadas a temperatura ambiente.....	87
Figura 24 - Amostra DTS de HBV armazenada em ambiente úmido em estufa a 34,96°C.....	88
Figura 25 - Amostra DTS de HBV armazenada em ambiente seco em estufa a 35,5°C.....	88
Figura 26 - Amostra DTS de HBV armazenada em ambiente úmido em estufa a 44,57°C.....	89
Figura 27 - Amostra DTS de HBV armazenada em ambiente seco em estufa a 44,04°C.....	89
Figura 28 - Amostras preparadas para o teste de congelamento.....	95
Figura 29 - Crioboxes utilizadas para armazenar as amostras para congelamento.....	95
Figura 30 - Amostras descongeladas após congelamento por 10 dias.....	96
Figura 31 - Escala de enfraquecimento da linha de teste.....	97
Figura 32 - Gráfico das amostras congeladas em freezer -20°C por 10 dias.....	98
Figura 33 - Gráfico das amostras congeladas em freezer -80°C por 10 dias.....	98
Figura 34 - Gráfico das amostras congeladas em freezer -20°C por 20 dias entre 1 e 30 dias pós descongelamento.....	99
Figura 35 - Gráfico das amostras congeladas em freezer -80°C por 20 dias entre 1 e 30 dias pós descongelamento.....	100

Figura 36 - Gráfico das amostras congeladas em freezer -20°C por 30 dias entre 1 e 30 dias pós descongelamento.....	101
Figura 37 - Gráfico das amostras congeladas em freezer -80°C por 30 dias entre 1 e 30 dias pós descongelamento.....	101
Figura 38 - Gráfico das amostras congeladas em freezer -20°C por 60 dias entre 1 e 30 dias pós descongelamento.....	102
Figura 39 - Gráfico das amostras congeladas em freezer -80°C por 60 dias entre 1 e 30 dias pós descongelamento.....	102
Figura 40 - Gráfico das amostras congeladas em freezer -20°C por 90 dias entre 1 e 30 dias pós descongelamento.....	103
Figura 41 - Gráfico das amostras congeladas em freezer -80°C por 90 dias entre 1 e 30 dias pós descongelamento.....	104
Figura 42 - Gráfico das amostras congeladas em freezer -20°C por 120 dias entre 1 e 30 dias pós descongelamento.....	105
Figura 43 - Gráfico das amostras congeladas em freezer -80°C por 120 dias entre 1 e 30 dias pós descongelamento.....	105
Figura 44 - Gráfico das amostras congeladas em freezer -20°C por 150 dias entre 1 e 30 dias pós descongelamento.....	106
Figura 45 - Gráfico das amostras congeladas em freezer -80°C por 150 dias entre 1 e 30 dias pós descongelamento.....	106
Figura 46 - Amostras DTS hidratadas após 180 dias de congelamento.....	108
Figura 47 - Gráfico das amostras congeladas em freezer -20°C por 180 dias entre 1 e 30 dias pós descongelamento.....	108
Figura 48 - Gráfico das amostras congeladas em freezer -80°C por 180 dias entre 1 e 30 dias pós descongelamento.....	109
Figura 49 - Testes de sífilis em diferentes kits no 1º dia após descongelamento.....	110
Figura 50 - Testes de sífilis em diferentes kits no 30º dia após descongelamento.....	110

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Resultados dos testes para HBsAg ao longo de 10 a 40 dias de testagem em diversas condições.....	84
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Carga viral e log das amostras de HBV.....	36
Tabela 2 - Carga viral do primeiro teste com trealose.....	51
Tabela 3 - Carga viral do segundo teste de adição de trealose.....	52
Tabela 4 - Carga viral do terceiro teste de adição de trealose.....	53
Tabela 5 - Carga viral e log das amostras de HIV puro.....	56
Tabela 6 - Desvio padrão e coeficiente de variação das amostras com HIV puro.....	58
Tabela 7 - Carga viral e log das amostras de HIV com trealose.....	59
Tabela 8 - Desvio padrão e coeficiente de variação das amostras com HIV com trealose.....	61
Tabela 9 - Carga viral e log das amostras de HCV puro.....	62
Tabela 10 - Desvio padrão e coeficiente de variação das amostras com HCV puro.....	64
Tabela 11 - Carga viral e log das amostras de HCV com trealose.....	65
Tabela 12 - Desvio padrão e coeficiente de variação das amostras com HCV com trealose....	67
Tabela 13 - Carga viral e log das amostras com HBV puro.....	68
Tabela 14 - Carga viral e log das amostras de HBV com trealose.....	69
Tabela 15 - Desvio padrão e coeficiente de variação das amostras com HBV puro.....	71
Tabela 16 - Desvio padrão e coeficiente de variação das amostras com HBV com trealose....	72
Tabela 17 - Kits usados para testagem dos painéis DTS congelados.....	96

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µl	microlitro
AEQ	Avaliação Externa da Qualidade
AEQ-CV	Avaliação Externa da Qualidade de Carga Viral
AEQ-TR	Avaliação Externa da Qualidade para Testes Rápidos
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ANASUS	Ambiente Virtual de Aprendizagem do SUS
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças, do inglês <i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CT	<i>Chlamydia trachomatis</i>
CV	Carga Viral
DATHI	Departamento de HIV/Aids, Tuberculose, Hepatites Virais e Infecções Sexualmente Transmissíveis
DBS	Mancha de sangue seco em papel, do inglês <i>Dried Blood Spots</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico, do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>
DPP	Plataforma de Duplo Percurso, do inglês <i>Dual Path Platform</i>
DTS	Amostras Secas em Tubos do inglês, <i>Dried Tube Specimens</i>
ELFA	do inglês <i>enzyme-linked fluorescent assay</i>
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática, do inglês <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FTA-ABS	do inglês <i>Fluorescent Treponemal Antibody Absorption Test</i>
HBV	Vírus da Hepatite B do inglês, <i>Hepatitis B Virus</i>
HCV	Vírus da Hepatite C do inglês, <i>Hepatitis C Virus</i>
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana do inglês, <i>Human Immunodeficiency Virus</i>
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
ISTs	Infecções Sexualmente Transmissíveis
LBMMS	Laboratório de Biologia Molecular, Microbiologia e Sorologia
ml	Mililitro
MS	Ministério da Saúde

NAAT	Teste de Amplificação de Ácidos Nucleicos, do inglês <i>Nucleic Acid Amplification Test</i>
NG	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
NR	Não Reagente
ODS	Objetivos de Desenvolvimento Sustentável
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONU	Organização das Nações Unidas
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase, do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PNS	Pesquisa Nacional de Saúde
RDC	Resolução de Diretoria Colegiada
R	Reagente
RNA	Ácido ribonucleico, do inglês <i>ribonucleic acid</i>
RPR	do inglês <i>Rapid Plasmatic Reagin</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
SVSA	Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente
TR	Teste Rápido
TRUST	do inglês <i>Toluidine Red Unheated Serum Test</i>
UBS	Unidades Básicas de Saúde
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
UI	Unidade Internacional
USR	do inglês <i>Unheated Serum Reagin</i>
VDRL	do inglês <i>Venereal Disease Research Laboratory</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	20
2 REVISÃO DA BIBLIOGRAFIA.....	21
2.1 HIV.....	21
2.2 SÍFILIS.....	22
2.3 HEPATITES VIRAIS.....	23
2.4 TESTES RÁPIDOS.....	24
2.5 TESTES MOLECULARES PARA QUANTIFICAÇÃO DE CARGA VIRAL.....	24
2.6 PROGRAMA DE AVALIAÇÃO EXTERNA DA QUALIDADE (AEQ).....	24
3 OBJETIVOS.....	25
3.1 OBJETIVO GERAL.....	25
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
4 REFERÊNCIAS.....	27
CAPÍTULO 1 - VALIDAÇÃO DO PAINEL DE HBV PARA AEQ-CV.....	30
1 INTRODUÇÃO.....	31
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
2.1 AMOSTRAGEM.....	33
2.2 PREPARO DAS AMOSTRAS.....	33
2.3 EQUIPAMENTO CEPHEID – GENEXPERT® KIT XPRT® HBV VIRAL LOAD... 34	
2.4 ANÁLISE DOS RESULTADOS DA CARGA VIRAL.....	35
3 RESULTADOS.....	35
3.1 GELADEIRA (2 - 8°C).....	37
3.2 TEMPERATURA AMBIENTE (20-26°C).....	37
3.3 ESTUFA A 35°C.....	37
3.4 ESTUFA A 45°C.....	38
4 DISCUSSÃO.....	38
5 CONCLUSÃO.....	40
6 REFERÊNCIAS.....	41
CAPÍTULO 2 - PAINÉIS LIOFILIZADOS COM TREALOSE.....	43
1 INTRODUÇÃO.....	44
1.1 LIOFILIZAÇÃO.....	44
1.2 TREALOSE.....	45
1.3 JUSTIFICATIVA.....	45
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	46
2.1 SELEÇÃO DA TREALOSE.....	46
2.2 PREPARO DE SOLUÇÃO-MÃE.....	46
2.3 ADIÇÃO DE TREALOSE DIRETAMENTE NA AMOSTRA.....	47
2.4 LIOFILIZAÇÃO E TESTAGEM DAS AMOSTRAS.....	48
2.5 EQUIPAMENTO CEPHEID – GENEXPERT®.....	49
2.6 ANÁLISE DOS RESULTADOS DE CARGA VIRAL.....	50

3 RESULTADOS.....	51
3.1 RESULTADO DA SOLUÇÃO-MÃE.....	51
3.2 ADIÇÃO DE TREALOSE DIRETAMENTE NA AMOSTRA.....	52
3.2.1 Primeiro teste.....	52
3.2.2 Segundo teste.....	52
3.2.3 Terceiro teste.....	54
3.2.3.1 HIV.....	56
3.2.3.2 HCV.....	62
3.2.3.3 HBV.....	68
4 DISCUSSÃO.....	73
5 CONCLUSÃO.....	75
6 REFERÊNCIAS.....	76
CAPÍTULO 3 - VALIDAÇÃO DO PAINEL DE HBV PARA AEQ-TR.....	78
1 INTRODUÇÃO.....	79
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	80
2.1 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	80
2.2 ANÁLISES DAS AMOSTRAS SECAS EM TUBO - DTS PARA HBsAg.....	82
3 RESULTADOS.....	83
3.1 GELADEIRA (2-8°C).....	85
3.2 TEMPERATURA AMBIENTE (20-26°C).....	86
3.3 ESTUFA A 35°C.....	87
3.4 ESTUFA A 45°C.....	88
4 DISCUSSÃO.....	90
5 CONCLUSÃO.....	91
6 REFERÊNCIAS.....	92
CAPÍTULO 4 - ESTABILIDADE DOS PAINÉIS AEQ-TR APÓS CONGELAMENTO... 93	
1 INTRODUÇÃO.....	94
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	94
2.1 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DTS.....	94
2.2 ANÁLISES DOS RESULTADOS DAS AMOSTRAS DTS APÓS CONGELAMENTO.....	97
3 RESULTADOS.....	98
3.1 CONGELAMENTO POR 10 DIAS.....	98
3.2 CONGELAMENTO POR 20 DIAS.....	99
3.3 CONGELAMENTO POR 30 DIAS.....	100
3.4 CONGELAMENTO POR 60 DIAS.....	102
3.5 CONGELAMENTO POR 90 DIAS.....	103
3.6 CONGELAMENTO POR 120 DIAS.....	104
3.7 CONGELAMENTO POR 150 DIAS.....	106
3.8 CONGELAMENTO POR 180 DIAS.....	107
4 DISCUSSÃO.....	111

5 CONCLUSÃO.....	113
6 REFERÊNCIAS.....	114
CONCLUSÃO GERAL.....	115
PERSPECTIVAS.....	116
APÊNDICE A - CARGAS VIRAIS E LOG DAS AMOSTRAS DE HIV PURO E COM TREALOSE (CONTINUA).....	117
APÊNDICE B - CARGAS VIRAIS E LOG DAS AMOSTRAS DE HCV PURO E COM TREALOSE (CONTINUA).....	120
APÊNDICE C - CARGAS VIRAIS E LOG DAS AMOSTRAS DE HBV PURO E COM TREALOSE (CONTINUA).....	123

1 INTRODUÇÃO

As infecções sexualmente transmissíveis (ISTs) desenvolvem-se a partir da transmissão de um organismo patogênico (como vírus, bactérias, fungos ou protozoários) geralmente por meio de relações sexuais sem proteção (Fawco, 2019; Otu *et al.*, 2021; UNAIDS, 1999). O contágio também pode acontecer de forma vertical (da mãe para o feto durante a gravidez ou para o recém-nascido no momento do parto), por meio de transfusão sanguínea e componentes do sangue, de contato com secreções, de tecidos e órgãos transplantados (UNAIDS, 1999).

A maioria das ISTs são assintomáticas ou apresentam sintomas brandos, entretanto podem causar graves complicações nos indivíduos, dentre elas infertilidade, doenças neurológicas e cardiovasculares, câncer, dor pélvica crônica, problemas gestacionais, como gravidez ectópica, parto prematuro, aborto, más formações e deficiências no feto ou recém-nascido (Newman *et al.*, 2015; UNAIDS, 1999; OMS, 2018). Além disso, o indivíduo se torna mais suscetível a adquirir e transmitir o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Newman *et al.*, 2015; UNAIDS, 1999; OMS, 2018).

O HIV, a sífilis, as hepatites virais e outras ISTs representam um grande desafio para a saúde pública, já que conforme estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS) são contabilizados cerca de 1 milhão de novas infecções por dia, que resultam em 2,3 milhões de mortes por ano (OMS, 2021). No Brasil, o cenário apresenta-se igualmente preocupante, pois, como mostram os dados da Pesquisa Nacional de Saúde (PNS), realizada em 2019, aproximadamente 1 milhão de pessoas receberam o diagnóstico de IST naquele ano (Brasil, 2021b).

Visando melhorias e caminhos para o controle da epidemia das ISTs, a Agenda 2030 para o Desenvolvimento Sustentável da Organização das Nações Unidas (ONU) estabeleceu, dentre os 17 Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS), o ODS 3 focado em assegurar saúde e bem-estar para todas as faixas etárias, o que inclui estratégias globais para combater essas infecções (ONU, 2023; OMS, 2016). As estratégias buscam melhorar a saúde da população, diminuindo o número de novas infecções, de morbidades e de mortalidades, por meio da facilitação do acesso à informação, ao diagnóstico, ao tratamento e prevenção das ISTs (OMS, 2016).

No âmbito brasileiro, o Sistema Único de Saúde (SUS), criado e garantido pela Constituição Federal de 1988, reúne esforços para promover a saúde da população, garantido o acesso gratuito aos serviços de saúde (FIOCRUZ, 2023b). Na perspectiva das ISTs, são

ofertados no SUS gratuitamente testes rápidos (TRs) para quatro delas: HIV, sífilis, hepatite B e hepatite C (Brasil, 2023a).

Para garantir a qualidade, excelência e redução do máximo de erros nos resultados dos testes, vários critérios e cuidados foram adotados pelo Ministério da Saúde (Brasil, 2018a; Brasil, 2021c). Entre as medidas adotadas, pode-se citar que os TRs adquiridos, como todo teste diagnóstico, devem ter registro na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e passar regularmente por avaliações de desempenho junto ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS/Fiocruz) (Brasil, 2021c; Brasil, 2024a). Além disso, o Ministério da Saúde oferece aos profissionais cursos *online*, como os das plataformas TELELAB, Ambiente Virtual de Aprendizagem do SUS (AVASUS) e Campus Virtual Fiocruz, e proporciona a toda a rede de diagnóstico e monitoramento das ISTs a oportunidade de participar do Programa Nacional de Avaliação Externa da Qualidade (AEQ), contribuindo para que os serviços e ou laboratórios cumpram as exigências preconizadas na Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) 786 de 5 de maio de 2023, que entrou em vigor em 1º de agosto de 2023 (Brasil, 2021c; Brasil, 2023c). Enquanto as plataformas de treinamento online informam o profissional sobre as diretrizes e procedimentos corretos para realizar a testagem e diagnóstico, o Programa AEQ busca avaliar tal conhecimento, além de identificar as não conformidades na execução dos testes, e devido ao caráter educacional e não punitivo, busca corrigir as falhas na execução (Brasil, 2021c).

2 REVISÃO DA BIBLIOGRAFIA

2.1 HIV

HIV é um vírus pertencente ao gênero *Lentivirus* e o seu principal meio de transmissão é por contato de secreções com mucosas durante o ato sexual desprotegido (ICTV, 2023; Brasil, 2018a). No organismo hospedeiro, ele infecta e destrói células do sistema imunológico, entre elas os linfócitos T CD4+, que são os principais responsáveis pela resposta imune (Brasil, 2018a; Kedzierska; Crowe, 2001). Se o indivíduo não realizar o diagnóstico e tratamento, a contínua diminuição e destruição dos linfócitos T CD4+, leva ao desenvolvimento da síndrome da imunodeficiência adquirida (Aids) que, devido ao sistema imunológico estar fragilizado, favorece o surgimento de infecções oportunistas (Brasil, 2018a; Kedzierska; Crowe, 2001).

Atualmente, ainda se enfrentam diversos desafios com a infecção pelo HIV que tentam ser minimizados pelas políticas públicas do Ministério da Saúde (Brasil, 2018a). Esses

esforços vão desde soluções estruturais até operacionais, com novas tecnologias diagnósticas e sua validação, formação dos profissionais de saúde e o cuidado com boas práticas (Brasil, 2018a). Outros cuidados são tomados com a construção de inúmeros fluxogramas detalhados presentes nos Manuais Técnicos, com os diferentes tipos de testes, que dão suporte para a realização do diagnóstico nas diversas situações ao qual o profissional pode se deparar (Brasil, 2018a).

Uma tecnologia que foi incorporada nos últimos anos e que passou a ser o mais eficaz para a confirmação do diagnóstico e que apresenta o melhor custo-efetividade, são os testes moleculares (Brasil, 2018a). Outro método muito importante e com resultado em poucos minutos, são os testes rápidos. Nesses casos, o diagnóstico é realizado seguindo-se o fluxograma de testes rápidos do Manual Técnico para o Diagnóstico da Infecção pelo HIV em Adultos e Crianças, que após dois TRs reagentes, por exemplo, deve-se ofertar o tratamento e encaminhar o paciente para realizar o teste molecular para quantificação da CV e contagem de linfócitos T CD4+ (Brasil, 2018a). Dessa forma, os TRs e testes moleculares que realizam a quantificação da carga viral são essenciais no diagnóstico e monitoramento da infecção pelo HIV, lembrando que não são os únicos, mas são muito utilizados. Além do diagnóstico, os testes moleculares também são essenciais no acompanhamento da infecção do HIV no paciente (Brasil, 2018a). Além disso, existe a possibilidade de serem usados apenas como único teste na detecção direta de HIV, essenciais no diagnóstico de crianças, adolescentes e adultos em estágio agudo (Brasil, 2018a).

2.2 SÍFILIS

A sífilis é causada pela bactéria *Treponema pallidum*, uma infecção curável, mas quando não tratada, evolui para um estado crônico e acomete vários órgãos e sistemas do organismo (Brasil, 2021c; Brasil, 2022a). As principais formas de transmissão são por via sexual ou vertical, da mãe para o feto, causando a sífilis congênita (Brasil, 2021c; Brasil, 2022a).

A sífilis representa uma grande preocupação no âmbito da saúde e para o diagnóstico da doença vários pontos devem ser analisados e correlacionados. Observa-se os dados clínicos do paciente, histórico de infecções passadas e novas exposições, mas além de tudo, deve-se realizar teste treponêmico e um teste não treponêmico, seguindo-se os fluxogramas do Manual Técnico para o Diagnóstico da Sífilis (Brasil, 2021c). Os exames diretos detectam a própria bactéria a partir de amostras coletadas das próprias lesões, por meio de microscopia de campo escuro ou com material corado, imunofluorescência direta, ou ainda por amplificação de

ácidos nucleicos (NAAT) (Brasil, 2021c). Já os testes imunológicos podem ser do tipo treponêmico que detectam anticorpos totais contra o *T. pallidum*, por exemplo o teste de anticorpos treponêmicos fluorescentes com absorção (FTA-Abs, do inglês *fluorescent treponemal antibody absorption test*), ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA do inglês, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), quimioluminescência, hemaglutinação, aglutinação e TRs (Brasil, 2021c). Existem também os testes não treponêmicos que detectam anticorpos anticardiolipina não específicos para *T. pallidum*, sendo que a cardiolipina é liberada pelas células danificadas no organismo em decorrência da doença (Brasil, 2021c). Exemplos de testes não treponêmicos utilizados são o VDRL (do inglês *Venereal Disease Research Laboratory*), RPR (do inglês *Rapid Plasmatic Reagin*), USR (do inglês *Unheated Serum Reagin*) e o TRUST (do inglês *Toluidine Red Unheated Serum Test*) (Brasil, 2021c).

2.3 HEPATITES VIRAIS

Dentre as hepatites virais, as que representam preocupações no âmbito das ISTs são as hepatites B e C, mas que assim como as demais também possuem a característica de tropismo, ou atração, primeiramente por tecidos do fígado (Brasil, 2018b; Brasil, 2022a). Devido aos altos índices de predomínio e contágio, e estados clínicos como complicações e cronicidade, as hepatites B e C são as que representam a maior preocupação para a saúde mundial, já que somam 296 milhões e 71,1 milhões de diagnósticos, respectivamente, como indicam dados de 2019 (Jeng; Papatheodoridis; Lok, 2023; Brasil, 2022a; Spearman *et al.*, 2019).

A hepatite B é causada pelo vírus da hepatite B (HBV), um vírus de DNA, transmitido através de sêmen, sangue e saliva (Brasil, 2022a; Lee, 1997). Já a hepatite C é transmitida pelo vírus da hepatite C (HCV), um vírus de RNA (Lauer; Walker, 2001). O contágio ocorre durante procedimentos de hemodiálise, por meio de transfusão sanguínea, drogas injetáveis e por perfurocortantes, se caso não esterilizados de forma correta, por exemplo, durante tatuagens, colocação de piercings, em centros estéticos ou odontológicos (Brasil, 2018b; Brasil, 2022a; Spearman *et al.*, 2019). A transmissão por via sexual é menos comum, ocorrendo em casos de indivíduos com múltiplos parceiros e que praticam relações sexuais sem a utilização de preservativo (Brasil, 2018b; Brasil, 2022a). O contágio do feto por via vertical pelo HCV é mais rara do que pelo HBV (Brasil, 2018b; Brasil, 2022a).

As hepatites virais podem ser diagnosticadas por diferentes métodos abordados nos fluxogramas do Manual Técnico para o Diagnóstico das Hepatites Virais, por exemplo imunoensaios, que detectam antígenos ou anticorpo, como ELISA, ELFA (do inglês *enzyme-linked fluorescent assay*), quimioluminescência, eletroquimioluminescência e teste

rápido ou por teste molecular, que detectam o material genético viral, como reação em cadeia da polimerase (PCR do inglês *Polymerase Chain Reaction*) (Brasil, 2018b).

2.4 TESTES RÁPIDOS

A realização de um teste rápido é simples, sem a necessidade de uma estrutura laboratorial, sendo que os dispositivos utilizados são imunocromatográficos de fluxo lateral ou de plataforma de duplo percurso (DPP) (Brasil, 2022a; Hanafiah; Garcia; Anderson, 2013). Além disso, fornecem resultados rápidos, são empregados para diagnóstico, triagem sorológica e dependendo do marcador permitem o início de um tratamento e controle da infecção precocemente (Brasil, 2022a; Hanafiah; Garcia; Anderson, 2013).

Os TRs podem detectar antígeno ou anticorpo a partir de soro, plasma ou sangue total, dependendo de qual agravo está se testando, por exemplo os testes rápidos para diagnóstico da infecção pelo HIV detectam anticorpos anti-HIV (Brasil, 2018a; Brasil, 2022a). Já para sífilis, o teste detecta anticorpos treponêmicos (Brasil, 2021c). No diagnóstico da hepatite B, podem ser empregados testes rápidos que detectam o antígeno de superfície do HBV (HBsAg), já para a hepatite C, os testes rápidos detectam o anticorpo anti-HCV (Brasil, 2018b).

2.5 TESTES MOLECULARES PARA QUANTIFICAÇÃO DE CARGA VIRAL

Os testes moleculares realizam quantificação da carga viral, determinando a quantidade de vírus (DNA ou RNA) presente no soro ou plasma (Brasil, 2018a; Brasil, 2018b; Brasil, 2021c). Como visto nos tópicos de HIV, sífilis e hepatites virais, como HBV e HCV, essa metodologia é essencial no diagnóstico e monitoramento das infecções causadas por esses patógenos. Essa quantificação pode ser realizada tanto na rede convencional, em laboratórios de grandes centros com grande demanda ou na rede rápida, mais focada na descentralização da oferta do exame para regiões pequenas ou remotas (Brasil, 2024b).

2.6 PROGRAMA DE AVALIAÇÃO EXTERNA DA QUALIDADE (AEQ)

O programa é constituído de ensaios de proficiência, um método de avaliação que busca demonstrar se os resultados dos exames realizados em determinada instituição são confiáveis, sendo esses resultados importantes para o local comprovar a qualidade na execução dos testes (Brasil, 2021b; FIOCRUZ, 2023a; Brasil, 2023c). Destaca-se que a AEQ tem um caráter educacional, não tendo o intuito de punir os profissionais, mas sim de avaliar seu desempenho e permitir que revejam eventuais não conformidades e aperfeiçoem suas execuções, caso necessário, podendo oferecer um serviço seguro e de qualidade à população

usuária do SUS (Brasil, 2021b; LBMMS, 2023). A AEQ vem sendo desenvolvida pelo Laboratório de Biologia Molecular, Microbiologia e Sorologia da Universidade Federal de Santa Catarina (LBMMS/UFSC) em parceria com o Departamento de HIV/Aids, Tuberculose, Hepatites Virais e Infecções Sexualmente Transmissíveis da Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente do Ministério da Saúde (DATHI/SVSA/MS) (Brasil, 2021b; LBMMS, 2023). Atualmente, conforme a RDC nº 786 de 5 de maio de 2023, que entrou em vigor em 1º de agosto de 2023, todos os laboratórios clínicos, hospitais, maternidades, Unidade Básica de Saúde (UBS) ou serviços que executam exames de análises clínicas devem participar de programas de ensaios de proficiência (Brasil, 2021b; FIOCRUZ, 2023a; Brasil, 2023c).

A avaliação consiste em rodadas teóricas, nas quais os profissionais respondem a um questionário *online*, e práticas, que são compostas pelo envio de painéis com amostras para a realização dos testes (Brasil, 2021b). Todas as informações sobre o funcionamento do programa, cronogramas, critérios de avaliação, materiais e relatórios estão disponíveis nos sites <https://qualitr.paginas.ufsc.br/> e <https://aeqnacional.paginas.ufsc.br/>. Atualmente, são desenvolvidos seis AEQs: Avaliação Externa da Qualidade para Testes Rápidos (AEQ-TR) com envio de amostras *DTS* reagentes ou não para HIV, HCV e Sífilis; Avaliação Externa da Qualidade da Carga Viral (AEQ-CV) com amostras liofilizadas de HIV, HCV, HBV e *Chlamydia trachomatis/Neisseria gonorrhoeae* (CT/NG) para rede rápida e convencional; Avaliação Externa da Qualidade dos linfócitos CD4/CD8 para rede rápida e convencional com amostras de sangue total; Avaliação Externa da Qualidade do HLA B5701 também com amostras de sangue total.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Aprimoramento do processo de liofilização de amostras de plasma e otimização da produção de painéis *DTS* para o Programa Nacional de Avaliação Externa da Qualidade, juntamente com a validação de amostras com HBV para implementação em ambos os painéis.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aprimorar o processo de liofilização de amostras de plasma de HIV, HBV e HCV por meio da inserção de trealose;
- Validar o painel liofilizado para HBV no equipamento Cepheid – GeneXpert®, com armazenamento em diferentes condições de temperatura;

- Validar o painel *DTS* para HBsAg em diferentes condições de temperatura e umidade, simulando diferentes condições de transporte.
- Testar a estabilidade de painéis *DTS* para HIV, sífilis, HCV e HBsAg após o congelamento por 10, 20, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias no 1º, 10º, 20º e 30º dia após o descongelamento, respectivamente;

4 REFERÊNCIAS

BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). **Pesquisa Nacional de Saúde 2019**: acidentes, violências, doenças transmissíveis, atividade sexual, características do trabalho e apoio social. Rio de Janeiro: Ibge, 2021a.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Diagnosticar e tratar as pessoas com IST e HV**. Disponível em: <https://www.gov.br/aids/pt-br/assuntos/prevencao-combinada/diagnosticar-e-tratar-as-pessoas-com-ist-e-hv>. Acesso em: 14 abr. 2023a.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Estratégias para viabilizar transporte mais econômico e ampliar os marcadores avaliados no Programa Nacional de Avaliação Externa da Qualidade no Brasil para a rede de laboratórios de Sorologia para Sífilis e monitoramento das infecções pelo HIV e Hepatites Virais**. Brasília: Ministério da Saúde, 2021b.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde**. Disponível em: <https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/folder/10006003303.pdf>. Acesso em: 23 jun. 2024a.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual Técnico para o Diagnóstico da Infecção pelo HIV em Adultos e Crianças**. 4. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2018a.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual Técnico para o Diagnóstico da Sífilis**. 1. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2021c.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual Técnico para o Diagnóstico das Hepatites Virais**. 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2018b.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Atenção Integral às Pessoas com Infecções Sexualmente Transmissíveis (IST)**. Brasília: Ministério da Saúde, 2022a.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Rede Nacional de Laboratórios de Carga Viral do HIV**. Disponível em: <https://antigo.aids.gov.br/pt-br/profissionais-de-saude/monitoramento-da-infeccao-pelo-hiv-hiv/rede-nacional-de-laboratorios-de-carga>. Acesso em: 23 jun. 2024b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução de Diretoria Colegiada nº 786, de 5 de maio de 2023. **Diário Oficial da União**, Brasília, 5 de maio de 2023. Seção 1, p. 161. 2023c.

FAWCO. **The Impact of Sexually Transmitted Infections (STIs) on Women's Health**. 2019. Disponível em: https://www.fawco.org/global-issues/health/health-articles/4051-the-impact-of-sexually-transmitted-infections-stis-on-women-s-health#_msoanchor_1. Acesso em: 11 abr. 2023.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ (FIOCRUZ). **Ensaio de Proficiência (EP/INCQS)**. Disponível em: https://www.incqs.fiocruz.br/index.php?option=com_content&view=article&id=94&Itemid=72. Acesso em: 17 abr. 2023a.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ (FIOCRUZ). **SUS**. Disponível em: <https://pensesus.fiocruz.br/sus>. Acesso em: 14 abr. 2023b.

HANAFIAH, Khayriyyah Mohd; GARCIA, Mary; ANDERSON, David. Point-of-care testing and the control of infectious diseases. **Biomarkers In Medicine**, [S.L.], v. 7, n. 3, p. 333-347, jun. 2013. Future Medicine Ltd. <http://dx.doi.org/10.2217/bmm.13.57>.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES (ICTV). **Family: Retroviridae**. Disponível em: <https://ictv.global/report/chapter/retroviridae/retroviridae>. Acesso em: 16 abr. 2023.

JENG, Wen-Juei; PAPTAEODORIDIS, George V; LOK, Anna S F. Hepatitis B. **The Lancet**, [S.L.], v. 401, n. 10381, p. 1039-1052, mar. 2023. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(22\)01468-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(22)01468-4).

KEDZIERSKA, Katherine; CROWE, Suzanne M. Cytokines and HIV-1: interactions and clinical implications. **Antiviral Chemistry And Chemotherapy**, [S.L.], v. 12, n. 3, p. 133-150, jun. 2001. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/095632020101200301>.

LABORATÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR, MICROBIOLOGIA E SOROLOGIA (LBMMS). **Avaliação Externa da Qualidade de Testes Rápidos**. Disponível em: <https://qualitr.paginas.ufsc.br/category/divulgacao/>. Acesso em: 17 abr. 2023.

LAUER, Georg M.; WALKER, Bruce D.. Hepatitis C Virus Infection. **New England Journal Of Medicine**, [S.L.], v. 345, n. 1, p. 41-52, 5 jul. 2001. Massachusetts Medical Society. <http://dx.doi.org/10.1056/nejm200107053450107>.

LEE, William M.. Hepatitis B Virus Infection. **New England Journal Of Medicine**, [S.L.], v. 337, n. 24, p. 1733-1745, 11 dez. 1997. Massachusetts Medical Society. <http://dx.doi.org/10.1056/nejm199712113372406>.

NEWMAN, Lori *et al.*. Global Estimates of the Prevalence and Incidence of Four Curable Sexually Transmitted Infections in 2012 Based on Systematic Review and Global Reporting. **Plos One**, [S.L.], v. 10, n. 12, p. 1-17, 8 dez. 2015. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0143304>.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS (ONU). **Make the SDGS reality**. Disponível em: https://sdgs.un.org/#goal_section. Acesso em: 14 abr. 2023.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Global health sector strategy on sexually transmitted infections, 2016–2021**. Genebra: World Health Organization, 2016.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Global progress report on HIV, viral hepatitis and sexually transmitted infections, 2021**. Geneva: World Health Organization, 2021.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Report on global sexually transmitted infection surveillance, 2018**. Genebra: World Health Organization, 2018.

OTU, Akaninyene *et al.* Refocusing on sexually transmitted infections (STIs) to improve reproductive health: a call to further action. **Reproductive Health**, [S.L.], v. 18, n. 1, p. 1-4, dez. 2021. <http://dx.doi.org/10.1186/s12978-021-01296-4>.

SPEARMAN, C Wendy *et al.* Hepatitis C. **The Lancet**, [S.L.], v. 394, n. 10207, p. 1451-1466, out. 2019. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(19\)32320-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(19)32320-7).

UNAIDS. Sexually transmitted diseases: policies and principles for prevention and care.
Genebra: Unaid, 1999.

CAPÍTULO 1 - VALIDAÇÃO DO PAINEL DE HBV PARA AEQ-CV

1 INTRODUÇÃO

O Programa AEQ inclui a Avaliação Externa da Qualidade da Carga Viral (AEQ-CV) das redes rápida e convencional. Os painéis AEQ-CV avaliam a qualidade dos resultados laboratoriais para os testes moleculares de carga viral para HIV, HCV e HBV (Bazzo et al., 2015). Atualmente, participam da rede convencional 81 laboratórios que fazem CV para HIV, 68 para HCV, 62 para HBV e 46 CT/NG que recebem o painel da Figura 1.

Figura 1 - Painel AEQ-CV convencional



Fonte: a autora, 2024.

O painel AEQ-CV é composto por um manual de instruções, um formulário de respostas, seis amostras liofilizadas, seis frascos de água para hidratação das amostras. No caso da rede rápida, ainda são fornecidas seis pipetas Pasteur para transferência da água para hidratação das amostras, uma para cada amostra, enquanto na rede convencional, deve-se utilizar micropipetas e ponteiras descartáveis com filtro, devidamente calibradas. Na rede rápida, é enviado o painel da Figura 2 para 55 laboratórios/serviços que fazem CV para HIV, 51 para HCV e 51 para HBV.

Figura 2 - Painel AEQ-CV rápida



Fonte: a autora, 2024.

Em 2021, houve a validação das amostras dos painéis da AEQ-CV para que o plasma fosse enviado liofilizado, o que garante maior segurança e estabilidade para armazenamento e transporte em temperatura ambiente, quando comparado com amostras de plasma líquidas (Brasil, 2021a). Os painéis liofilizados podem até ser enviados pelos Correios, diminuindo consideravelmente o custo de transporte, mantendo a segurança e permitindo a participação de regiões mais distantes do país em virtude da ausência de controle de temperatura durante o transporte (Brasil, 2021a; Brogna et al., 2020). A validação das amostras liofilizadas foi realizada previamente para HIV e HCV nos equipamentos Cepheid – GeneXpert® para carga viral rápida e Abbott - m2000sp para a rede de quantificação de carga viral convencional (Brasil, 2021a; Bezerra; Araújo, 2021). Já as amostras liofilizadas para HBV foram validadas apenas no equipamento Abbott - m2000sp disponível, naquele período, na rede convencional. A rede de carga viral rápida só foi implantada posteriormente à validação (Brasil, 2021a).

A carga viral para HBV, no equipamento Cepheid – GeneXpert®, é relativamente recente, foi disponibilizada em torno de 2019 e os estudos avaliando a sua confiabilidade datam por volta de 2020. Estudos compararam a detecção da CV de HBV no Cepheid – GeneXpert® com outros testes de referência, como o Cobas Ampliprep/Taqman e o Cobas 4800 da Roche, os quais apresentaram resultados concordantes e correlacionados entre os

ensaios (Auzin et al., 2020). Um estudo semelhante comparou a detecção de HBV no GeneXpert® da Cepheid com ensaios da Roche (Cobas Ampliprep/Taqman e Cobas 6800) e da Abbott (Abbott m2000 e o Alinity m) e os resultados também demonstraram boa correlação entre os testes, cerca de 82% (Jackson et al., 2020). Esses trabalhos são importantes para demonstrar que os resultados dos ensaios realizados no GeneXpert® são satisfatórios e demonstram que o desempenho do teste é confiável, rápido e preciso. Em virtude da qualidade do teste rápido molecular para HBV (Cepheid) foi necessário verificar o desempenho dos painéis AEQ nesta metodologia em amostras liofilizadas com HBV reagentes e não reagente, e expô-las a diferentes condições de armazenamento para verificação da estabilidade da carga viral. Esses testes possibilitam observar quais são as condições de tempo e temperatura de produção e transporte que viabilizem que as amostras cheguem ao local de testagem íntegras e com qualidade, possibilitando que os laboratórios sejam avaliados para este agravo.

A hipótese inicial desta validação foi de que após as testagens em várias condições de tempo e temperatura, o painel para HBV irá apresentar CV estável e poderá ser acrescentado às AEQ-CV. Portanto, o objetivo deste capítulo foi validar o painel liofilizado para HBV no equipamento Cepheid – GeneXpert®, com armazenamento em diferentes condições de tempo e temperatura de produção e armazenamento.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 AMOSTRAGEM

O estudo foi realizado no LBMMS, localizado no Departamento de Análises Clínicas/CCS/UFSC localizado no subsolo do Hospital Universitário-UFSC/EBSERH. As amostras de plasma utilizadas no estudo são provenientes de projeto da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), sob coordenação da Dra. Lia Laura Lewis Ximenez e sua utilização foi aprovada pelo comitê de ética (C.A.A.E 71396617.6.0000.5248). As amostras foram separadas em alíquotas, enumeradas (sem identificação do doador) e armazenadas em freezer -80°C.

2.2 PREPARO DAS AMOSTRAS

Após a seleção das amostras, seu conteúdo de 1,5 ml foi diluído em plasma não reagente, já testado anteriormente, e a CV foi quantificada em duplicata no Cepheid – GeneXpert® com o kit Xpert® HBV Viral Load. Posteriormente, em frascos próprios para a

técnica de liofilização, foram pipetados 1,2 ml de amostra. Os frascos foram agrupados com o auxílio de um elástico e colocados nas bandejas próprias para o liofilizador e envoltos com plástico/papel filme (já que as tampas só foram colocadas depois da finalização do processo) conforme observa-se na Figura 3.

Figura 3 - Amostras agrupadas e envoltas por plástico filme



Fonte: a autora, 2024.

O equipamento usado foi o Liofilizador LS6000 da marca Terrone e o protocolo se baseou em experimentos prévios realizados no LBMMS, no qual após as amostras serem colocadas nas bandejas, foram congeladas de forma gradativa (Brasil, 2021a). No congelamento gradativo, as amostras foram armazenadas em freezer -20°C por no mínimo 3 horas e em seguida, mais 24 horas em freezer -80°C, e só então foram levadas ao liofilizador.

Ao término do processo, duplicatas de amostras foram testadas no Cepheid – GeneXpert® com o kit Xpert® HBV Viral Load para avaliar se houve comprometimento da estabilidade da carga viral da amostra após o processo de liofilização. As demais amostras foram fechadas e lacradas, para serem armazenadas por 7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias sob diferentes condições de temperatura, como geladeira (2°C a 8°C), temperatura ambiente (21°C a 26°C), em estufa a 35°C e em estufa a 45°C.

2.3 EQUIPAMENTO CEPHEID – GENEXPERT® KIT XPERT® HBV VIRAL LOAD

Os testes realizados no equipamento Cepheid – GeneXpert® consistem em um ensaio de quantificação da carga viral, que determina a concentração de material genético (DNA ou RNA) do vírus em plasma ou soro humano (Cepheid, 2015; Cepheid, 2016; Cepheid, 2020; Abravanel *et al.*, 2020). A carga viral para HBV é importante para avaliar a infecção crônica, especialmente, para avaliar fases de portador inativo, reativação da infecção e resposta ao tratamento (Brasil, 2010).

Para execução dos testes, são utilizados cartuchos que possuem (embarcados) todos reagentes necessários para realizar a PCR em tempo real bem como dois controles internos (Cepheid, 2015; Cepheid, 2016; Cepheid, 2020). A vantagem de utilizar cartuchos está na baixa exigência de estrutura laboratorial, automatização e integração da manipulação, extração, amplificação, detecção e quantificação do material genético de interesse, reduzindo a possibilidade de contaminação entre amostras (Cepheid, 2015; Cepheid, 2016; Cepheid, 2020). O limite de detecção para HBV é de 10 a 1.000.000.000 UI/ml (Cepheid, 2020; Abravanel *et al.*, 2020).

Com o objetivo de padronizar todo o processo de liofilização, decidiu-se produzir os painéis AEQ com o mesmo volume de amostra já utilizados para os demais agravos (1,2 ml) embora a bula de teste de HBV indique a necessidade de adicionar no cartucho apenas 600 µl de amostra para a correta execução do ensaio (Cepheid, 2020). O volume excedente, não irá prejudicar o desempenho dos laboratórios porque se adiciona a amostra ao cartucho com a pipeta e seguindo-se o protocolo do próprio kit, a quantidade correta será incorporada ao cartucho, sem prejuízo para a realização do teste.

2.4 ANÁLISE DOS RESULTADOS DA CARGA VIRAL

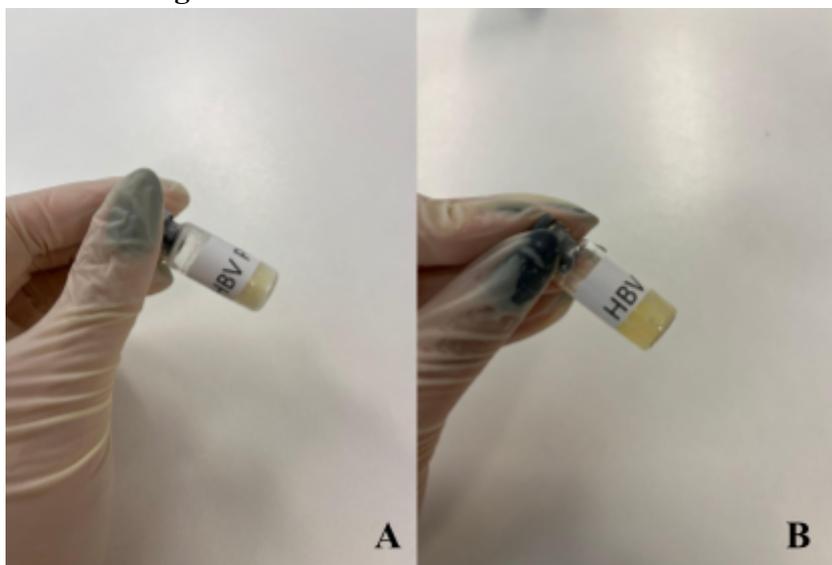
Para validação do painel de HBV para AEQ-CV, os valores foram analisados em escala de $\log_{(10)}$, já fornecidos pelo equipamento. Sabendo-se disso, considerou-se significativa a diferença superior ou inferior a 0,5 log, pois valores de até 0,5 log são considerados variações intra-ensaios aceitáveis para testes moleculares (Baleriola *et al.*, 2011; Pawlotsky, 1997; Saag *et al.*, 1996; Sebire *et al.*, 1998). Para todas as tabelas, cálculos e gráficos apresentados, foi utilizado o Planilhas Google.

3 RESULTADOS

Para ser incluído no Programa AEQ, foi necessário analisar se o painel para HBV mantinha a estabilidade da CV das amostras após a liofilização, ao decorrer dos dias e submetido a diferentes condições. As amostras foram testadas em duplicatas. A terceira amostra foi utilizada apenas em caso de divergência (maior que 0,5 log) nos resultados de CV da duplicata, antes e após a liofilização. A carga viral média antes da liofilização foi de 305.333 UI/ml e após, foi de 328.500 UI/ml, dessa forma, o processo aparentemente não afeta a estabilidade da CV, já que não houve queda. Posteriormente, também foi realizada a testagem das amostras que ficaram em geladeira (2 a 8°C), temperatura ambiente (20 a 26°C), em estufa a 35°C e em estufa de 45°C, ao decorrer de 7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias. O aspecto e

reidratação das amostras logo no primeiro dia após a liofilização podem ser visualizadas na Figura 4.

Figura 4 - Amostras com HBV liofilizadas



Legenda: (A) Amostra com HBV pré-hidratação; (B) Amostra com HBV pós hidratação;
Fonte: a autora, 2024.

Na Tabela 1 podem ser visualizados os resultados da carga viral média e em log das amostras com HBV testadas no equipamento Cepheid – GeneXpert®, cada um dos resultados que gerou a média se encontra no Apêndice C.

Tabela 1- Carga viral e log das amostras de HBV

HBV								
Pré-liofilização (CV e log)			305333 UI/ml			5,46 log		
Pós-liofilização	Geladeira (3,88°C)		Temperatura ambiente (22,95°C)		Estufa 35°C (35,7°C)		Estufa 45°C (45°C)	
	Carga viral	Log	Carga viral	Log	Carga viral	Log	Carga viral	Log
1° dia	328500	5,52	328500	5,52	328500	5,52	328500	5,52
7° dia	243666	5,37	252500	5,44	273500	5,43	256000	5,40
14° dia	369000	5,56	406000	5,61	370500	5,56	155150	5,15
21° dia	370000	5,56	340000	5,52	405500	5,61
28° dia	396500	5,60	373000	5,57	343000	5,53
35° dia	364500	5,56	410000	5,61	410500	5,61
42° dia	371000	5,57	360000	5,55	360000	5,55

Fonte: Elaborada pela autora (2024)

Legenda: ... indicam que não foi avaliado por ausência de dissolução

3.1 GELADEIRA (2 - 8°C)

A temperatura da geladeira foi monitorada diariamente. Para as amostras armazenadas em geladeira, a média de temperatura foi de 3,88°C. Os resultados mostraram ótima estabilidade do painel, apesar de ter ocorrido uma queda de 20,2% da carga viral no 7º dia, no entanto, analisando-se o resultado, provavelmente essa queda foi devido a variação do método. Analisando-se o valor de log, foi apenas nesse dia que ocorreu a maior variação (0,09), sendo que se considera significativo apenas variações maiores que 0,5 (Baleriola *et al.*, 2011; Pawlotsky, 1997; Saag *et al.*, 1996; Sebire *et al.*, 1998). Ademais, a carga viral se manteve estável até o 42º dia, não apresentando queda. Durante todo o período de estudo, não houve nenhuma reidratação espontânea da amostra durante o armazenamento e quando adicionada a água, sua reidratação ocorreu de forma homogênea e límpida (sem grumos).

3.2 TEMPERATURA AMBIENTE (20-26°C)

As amostras que permaneceram à temperatura ambiente média de 22,95°C, tiveram um resultado semelhante, com uma queda de 17,3% da carga viral no 7º dia. Entretanto, houve uma recuperação da sua estabilidade nos dias que se sucederam até o 42º dia, e sem queda quando comparada à CV inicial. Além do mais, essa queda do 7º dia, quando analisada pelo valor de log, apresentou uma variação de apenas 0,02, o que não é significativo. As amostras não apresentaram reidratação espontânea durante os 42 dias e a reidratação do pó liofilizado foi homogênea, sem a presença de grumos.

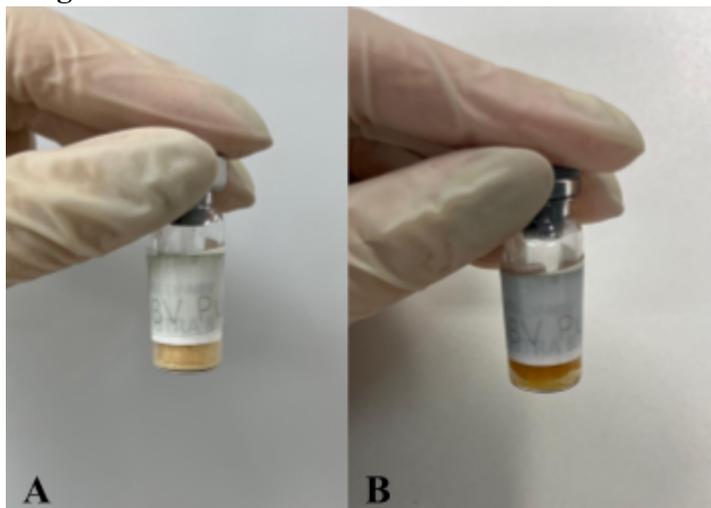
3.3 ESTUFA A 35°C

As amostras armazenadas em estufa com temperatura média de 35,7°C, também tiveram uma carga viral com boa estabilidade ao longo dos dias. Apenas inicialmente, no 7º dia, que houve uma queda de 10,4% e posteriormente, a carga viral se estabilizou, e sem queda em comparação com a CV antes da liofilização. Pelo valor de log, essa queda foi de apenas 0,03, também não mostrando significância. Assim como nas amostras que permaneceram na geladeira e à temperatura ambiente, as da estufa a 35,7°C também tiveram uma reidratação homogênea do pó liofilizado, não sendo possível notar nenhuma reidratação espontânea durante os 42 dias de estudo.

3.4 ESTUFA A 45°C

Quando armazenado em estufa a 45°C, o painel teve seus resultados afetados, pois ao passar 7 dias nessa condição a CV teve uma queda de 16%. Após 14 dias, a queda foi ainda mais significativa, (49%). Entretanto, pelo valor de log, a queda foi de 0,31, permanecendo ainda dentro da faixa admitida de até 0,5. Após esse período, as amostras começaram a apresentar problemas de reidratação, formando-se grandes grumos que impossibilitaram a transferência para o cartucho. Com o passar do tempo, a dissolução da amostra não foi mais possível, como mostra a Figura 5. Não foi possível verificar reidratação durante os 42 dias, porém a amostra mudou de cor, passando de branco para amarelo, como se a temperatura tivesse “queimado” o pó liofilizado, como na Figura 3. Dessa forma, altas temperaturas, como de 45°C, afetaram negativamente a amostra, principalmente seu estado físico, sendo que devido a isso não é possível sua testagem para verificação da CV.

Figura 5 - Amostras com HBV armazenadas a 45°C



Legenda: (A) Amostra com HBV pré-hidratação; (B) Amostra com HBV pós hidratação;
Fonte: a autora, 2024.

4 DISCUSSÃO

A partir dos resultados da avaliação das amostras liofilizadas para CV de HBV, foi observado que as amostras com HBV praticamente não sofrem grandes alterações em sua estabilidade, mesmo armazenadas em diferentes condições ao longo dos 42 dias. As amostras que ficaram em geladeira, temperatura ambiente e em estufa a 35°C foram as que apresentaram melhor estabilidade, com nenhuma queda significativa e, tiveram boa reidratação, portanto, amostras que são expostas a temperaturas entre 2°C e 37°C até 42 dias de armazenamento, permanecem estáveis, mantendo suas características iniciais de carga viral

e capacidade de reidratação. Entretanto, as amostras liofilizadas mantidas em estufa a 45°C, perderam ao longo do tempo suas características iniciais e não puderam ser reidratadas.

Em estudo realizado por Vaughan e colaboradores (2006) no qual amostras com HBV liofilizadas, foram armazenadas por até 11 meses em temperaturas de -30°C, 4°C e temperatura ambiente, os autores observaram que nos equipamentos COBAS (Roche) e Amplicor Monitor (Roche), não houve diminuição significativa da CV ao longo do tempo. Dessa forma, Vaughan e colaboradores (2006) demonstraram que a carga viral de liofilizados de HBV é estável a -30°C, 4°C e temperatura ambiente por até 11 meses, apresentando variações dentro de até 0,5 log (variação essa já citada como estimada para testes moleculares). Em nossa busca por artigos, não foram encontrados outros estudos além do de Vaughan e colaboradores (2006) que tenham avaliado a estabilidade CV em amostras liofilizadas com HBV. Entretanto, estudos semelhantes, apesar de não utilizarem liofilização, garantem a manutenção da carga viral em amostras com HBV, como de Almeida e colaboradores (2015) que avaliaram a estabilidade do DNA de HBV em amostras de plasma, enviadas em painéis de AEQ, expostas a 42°C por um período de 7 dias. Os resultados desses autores indicam que apesar de haver ocorrido uma pequena queda da carga viral, ela não foi significativa (0,005 a 0,30 log), já que a variação aceita por eles também foi de 0,5 log. O estudo de José, Gajardo e Jorquera (2005), avaliou a estabilidade de amostras com HBV, em amostras não liofilizadas, expostas a 5°C e 25°C por 28 dias. Seus resultados demonstram que mesmo após 28 dias, não houve diminuição significativa do DNA de HBV nas amostras, caracterizando alta estabilidade. Um estudo semelhante foi realizado por Zhang e colaboradores (2016), no qual os autores avaliaram a estabilidade do DNA de HBV armazenado a 4°C por 30 dias e os resultados encontrados também revelam que não ocorreu redução significativa da carga viral nesse período e condição de armazenamento.

5 CONCLUSÃO

As amostras para CV de HBV liofilizadas, após serem armazenadas em geladeira, temperatura ambiente e estufa 35°C, mantiveram a carga viral muito semelhante à observada com a amostra inicial não liofilizada e apresentaram boa estabilidade. As amostras que ficaram a 45°C perderam a capacidade de reidratação e, por isso, não tiveram sua CV quantificada.

Devido a carga viral ter permanecido estável na maioria das condições de armazenamento, as amostras liofilizadas para CV de HBV foram validadas e passarão a integrar os painéis AEQ-CV do Programa de Avaliação Externa da Qualidade para as Redes de Carga Viral Rápida e Convencional do Ministério da Saúde.

Em relação ao problema de hidratação encontrado nas amostras armazenadas a 45°C, como perspectiva, foi avaliada a possível proteção com adição de trealose às amostras para CV (HIV, HCV e HBV) a serem liofilizadas, assunto do capítulo 2 deste TCC.

6 REFERÊNCIAS

- ABRAVANEL, Florence *et al.*. Performance of the Xpert HBV Viral Load assay versus the Aptima Quant assay for quantifying hepatitis B virus DNA. **Diagnostic Microbiology And Infectious Disease**, [S.L.], v. 96, n. 2, p. 114946, fev. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2019.114946>.
- ALMEIDA, R.W. de *et al.*. Hepatitis B virus DNA stability in plasma samples under short-term storage at 42°C. **Brazilian Journal Of Medical And Biological Research**, [S.L.], v. 48, n. 6, p. 553-556, jun. 2015. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1414-431x20144040>.
- AUZIN, Ali M. *et al.*. Rapid, random-access, and quantification of hepatitis B virus using the Cepheid Xpert HBV viral load assay. **Journal Of Medical Virology**, [S.L.], v. 93, n. 6, p. 3999-4003, 25 ago. 2020. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.26392>.
- BALERIOLA, Cristina *et al.*. Stability of Hepatitis C Virus, HIV, and Hepatitis B Virus Nucleic Acids in Plasma Samples after Long-Term Storage at -20 o C and -70 o C. **Journal Of Clinical Microbiology**, [S.L.], v. 49, n. 9, p. 3163-3167, set. 2011. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.02447-10>.
- BAZZO, M. L. *et al.* **Programa da Qualidade da Rede Nacional de Laboratórios para Diagnóstico e Monitoramento da Infecção pelo HIV no Brasil no período de 2008 a 2015**. In: 10º CONGRESSO BRASILEIRO DE HIV/AIDS e 3º CONGRESSO BRASILEIRO HEPATITES VIRAIS (HepAids 2015), João Pessoa, 2015.
- BEZERRA, Fábila; ARAÚJO, Mariana M. Zanotto de. **Validação de ensaios em Análises Clínicas**. 2021. Disponível em: <https://newslab.com.br/secao-minuto-laboratorio-validacao-de-ensaios-em-analises-clinicas/>. Acesso em: 18 abr. 2023.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para o tratamento da hepatite viral crônica B e coinfeções** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. – Brasília: Ministério da Saúde, 2010. 132 p.: il. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos) ISBN 978-85-334-1687-1.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Estratégias para viabilizar transporte mais econômico e ampliar os marcadores avaliados no Programa Nacional de Avaliação Externa da Qualidade no Brasil para a rede de laboratórios de Sorologia para Sífilis e monitoramento das infecções pelo HIV e Hepatites Virais**. Brasília: Ministério da Saúde, 2021a.
- BROGNA, Raffaele *et al.*. Increasing storage stability of freeze-dried plasma using trehalose. **Plos One**, [S.L.], v. 15, n. 6, p. 0234502, 11 jun. 2020. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0234502>.
- CEPHEID. **Xpert® HBV Viral Load**. Suécia: Rev. D, 2020. 22 p.
- CEPHEID. **Xpert® HCV Viral Load**. Suécia: Rev. D, 2016. 24 p.
- CEPHEID. **Xpert® HIV-1 Viral Load**. Suécia: Rev. C, 2015. 22 p.

JACKSON, Kathy *et al.*. Real-world application of the Xpert® HBV viral load assay on serum and dried blood spots. **Journal Of Medical Virology**, [S.L.], v. 93, n. 6, p. 3707-3713, 22 nov. 2020. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.26662>.

JOSÉ, Marta; GAJARDO, Rodrigo; JORQUERA, Juan I.. Stability of HCV, HIV-1 and HBV nucleic acids in plasma samples under long-term storage. **Biologicals**, [S.L.], v. 33, n. 1, p. 9-16, mar. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biologicals.2004.10.003>.

PAWLOTSKY, J. Measuring hepatitis C viremia in clinical samples: can we trust the assays?. **Hepatology**, [S.L.], v. 26, n. 1, p. 1-4, jul. 1997. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1002/hep.510260131>.

SAAG, M.s. *et al.*. HIV viral load markers in clinical practice. **Nature Medicine**, [S.L.], v. 2, n. 6, p. 625-629, jun. 1996. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nm0696-625>.

SEBIRE, Kimberley *et al.*. Stability of Human Immunodeficiency Virus RNA in Blood Specimens as Measured by a Commercial PCR-Based Assay. **Journal Of Clinical Microbiology**, [S.L.], v. 36, n. 2, p. 493-498, fev. 1998. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.36.2.493-498.1998>.

VAUGHAN, Helen *et al.*. Stability of lyophilised specimens for the molecular detection of viral DNA/RNA. **Journal Of Clinical Virology**, [S.L.], v. 35, n. 2, p. 135-140, fev. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2005.06.001>.

ZHANG, Xiaolian *et al.*. Impact of Storage Time on Hepatitis B Virus DNA Stability in Clinical Specimens Determined by Quantitative Real-time PCR. **Clinical Laboratory**, [S.L.], v. 62, n. 05/2016, p. 887-891, maio 2016. Clinical Laboratory Publications. <http://dx.doi.org/10.7754/clin.lab.2015.150919>.

CAPÍTULO 2 - PAINÉIS LIOFILIZADOS COM TREALOSE

1 INTRODUÇÃO

Entre as ações do Programa AEQ é desenvolvida a Avaliação Externa da Qualidade da Carga Viral (AEQ-CV) das redes rápida e convencional, já exemplificadas na introdução do Capítulo 1. De acordo com a validação inicial, feita no LBMMS em 2021, para quantificação da carga viral de HCV e HIV realizada no equipamento Cepheid – GeneXpert®, essas amostras perdem 25% da carga viral após a liofilização (Brasil, 2021a) e ficam estáveis por apenas 21 dias quando armazenadas em temperatura ambiente (BRASIL, 2021a). O prazo da rodada AEQ se limita a esses 21 dias de estabilidade divididos entre a produção, o envio (transporte) e a execução pelo profissional na instituição, o que dificulta a participação das instituições em locais remotos.

1.1 LIOFILIZAÇÃO

A liofilização é um método utilizado para preservação a longo prazo de materiais biológicos, incluindo células ou seus componentes, como os ácidos nucleicos (Mehanna e Abla, 2022; Paoli, 2005). No processo de liofilização, ocorre a secagem da amostra (previamente congelada) a partir da retirada da água, que passa do estado sólido diretamente para o estado gasoso (sublimação), o que garante maior estabilidade, viabilidade e segurança biológica (Brasil, 2021a; Silva, 2022). O procedimento é constituído por três etapas: (1) fase de congelamento: quando a água passa do estado líquido para o sólido; (2) secagem primária: o gelo formado é transformado em vapor com a utilização de vácuo; (3) secagem secundária: eliminação do restante de água que ainda possa ter restado na amostra (Mehanna e Abla, 2022; Paoli, 2005). Entretanto, durante essas etapas, as amostras são expostas a situações extremas, de congelamento e desidratação que podem alterar as condições físicas e químicas da amostra, causando danos e afetando sua qualidade (Brogna *et al.*, 2020; Mehanna e Abla, 2022; Paoli, 2005). No congelamento, o dano causado pode ser devido a formação de cristais de gelo intra e extracelular, já a retirada da água, afeta as propriedades dos fosfolipídeos e provoca a desnaturação de proteínas, pois a perda das ligações de hidrogênio entre as proteínas faz com que elas interajam entre si e percam sua função (Brogna *et al.*, 2020; Crowe *et al.*, 1990; Paoli, 2005). Além disso, pode ocorrer acúmulo e interação de espécies reativas de oxigênio com lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos da amostra, interferindo em suas estruturas e atividades, o que pode acarretar na desnaturação de proteínas e alteração da carga viral do plasma (Brogna *et al.*, 2020; Paoli, 2005). Dessa forma, acredita-se que uma ou mais

dessas alterações causadas pela liofilização seja responsável por afetar as amostras, ocasionando a queda de 25% da carga viral.

1.2 TREALOSE

A liofilização necessita de uma substância que promova a proteção das biomoléculas durante o congelamento e a desidratação (Brojna *et al.*, 2020). Existem vários crioprotetores que promovem a preservação contra o estresse do congelamento e secagem, como o glicerol, prolina, sacarose, glicose, trealose, maltose, manitol, sorbitol, glicina, entre outros (Bakaltcheva *et al.*, 2007; Brojna *et al.*, 2020; Crowe *et al.*, 1990; Elbrink *et al.*, 2023; Mehanna e Abla, 2022), mas especialmente e exclusivamente os dissacarídeos, como a trealose, possuem maior sucesso em sua ação protetora e de estabilidade (Bakaltcheva *et al.*, 2007; Brojna *et al.*, 2020; Crowe *et al.*, 1990; Mehanna e Abla, 2022). Há três hipóteses que tentam explicar este fato: (1) da substituição da água por pontes de hidrogênio, durante a desidratação extrema, evita a desnaturação de proteínas e garante a estabilização de membranas com ligações de hidrogênio flexíveis (Crowe *et al.*, 1990; Luo; Li; Wang, 2008; Mehanna e Abla, 2022); (2) da vitrificação, que ocorre na fase de secagem, a trealose forma uma espécie de vidro, o que estabiliza moléculas secas (Luo; Li; Wang, 2008; Mehanna e Abla, 2022); (3) da estabilização química, já que não ocorrem alterações em sua estabilidade quando a trealose é exposta a altas temperaturas e pH baixo (Luo; Li; Wang, 2008). Esses diferentes mecanismos permitem a trealose ser usada em uma grande gama de experimentos, que vão desde congelamentos, atuando como crioprotetor, preservação de proteínas e células, revestimento de alimentos secos e ainda, protegendo amostras que são submetidas ao vácuo (Lins; Pereira; Hünenberger, 2004).

1.3 JUSTIFICATIVA

Analisando-se a abrangência e importância da AEQ-CV, aumentar a estabilidade das amostras da AEQ-CV, para mais de 21 dias, é desejável para melhorar os processos de produção e distribuição dos painéis associada à necessidade de reduzir a perda da carga viral após a liofilização. Essas mudanças irão possibilitar que a produção de painéis possa ser feita com maior antecedência, além de garantir a estabilidade até os locais mais distantes e aumentar o tempo de testagem.

Portanto, neste capítulo investigamos se a adição de alguma substância na amostra que será liofilizada, evitaria a perda da carga viral após o processo de liofilização e aumentaria a validade dos painéis em temperatura ambiente. Nossa hipótese foi de que a trealose, quando

adicionada à amostra, protege o material genético e impede que a liofilização afete a carga viral após a liofilização e apresente influência positiva na estabilidade da CV. Dessa forma, o objetivo deste capítulo foi aprimorar o processo de liofilização de amostras de plasma de HIV, HBV e HCV por meio da inserção de trealose às amostras antes da liofilização.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 SELEÇÃO DA TREALOSE

Ao realizar-se os orçamentos da trealose, deparou-se com duas apresentações, uma laboratorial e outra alimentícia. Nossa inexperiência com esta molécula nos levou a testar as duas apresentações. A trealose alimentícia, é mais barata, o que seria vantajoso, caso os resultados demonstrassem eficácia. Foram testadas a Trealose - Puro da marca Ingredientes Online que passaremos a chamar de trealose alimentícia e a D-(+)-Trehalose dihydrate da marca Chem-Gold, a trealose laboratorial. A partir delas, foram testadas diferentes formas de dissolução do pó, desde o preparo de solução-mãe até a adição de trealose diretamente na amostra.

2.2 PREPARO DE SOLUÇÃO-MÃE

Considerando a solubilidade de 1g/1ml foi preparada uma solução-mãe para ambos os solutos. Dois (2) gramas de trealose foram diluídos em 2 ml de água ultrapura do tipo I. A partir da solução-mãe foi adicionada trealose para concentração final de 10% (Brogna *et al.*, 2020), conforme Figura 6.

Figura 6 - Preparação das amostras de HCV pura (sem trealose), com trealose laboratorial e com trealose alimentícia



Fonte: a autora, 2024.

Após a seleção das amostras com HIV, HCV e HBV (provenientes do mesmo estudo, com aprovação no comitê de ética, já citado no tópico 2.1 AMOSTRAGEM, dos materiais e métodos do capítulo 1), todas tiveram sua carga viral quantificada no GeneXpert® utilizando-se os kits Xpert® HIV-1 Viral Load, Xpert® HCV Viral Load e Xpert® HBV Viral Load respectivamente, para verificação da CV anteriormente à liofilização. Da mesma forma, após o processo, tanto as amostras puras quanto as com as duas apresentações de trealose, tiveram a carga viral quantificada.

2.3 ADIÇÃO DE TREALOSE DIRETAMENTE NA AMOSTRA

Diferente do protocolo anterior, testou-se a adição da trealose (pó) diretamente no plasma, sem diluir em água. Neste protocolo foram realizados dois testes pilotos e um teste final já com etapa bem estabelecida.

Primeiramente, 0,75 gramas de trealose foram misturadas e homogeneizadas em 7,5ml de amostra de agravo, totalizando 10% do produto nas amostras de plasma. Em um segundo teste, aumentou-se para seis frascos e assim, necessitou-se de 1,250 gramas de trealose que foram dissolvidos em 12,5 ml de amostra de cada agravo. Para uma melhor homogeneização, a amostra já com trealose, foi colocada por 10 minutos na mesa agitadora orbital na velocidade de 19,2 (100 rpm) e sempre homogeneizada antes de ser pipetada em cada *vial*.

Por fim, após a padronização da quantidade e das etapas de preparo e homogeneização, foi realizado um último teste. Para pipetar todas as alíquotas necessárias, diluiu-se as amostras com alta carga viral em 215 ml de plasma não reagente (previamente caracterizado e negativo para todos os agravos). Para HIV e HCV foram diluídos 1,25 ml e 1,9 ml de amostra, respectivamente. Posteriormente, testou-se cada agravo em duplicata no Cepheid – GeneXpert® para verificar qual foi a carga viral obtida antes do processo de liofilização.

Para todos os agravos, foram realizadas as mesmas etapas e quantitativos descritos a seguir e observáveis na Figura 7. Da amostra inicial, foi separado 105,6 ml e utilizando-se de uma balança de precisão, pesou-se em um béquer 10,56 gramas de trealose (totalizando 10% de trealose). Essa amostra foi levada para uma mesa agitadora orbital na velocidade 27 (163,6 rpm) por 10 minutos para dissolver e misturar a trealose. Para auxiliar na homogeneização, usou-se uma alça estéril para misturar a amostra até que toda a trealose estivesse dissolvida e então, retornou-se a amostra para a mesma mesa agitadora, na mesma velocidade, por mais 10 minutos. Posteriormente, foram pipetados 1,2 ml em 85 *vials* da amostra com a adição de trealose e outros 85 *vials* da amostra inicial sem trealose, homogeneizando regularmente a amostra com movimentos circulares, durante a pipetagem.

Figura 7 - Preparo de amostras puras e com trealose para CV de HIV, HCV e HBV



Fonte: a autora, 2024.

2.4 LIOFILIZAÇÃO E TESTAGEM DAS AMOSTRAS

Após o preparo das amostras puras e com trealose, os frascos foram agrupados com o auxílio de um elástico e colocados nas bandejas próprias para o liofilizador e envoltas com

plástico/papel filme (já que as tampas só foram colocadas depois da finalização do processo) conforme observa-se na Figura 8.

Figura 8 - Amostras agrupadas e envoltas por plástico filme



Fonte: a autora, 2024.

O equipamento utilizado foi o Liofilizador LS6000 da marca Terrone e o protocolo experimental se baseou no dos experimentos realizados no LBMMS. Após as amostras terem sido colocadas nas bandejas, foram congeladas de forma gradativa (Brasil, 2021a). No congelamento gradativo, as amostras são armazenadas em freezer -20°C por no mínimo 3 horas e em seguida, por mais 24 horas em freezer -80°C , antes de serem levadas ao liofilizador.

Após o término da liofilização, para verificação da CV, duplicatas de amostras puras e com trealose para cada agravo foram testadas no Cepheid – GeneXpert®, utilizando-se os kits Xpert® HIV-1 Viral Load, Xpert® HCV Viral Load e Xpert® HBV Viral Load. O restante das amostras puras e com trealose para cada agravo, em torno de 20 para cada condição, foram fechadas com tampa e lacradas, e armazenadas em geladeira (2°C a 8°C), temperatura ambiente (21°C a 25°C), estufa a 35°C e estufa a 45°C , onde permaneceram por 7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias. Para hidratar a amostra, foi utilizado 1,2 ml de água ultrapura do tipo 1 e esperado o tempo de, no mínimo, 30 minutos para a completa reidratação. Caso fossem observados grumos, o tempo de repouso foi aumentado.

2.5 EQUIPAMENTO CEPHEID – GENEXPERT®

Os testes realizados no equipamento Cepheid – GeneXpert® consistem em um ensaio de quantificação da carga viral, que determina a concentração de material genético (DNA ou

RNA) do vírus em plasma ou soro humano (Cepheid, 2015; Cepheid, 2016; Cepheid, 2020; Abravanel *et al.*, 2020).

Para execução dos testes, são utilizados cartuchos que possuem os reagentes necessários para realizar a PCR em tempo real bem como dois controles internos (Cepheid, 2015; Cepheid, 2016; Cepheid, 2020). Para a quantificação de HIV com o kit Xpert® HIV-1 Viral Load têm-se um intervalo de detecção da carga viral entre 40 e 10.000.000 cópias/ml, o kit Xpert® HBV Viral Load para HBV de 10 a 1.000.000.000 UI/ml e o kit Xpert® HCV Viral Load para HCV é de 10 UI/ml a 100.000.000 UI/ml (Cepheid, 2015; Cepheid, 2016; Cepheid, 2020; ABRAVANEL *et al.*, 2020).

Para realização de todos os testes, foram seguidos os manuais de cada kit, utilizando inclusive a pipeta do kit correspondente que conforme a marcação, já pipeta a quantidade de amostra necessária para realização do ensaio. Conforme o manual do kit para HIV e HCV, é necessário, no mínimo, 1 ml de amostra para o equipamento realizar o ensaio de forma eficiente (Cepheid, 2015; Cepheid, 2016). Já na bula de teste de HBV é indicado que se necessita adicionar no cartucho apenas 600 µl de amostra para a correta execução do ensaio (Cepheid, 2020).

2.6 ANÁLISE DOS RESULTADOS DE CARGA VIRAL

Após a quantificação viral, analisou-se e comparou-se os resultados antes e após a liofilização com trealose, verificando-se a estabilidade e a eficiência da proteção contra a perda da carga viral.

Nos testes das duas apresentações de trealose analisou-se se a porcentagem de queda da carga viral havia sido significativa. Posteriormente, para a análise de eficácia da trealose laboratorial escolhida, os valores foram analisados em escala de $\log(10)$, já fornecidos pelo equipamento. Foi admitido como significativa a diferença superior ou inferior a 0,5 log, pois valores menores de 0,5 log são considerados variações intra-ensaios aceitáveis para testes moleculares (Baleriola *et al.*, 2011; Pawlotsky, 1997; Saag *et al.*, 1996; Sebire *et al.*, 1998). Ademais, elaborou-se gráficos para melhor visualização e entendimento dos dados, além de calcular o desvio padrão e coeficiente de variação para comparação dos resultados. Para o coeficiente de variação, adotou-se valores seguros ou baixos quando inferiores a 10%, pois quanto menor o valor, menor a variação, médios de 10 a 20%, altos de 20 a 30% e muito altos acima de 30% (Gomes, 1990). Para todas as tabelas, cálculos e gráficos apresentados, foi utilizado o Planilhas Google.

3 RESULTADOS

3.1 RESULTADO DA SOLUÇÃO-MÃE

O primeiro teste piloto realizado foi com o preparo de uma solução-mãe com trealose e posterior adição nas amostras. Na Tabela 2 consta a carga viral dos três agravos (HIV, HCV e HBV) antes da liofilização e após o processo, com amostras puras (sem trealose) e outras com adição de trealose laboratorial e alimentícia.

Tabela 2 - Carga viral do primeiro teste com trealose

Teste 1 - Carga viral							
Agravo	Puro (antes da liofilização)	Puro (após liofilização)	Queda	Trealose lab (após liofilização)	Queda	Trealose alim. (após liofilização)	Queda
HIV (cópias/ml)	25700	18700	27,0%	18400	28,50%	17400	32,3%
HCV (UI/ml)	77600	76400	1,5%	52900	32,00%	33400	57,0%
HBV (UI/ml)	43100	16900	61,0%	23200	46,00%	16400	62,0%

Fonte: Elaborada pela autora (2024)

Neste primeiro resultado, a carga viral do HIV puro apresentou a queda esperada, de 27%. Entretanto, o modo como a trealose foi adicionada, não foi suficiente para proteger a carga viral, sendo que ocorreu uma queda de 28,50%. Já a amostra pura de HCV, praticamente não teve sua CV afetada e novamente a trealose laboratorial não impediu a queda da CV da amostra. Nas amostras de HBV observa-se uma diminuição significativa da CV nas três amostras, mas dessa vez, o melhor resultado foi da trealose laboratorial. Independente do agravo, a amostra que apresentou a maior queda sempre foi a com adição de trealose alimentícia.

Os resultados desse primeiro teste piloto não foram satisfatórios, apresentando quedas significativas e oscilantes sem manter um padrão. Dessa forma, foi alterada a metodologia inicial que consistia em adicionar a trealose em água primeiramente e então, misturá-la com a amostra. Após a alteração, a trealose foi adicionada diretamente na amostra, para verificar se teria maior eficácia. Além disso, foi aumentado o número de amostra para triplicatas, para se ter um melhor parâmetro dos resultados. Por se mostrar inferior, a trealose alimentícia foi excluída do estudo.

3.2 ADIÇÃO DE TREALOSE DIRETAMENTE NA AMOSTRA

3.2.1 Primeiro teste

Os resultados do primeiro teste realizado com adição de trealose diretamente nas amostras podem ser observados na Tabela 3.

Tabela 3 - Carga viral do segundo teste de adição de trealose

Teste 1 com trealose diretamente na amostra - Carga viral								
Agravo	Antes da liofilização	CV média	Puro (após liofilização)	CV média	Queda	Trealose lab (após liofilização)	CV média	Queda
HIV (cópias/ml)	84700		58800			63600		
	82100	81000	60400	60500	25,30%	65300	64100	20,90 %
	76200		62300			63400		
HCV (UI/ml)	57700		32400			33600		
	39000	47200	31900	32700	30,70%	46900	39000	17,40%
	45100		33800			36600		
HBV (UI/ml)	26400		20400		22,80%	31600		10,30%
	22300	28100	42800	34500	de	32500	31000	de
	35700		40400		aumento	29100		aumento

Fonte: Elaborada pela autora (2024)

Neste primeiro teste com adição direta do sal de trealose na amostra, os resultados se mostraram mais satisfatórios já que as amostras com trealose laboratorial apresentaram bons resultados, com menor queda quando comparada com as amostras puras. Entretanto, os dados observados para HBV apresentaram um aumento da carga viral que não era esperado, tanto para amostras puras quanto para aquelas com adição de trealose laboratorial.

3.2.2 Segundo teste

Para certificar-se que a trealose estaria exercendo o seu papel protetor foi realizado ainda um segundo teste antes de aplicá-la em um número maior de amostras que seriam ainda expostas a outros parâmetros. Nessa nova testagem, conforme a Tabela 4, a quantidade de amostras foi ampliada novamente, sendo no momento seis para cada agravo e devido aos resultados inesperados com o HBV, foi dada maior atenção à homogeneização das amostras, para que todas tenham a mesma quantidade de trealose.

Tabela 4 - Carga viral do terceiro teste de adição de trealose

Teste 2 com trealose diretamente na amostra - Carga viral								
Agravo	Antes da liofilização	CV média	Puro (após liofilização)	CV média	Queda	Trealose lab (após liofilização)	CV média	Queda
HIV (cópias/ml)	92900		74000			85100		
	96200		71500			79100		
	110000	94700	86600	80500	15,00%	105000	91300	3,59%
	90200		87400			75900		
	97700		98000			99000		
	81100		65400			104000		
HCV (UI/ml)	64600		29800			17400		
	37100		35500			16000		
	53200	51100	19000	33600	34,25%	39000	35600	30,30%
	52200		48800			54400		
	47100		28500			47600		
	52300		39900			39100		
HBV (UI/ml)	48400		41200			31000		
	49600		39400			30800		
	45400	48200	38100	38500	20,10%	32800	32300	33%
	56800		39400			35100		
	42700		35600			33600		
	46200		37400			30500		

Fonte: Elaborada pela autora (2024)

Conforme a Tabela 4, novamente as amostras de HIV e HCV que continham trealose apresentaram resultados com queda de CV menor do que as amostras puras. Esses testes divergiram bastante do resultado do segundo teste (Tabela 3), já que no anterior visualizou-se um aumento da CV e desta vez houve queda, sendo que de maior porcentagem nas amostras com trealose. Apesar dessa divergência e como a maioria dos resultados apresentou-se favorável, decidiu-se seguir os testes, aplicando a metodologia em todos os agravos e em um maior quantitativo de amostras, submetendo-as também a diferentes condições de armazenamento.

Dessa forma, padronizou-se todo o processo que antecede a liofilização, desde a adição de 10% de trealose laboratorial diretamente na amostra, até sua precisa homogeneização anterior e durante a pipetagem.

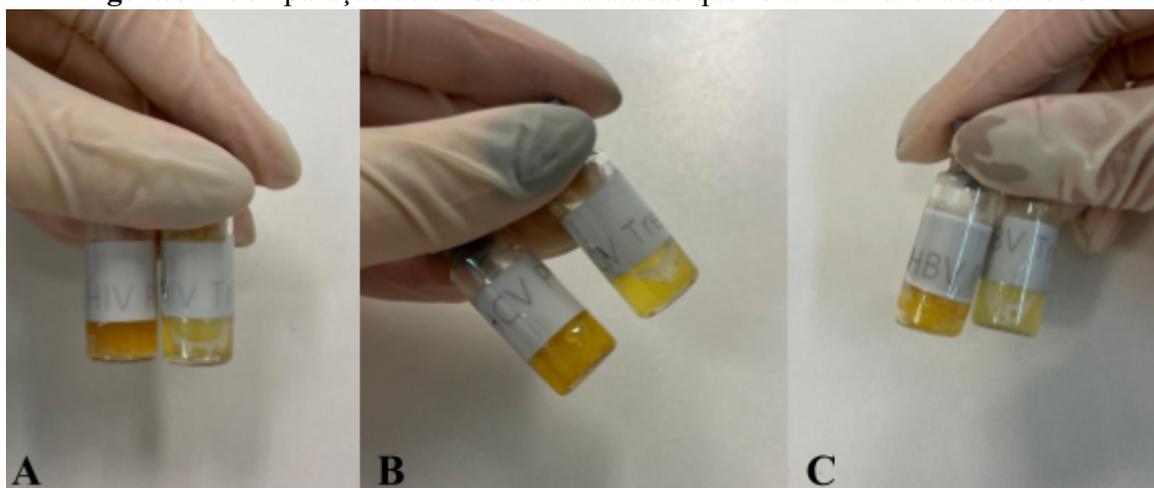
3.2.3 Terceiro teste

Todas as amostras de todos os agravos (HIV, HCV e HBV) permaneceram nas quatro condições por 42 dias. As amostras de todos os agravos que permaneceram em geladeira ficaram expostas a uma temperatura média de 3,88°C e as de temperatura ambiente, a uma temperatura média de 22,95°C. Já as amostras que ficaram em altas temperaturas, foram levadas a duas estufas, uma a 35,7°C e outra a 45°C.

Durante o período de 42 dias, não foi possível de se notar reidratação espontânea de nenhuma amostra, independente da condição de armazenamento. Tanto as amostras puras quanto as com trealose armazenadas em geladeira ou temperatura ambiente, permaneceram com o pó liofilizado íntegro e que, quando acrescido de água, teve uma dissolução homogênea, límpida e sem grumos. Já as amostras puras que ficaram na estufa com temperatura de 35°C, apresentaram turvação ou pequenos grumos, quando comparadas com às que continham trealose, que mantiveram o líquido límpido e homogêneo.

As amostras que foram armazenadas em estufa com temperatura de 45°C foram as que apresentaram a maior discrepância nos resultados. As amostras puras tiveram sérios problemas de reidratação, no 7º dia de testagem para HIV e HCV, já foi possível notar a presença de muitos grumos que dificultaram a realização do teste podendo ocasionar entupimento do equipamento (e erro no cartucho) e redução dos valores de CV. Posteriormente, no 14º dia, a testagem para essa condição de temperatura teve que ser descontinuada pois a amostra apenas reidratava até formar um grande grumo, não tendo líquido suficiente para ser adicionado ao cartucho. Do 21º dia em diante, as amostras não reidratavam, a água apenas molhava o bloco de pó liofilizado compacto, mas não era capaz de hidratá-lo. Para HBV a situação foi semelhante, a única diferença é que foi possível testá-lo até o 14º dia. A partir do 21º dia, os testes também foram cancelados devido ao problema de não ocorrer a dissolução da amostra. Já as amostras com trealose, para os três agravos, não apresentaram nenhum problema de reidratação durante os 42 dias nessa condição de temperatura. A amostra permaneceu homogênea, límpida e sem grumos. Na Figura 9, é possível observar a comparação das amostras puras e com trealose armazenadas na condição de 45°C.

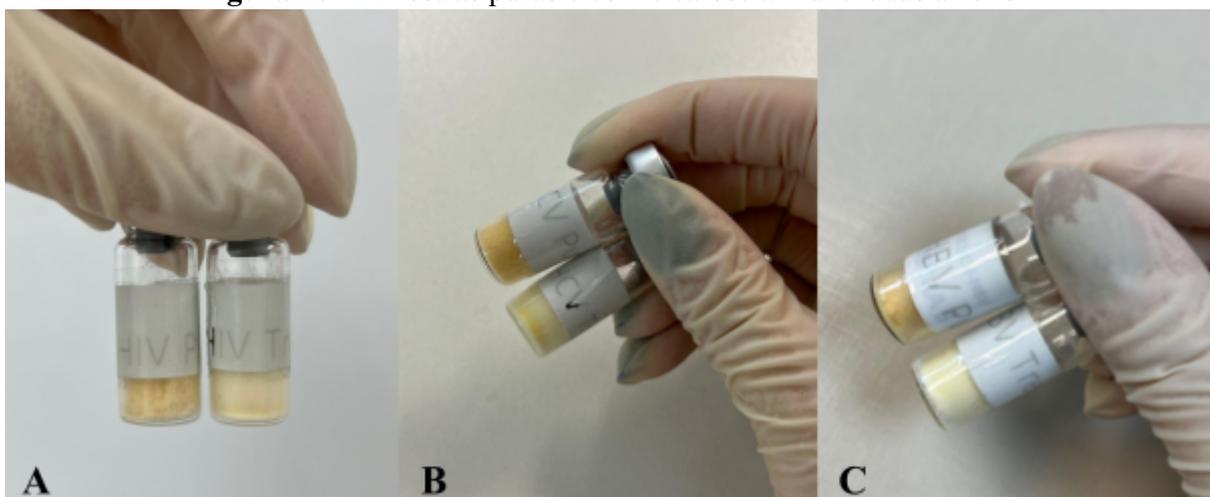
Figura 9 - Comparação de amostras hidratadas que foram armazenadas a 45°C



Legenda: (A) Amostras de HIV puro e com trealose após hidratação; (B) Amostras de HCV puro e com trealose após hidratação; (C) Amostras com HBV puro e com trealose após hidratação;

Fonte: a autora, 2024.

Os resultados mostraram que a trealose não interferiu na correta dissolução do pó liofilizado, formando um líquido de aspecto uniforme, sem grumos. Outra proteção exercida pela trealose foi observada no aspecto físico da amostra, mais especificamente na cor do pó liofilizado. As amostras puras de todos os agravos apresentaram uma coloração amarela, cada vez mais intensa ao decorrer dos dias. Em contrapartida, as amostras acrescidas de trealose não tiveram alteração de cor, permanecendo com a cor inicial de antes do armazenamento na estufa, que era um pó branco ou levemente amarelo. Nas Figuras 9 e 10 é possível comparar as amostras puras e com trealose. Pode-se observar como a cor das amostras puras foi alterada, para uma coloração mais intensa, quando armazenadas a 45°C, tanto no pó liofilizado, quanto depois da hidratação.

Figura 10 - Amostras puras e com trealose armazenadas a 45°C

Legenda: (A) Amostras de HIV pura e com trealose pré-hidratação; (B) Amostras de HCV puro e com trealose pré-hidratação; (C) Amostras com HBV puro e com trealose pré-hidratação;

Fonte: a autora, 2024.

3.2.3.1 HIV

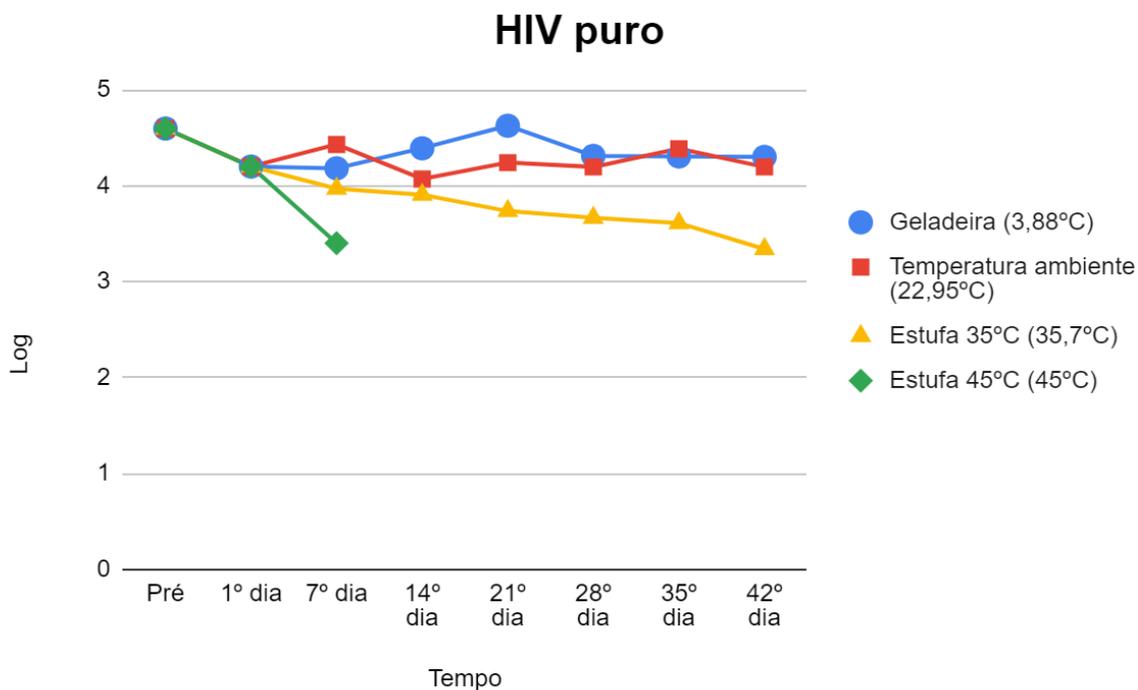
Na Tabela 5 é possível visualizar a média da carga viral das amostras de HIV puras (geradas a partir dos dados presentes no Apêndice A) ao longo dos 42 dias e juntamente, o valor médio de log correspondente. Com os valores de log foi elaborado um gráfico (Figura 11).

Tabela 5 - Carga viral e log das amostras de HIV puro

HIV puro								
Pré-liofilização (CV e log)		39400 cópias/ml		4,60 log				
1º dia (CV e log)		15800 cópias/ml		4,20 log				
Pós-liofilização	Geladeira (3,88°C)		Temperatura ambiente (22,95°C)		Estufa 35°C (35,7°C)		Estufa 45°C (45°C)	
	Carga viral	Log	Carga viral	Log	Carga viral	Log	Carga viral	Log
7º dia	15600	4,18	30850	4,43	9420	3,97	2500	3,40
14º dia	24900	4,39	13125	4,07	8000	3,90
21º dia	48350	4,62	17550	4,24	5410	3,75
28º dia	20500	4,31	15850	4,20	4670	3,66
35º dia	20200	4,30	27450	4,40	4210	3,61
42º dia	19950	4,30	15800	4,20	2210	3,34

Fonte: Elaborada pela autora (2024)
 Legenda: ... indicam que não foi avaliado por ausência de dissolução

Figura 11 - Gráfico das amostras com HIV puro



Fonte: autora, 2024.

Na Tabela 5 e Figura 9 é possível visualizar que as amostras com HIV puro tiveram queda após a liofilização. A partir do 7º dia, os resultados observados graficamente aparentaram que as amostras puras mantidas a temperatura ambiente tiveram uma menor variação ao longo dos 42 dias de teste, quando comparados aos de geladeira que tiveram aumentos e quedas mais significativas. Nota-se também como foi significativa a queda do log das amostras puras que ficaram em estufa a 35,7°C, sendo que a partir do 7º dia, a queda do log foi superior a 0,5. As que ficaram em estufa a 45°C apresentaram queda que ultrapassou o log de 0,5 e posteriormente, as testagens nesta condição foram descontinuadas.

Os resultados do desvio padrão e coeficiente de variação podem ser visualizados na Tabela 6, que corroboram os dados observados na Figura 9. Observamos que, embora apresentem certa variação, as amostras mantidas em temperatura ambiente e em geladeira, apresentaram coeficiente de variação baixo (<10). Entretanto, como já observado anteriormente, as amostras mantidas em estufa a 35°C apresentaram valores de coeficiente de variação médios e altos, acima de 10%, assim como às mantidas em estufa de 45°C.

Tabela 6 - Desvio padrão e coeficiente de variação das amostras com HIV puro

HIV puro												
Pré liof. (log)											4,60	
1º dia (log/desvio padrão/coeficiente de variação)								4,20		0,20		4,70
Tempo	Geladeira			Temperatura ambiente			Estufa 35°C			Estufa 45°C		
	log	Desvio padrão	Coeficiente de variação (%)	log	Desvio padrão	Coeficiente de variação (%)	log	Desvio padrão	Coeficiente de variação (%)	log	Desvio padrão	Coeficiente de variação (%)
7º dia	4,18	0,21	4,96	4,43	0,08	1,86	3,97	0,31	7,87	3,40	0,60	17,57
14º dia	4,39	0,10	2,33	4,07	0,26	6,45	3,90	0,35	8,83
21º dia	4,62	0,02	0,46	4,24	0,25	5,92	3,75	0,61	16,28
28º dia	4,31	0,20	4,68	4,20	0,28	6,74	3,66	0,66	17,94
35º dia	4,30	0,21	4,76	4,40	0,15	3,39	3,61	0,70	19,29
42º dia	4,30	0,21	4,85	4,20	0,28	6,74	3,34	0,89	26,57

Fonte: Elaborada pela autora (2024)

Legenda: ... indicam que não foi avaliado por ausência de dissolução

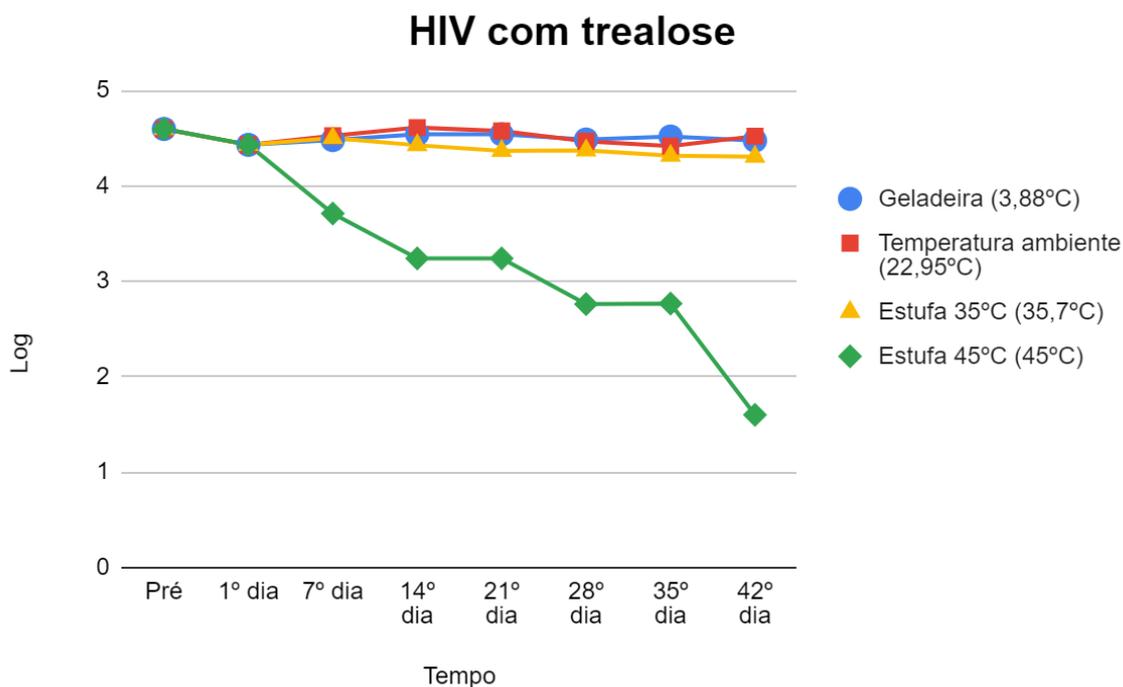
Em contrapartida, quando se analisa a Tabela 7 (gerada a partir da média dos dados presentes no Apêndice A) e a Figura 12 pode-se observar que as amostras mantidas à temperatura ambiente apresentaram uma estabilidade dos resultados discretamente maior quando comparadas às mantida em geladeira, mas os resultados de ambas as condições de armazenamento apresentaram pouca variação. Ao contrário do que se observou nas amostras puras, os resultados daquelas que tiveram a adição de trealose e foram mantidas a 35°C, mostram a proteção contra a queda dos valores de CV, sendo a maior uma redução de 0,29 log no 42° dia. Já para as amostras armazenadas em estufa a 45°C, tem-se o ponto positivo da garantia de reidratação da amostra, característica que não foi possível observar nas amostras puras. Porém, a trealose não foi capaz de impedir a queda das cargas virais das amostras com HIV armazenadas a altas temperaturas, sendo que logo no 7° dia a diminuição do log já foi maior que 0,5.

Tabela 7 - Carga viral e log das amostras de HIV com trealose

HIV com trealose								
Pré-liofilização (CV e log)		39400 cópias/ml				4,60 log		
1° dia (CV e log)		27650 cópias/ml				4,43 log		
Pós-liofilização	Geladeira (3,88°C)		Temperatura ambiente (22,95°C)		Estufa 35°C (35,7°C)		Estufa 45°C (45°C)	
	Carga viral	Log	Carga viral	Log	Carga viral	Log	Carga viral	Log
7° dia	30300	4,48	33400	4,52	32600	4,50	5350	3,71
14° dia	34650	4,54	25550	4,61	26600	4,42	2806	3,24
21° dia	34700	4,54	41550	4,57	23200	4,36	1740	3,24
28° dia	30550	4,48	29600	4,46	23850	4,37	638	2,76
35° dia	32650	4,51	26100	4,41	20550	4,31	586,5	2,76
42° dia	29900	4,47	30250	4,52	20350	4,30	40	1,60

Fonte: Elaborada pela autora (2024)

Figura 12 - Gráfico das amostras de HIV com trealose



Fonte: autora, 2024.

Os coeficientes de variação calculados na Tabela 8, confirmam as observações do estudo, indicando que os resultados das amostras com trealose são melhores, apresentaram em sua maioria valores baixos, menores que 10% de variação. A exceção foi observada apenas em amostras armazenadas em estufa a 45°C, para as quais já no 7º dia foram encontrados valores de coeficiente de variação médios (superiores a 10%) e nos 14º e 21º dias valores altos. A partir do 28º dia foram observados valores muito altos, chegando a variação de até, aproximadamente, 132,50%.

Tabela 8 - Desvio padrão e coeficiente de variação das amostras com HIV com trealose

HIV com trealose														
Pré liof. (log)												4,60		
1º dia (log/desvio padrão/coeficiente de variação)												4,43	0,08	1,86
Tempo	Geladeira			Temperatura ambiente			Estufa 35°C			Estufa 45°C				
	log	Desvio padrão	Coeficiente de variação (%)	log	Desvio padrão	Coeficiente de variação (%)	log	Desvio padrão	Coeficiente de variação (%)	log	Desvio padrão	Coeficiente de variação (%)		
7º dia	4,48	0,06	1,28	4,52	0,03	0,77	4,50	0,05	1,06	3,71	0,44	11,93		
14º dia	4,54	0,03	0,61	4,61	0,01	0,16	4,42	0,09	1,92	3,24	0,68	20,91		
21º dia	4,54	0,04	0,86	4,57	0,01	0,31	4,36	0,16	3,73	3,24	0,96	29,57		
28º dia	4,48	0,08	1,73	4,46	0,09	2,06	4,37	0,16	3,64	2,76	1,30	47,01		
35º dia	4,51	0,06	1,25	4,41	0,13	2,88	4,31	0,20	4,59	2,76	1,29	46,80		
42º dia	4,47	0,08	1,90	4,52	0,05	1,17	4,30	0,21	4,76	1,60	2,12	132,36		

Fonte: Elaborada pela autora (2024)

3.2.3.2 HCV

A Tabela 9 sintetiza a média das cargas virais e os respectivos valores de log das amostras com HCV puro (geradas a partir dos dados presentes no Apêndice B). Inicialmente, após a liofilização, não ocorreu a queda do valor de log e a partir do 7º dia de teste, observou-se que as amostras mantidas à temperatura ambiente apresentaram valores levemente maiores quando comparados aos valores encontrados para as amostras armazenadas em geladeira. Ambos tiveram algumas quedas, mas no geral apresentaram uma estabilidade semelhante, sendo que todas as diferenças de valores de log foram inferiores a 0,5, então nenhuma queda foi significativa e a variação foi aceitável. Uma queda nítida e significativa, com valores superiores a 0,5 log, ocorreu nas amostras que foram armazenadas em estufa a 35°C a partir do 21º dia de teste, momento em que a temperatura começou a afetar a carga viral. As amostras mantidas em estufa a 45°C apresentaram queda significativa já no 7º dia e, a partir do 14º dia, não foi mais possível de realizar-se a testagem devido a problemas de reidratação.

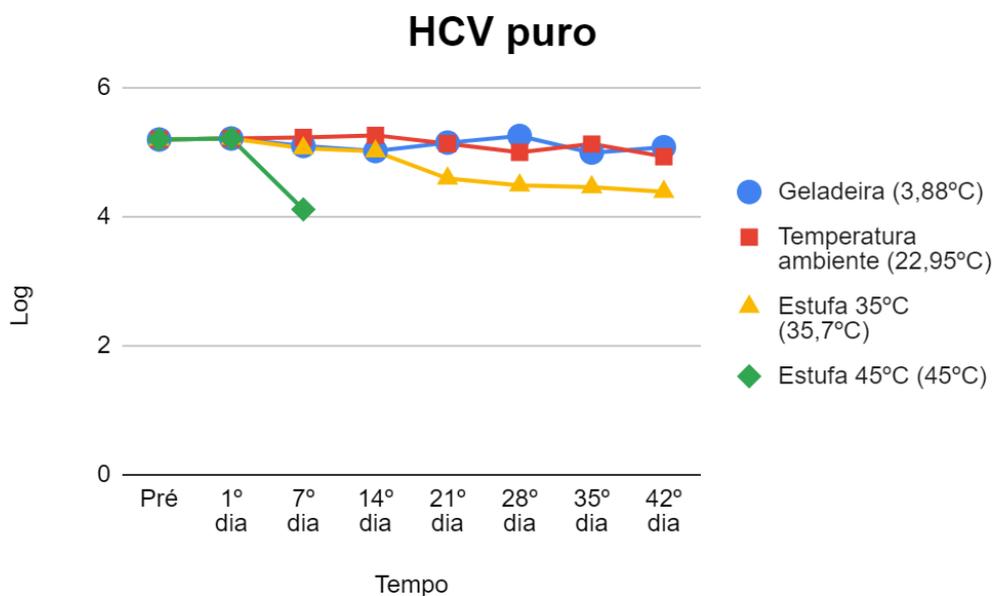
Tabela 9 - Carga viral e log das amostras de HCV puro

HCV puro								
Pré-liofilização (CV e log)			162000 UI/ml		5,20 log			
1º dia (CV e log)			161000 UI/ml		5,21 log			
Pós-liofilização	Geladeira (3,88°C)		Temperatura ambiente (22,95°C)		Estufa 35°C (35,7°C)		Estufa 45°C (45°C)	
	Carga viral	Log	Carga viral	Log	Carga viral	Log	Carga viral	Log
7º dia	127500	5,10	169000	5,22	115000	5,06	12900	4,11
14º dia	105000	5,01	185500	5,26	102050	5,01
21º dia	141500	5,14	136000	5,13	41350	4,59
28º dia	187500	5,25	107500	4,99	30550	4,48
35º dia	97350	4,99	134000	5,12	29550	4,45
42º dia	118500	5,07	85250	4,93	24350	4,38

Fonte: Elaborada pela autora (2024)

Legenda: ... indicam que não foi avaliado por ausência de dissolução

Figura 13 - Gráfico das amostras com HCV puro



Fonte: autora, 2024.

Os resultados dos desvios padrões e dos coeficientes de variação podem ser visualizados na Tabela 10. Nesses dados, observa-se que o coeficiente de variação das amostras puras mantidas em geladeira e temperatura ambiente foram baixos, não chegando a 4%. Já as amostras a 35°C foram afetadas após o 21º dia, chegando a coeficientes de variação médios, assim como observado para as amostras mantidas a 45°C.

Tabela 10 - Desvio padrão e coeficiente de variação das amostras com HCV puro

HCV puro												
Pré liof. (log)											5,20	
1º dia (log/desvio padrão/coeficiente de variação)							5,21		0,01		0,14	
Tempo	Geladeira			Temperatura ambiente			Estufa 35°C			Estufa 45°C		
	log	Desvio padrão	Coeficiente de variação (%)	log	Desvio padrão	Coeficiente de variação (%)	log	Desvio padrão	Coeficiente de variação (%)	log	Desvio padrão	Coeficiente de variação (%)
7º dia	5,10	0,05	0,98	5,22	0,01	0,29	5,06	0,07	1,33	4,11	0,54	13,20
14º dia	5,01	0,09	1,79	5,26	0,03	0,62	5,01	0,09	1,85
21º dia	5,14	0,04	0,69	5,13	0,05	0,90	4,59	0,43	9,32
28º dia	5,25	0,04	0,74	4,99	0,14	2,83	4,48	0,50	11,19
35º dia	4,99	0,14	2,90	5,12	0,05	0,97	4,45	0,52	11,75
42º dia	5,07	0,08	1,67	4,93	0,19	3,80	4,38	0,57	13,06

Fonte: Elaborada pela autora (2024)

Legenda: ... indicam que não foi avaliado por ausência de dissolução

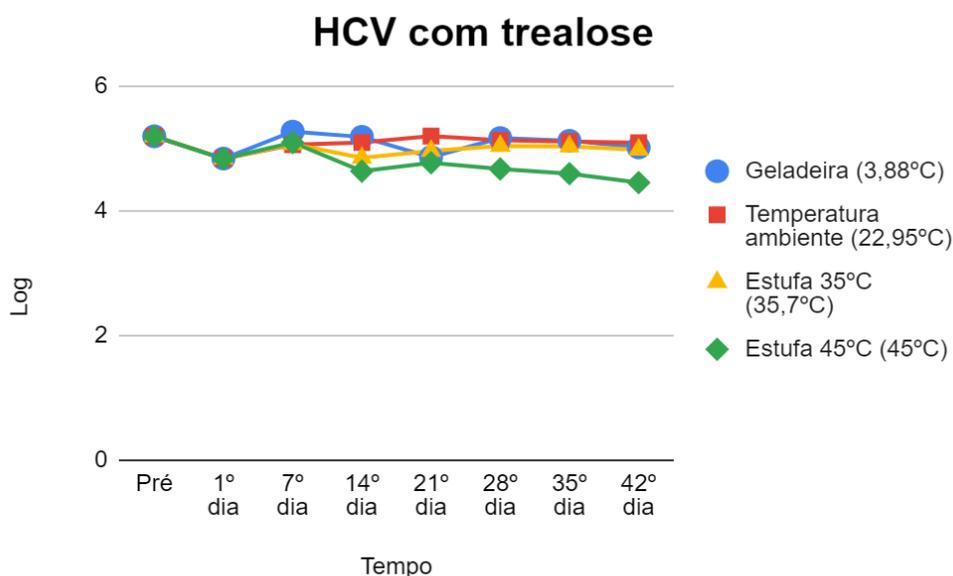
A Tabela 11 (gerada a partir da média dos dados presentes no Apêndice B) e Figura 14 mostram a estabilidade das amostras de HCV com trealose nas diferentes condições de armazenamento.

Tabela 11 - Carga viral e log das amostras de HCV com trealose

HCV com trealose								
Pré-liofilização (CV e log)		162000 UI/ml				5,20 log		
1º dia (CV e log)		68850 UI/ml				4,83 log		
Pós-liofilização	Geladeira (3,88°C)		Temperatura ambiente (22,95°C)		Estufa 35°C (35,7°C)		Estufa 45°C (45°C)	
	Carga viral	Log	Carga viral	Log	Carga viral	Log	Carga viral	Log
7º dia	186000	5,27	126133	5,06	122733	5,07	125000	5,10
14º dia	156500	5,18	125000	5,10	71600	4,85	44800	4,63
21º dia	73150	4,86	160500	5,20	91100	4,96	64300	4,77
28º dia	149000	5,16	135500	5,13	119000	5,04	46950	4,67
35º dia	135000	5,12	134833	5,11	108000	5,03	39400	4,60
42º dia	103750	5,01	123500	5,09	94800	4,98	28200	4,45

Fonte: Elaborada pela autora (2024)

Figura 14 - Gráfico das amostras de HCV com trealose



Fonte: autora, 2024.

Essas amostras apresentaram uma queda na carga viral logo após a liofilização e posteriormente apresentaram certas variações, tanto nas armazenadas em geladeira e temperatura ambiente, quanto as armazenadas em estufa a 35°C. A partir do 21º dia houve uma estabilização, sendo que as amostras armazenadas em geladeira, temperatura ambiente e em 35°C e 45°C tiveram resultados semelhantes, como é possível observar na proximidade das linhas no gráfico da Figura 14. As amostras armazenadas em geladeira, apresentaram resultados discretamente maiores na maioria das vezes e também, é notório os excelentes resultados observados nas amostras com trealose mantidas em estufa a 35°C quando comparadas com as amostras de HCV puras. Não foram observadas quedas significativas. Da mesma forma, pode-se concluir que nenhuma queda foi significativa nas amostras armazenadas em geladeira, temperatura ambiente e estufa 35°C, pois a variação ficou dentro de 0,5 log, conforme esperado (nenhuma foi superior a 0,36 log). Outro dado interessante foi o resultado superior observado nas amostras de HCV com trealose armazenadas em estufa a 45°C, um ponto importante que se destacou foi que nessa condição as amostras mantiveram a capacidade de reidratação permanecendo aptas para serem testadas, fato que não foi possível observar nas amostras puras. Os resultados da carga viral, embora menores do que os observados nas outras condições de armazenamento, não foram tão desfavoráveis, apresentando queda um pouco mais significativa a partir do 28º dia de estudo, no qual a variação de log passou a ser maior do que 0,5.

Na Tabela 12, estão apresentados os desvios padrões e os coeficientes de variação das amostras de HCV com trealose. Essas amostras demonstraram porcentagem de coeficiente de variação estável, com valores abaixo de 4% na maioria dos resultados. Os coeficientes mais altos foram registrados apenas nas amostras mantidas em estufa a 45°C e valores médios, acima de 10%, foram observados apenas no 42º dia de teste.

Tabela 12 - Desvio padrão e coeficiente de variação das amostras com HCV com trealose

HCV com trealose												
Pré liof. (log)												5,20
1º dia (log/desvio padrão/coeficiente de variação)							4,83	0,18			3,72	
Tempo	Geladeira			Temperatura ambiente			Estufa 35°C			Estufa 45°C		
	log	Desvio padrão	Coeficiente de variação (%)	log	Desvio padrão	Coeficiente de variação (%)	log	Desvio padrão	Coeficiente de variação (%)	log	Desvio padrão	Coeficiente de variação (%)
7º dia	5,27	0,04	0,71	5,06	0,07	1,33	5,07	0,06	1,23	5,10	0,05	0,98
14º dia	5,18	0,01	0,10	5,10	0,05	0,98	4,85	0,17	3,56	4,63	0,28	6,04
21º dia	4,86	0,24	4,87	5,20	0,00	0,07	4,96	0,17	3,35	4,77	0,30	6,30
28º dia	5,16	0,02	0,41	5,13	0,05	0,90	5,04	0,11	2,17	4,67	0,37	7,95
35º dia	5,12	0,05	0,97	5,11	0,06	1,18	5,03	0,12	2,32	4,60	0,42	9,23
42º dia	5,01	0,13	2,54	5,09	0,07	1,46	4,98	0,15	3,05	4,45	0,53	11,84

Fonte: Elaborada pela autora (2024)

3.2.3.3 HBV

Entre os agravos testados, o HBV foi o que apresentou os melhores resultados, tanto para as amostras puras quanto para as aditivadas com trealose, sendo a diferença praticamente insignificante. Inicialmente, como se observa na Tabela 13 (gerada a partir da média dos dados presentes no Apêndice C) e na Figura 15, não ocorreu queda da carga viral da amostra pura de HBV logo após a liofilização, apresentando uma leve queda no 7º dia de testagem para as amostras em todas as condições de armazenamento. Posteriormente, ocorreu uma estabilização dos valores de log da carga viral tanto para as amostras mantidas em geladeira, à temperatura ambiente e em estufa a 35°C, sendo a diferença entre as linhas no gráfico quase imperceptível e os valores de log muito parecidos, sempre com diferença menor que 0,5 log. Para as amostras puras que ficaram a 45°C, ocorreu uma pequena queda da carga viral no 7º dia de teste, mas que aumentou no 14º dia. A partir do 21º dia, devido a degradação da amostra pela alta temperatura, sua reidratação não foi possível e dessa forma, os testes não puderam ser realizados.

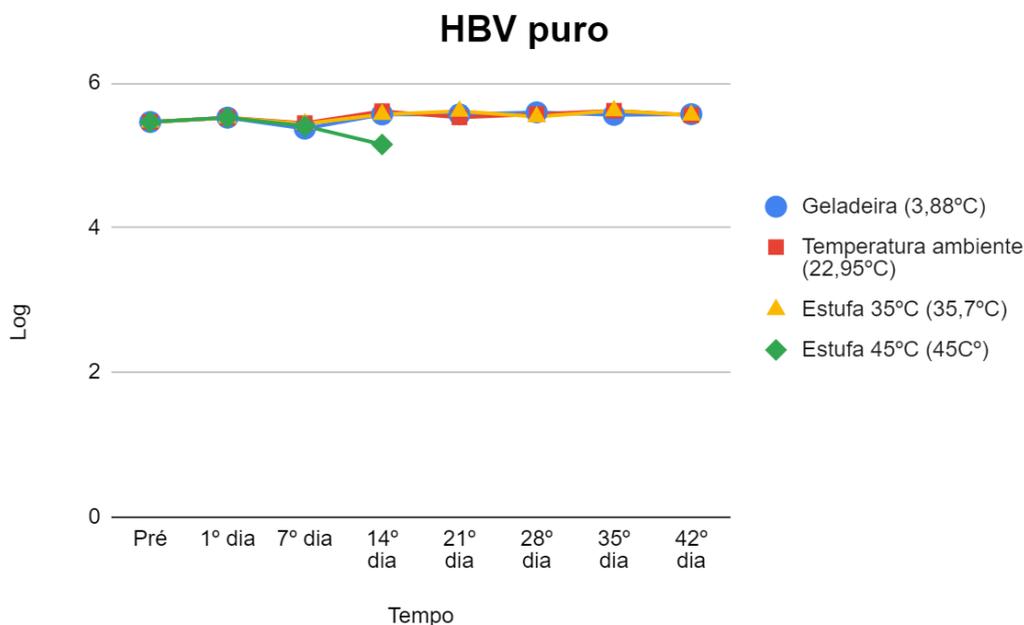
Tabela 13 - Carga viral e log das amostras com HBV puro

HBV puro								
Pré-liofilização (CV e log)		305333 UI/ml		5,46 log				
1º dia (CV e log)		328500 UI/ml		5,52 log				
Pós-liofilização	Geladeira (3,88°C)		Temperatura ambiente (22,95°C)		Estufa 35°C (35,7°C)		Estufa 45°C (45°C)	
	Carga viral	Log	Carga viral	Log	Carga viral	Log	Carga viral	Log
7º dia	243666	5,37	252500	5,44	273500	5,43	256000	5,40
14º dia	369000	5,56	406000	5,61	370500	5,56	155150	5,15
21º dia	370000	5,56	340000	5,52	405500	5,61
28º dia	396500	5,60	373000	5,57	343000	5,53
35º dia	364500	5,56	410000	5,61	410500	5,61
42º dia	371000	5,57	360000	5,55	360000	5,55

Fonte: Elaborada pela autora (2024)

Legenda: ... indicam que não foi avaliado por ausência de dissolução

Figura 15 - Gráfico das amostras com HBV puro



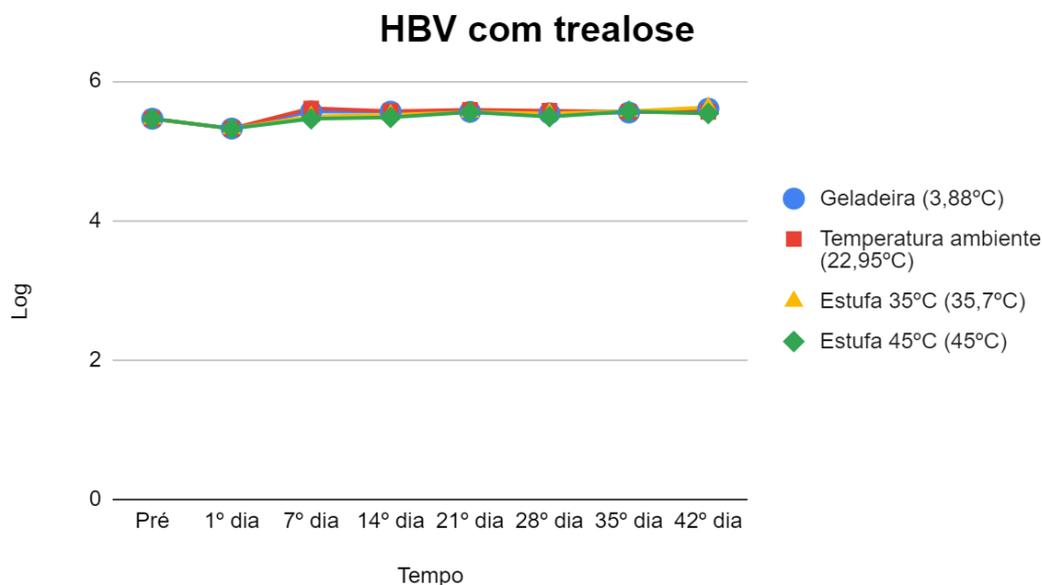
Fonte: autora, 2024.

Na Tabela 14 (gerada a partir da média dos dados presentes no Apêndice B) e Figura 16 é possível observar que a estabilidade das amostras com HBV aditivadas com trealose foi semelhante à observada nas amostras com HBV puro, ocorrendo apenas uma pequena queda logo após a liofilização.

Tabela 14 - Carga viral e log das amostras de HBV com trealose

HBV com trealose								
Pré-liofilização (CV e log)		305333 UI/ml		5,46 log				
1º dia (CV e log)		214000 UI/ml		5,32 log				
Pós-liofilização	Geladeira (3,88°C)		Temperatura ambiente (22,95°C)		Estufa 35°C (35,7°C)		Estufa 45°C (45°C)	
	Carga viral	Log	Carga viral	Log	Carga viral	Log	Carga viral	Log
7º dia	369500	5,56	410000	5,61	312500	5,50	287500	5,46
14º dia	378666	5,56	371000	5,57	330000	5,51	301500	5,48
21º dia	367000	5,56	390000	5,59	361000	5,55	356500	5,55
28º dia	352000	5,54	378000	5,57	342500	5,53	315000	5,49
35º dia	358000	5,55	364500	5,56	373000	5,57	370500	5,565
42º dia	404000	5,60	366000	5,56	424000	5,62	346000	5,53

Fonte: Elaborada pela autora (2024)

Figura 16 - Gráfico das amostras de HBV com trealose

Fonte: autora, 2024.

Os resultados são muito semelhantes, formando quase uma linha reta no gráfico, com sobreposição dos resultados encontrados nas quatro condições de armazenamento, sendo a diferença entre as condições quase imperceptíveis e a queda do log nunca foi superior a 0,5, sendo a maior queda de 0,14 após a liofilização. Outro dado interessante é o bom resultado observado para as amostras que ficaram armazenadas a 45°C, que além de manterem uma ótima capacidade de reidratação, apresentaram cargas virais muito estáveis, semelhante às encontradas nas amostras mantidas em outras condições. A queda das cargas virais foi muito pequena ao longo dos 42 dias. Surpreendentemente, nessa condição nenhuma queda foi superior a 0,5 log, o que não foi observado para os outros agravos.

Além das tabelas e gráficos calculou-se o desvio padrão e coeficiente de variação. Esses dados, que podem ser observados nas Tabelas 15 e 16, confirmaram o que já havia sido observado visualmente, pois os coeficientes de variação foram muito baixos tanto para o HBV puro quanto para o HBV com trealose. Esses valores baixos significam que houve pouca variação nos resultados, sendo muito semelhantes ao inicial. A maioria dos coeficientes de variação ficou em torno de 0,1% a 2,07%, sendo a maior variação, mas ainda considerada baixa, de 4,26%, observada da amostra pura mantida a 45°C.

Tabela 15 - Desvio padrão e coeficiente de variação das amostras com HBV puro

HBV puro													
Pré liof. (log)											5,46		
1º dia (log/desvio padrão/coeficiente de variação)											5,52	0,03	0,54
Tempo	Geladeira			Temperatura ambiente			Estufa 35°C			Estufa 45°C			
	log	Desvio padrão	Coeficiente de variação (%)	log	Desvio padrão	Coeficiente de variação (%)	log	Desvio padrão	Coeficiente de variação (%)	log	Desvio padrão	Coeficiente de variação (%)	
7º dia	5,37	0,04	0,84	5,44	0,01	0,14	5,43	0,01	0,23	5,46	0,03	0,51	
14º dia	5,56	0,05	0,94	5,61	0,08	1,34	5,56	0,05	0,94	5,48	0,22	4,26	
21º dia	5,56	0,07	1,33	5,52	0,05	0,83	5,61	0,11	1,89	5,55	
28º dia	5,60	0,10	1,71	5,57	0,08	1,40	5,53	0,05	0,96	5,49	
35º dia	5,56	0,07	1,27	5,61	0,11	1,95	5,61	0,11	1,95	5,565	
42º dia	5,57	0,08	1,40	5,55	0,07	1,21	5,55	0,07	1,21	5,53	

Fonte: Elaborada pela autora (2024)

Legenda: ... indicam que não foi avaliado por ausência de dissolução

Tabela 16 - Desvio padrão e coeficiente de variação das amostras com HBV com trealose

HBV com trealose													
Pré liof. (log)											5,46		
1º dia (log/desvio padrão/coeficiente de variação)											5,32	0,07	1,32
Tempo	Geladeira			Temperatura ambiente			Estufa 35°C			Estufa 45°C			
	log	Desvio padrão	Coeficiente de variação (%)	log	Desvio padrão	Coeficiente de variação (%)	log	Desvio padrão	Coeficiente de variação (%)	log	Desvio padrão	Coeficiente de variação (%)	
7º dia	5,56	0,05	0,94	5,61	0,08	1,34	5,50	0,02	0,32	5,10	0,00	0,00	
14º dia	5,56	0,05	0,93	5,57	0,05	0,99	5,51	0,03	0,50	4,63	0,01	0,18	
21º dia	5,56	0,07	1,27	5,59	0,09	1,64	5,55	0,07	1,21	4,77	0,07	1,21	
28º dia	5,54	0,06	1,02	5,57	0,08	1,46	5,53	0,05	0,96	4,67	0,02	0,39	
35º dia	5,55	0,06	1,15	5,56	0,07	1,27	5,57	0,08	1,40	4,60	0,07	1,33	
42º dia	5,60	0,10	1,83	5,56	0,07	1,27	5,62	0,12	2,07	4,45	0,05	0,96	

Fonte: Elaborada pela autora (2024)

4 DISCUSSÃO

Após a análise dos resultados, observamos que a liofilização das amostras de HIV e HCV e seu armazenamento em temperaturas elevadas, afetam negativamente os valores de carga viral. Temperaturas altas, como de 45°C, juntamente com a amostra já liofilizada, podem causar a desnaturação de proteínas (já mencionado no tópico 1.1 sobre liofilização) e afetar as propriedades físicas e químicas da amostra, por exemplo, a sua reidratação. Em um estudo de Poe e colaboradores (2018), amostras de HCV liofilizadas foram armazenadas a 4°C, 25°C, 37°C e 45°C por 12 semanas, muito semelhante às condições estabelecidas no presente estudo. Apesar de Poe e colaboradores (2018) considerarem a liofilização um método muito importante para testes de proficiência, toram que a amostra exposta a altas temperaturas (37°C ou mais) era afetada e apresentava viscosidade aumentada, além de observar uma queda na concentração de RNA durante as 12 semanas do estudo. No estudo de Vaughan e colaboradores (2006) citado na validação do HBV, os autores analisaram também os agravos HIV e HCV. Para HCV eles observaram que para as amostras liofilizadas expostas à temperatura ambiente, ocorreu uma diminuição na quantificação do RNA viral. Enquanto para HIV, não houve essa perda, mas para ambos os agravos o armazenamento a -30°C apresentou bons resultados, sem queda da carga viral. Já para HBV, como já mencionado no capítulo 1, observou-se boa estabilidade em várias temperaturas por um período de 11 meses. Outro trabalho também já citado (capítulo 1) na validação do HBV é o de José, Gajardo e Jorquera (2005) que encontraram bons resultados de estabilidade em amostras de plasma, embora os autores não tenham estudado o efeito da liofilização. Além da estabilidade do DNA de HBV já discutido, o RNA de HIV e HCV também tiveram resultados satisfatórios quando expostos a temperaturas de -70°C, -20°, 5°C e 25°C (José, Gajardo e Jorquera, 2005). Entretanto, embora estáveis, os resultados por eles encontrados sugerem que amostras contendo DNA apresentam maior estabilidade do que as com RNA, como regra geral observada em laboratórios de biologia molecular (José, Gajardo e Jorquera, 2005). Entre os vírus estudados neste trabalho, apenas HBV é um vírus DNA, enquanto HIV e HCV são RNA- vírus.

Os resultados encontrados na literatura corroboram os resultados do presente estudo, demonstrando que a liofilização causa alteração na amostra e que determinadas condições de armazenamento também causam alterações, enquanto outras são consideradas ideais. A perda da carga viral após o processo de liofilização é uma condição que deve ser estudada e controlada, uma vez que há muitos benefícios de transportar amostras liofilizadas em um país continental como o Brasil, entre eles a redução de custos e a possibilidade dos painéis AEQ

chegarem a municípios distantes, de difícil acesso, que desafiam o transporte quando há necessidade de controle rígido de temperatura. Nossos resultados mostraram que a adição de trealose às amostras liofilizadas protegeu significativamente as amostras, impedindo a queda da carga viral e mantendo a capacidade de reidratação da amostra. No estudo de Brogna e colaboradores (2020) foram testados alguns protetores para amostras de plasma liofilizadas. Os resultados por eles obtidos indicam que entre os açúcares testados (glicose, sacarose e trealose) o melhor desempenho foi observado em amostras de plasma que tiveram adição de 10% de trealose (Brogna *et al.*, 2020). Ainda conforme Brogna e colaboradores (2020), a trealose aumenta a vida útil tanto de proteínas como de ácidos nucleicos que foram submetidos à liofilização, mesmo se essas amostras forem expostas a condições de armazenamento com temperaturas elevadas. Além disso, em amostras sem adição de trealose, os autores observaram a presença de turbidez no plasma (Brogna *et al.*, 2020). Em um estudo semelhante de Bakaltcheva e colaboradores (2007) também foram estudados protetores para amostras de plasma liofilizadas. Os resultados para a trealose foram significativos, sendo que se destacou a estabilidade fornecida por esse dissacarídeo quando as amostras são expostas a altas temperaturas, no caso do estudo foi 40°C, e por um período maior (Bakaltcheva *et al.*, 2007).

5 CONCLUSÃO

O processo de melhoria dos painéis AEQ do Programa Nacional de Avaliação da Qualidade das redes de Diagnóstico e Monitoramento do Ministério da Saúde é uma preocupação constante. Com o objetivo de aprimorar o processo de liofilização das amostras para AEQ-CV para HIV, HBV e HCV a adição de trealose mostrou-se eficaz contra a perda da carga viral, garantindo a estabilidade das amostras de todos os agravos armazenadas em geladeira, temperatura ambiente e em estufa 35°C, por 42 dias e a melhor reidratação das amostras. Aquelas armazenadas a 45°C e com adição de trealose, tiveram a capacidade de reidratação garantida, porém a queda da carga viral foi diferente para cada agravo: as amostras com HBV tiveram boa estabilidade por 42 dias, as com HCV mantiveram a estabilidade por 21 dias e as com HIV tiveram queda maior de 0,5 log já no 7º dia. Devido aos resultados satisfatórios de reidratação e estabilidade das amostras liofilizadas, expostas a temperaturas de 2°C a 35°C por 42 dias, a trealose a partir da próxima rodada, será adicionada nas amostras com HIV, HCV e HBV dos painéis da AEQ-CV.

6 REFERÊNCIAS

- ABRAVANEL, Florence *et al.*. Performance of the Xpert HBV Viral Load assay versus the Aptima Quant assay for quantifying hepatitis B virus DNA. **Diagnostic Microbiology And Infectious Disease**, [S.L.], v. 96, n. 2, p. 114946, fev. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2019.114946>.
- BAKALTCHEVA, Irina *et al.*. Freeze-dried whole plasma: evaluating sucrose, trehalose, sorbitol, mannitol and glycine as stabilizers. **Thrombosis Research**, [S.L.], v. 120, n. 1, p. 105-116, jan. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.thromres.2006.07.005>.
- BALERIOLA, Cristina *et al.*. Stability of Hepatitis C Virus, HIV, and Hepatitis B Virus Nucleic Acids in Plasma Samples after Long-Term Storage at -20°C and -70°C . **Journal Of Clinical Microbiology**, [S.L.], v. 49, n. 9, p. 3163-3167, set. 2011. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.02447-10>.
- BAZZO, M. L. *et al.* **Programa da Qualidade da Rede Nacional de Laboratórios para Diagnóstico e Monitoramento da Infecção pelo HIV no Brasil no período de 2008 a 2015**. In: 10º CONGRESSO BRASILEIRO DE HIV/AIDS e 3º CONGRESSO BRASILEIRO HEPATITES VIRAIS (HepAids 2015), João Pessoa, 2015.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Estratégias para viabilizar transporte mais econômico e ampliar os marcadores avaliados no Programa Nacional de Avaliação Externa da Qualidade no Brasil para a rede de laboratórios de Sorologia para Sífilis e monitoramento das infecções pelo HIV e Hepatites Virais**. Brasília: Ministério da Saúde, 2021a.
- BROGNA, Raffaele *et al.*. Increasing storage stability of freeze-dried plasma using trehalose. **Plos One**, [S.L.], v. 15, n. 6, p. 0234502, 11 jun. 2020. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0234502>.
- CEPHEID. **Xpert® HBV Viral Load**. Suécia: Rev. D, 2020. 22 p.
- CEPHEID. **Xpert® HCV Viral Load**. Suécia: Rev. D, 2016. 24 p.
- CEPHEID. **Xpert® HIV-1 Viral Load**. Suécia: Rev. C, 2015. 22 p.
- CROWE, John H. *et al.*. Are freezing and dehydration similar stress vectors? A comparison of modes of interaction of stabilizing solutes with biomolecules. **Cryobiology**, [S.L.], v. 27, n. 3, p. 219-231, jun. 1990. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0011-2240\(90\)90023-w](http://dx.doi.org/10.1016/0011-2240(90)90023-w).
- ELBRINK, Kimberley *et al.*. Optimization of the different phases of the freeze-drying process of solid lipid nanoparticles using experimental designs. **International Journal Of Pharmaceutics**, [S.L.], v. 635, p. 122717, mar. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2023.122717>.
- GOMES, Frederico Pimentel. **Curso de Estatística Experimental**. 13. ed. Piracicaba: Livraria Nobel, 1990.
- JOSÉ, Marta; GAJARDO, Rodrigo; JORQUERA, Juan I.. Stability of HCV, HIV-1 and HBV nucleic acids in plasma samples under long-term storage. **Biologicals**, [S.L.], v. 33, n. 1, p. 9-16, mar. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biologicals.2004.10.003>.

- LINS, Roberto D.; PEREIRA, Cristina S.; HÜNENBERGER, Philippe H.. Trehalose-protein interaction in aqueous solution. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, [S.L.], v. 55, n. 1, p. 177-186, 17 fev. 2004. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/prot.10632>.
- LUO, Yin; LI, Wei-Min; WANG, Wei. Trehalose: protector of antioxidant enzymes or reactive oxygen species scavenger under heat stress?. **Environmental And Experimental Botany**, [S.L.], v. 63, n. 1-3, p. 378-384, maio 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envexpbot.2007.11.016>
- MEHANNA, Mohammed M.; ABLA, Kawthar K.. Recent advances in freeze-drying: variables, cycle optimization, and innovative techniques. **Pharmaceutical Development And Technology**, [S.L.], v. 27, n. 8, p. 904-923, 14 set. 2022. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/10837450.2022.2129385>.
- PAOLI, Paolo de. Biobanking in microbiology: from sample collection to epidemiology, diagnosis and research. **Fems Microbiology Reviews**, [S.L.], v. 29, n. 5, p. 897-910, nov. 2005. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1016/j.femsre.2005.01.005>.
- PAWLOTSKY, J. Measuring hepatitis C viremia in clinical samples: can we trust the assays?. **Hepatology**, [S.L.], v. 26, n. 1, p. 1-4, jul. 1997. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1002/hep.510260131>.
- POE, Amanda *et al.*. Stability of hepatitis C virus RNA and anti-HCV antibody in air-dried and freeze-dried human plasma samples. **Journal Of Virological Methods**, [S.L.], v. 253, p. 53-55, mar. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2017.12.004>.
- SAAG, M.s. *et al.*. HIV viral load markers in clinical practice. **Nature Medicine**, [S.L.], v. 2, n. 6, p. 625-629, jun. 1996. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nm0696-625>.
- SEBIRE, Kimberley *et al.*. Stability of Human Immunodeficiency Virus RNA in Blood Specimens as Measured by a Commercial PCR-Based Assay. **Journal Of Clinical Microbiology**, [S.L.], v. 36, n. 2, p. 493-498, fev. 1998. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.36.2.493-498.1998>.
- SILVA, Lorena Rodrigues Guimarães. **NOTA TÉCNICA: Liofilização e Operacionalização do Equipamento**. 2022. 20 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biotecnologia e Bioprocessos, Escola Superior de Ensino do Instituto Butantan, São Paulo, 2022.
- VAUGHAN, Helen *et al.*. Stability of lyophilised specimens for the molecular detection of viral DNA/RNA. **Journal Of Clinical Virology**, [S.L.], v. 35, n. 2, p. 135-140, fev. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2005.06.001>.

CAPÍTULO 3 - VALIDAÇÃO DO PAINEL DE HBV PARA AEQ-TR

1 INTRODUÇÃO

A Avaliação Externa da Qualidade para Testes Rápidos (AEQ-TR) foi implementada ao Programa Nacional AEQ em 2011 (DIVE, 2016). Atualmente, estão cadastrados no portal da avaliação, 7417 profissionais de 2315 unidades espalhadas por todo o Brasil, que podem participar de três rodas no ano, duas práticas e uma teórica. O painel enviado nesta avaliação, conforme Figura 16, é composto por um manual de instruções para a hidratação do painel, dois formulários de resultados, uma solução tampão, uma pipeta e quatro amostras, reagentes ou não reagentes para HIV, sífilis e HCV, preparadas a partir da técnica de amostras secas em tubo (DTS, do inglês *Dried Tube Specimens*) (Benzaken *et al.*, 2013; Brasil, 2022b; Parekh *et al.*, 2010). Nesta metodologia, as amostras de plasma ou soro, com acréscimo de corante, são pipetadas em tubos e deixadas para secar em cabine de segurança biológica (Brasil, 2022b). Posteriormente, os painéis são enviados às unidades de saúde participantes da AEQ-TR e o profissional precisa hidratar as amostras com a solução tampão de hidratação, fornecida com o painel, realizar os TRs para os três agravos nas quatro amostras, interpretar os resultados e enviar os resultados ao provedor do programa (Brasil, 2022b).

Figura 16 - Painel AEQ-TR



Fonte: a autora, 2024.

O presente estudo objetivou validar a metodologia *DTS* para HBsAg, marcador da Hepatite B, causada pelo HBV. A pergunta respondida neste estudo foi se amostras reagentes

para HBsAg possuem condições de serem acrescentadas à AEQ-TR no que diz respeito à estabilidade de 30 dias dos painéis. A hipótese inicial foi de que as amostras reagentes para HBsAg, após testagens em diferentes condições de umidade e temperatura, poderão integrar os painéis a AEQ-TR. Neste capítulo apresentamos os resultados da validação do painel *DTS* para HBsAg testado em diferentes condições de temperatura e umidade, simulando diferentes condições de transporte, no Brasil.

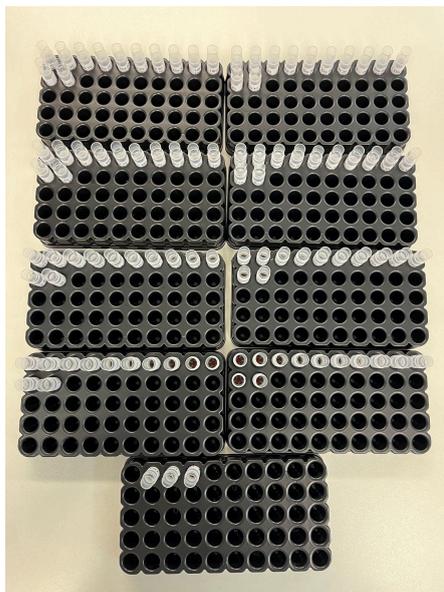
2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Para a produção dos painéis *DTS*, inicialmente, foi necessário caracterizar a amostra (proveniente do mesmo estudo, com aprovação no comitê de ética, já citado no tópico 2.1 AMOSTRAGEM, dos materiais e métodos do capítulo 1), para isso foram adicionados 100 microlitros de uma amostra reagente para HBsAg e 10 microlitros de corante vermelho (corante puro ou a 10%). Para a testagem inicial, de manutenção da reatividade da amostra, em seguida, 20 microlitros da mistura amostra-corante foram pipetados em tubos do tipo criotubos e acrescentou-se 500 microlitros de solução tampão PBS-Tween, correspondente à diluição final da amostra após reidratação. Na sequência testou-se esta amostra em um teste rápido para o agravo HBsAg, seguindo as instruções do fabricante do kit.

Após verificar que a reatividade foi mantida, foram preparadas as amostras de *DTS*, para isso foram utilizados 4 ml de plasma acrescidos de 400 microlitros de corante vermelho (Kerber, 2021). Após a homogeneização, foram pipetados 20 microlitros em 99 criotubos, conforme Figura 17.

Figura 17 - Criotubos com amostra reagentes para HBsAg preparados pela a metodologia *DTS*

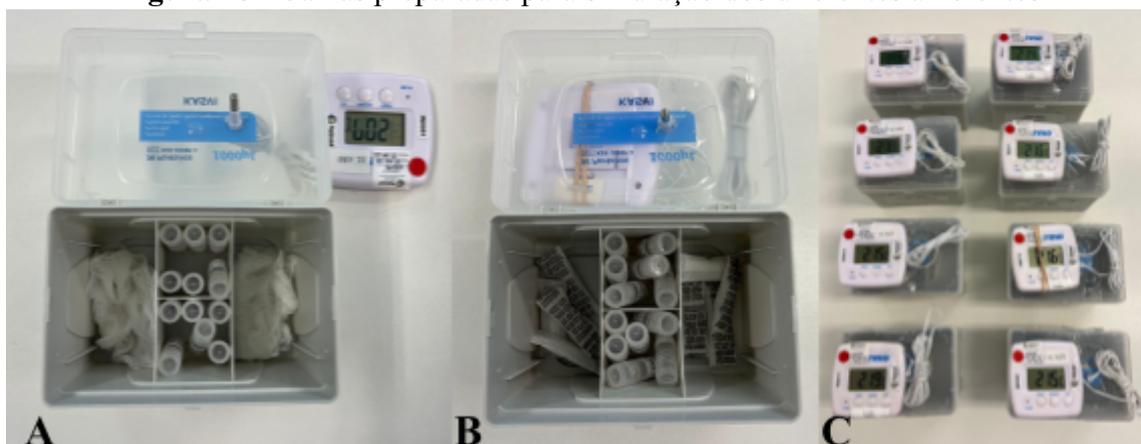


Fonte: a autora, 2024.

As amostras foram colocadas para secar em temperatura ambiente por 4 horas, em seguida foram colocadas em uma cabine de segurança biológica, de um dia para outro (*overnight*). Após a secagem das amostras os criotubos foram fechados e armazenados nas condições experimentais estabelecidas, a saber: em geladeira (2°C a 8°C), a temperatura ambiente (21°C a 25°C) e em estufa, uma de 35°C e outra de 45°C em ambientes úmidos e secos (Kerber, 2021). As amostras foram testadas antes de serem pipetadas, no dia seguinte após a secagem e posteriormente, no 10°, 20°, 30° e 40° dia após armazenamento nas condições experimentais.

Para as amostras contendo HBsAg serem incluídos no painel enviado na AEQ-TR, foi necessário avaliar diferentes condições de umidade e temperatura, simulando as situações que podem ocorrer durante o transporte do painel, devido ao alcance do programa, extensão territorial (dimensões continentais) e variações climáticas brasileiras. Para as condições experimentais os tubos *DTS*-HBsAg, foram são submetidas a um ambiente úmido simulado por uma caixa que contém em seu interior duas gazes umedecidas diariamente com 5 ml de água, em cada lado (Kerber, 2021). Para o ambiente seco, foram colocados quatro sachês de sílica, de cada lado, no interior da caixa (Kerber, 2021). Na parte superior da caixa, foi acoplado um termômetro para monitoramento diário das temperaturas obtidas no interior das caixas, como mostra a Figura 18.

Figura 18 - Caixas preparadas para simulação dos diferentes ambientes



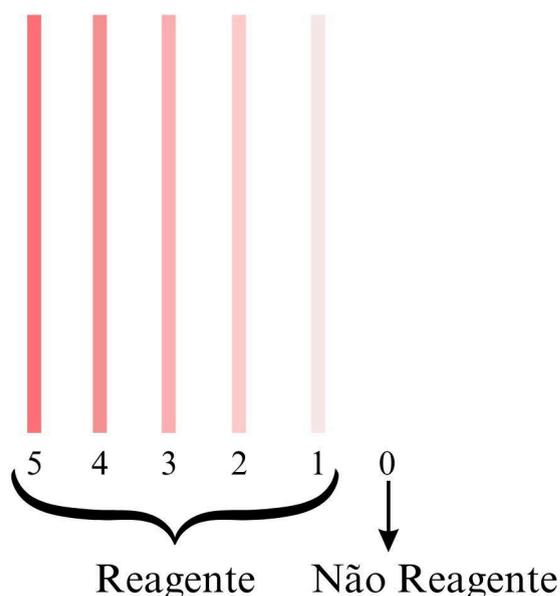
Legenda: (A) caixa simulando ambiente úmido por meio da adição de gazes umedecidas; (B) caixa com sílica para simulação de ambiente seco e (C) todas as caixas, tanto nas condições secas como úmidas para as diferentes condições de temperatura, com os termômetros acoplados.

Fonte: a autora, 2024.

Após esse processo, as caixas foram submetidas a diferentes condições de temperatura, armazenadas em geladeira (2°C a 8°C), a temperatura ambiente (21°C a 25°C) e em estufa, uma de 35°C e outra de 45°C (Kerber, 2021). Além dos testes iniciais (item 2.2 preparação da amostra), as amostras secas em tubos foram testadas logo após a secagem *overnight* e no 10°, 20°, 30° e 40° dias após incubação nas condições experimentais. Essa validação foi realizada utilizando os testes HBsAg da marca Bioclin (lote K145) e HBsAg da marca Assure Tech (lote l2311959), doados pelo DATHI do Ministério da Saúde.

2.2 ANÁLISES DAS AMOSTRAS SECAS EM TUBO - *DTS* PARA HBsAg

Para análise dos resultados do *DTS*-HBsAg, por ser um teste qualitativo, não foi realizado nenhum cálculo específico, apenas foram comparados os resultados da testagem das amostras mantidas nas condições ideais com os resultados da validação e comparado com estudos encontrados na literatura. Para verificar eventual perda de reatividade, criou-se uma escala de enfraquecimento da intensidade da linha dos resultados reagentes na qual todas as amostras partiram do número 5 (considerada a intensidade mais forte), Figura 19.

Figura 19 - Escala de enfraquecimento da linha de teste

Fonte: adaptado de Brasil, 2014.

Foi atribuído o número 5 para a mostra que manteve a mesma intensidade de resultado quando comparado à amostra anterior ao congelamento. À medida que o resultado reagente foi enfraquecendo, o número foi diminuindo. Com um resultado reagente bem visível, mas com um leve enfraquecimento, foi atribuído o número 4, se o enfraquecimento foi mais perceptível, foi designado 3. Já para as amostras com o resultado reagente muito enfraquecido, foi atribuído 2 e 1, sendo 1 o mais fraco possível. Se a amostra se tornasse não reagente, seria atribuído 0 (zero). Para todas as tabelas, cálculos e gráficos apresentados, foi utilizado o Planilhas Google.

3 RESULTADOS

A fim de se incluir o painel de HBsAg na AEQ-TR, foram analisados os resultados reagentes e a qualidade da ressuspensão das amostras testadas no 1º, 10º, 20º, 30º e 40º dias após o preparo. No 1º dia após a secagem, as amostras, testadas em duplicatas, tiveram resultado reagente e dessa forma, elas puderam ser armazenadas em diferentes condições de umidade, seco e úmido, e de temperatura. Os resultados reagentes (R) e não reagentes (NR) para cada condição de armazenamento podem ser visualizados no Quadro 1.

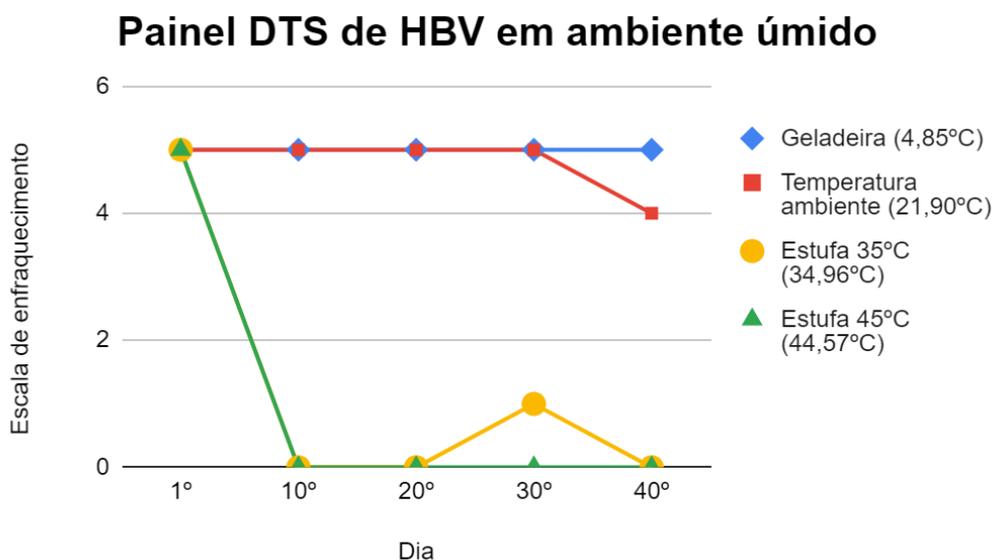
Quadro 1 - Resultados dos testes para HBsAg ao longo de 10 a 40 dias de testagem em diversas condições

Dia	Amostra	Geladeira		Temperatura ambiente		Estufa 35°C		Estufa 45°C	
		Seco	Úmido	Seco	Úmido	Seco	Úmido	Seco	Úmido
10° dia	1	R	R	R	R	R	NR	R	NR
	2	R	R	R	R	R	NR	R	NR
	3	—	—	—	—	—	—	—	—
20° dia	1	R	R	R	R	R	NR	R	NR
	2	R	R	R	R	R	NR	R	NR
	3	—	—	—	—	—	—	—	—
30° dia	1	R	R	R	R	R	R	R	NR
	2	R	R	R	R	R	NR	NR	NR
	3	—	—	—	—	—	R	R	—
40° dia	1	R	R	R	R	R	NR	NR	R
	2	R	R	R	R	R	NR	NR	R
	3	—	—	—	—	—	—	—	—

Fonte: autora, 2024.

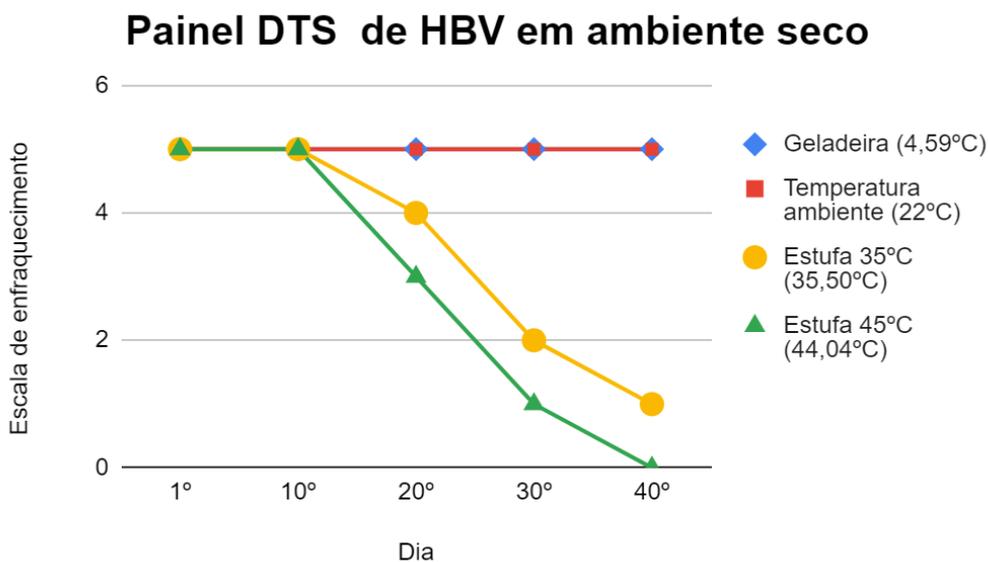
O gráfico da Figura 20 apresenta os resultados das amostras mantidas em ambiente úmido e o gráfico da Figura 21 apresenta os resultados das amostras mantidas em ambiente seco, a fim de analisar-se o enfraquecimento da linha de teste causado pela exposição a cada condição de armazenamento, levando em alguns casos até ao resultado não reagente. Para desenvolvimento e interpretação dos gráficos, considerou-se a escala elaborada de 0 a 5, descrita no tópico processo de análise dos resultados.

Figura 20 - Painel DTS de HBsAg submetido a ambiente úmido ao longo de 1 a 40 dias mantidas em ambiente úmido em diversas temperaturas



Fonte: autora, 2024.

Figura 21 - Painel DTS de HBV submetido a ambiente seco ao longo de 1 a 40 dias mantidas em ambiente seco em diversas temperaturas



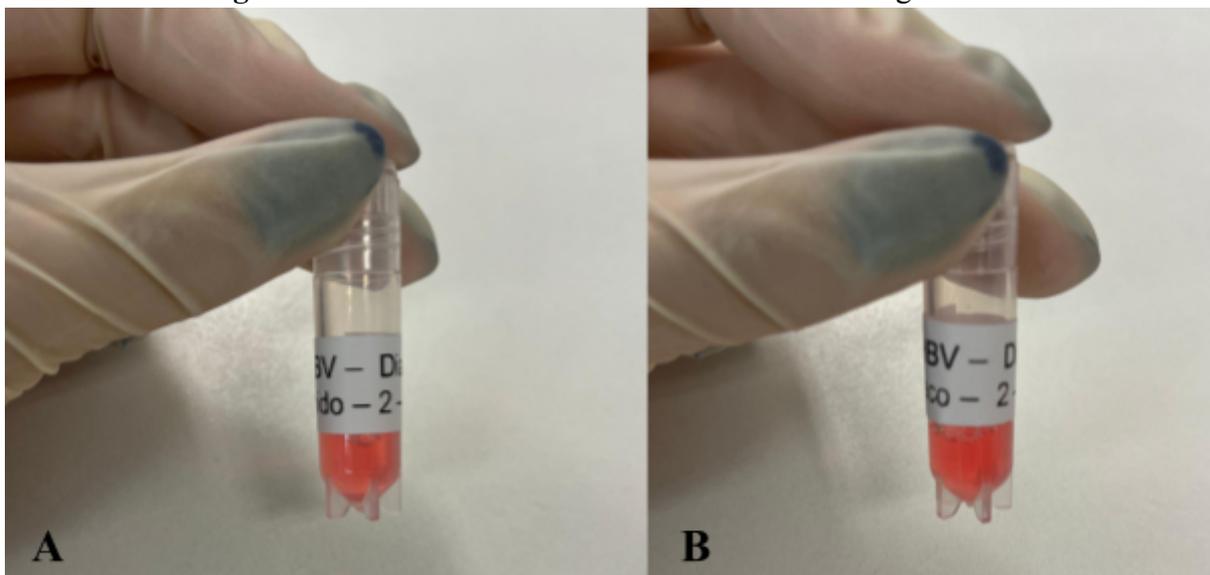
Fonte: autora, 2024.

3.1 GELADEIRA (2-8°C)

Em geladeira, as amostras úmidas ficaram expostas a temperatura média de 4,85°C, já as secas ficaram a 4,59°C. Todas as amostras armazenadas, tanto na condição úmida quanto na seca, tiveram uma boa ressuspensão, resultando em uma solução homogênea, de cor

vermelho vivo e sem grumos, como apresentado na Figura 22. Tal fato foi possível de ser observado durante os 40 dias que as amostras permaneceram nesta temperatura e todos os testes tiveram resultados reagentes como apresentado no Quadro 1, com a linha de teste de cor intensa e bem visível, sem indícios de enfraquecimento, Figuras 20 e 21.

Figura 22 - Amostras *DTS* de HBV armazenadas em geladeira



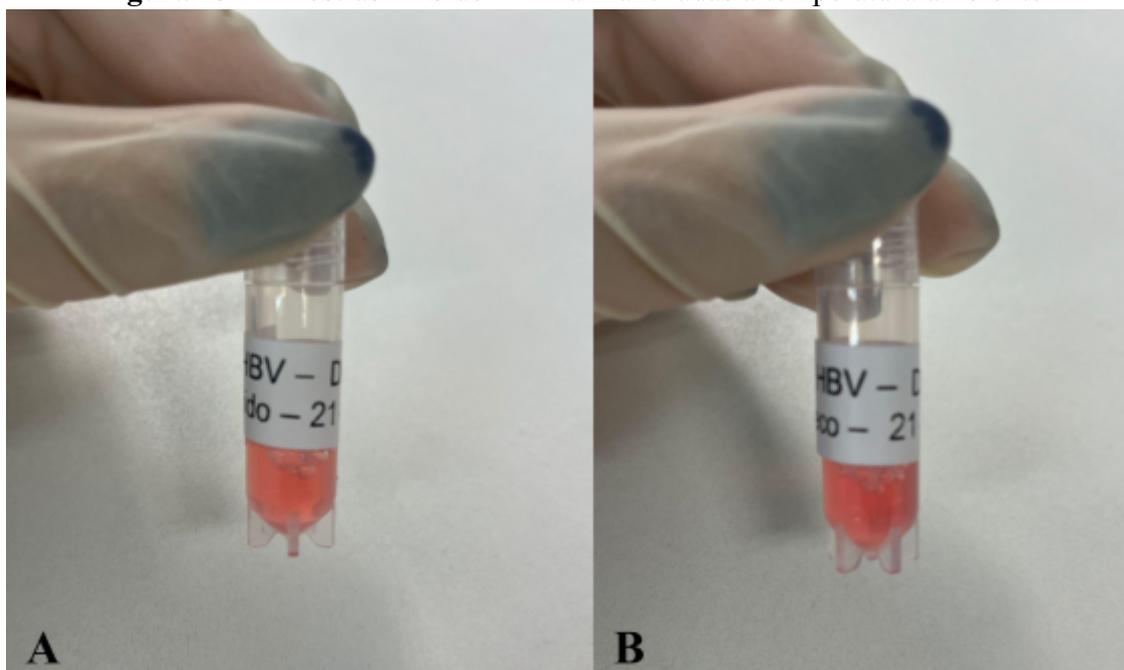
Legenda: (A) Amostra com HBV armazenada em ambiente úmido; (B) Amostra com HBV armazenada em ambiente seco.

Fonte: a autora, 2024.

3.2 TEMPERATURA AMBIENTE (20-26°C)

As amostras expostas à temperatura ambiente na condição úmida ficaram na faixa dos 21,9°C, já no ambiente seco ficou em torno de 22°C. Em temperatura ambiente, também não houve nenhum problema com a ressuspensão da amostra durante todo o período do estudo. Tanto no ambiente úmido quanto no seco, as amostras homogeneizaram de forma correta e sem grumos, apenas com uma pequena diferença na intensidade da cor quando comparada com a amostra que ficou em geladeira, conforme a Figura 23. Esse leve tom de vermelho mais claro, não interferiu nos resultados dos testes, sendo que todas as amostras tiveram resultados reagentes no decorrer dos 40 dias, apresentando um pequeno enfraquecimento da linha de teste no 40º dia para as amostras que ficaram em ambiente úmido, conforme apresentado na Figura 20. As amostras que permaneceram em ambiente seco não tiveram nenhuma interferência nos resultados, permanecendo reagentes, Quadro 1 e sem enfraquecimento da linha quando comparado com a amostra inicial do estudo.

Figura 23 - Amostras *DTS* de HBV armazenadas a temperatura ambiente



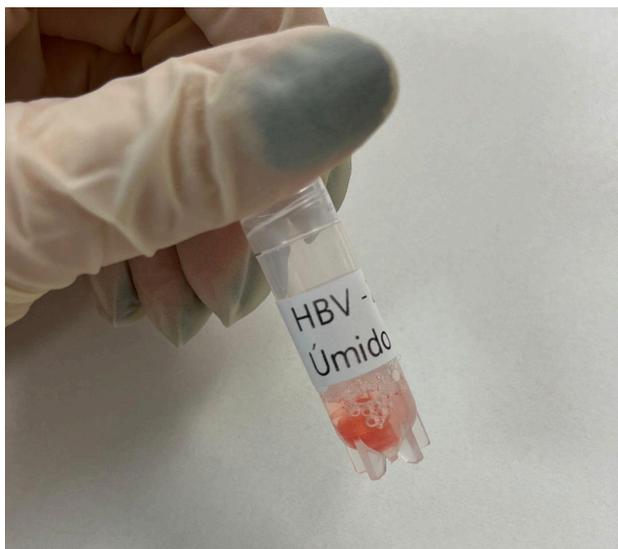
Legenda: (A) Amostra com HBV armazenada em ambiente úmido; (B) Amostra com HBV armazenada em ambiente seco.

Fonte: a autora, 2024.

3.3 ESTUFA A 35°C

As amostras que ficaram nesta condição, foram submetidas a temperatura média de 35,5°C no ambiente seco e no ambiente úmido a 34,96°C. Nas amostras que permaneceram na estufa a 35°C, observou-se que essa temperatura provavelmente afeta a ressuspensão da amostra quando ela é submetida a um ambiente úmido. Nesta condição, mesmo após decorridas 2 horas, a amostra não reidratou completamente, o “botão” de amostra que estava no fundo do criotubo não se dissolveu e ficou boiando no tampão de reidratação, Figura 24. Em virtude da não reidratação completa, essas amostras tiveram, na sua maioria, resultados não reagentes nos testes ao decorrer do período experimental, como se observa no Quadro 1. A única exceção ocorreu no 30º dia, quando houve divergência no resultado dos testes, um com resultado não reagente e outro reagente bem fraco em ambos os kits de teste. De acordo com o protocolo experimental, neste caso foi realizado um terceiro teste que também apresentou resultado reagente, mas muito fraco de escala 1.

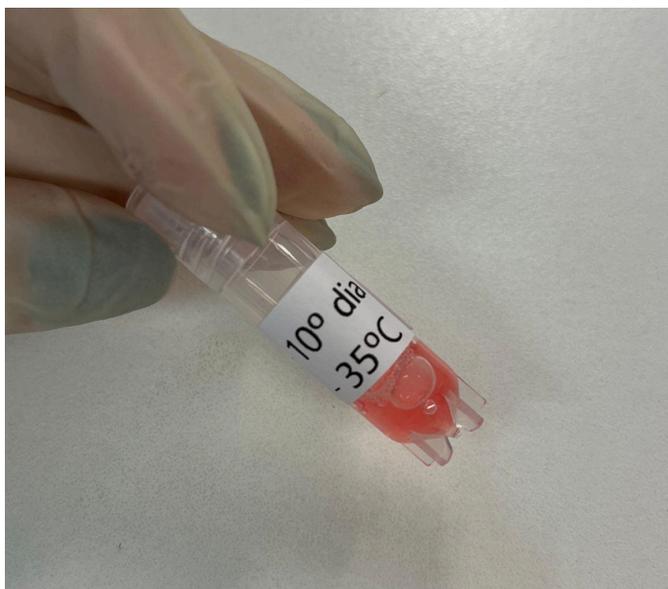
Figura 24 - Amostra *DTS* de HBV armazenada em ambiente úmido em estufa a 34,96°C



Fonte: a autora, 2024.

Entretanto, as amostras que ficaram na mesma temperatura, mas em um ambiente seco, tiveram boa ressuspensão, se homogeneizando com o tampão, como pode ser observado na Figura 25 e Quadro 1, tiveram resultados reagentes. Porém, como observa-se na Figura 21 a linha de teste foi enfraquecendo ao longo dos dias, sendo que no 40º dia a linha estava muito fraca, de escala 1, entretanto a reatividade permaneceu.

Figura 25 - Amostra *DTS* de HBV armazenada em ambiente seco em estufa a 35,5°C



Fonte: a autora, 2024.

3.4 ESTUFA A 45°C

Na condição de 45°C em ambiente úmido, a temperatura média atingida foi de 44,57°C, já para o ambiente seco foi de 44,04°C. Em ambiente úmido, o resultado foi

semelhante ao das amostras da estufa a 35°C, pois a ressuspensão também foi afetada e não ocorreu a homogeneização da amostra com o tampão, permanecendo apenas o botão da amostra boiando, como na Figura 26. No Quadro 1 e Figura 20 pode-se observar que, todos os resultados para esta condição, durante os 40 dias foram não reagentes.

Figura 26 - Amostra *DTS* de HBV armazenada em ambiente úmido em estufa a 44,57°C



Fonte: a autora, 2024.

Para as amostras que permaneceram 45°C na condição seca, tiveram sua ressuspensão afetada de certa forma, pois a amostra ficou com um tom vermelho claro, não homogênea e com grumos, como apresentado na Figura 27.

Figura 27 - Amostra *DTS* de HBV armazenada em ambiente seco em estufa a 44,04°C



Fonte: a autora, 2024.

Inicialmente, como observa-se na Figura 21, isso não afetou o resultado, pois no 10º dia, o teste mostrou-se reagente e sem enfraquecimento da linha de teste. Já no 20º dia, o resultado dos testes foi reagente, mas apresentou a linha de teste com enfraquecimento, tendo sido classificada na escala 3. No 30º dia teve inicialmente uma divergência nos resultados, um

teste foi reagente e outro não reagente em ambos os kits de teste, portanto, foi realizado um terceiro teste. Esse terceiro teste também foi reagente, assim como um dos primeiros, mesmo os dois apresentando a linha de teste extremamente fracas, de grau 1. No 40º dia de teste, ambos os resultados foram não reagentes, sendo que todos esses resultados constam do Quadro 1.

4 DISCUSSÃO

Conforme os resultados observados nos testes rápidos para HBsAg para validação do painel de HBV para AEQ-TR, a estabilidade do *DTS* é garantida em ambiente seco por 40 dias na faixa de temperaturas entre 4 e 35,5°C, para temperaturas elevadas como a 44-45°C, a validade é de até 30 dias. A estabilidade para ambiente úmido é observada apenas para as condições de 4-5°C, e de 21-22°C. Entretanto, considerando as atuais condições das AEQ-TR que já vem sendo desenvolvidas, a umidade não é um problema porque se adiciona sílica gel nas embalagens dos painéis. Os resultados deste estudo mostram que o marcador HBsAg pode ser incorporado na AEQ-TR, ampliando a avaliação do desempenho dos profissionais que fazem TR para todos os TR rotineiramente testados (HIV, Sífilis, HCV e HBsAg). Para o envio de painéis para as regiões mais quentes e úmidas do Brasil a equipe AEQ-TR deverá monitorar o tempo de entrega dos painéis para que não ultrapasse os 30 dias.

Outro fator que assegura a confiabilidade dos resultados é que existem estudos empregando a mesma metodologia (*DTS*) com o mesmo agravo e condições de armazenamento. De acordo com os testes de Mendiratta e colaboradores (2017) que empregaram, praticamente do mesmo protocolo, os autores concluíram que os níveis de HBsAg se mantêm estáveis por 28 dias em temperaturas de 4°C a 45°C e por até 42 dias a 4°C, 25°C e 37°C. Dessa forma, Mendiratta e colaboradores (2017) evidenciam que a metodologia *DTS* para HBV apenas é afetada em temperaturas elevadas como de 45°C no 42º dia, assim como observados nos resultados deste trabalho, no qual se verificou que os testes para as demais condições experimentais permanecem reagentes até 40 dias e resultados falso-negativos foram observados apenas para a condição de 45°C, em ambiente seco, ao 40º dia.

5 CONCLUSÃO

Com o objetivo de validar o painel *DTS* para HBsAg para integrar a AEQ-TR, submeteu-se às amostras a diferentes condições de temperatura e umidade. Os resultados mostraram que em ambiente seco, as amostras apresentam reatividade até 40 dias, quando submetidas a armazenamento em geladeira, temperatura ambiente e estufa 35°C, e a até 30 dias em estufa 45°C. As amostras em ambiente úmido tiveram resultados reagentes apenas quando armazenadas em geladeira e temperatura ambiente por 40 dias. Dessa forma, como atualmente já são enviados sachês de sílica nos painéis, o que garante um ambiente seco, as amostras para HBsAg foram validadas e este marcador será acrescentado à AEQ-TR.

6 REFERÊNCIAS

- BENZAKEN, Adele Schwartz *et al.*. External quality assurance with dried tube specimens (DTS) for point-of-care syphilis and HIV tests: experience in an indigenous populations screening programme in the brazilian amazon. **Sexually Transmitted Infections**, [S.L.], v. 90, n. 1, p. 14-18, 12 set. 2013. BMJ. <http://dx.doi.org/10.1136/sextrans-2013-051181>.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Orientações para utilização de Teste Rápido DPP HIV com amostra de fluido oral**. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Relatório Global: Vigésima Segunda Avaliação Externa da Qualidade para Testes Rápidos para o Diagnóstico do HIV, da Sífilis e Hepatite C (HCV) 22AEQ-TR21 HIV, Sífilis e HCV**. Brasília: Ministério da Saúde, 2022b.
- DIRETORIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA (DIVE). **Plano de ampliação de Testes Rápidos nos serviços de saúde de Santa Catarina**. Florianópolis: Dive, 2016.
- KERBER, Guilherme. **Validação do uso de corante vermelho na produção de amostra controle para teste rápido**. 2021. 58 f. TCC (Graduação) - Curso de Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2021.
- MENDIRATTA, Sanjay *et al.*. Dried tube specimens: A tool to ensure effective proficiency testing & quality control of Hepatitis B virus diagnosis in developing countries. **International Journal Of Biomedical And Advance Research**. Noida, p. 233-238. nov. 2017.
- PAREKH, Bharat S. *et al.*. Dried tube specimens: a simple and cost-effective method for preparation of hiv proficiency testing panels and quality control materials for use in resource-limited settings. **Journal Of Virological Methods**, [S.L.], v. 163, n. 2, p. 295-300, fev. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2009.10.013>.

CAPÍTULO 4 - ESTABILIDADE DOS PAINÉIS AEQ-TR APÓS CONGELAMENTO

1 INTRODUÇÃO

Neste capítulo também trabalhou-se com o painel da AEQ-TR, já apresentado na introdução do Capítulo 3. Atualmente, para a AEQ-TR são produzidos mais de quatro mil painéis, sendo que cada painel possui volume suficiente para dois profissionais executarem as testagens. Toda a demanda de pipetagem, montagem e envio dos painéis era realizada uma semana antes de serem enviados (Brasil, 2022b). O aumento crescente do número de painéis produzidos, demanda revisão das práticas de produção e ampliação da validade dos painéis produzidos. Para um número pequeno de painéis toda a sua produção acontecia na mesma semana do seu envio. Esse fato gerava grande estresse para a equipe de produção e qualquer problema interferia na data planejada para o envio. Portanto, ter a possibilidade de preparar as amostras com antecedência e congelá-las, seria uma forma de armazenamento segura e que melhoraria a rotina laboratorial, otimizando cerca de cinco dias de trabalho, sem afetar o desenvolvimento e resultados do programa. Dessa forma, estocando as amostras, na semana do envio seria apenas necessário descongelá-las e iniciar a montagem dos painéis.

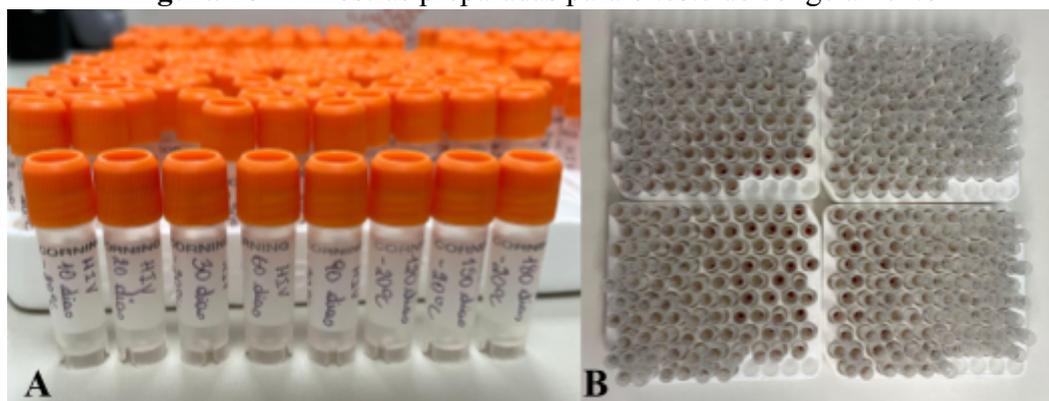
Com o intuito de otimizar a produção dos painéis da AEQ-TR, foi necessário investigar qual é a possibilidade de realizar a pipetagem das amostras e congelá-las para envio posterior sem afetar os resultados reagentes. Essa pergunta precisava ser respondida para cada um dos marcadores incluídos nos painéis ARQ-TR. A hipótese que motivou este estudo foi: as amostras *DTS* permanecerão estáveis e garantindo resultados confiáveis após o congelamento. Portanto, esta parte do estudo teve o propósito de testar a estabilidade de painéis *DTS* para HIV, sífilis, HCV e HBsAg após o congelamento por 10, 20, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias e testagens das suas reatividades no 1º, 10º, 20º e 30º dias após o descongelamento, respectivamente.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS *DTS*

Utilizando-se do método *DTS* (já explicado no tópico 2.1 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS *DTS* dos materiais e métodos do capítulo 3), foram preparadas 96 amostras de cada agravo, previamente identificadas com os respectivos dias de congelamento conforme a Figura 28, utilizando a metodologia para o preparo do painel *DTS*.

Figura 28 - Amostras preparadas para o teste de congelamento



Legenda: Em (A) Criotubos identificados com o respectivo agravo, tempo e temperatura de congelamento; em (B) amostras pipetadas para a metodologia *DTS* e posterior congelamento.

Fonte: a autora, 2024.

Após a secagem, os criotubos foram fechados e colocados em *crioboxes* separados por agravo e por temperatura de congelamento, Figura 29.

Figura 29 - *Crioboxes* utilizadas para armazenar as amostras para congelamento



Fonte: a autora, 2024.

As *crioboxes* foram armazenadas em freezers -20° e -80°C por 10, 20, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias e as amostras foram testadas após o descongelamento (nos dias 1, 10, 20 e 30), para verificar se continuavam reagentes. Para realização dos testes rápidos, foram utilizados os kits apresentados na Tabela 17, doados para o estudo pelo DATHI do Ministério da Saúde.

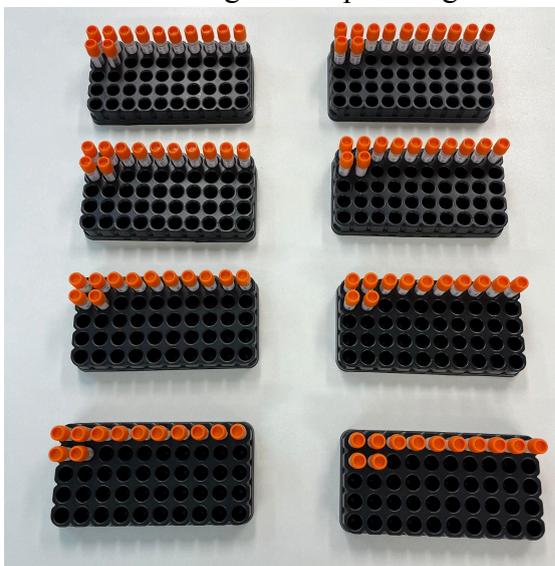
Tabela 17 - Kits usados para testagem dos painéis *DTS* congelados

Agravo	Kit	Marca	Lote
Sífilis	ABON Syphilis Ultra Rapid Test Device	Abbott	0000646819
			0000718632
			10071779006
	Sífilis Bio	Bioclin	0057
HIV	ABON HIV 1/2/o Tri-line Human Immunodeficiency Virus Rapid Test Device	Abbott	0000664466
HCV	HCV Ab Eco Teste	Eco Diagnóstica	51L42E1AC
HBV	HBsAg	Bioclin	K145

Fonte: elaborada pela autora (2024)

O kit Sífilis Bio foi recebido por meio de doação apenas quando as amostras congeladas a 150 dias iniciaram as testagens, como não se tem a referência inicial dele, os resultados dos testes com este kit foram utilizados apenas para fins de comparação com o teste da marca Abbott.

Após os 10 primeiros dias, foram descongeladas 12 amostras de cada agravo, HIV, HCV, HBV e sífilis de ambas as temperaturas de congelamento (-20 °C e -80 °C), e armazenadas em temperatura ambiente, Figura 30.

Figura 30 - Amostras descongeladas após congelamento por 10 dias

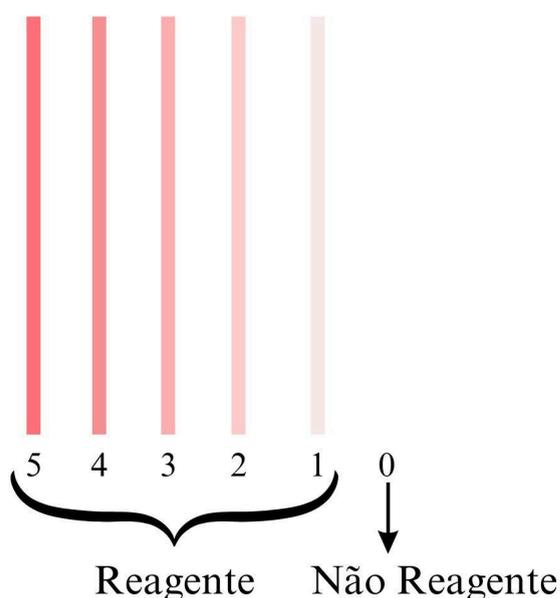
Fonte: a autora, 2024.

No dia do descongelamento, para cada agravo, foram hidratadas três das 12 amostras, mas apenas duas foram testadas, a terceira seria testada se os dois testes fossem discordantes. As amostras permaneceram fora do freezer, em bancada sob temperatura ambiente (20-26°C), para serem reidratadas com mesmo procedimento no 10º, 20º e 30º dias após o descongelamento. O mesmo protocolo foi empregado para as amostras congeladas por 20, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias.

2.2 ANÁLISES DOS RESULTADOS DAS AMOSTRAS *DTS* APÓS CONGELAMENTO

Para análise dos resultados do *DTS*, por ser um teste qualitativo, não foi realizado nenhum cálculo específico, apenas comparado os resultados da testagem das amostras mantidas nas condições ideais com os resultados da validação e comparado com estudos encontrados na literatura. Para verificar eventual perda de reatividade, criou-se uma escala de enfraquecimento da intensidade da linha dos resultados reagentes, Figura 31, a qual já foi explicada no tópico 2.2 ANÁLISES DAS AMOSTRAS SECAS EM TUBO - *DTS* PARA HBsAg dos materiais e métodos do capítulo 3. Para todas as tabelas, cálculos e gráficos apresentados, foi utilizado o Planilhas Google.

Figura 31 - Escala de enfraquecimento da linha de teste



Fonte: adaptado de Brasil, 2014.

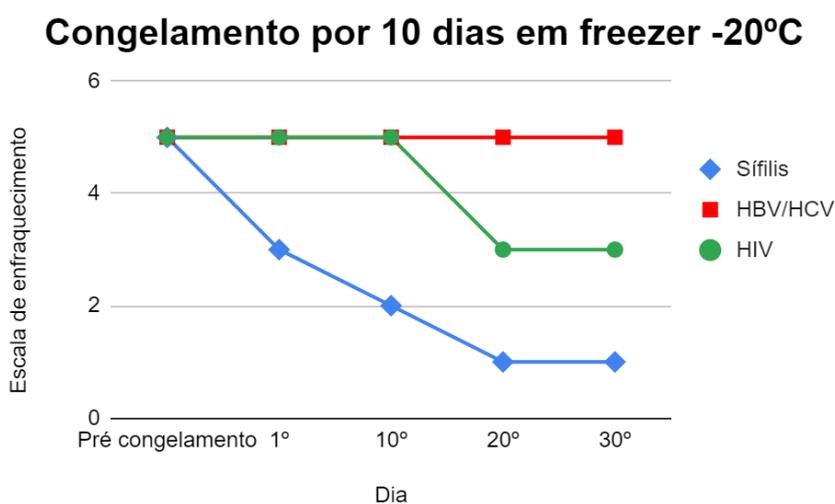
3 RESULTADOS

Após os respectivos dias de congelamento, as amostras foram descongeladas e testadas no 1º, 10º, 20º e 30º dias após o descongelamento. Destaca-se que para a análise dos resultados, levou-se em consideração a escala elaborada de 0 a 5, descrita no tópico processo de análise dos resultados.

3.1 CONGELAMENTO POR 10 DIAS

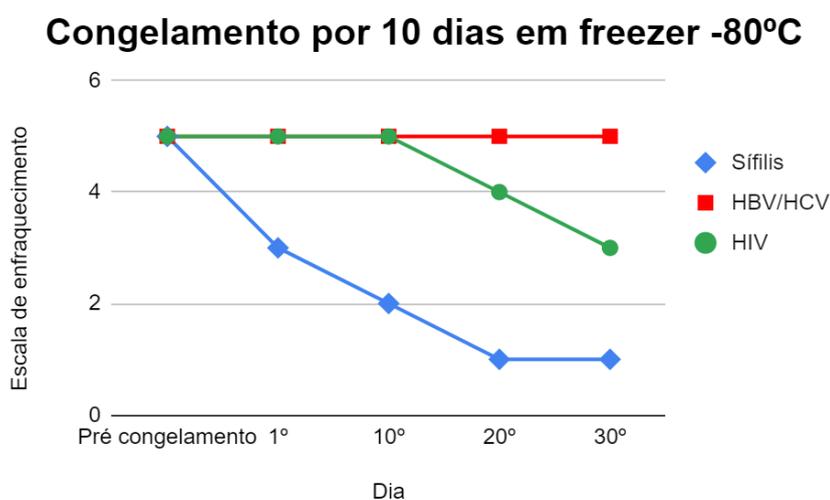
As amostras permaneceram congeladas por 10 dias e foram testadas nos respectivos dias de descongelamento, Figuras 32 e 33.

Figura 32 - Gráfico das amostras congeladas em freezer -20°C por 10 dias



Fonte: autora, 2024.

Figura 33 - Gráfico das amostras congeladas em freezer -80°C por 10 dias



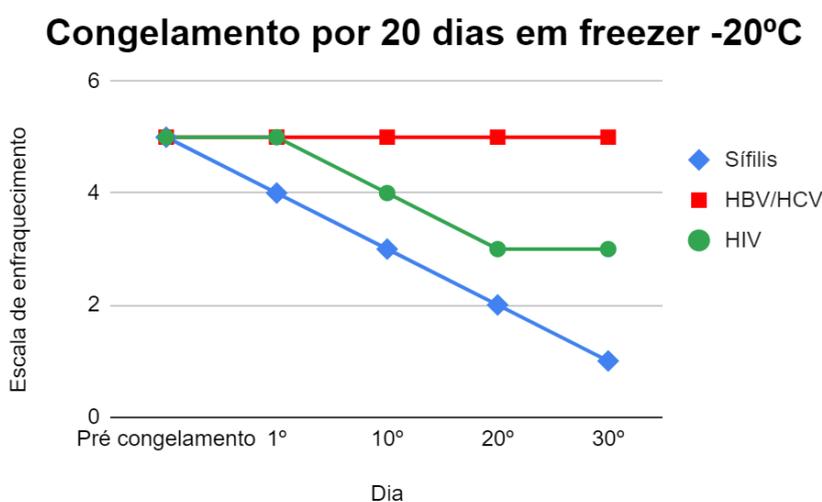
Fonte: autora, 2024.

No primeiro dia, a maioria dos agravos, HIV, HCV e HBV, tiveram resultado reagente com a linha de testagem bem visível para as diferentes condições de congelamento (freezer -20°C e -80°C). Apenas os testes para sífilis enfraqueceram quando comparados com o inicial, caindo para a escala 3, tanto para as amostras que estavam no freezer -20°C, quanto para as do freezer -80°C. Os mesmos resultados foram encontrados no 10º dia após o descongelamento, todos os agravos reagentes para ambas as condições, sem enfraquecimento nos testes para HIV, HCV e HBV, com exceção de sífilis que caiu para escala 2. No 20º dia após o descongelamento, os testes para HBV e HCV continuaram com resultados reagentes sem enfraquecimento. Já os testes de HIV apresentaram um leve enfraquecimento caindo para escala 3 para as amostras em freezer -20°C, e 4 no freezer -80°C. Os testes para sífilis, nas diferentes temperaturas de congelamento, mostraram um relevante enfraquecimento da linha de teste, ainda visível, mas fraca, decaindo para escala 1, resultado que se repetiu no 30º dia de teste. Os demais agravos também continuaram reagentes no 30º dia para ambas as condições, sendo HBV e HCV com linhas de verificação de cor intensa e escala 5, e HIV com certo enfraquecimento e encontrando-se na escala 3.

3.2 CONGELAMENTO POR 20 DIAS

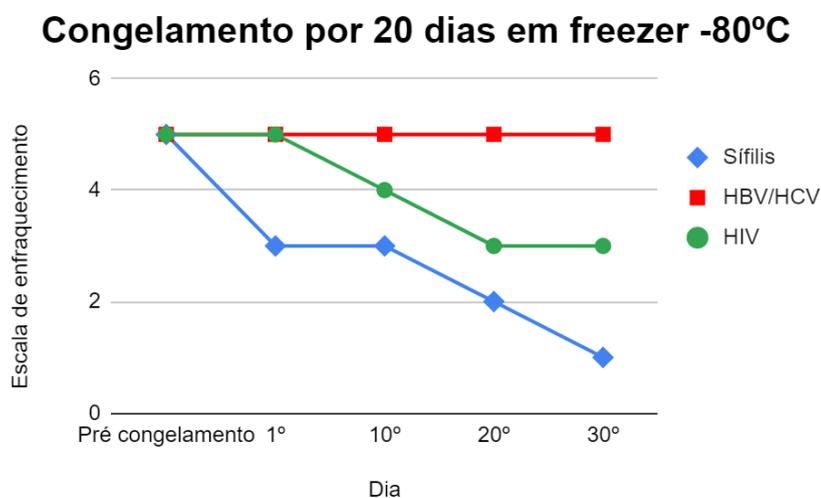
Os resultados das amostras congeladas por 20 dias podem ser vistos nos gráficos da Figura 34 e 35.

Figura 34 - Gráfico das amostras congeladas em freezer -20°C por 20 dias entre 1 e 30 dias pós descongelamento



Fonte: autora, 2024.

Figura 35 - Gráfico das amostras congeladas em freezer -80°C por 20 dias entre 1 e 30 dias pós descongelamento



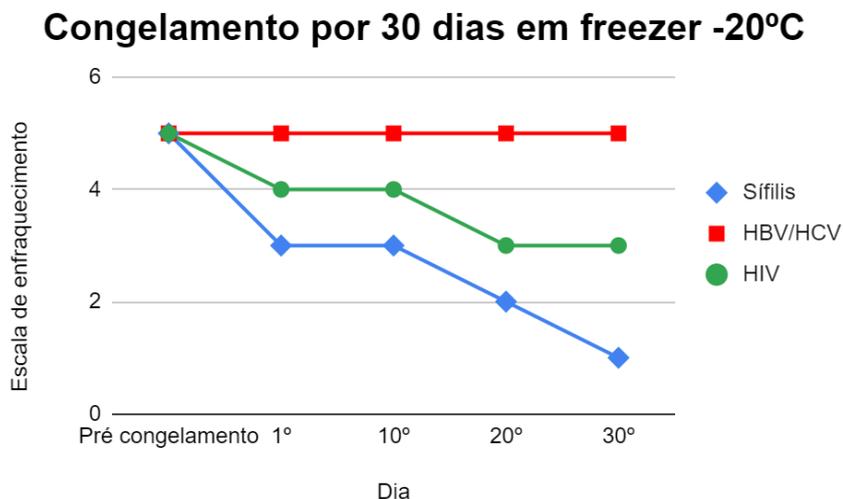
Fonte: autora, 2024.

No primeiro dia após o descongelamento das amostras mantidas em freezer por 20 dias, todas as amostras de HIV, HBV e HCV em suas diferentes condições, apresentaram resultado reagente de escala 5. Já a sífilis, teve um leve enfraquecimento de escala 4 nas amostras que ficaram no freezer -20°C e de escala 3 nas amostras do freezer -80°C . As amostras com HBV e HCV permaneceram na escala 5 até o 30° dia de testagem, não apresentando enfraquecimento. A amostra de HIV teve um enfraquecimento, caindo para escala 4 no 10° dia e para escala 3 no 20° e 30° dia, em ambas as temperaturas de estocagem. No 10°, 20° e 30° dia após o descongelamento, novamente os resultados de sífilis, tanto para as amostras do freezer -20°C quanto do freezer -80°C , se mostraram reagentes mas com significativo enfraquecimento da linha de teste, decaindo na escala para 3, 2 e 1 nos respectivos dias de teste.

3.3 CONGELAMENTO POR 30 DIAS

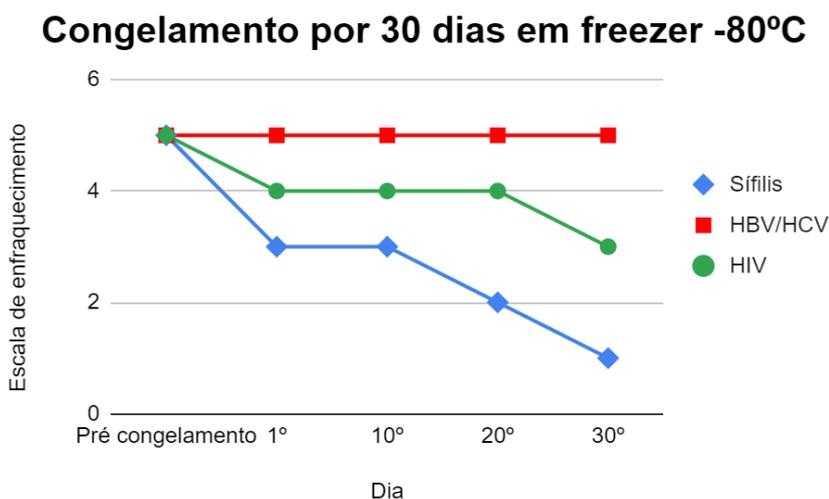
As amostras que permaneceram congeladas por 30 dias (em -20°C e -80°C) apresentaram os resultados apresentados no gráfico das Figuras 36 e 37.

Figura 36 - Gráfico das amostras congeladas em freezer -20°C por 30 dias entre 1 e 30 dias pós descongelamento



Fonte: autora, 2024.

Figura 37 - Gráfico das amostras congeladas em freezer -80°C por 30 dias entre 1 e 30 dias pós descongelamento



Fonte: autora, 2024.

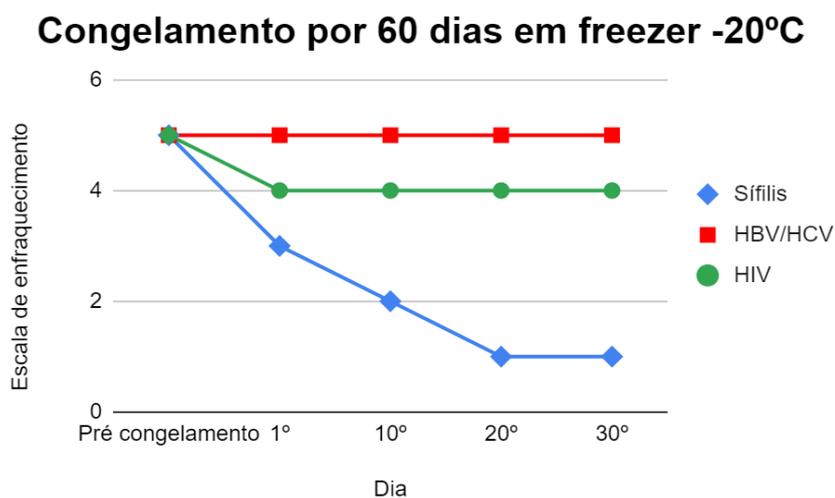
Os testes para HBV e HCV tiveram resultados reagentes com a linha de teste bem visível do primeiro ao 30° dia de teste em ambas as condições após o descongelamento, sem enfraquecimento quando comparado com resultado anterior ao congelamento. Os testes para HIV apresentaram um pequeno enfraquecimento, escala 4, no 1° dia pós descongelamento em ambas as condições. Esse resultado se repetiu no 10° dia nas amostras que ficaram a -20°C , no 20° dia a intensidade foi para escala 3, permanecendo assim no 30° dia. As amostras que ficaram a -80°C , mantiveram reatividade na escala 4 no 10° e 20° dia, apenas caindo para a escala 3 no 30° dia. Novamente, os testes de sífilis tiveram resultado reagente com linhas de

verificação mais fracas para ambas as condições, alcançando a escala 3 logo no 1º dia de teste pós descongelamento, permanecendo assim no 10º dia. Posteriormente, a cada testagem, foram descendo de escala, para 2 no 20º dia e para 1 no 30º dia.

3.4 CONGELAMENTO POR 60 DIAS

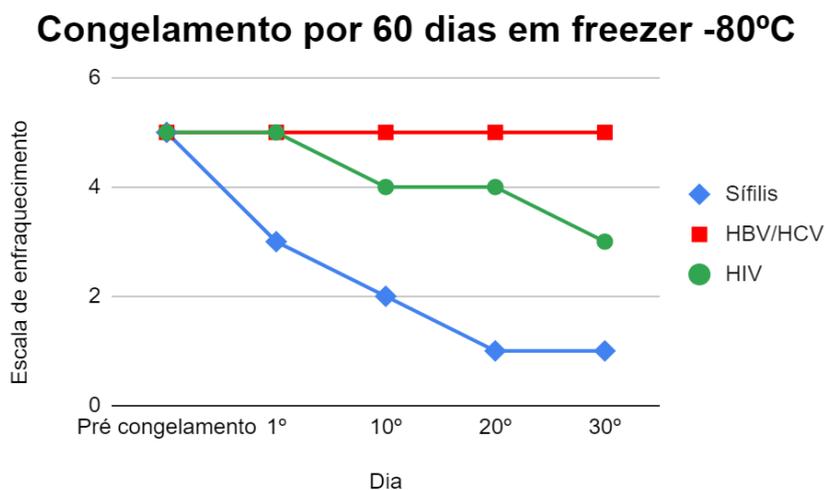
Nos gráficos das Figuras 37 e 38 podem ser visualizados os resultados das amostras congeladas por 60 dias em freezers -20°C e -80°C , ao longo dos 30 dias de testagens pós descongelamento.

Figura 38 - Gráfico das amostras congeladas em freezer -20°C por 60 dias entre 1 e 30 dias pós descongelamento



Fonte: autora, 2024.

Figura 39 - Gráfico das amostras congeladas em freezer -80°C por 60 dias entre 1 e 30 dias pós descongelamento



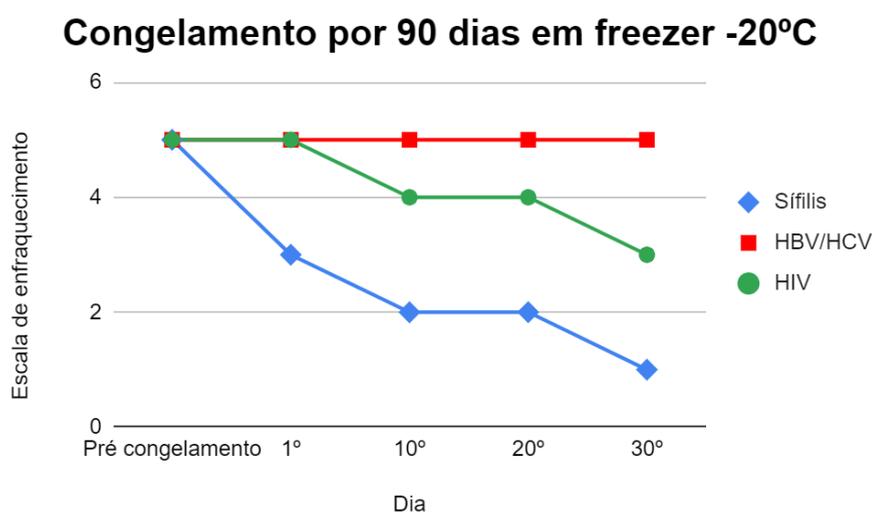
Fonte: autora, 2024.

Novamente, HBV e HCV tiveram resultados reagentes sem enfraquecimento, escala 5, quando comparado com os testes pré-congelamento ao longo dos 30 dias pós descongelamento e nas diferentes condições de armazenamento. Os testes para HIV, feitos nas amostras que permaneceram a -20°C , tiveram um pequeno enfraquecimento logo no primeiro dia de teste, mas permaneceram na escala 4 até o 30º dia. Para as amostras de HIV que ficaram a -80°C , esse enfraquecimento para escala 4 só foi notado no 10º dia, no qual se manteve no 20º dia, caindo para a escala 3 no 30º dia. Já os testes para sífilis, apresentaram um enfraquecimento para a escala 3, para ambas as condições de congelamento, no primeiro dia pós descongelamento e que foi decaindo nos testes subsequentes, para 2 no 10º dia e 1 no 20º dia, onde se manteve no 30º dia.

3.5 CONGELAMENTO POR 90 DIAS

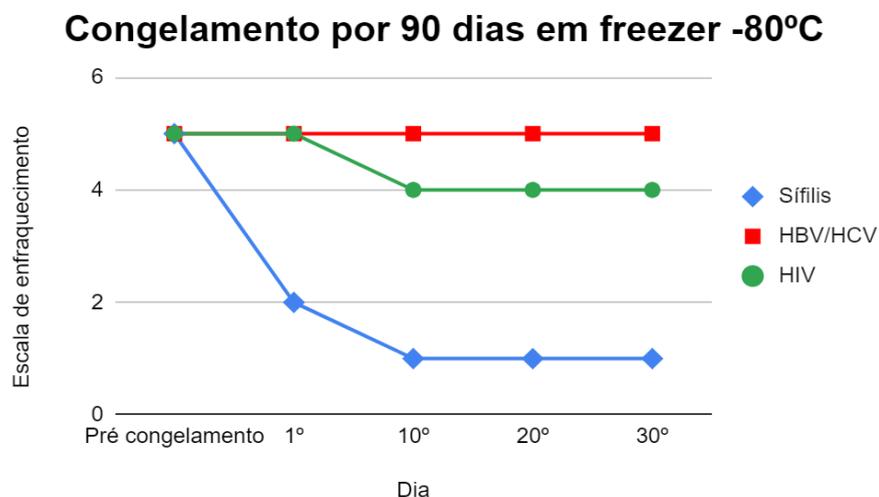
Os gráficos das Figuras 40 e 41 demonstram o grau de enfraquecimento dos resultados das amostras que ficaram a -20°C e -80°C por 90 dias.

Figura 40 - Gráfico das amostras congeladas em freezer -20°C por 90 dias entre 1 e 30 dias pós descongelamento



Fonte: autora, 2024.

Figura 41 - Gráfico das amostras congeladas em freezer -80°C por 90 dias entre 1 e 30 dias pós descongelamento



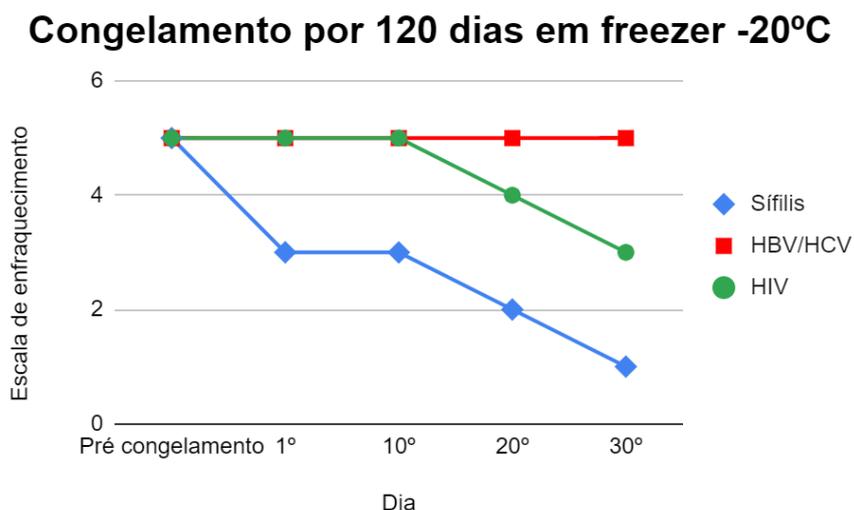
Fonte: autora, 2024.

Os resultados dos testes para as amostras de sífilis a -20°C apresentaram um grau de enfraquecimento compatível com a escala 3 no primeiro dia, caindo para 2 nos 10° e 20° dias e posteriormente, os resultados foram extremamente fracos, baixando para 1 no 30° dia. Já as que ficaram a -80°C mostraram significativo enfraquecimento logo no primeiro dia, estando em grau 2, caindo para 1 no 10° dia, onde permaneceram até o 30° dia. As amostras de HIV apenas demonstraram um pequeno enfraquecimento de escala 4 no 10° dia, onde permaneceram até o 30° dia para as que estavam a -80°C e para as que estavam a -20°C , permaneceram até o 20° dia, decaindo para 3 no 30° dia. Já as amostras com HBV e HCV, em ambas as condições, tiveram resultados reagentes sem enfraquecimento da linha de teste desde o 1° até o 30° dia de teste.

3.6 CONGELAMENTO POR 120 DIAS

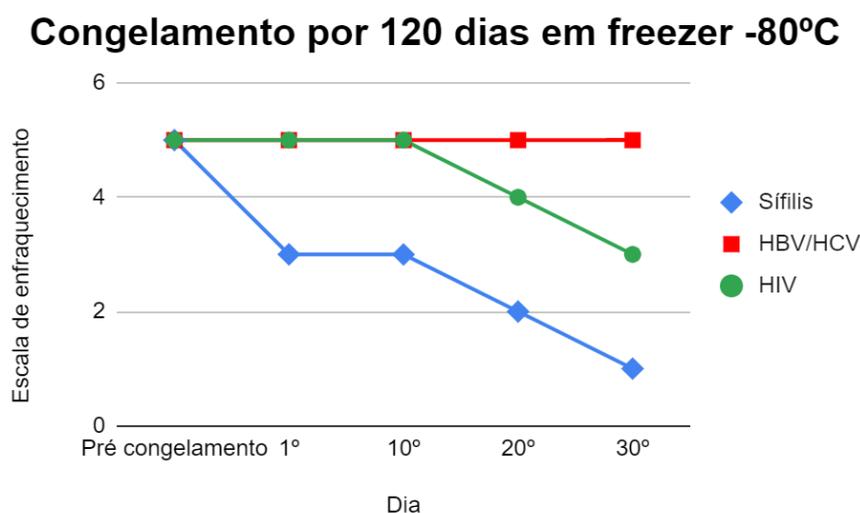
Os gráficos das Figuras 42 e 43 mostram a escala de enfraquecimento dos resultados das amostras dos diferentes agravos, armazenados a -20°C e -80°C , ao longo dos 30 dias de testes.

Figura 42 - Gráfico das amostras congeladas em freezer -20°C por 120 dias entre 1 e 30 dias pós descongelamento



Fonte: autora, 2024.

Figura 43 - Gráfico das amostras congeladas em freezer -80°C por 120 dias entre 1 e 30 dias pós descongelamento



Fonte: autora, 2024.

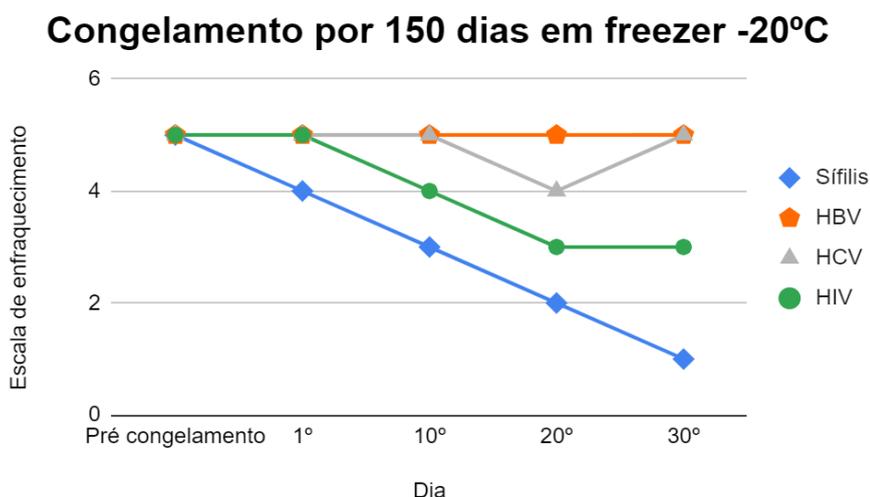
Todos os agravos apresentaram uma constância nos resultados, já que os graus de enfraquecimento de cada agravo foram os mesmos nas diferentes condições. Os testes de sífilis apresentaram enfraquecimento no primeiro dia após o descongelamento, ficando na escala 3, onde permaneceram no 10º dia de teste. No 20º o enfraquecimento já foi mais relevante, escala 2, se acentuando no 30º dia, escala 1. Os resultados de HIV não apresentaram enfraquecimento até o 10º dia, caindo para 4 no 20º dia e para 3, no 30º dia. Os

resultados para HBV e HCV continuaram estáveis como já observado, não sendo possível verificar algum enfraquecimento ao longo dos 30 dias de testagens pós descongelamento.

3.7 CONGELAMENTO POR 150 DIAS

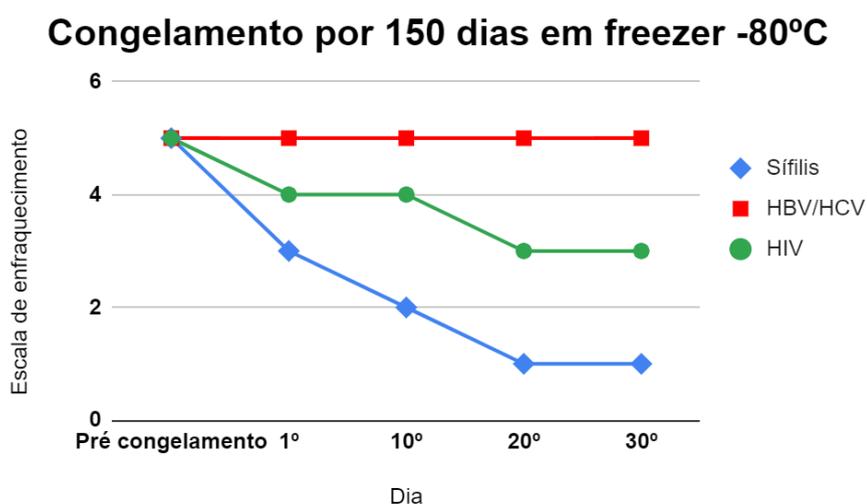
Os resultados das amostras que ficaram congeladas a -20°C e -80°C ao longo de 150 dias, podem ser visualizados nos gráficos das Figuras 44 e 45.

Figura 44 - Gráfico das amostras congeladas em freezer -20°C por 150 dias entre 1 e 30 dias pós descongelamento



Fonte: autora, 2024.

Figura 45 - Gráfico das amostras congeladas em freezer -80°C por 150 dias entre 1 e 30 dias pós descongelamento



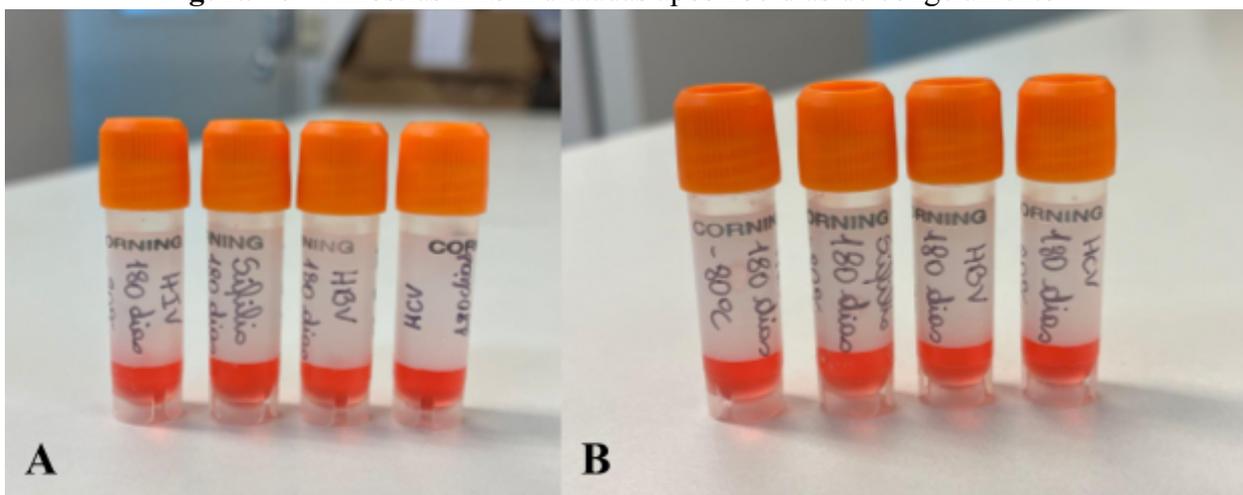
Fonte: autora, 2024.

Diferente do que se vinha observando, ocorreu um pequeno enfraquecimento do resultado das amostras de HCV no 20º dia pós descongelamento para as amostras que ficaram a -20°C, mas no restante dos períodos de testes, os seus resultados permaneceram em escala 5. Para as amostras que ficaram a -80°C, não foi observada queda de intensidade da linha teste, sendo que os resultados se mantiveram constantes na escala 5. Outro marcador que manteve os resultados vistos anteriormente foi o HBsAg, tanto a -20°C quanto a -80°C, os testes ficaram iguais aos resultados que antecederam o congelamento. Os resultados para HIV a -20°C se mantiveram constantes no primeiro dia pós descongelamento, tendo uma queda no 10º dia para grau 4 e posteriormente, para 3, resultado observado tanto no 20º quanto no 30º dia. Já na temperatura de -80°C, os resultados mostraram um pequeno enfraquecimento, intensidade 4, no 1º dia pós descongelamento e que se manteve também no 10º dia. Ocorreu novamente uma queda no 20º dia, para a escala 3, que permaneceu também no 30º dia. Os resultados para sífilis a -20°C mostraram um enfraquecimento gradual, caindo de intensidade a cada dia de teste, sendo 4 no primeiro dia e chegando a 1 no 30º dia. Já para as amostras que ficaram a -80°C, o enfraquecimento inicial foi mais visível, intensidade 3, apresentando queda logo em seguida para 2 e chegando a grau 1 nos 20º e 30º dias. Ao 10º dia de teste das amostras que ficaram congeladas por 150 dias, acrescentou-se mais um kit da marca Bioclin para sífilis, como não se possui uma referência inicial, os seus resultados apenas foram empregados para se comparar aos do kit que vinha sendo utilizado. Dessa forma, verificou-se que os resultados do kit Bioclin kits apontaram serem melhores do que os que vinham sido observados no kit Abbott, já que a linha de teste, apesar de ter um certo enfraquecimento ao longo dos dias, sempre apresentou cor mais intensa do que do kit da Abbott, pelo menos um grau a mais na escala.

3.8 CONGELAMENTO POR 180 DIAS

Ao final dos 180 dias de congelamento, foi possível notar que ambas as temperaturas de congelamento não afetaram a reidratação da amostra, permanecendo um líquido uniforme de cor vermelha intensa, como apresentado na figura 46.

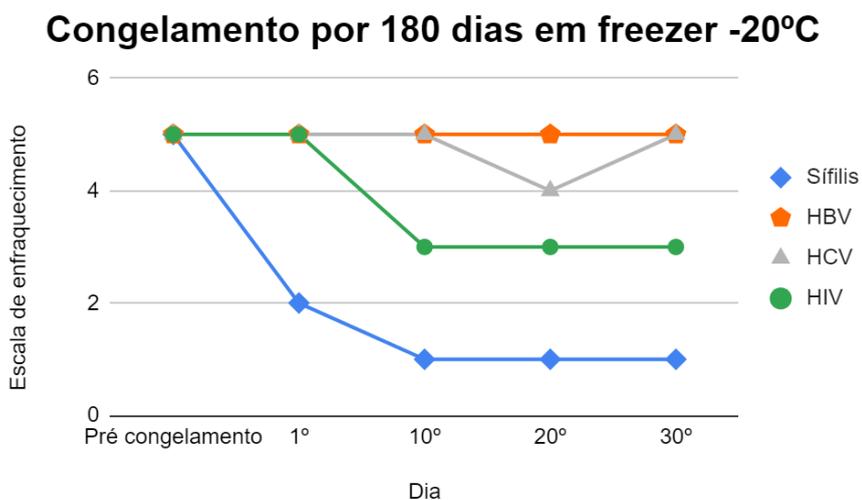
Figura 46 - Amostras DTS hidratadas após 180 dias de congelamento



Fonte: a autora, 2024.

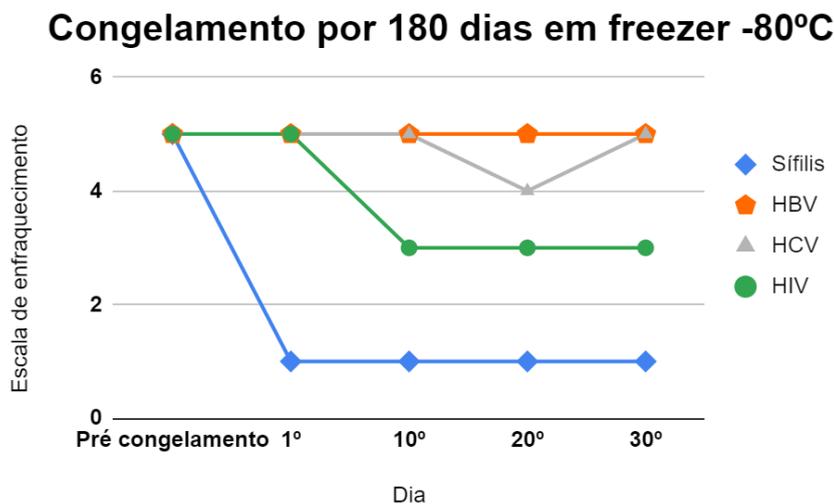
Após o término dos testes, os resultados foram adicionados aos gráficos das Figuras 47 e 48.

Figura 47 - Gráfico das amostras congeladas em freezer -20°C por 180 dias entre 1 e 30 dias pós descongelamento



Fonte: autora, 2024.

Figura 48 - Gráfico das amostras congeladas em freezer -80°C por 180 dias entre 1 e 30 dias pós descongelamento

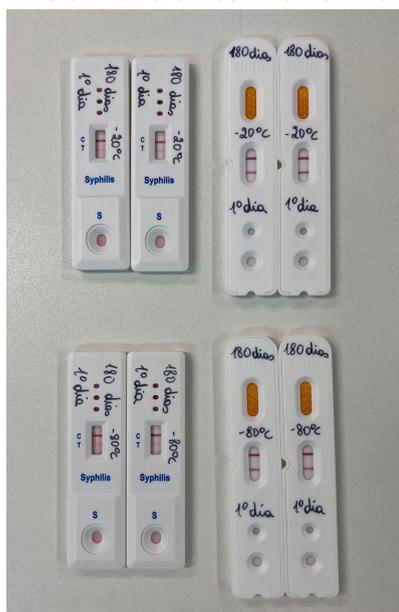


Fonte: autora, 2024.

A amostra de sífilis mostrou significativa queda tanto na condição de -20°C , quando já caiu para escala 1 no primeiro dia de testagem pós descongelamento, quanto para o armazenamento a -80°C , quando a queda inicial foi de intensidade 2 e logo em seguida para 1. Posteriormente, ambos continuaram na escala 1 até o 30° dia. Novamente, os resultados reagentes para sífilis dos testes realizados com o kit Bioclin se apresentaram melhores do que os do kit Abbott, com linha de teste de cor mais intensa desde o 1° dia (Figura 49) até o 30° dia (Figura 50) após congelamento de 180. As amostras de HIV demonstraram resultados semelhantes em ambas as condições, no primeiro dia pós descongelamento as intensidades foram ótimas, decaindo para grau 3 no 10° dia, permanecendo assim até o final dos 30 dias. Os resultados de HCV para ambas condições de armazenamento foram na sua maior parte de grau 5, sendo apenas que no 20° dia apresentaram um enfraquecimento de intensidade 4. Já as amostras para HBsAg continuaram com os bons resultados de grau 5 em ambas as condições de temperatura durante todo o período de testes pós descongelamento.

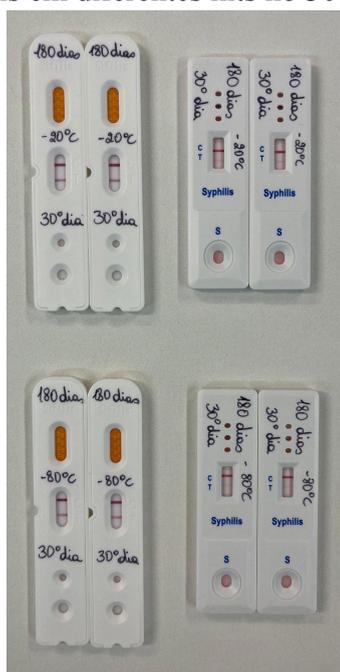
A comparação entre os resultados dos dispositivos de teste de cada kit pode ser observados na Figura 49 e 50.

Figura 49 - Testes de sífilis em diferentes kits no 1º dia após descongelamento



Fonte: a autora, 2024.

Figura 50 - Testes de sífilis em diferentes kits no 30º dia após descongelamento



Fonte: a autora, 2024.

Ao final dos 180 dias de congelamento, os dados mostraram que para a maioria dos agravos, como HIV, HCV e HBsAg, essa forma de armazenamento não afeta o resultado reagente das amostras. Ademais, não se verificou grandes diferenças de resultados quando o armazenamento ocorreu em freezer -20°C ou em -80°C , tendo-se a possibilidade de utilizar-se ambos para o armazenamento. Entretanto, as amostras de sífilis demonstraram grande

enfraquecimento já com 10 dias de congelamento, tanto em freezer -20°C quanto em -80°C e por isso, não é recomendado o congelamento prévio das amostras com a metodologia *DTS* para este agravo. Entretanto, este resultado pode mudar a depender do kit utilizado.

4 DISCUSSÃO

A atitude de realizar o congelamento das amostras após a realização do *DTS* surgiu após a realização de um projeto intitulado “Análise dos novos diagnósticos de HIV para detecção de infecção recente pelo HIV-1, na rede nacional de laboratórios” do Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC, do inglês *Centers for Disease Control and Prevention*). Neste trabalho, as amostras ficaram estáveis após um ano de congelamento e isso nos motivou a tentar a validação do congelamento das amostras da AEQ, o que contornaria a alta demanda de pipetar mais de quatro mil painéis, ou seja, mais de 16 mil tubos em uma única semana. Entretanto, esse protocolo não é rotineiramente empregado pois na maioria dos locais não há necessidade de uma produção tão grande num intervalo de tempo tão curto. Por esse motivo, não foram encontrados na literatura trabalhos que tenham feito testes semelhantes. Entretanto, alguns estudos avaliaram estabilidade de anticorpos em bolsas de soro, ou no emprego da metodologia de manchas de sangue secas (DBS, do inglês *Dried Blood Spots*), anticorpos esses que são detectados nos TRs de HIV e HCV, por exemplo.

Durante os 180 dias de congelamento ao qual as amostras foram submetidas, as amostras reagentes para HIV, apesar de ser observado um pequeno grau de enfraquecimento, nunca foram abaixo da escala 3. Nesse nível, a linha de teste ainda era facilmente observável e por isso, tem-se a segurança de que o congelamento não afetou a estabilidade e a utilização dessa amostra. Referências sobre o congelamento de amostras *DTS* de HIV não foram encontradas, porém alguns estudos avaliaram a estabilidade dos anticorpos anti-HIV, que no caso são detectados nos TRs. Conforme Fipps e colaboradores (1988) em seu estudo de congelamento e descongelamento, os anticorpos anti-HIV armazenados a -20°C ou 4°C tiveram pouco ou nenhum efeito na sua reatividade. As amostras deste estudo que eram reagentes continuaram reagentes e amostras não reagentes não geraram falsos-positivos, sendo que esse cenário se manteve até 57 dias. Nessa mesma área, um estudo feito por Castejon e colaboradores(2012) também verificou que a estabilidade dos anticorpos anti-HIV não foram afetados pelo congelamento e descongelamento das amostras. Ademais, Guimarães (2021) em seu trabalho analisou amostras que foram descongeladas e armazenadas por 28 dias em três diferentes condições de temperatura, 4°C a 6°C , 19°C a 25°C e 37°C a 38°C , sendo testadas a cada 7 dias. Os resultados observados por Guimarães (2021) também se mostraram

satisfatórios ao longo dos dias e nas diferentes condições, não afetando os resultados reagentes das amostras.

Já as amostras de HCV apresentaram resultados ótimos na maioria das vezes, com exceção do 20º dia de descongelamento das amostras que ficaram armazenadas a -20°C por 150 e 180 dias. Dessa forma, garante-se que o congelamento não afetou os resultados reagentes para essas amostras. Entretanto, assim como para as amostras de HIV, não se encontrou na literatura estudos que tenham empregado essa mesma estratégia, apenas avaliações sobre como as condições de armazenamento afetam os anticorpos anti-HCV. Em um estudo de McAllister e colaboradores (2015), avaliou-se a estabilidade de anticorpos anti-HCV em manchas de sangue seco em papel (DBS, do inglês *Dried Blood Spots*) e eluatos. Os resultados observados por McAllister e colaboradores (2015) demonstram que a detecção desse anticorpo não é afetada nas diversas condições de armazenamento empregada, -70°C, -20°, 4°C e 22°C a 28°C, durante 200 dias. Marques e colaboradores (2012) também analisaram a conservação de anticorpos anti-HCV em *DBS* quando armazenados em diferentes temperaturas, -20°C, 2°C a 8°C e 20°C a 25°C. Nesse estudo de Marques e colaboradores (2012) verificou-se que as amostras *DBS* mantêm os anticorpos estáveis, sendo detectados por mais de 100 dias em todas as condições de temperatura estudadas, entretanto, os melhores resultados foram notados a -20°C.

É visível que os melhores resultados observados foram as amostras *DTS* de HBV que não apresentaram nenhum sinal de enfraquecimento, mesmo após congeladas por 180 dias. Portanto, o congelamento não afetou a estabilidade dos resultados dessas amostras e assim como nos demais agravos, não se encontrou estudos semelhantes. Porém, no mesmo estudo de McAllister e colaboradores (2015), citado anteriormente para HCV, avaliou-se também a estabilidade do HBsAg em amostras *DBS*, o mesmo antígeno que é detectado nos TRs para HBV. Os resultados observados por McAllister e colaboradores (2015) mostraram que a detecção de HBsAg foi afetada em algumas temperaturas de armazenamento, como a 4°C e 22°C a 28°C já nos primeiros 14 dias. Entretanto, as amostras *DBS* armazenadas a -20°C e -70°C apresentaram mínima variação na detecção de HBsAg durante os 200 dias estudados.

5 CONCLUSÃO

Com o intuito de otimizar o processo de produção de painéis, devido à alta demanda e melhorar a rotina laboratorial, amostras *DTS* para HIV, sífilis, HCV e HBsAg foram congeladas por até 180 dias. As amostras para HIV, HCV e HBV apresentaram boa estabilidade, com pouco enfraquecimento da linha de teste mesmo após 180 dias congeladas e mantidas em temperatura ambiente até 30 dias pós descongelamento. Entretanto, as amostras de sífilis tiveram grande enfraquecimento da linha de teste desde o início, após 10 dias de congelamento. Dessa forma, com o atual kit de TR licitado pelo MS, as amostras *DTS* com sífilis não podem ser congeladas, tendo que ser pipetadas na semana de preparação de envio dos painéis, como já era feito anteriormente. Entretanto, para as demais amostras *DTS* com HIV, HCV e HBsAg, o congelamento tanto em freezer -20°C quanto em -80°C, não afeta sua estabilidade e portanto, este protocolo pode ser aplicada nas próximas rodadas AEQ-TR, permitindo a preparação das amostras com antecedência.

6 REFERÊNCIAS

- BENZAKEN, Adele Schwartz *et al.*. External quality assurance with dried tube specimens (DTS) for point-of-care syphilis and HIV tests: experience in an indigenous populations screening programme in the brazilian amazon. **Sexually Transmitted Infections**, [S.L.], v. 90, n. 1, p. 14-18, 12 set. 2013. BMJ. <http://dx.doi.org/10.1136/sextrans-2013-051181>.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Orientações para utilização de Teste Rápido DPP HIV com amostra de fluido oral**. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Relatório Global: Vigésima Segunda Avaliação Externa da Qualidade para Testes Rápidos para o Diagnóstico do HIV, da Sífilis e Hepatite C (HCV) 22AEQ-TR21 HIV, Sífilis e HCV**. Brasília: Ministério da Saúde, 2022b.
- CASTEJON, Márcia Jorge *et al.*. Avaliação dos múltiplos ciclos de congelamento e descongelamento na estabilidade dos soros para a detecção de anticorpos anti-HIV. **Rev Inst Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 3, n. 71, p. 573-581, maio 2012.
- DIRETORIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA (DIVE). **Plano de ampliação de Testes Rápidos nos serviços de saúde de Santa Catarina**. Florianópolis: Dive, 2016.
- FIPPS, Donald R. *et al.* Effects of multiple freeze thaws and various temperatures on the reactivity of human immunodeficiency virus antibody using three detection assays. **Journal Of Virological Methods**, [S.L.], v. 20, n. 2, p. 127-132, jun. 1988. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0166-0934\(88\)90146-2](http://dx.doi.org/10.1016/0166-0934(88)90146-2).
- GUIMARÃES, Layla Cristina Dias. **Estabilidade térmica das amostras de soros para HIV – 1 em um painel sorológico de Bio-Manguinhos/FIOCRUZ**. 2021. 77 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2021.
- KERBER, Guilherme. **Validação do uso de corante vermelho na produção de amostra controle para teste rápido**. 2021. 58 f. TCC (Graduação) - Curso de Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2021.
- MARQUES, B.L.C. *et al.*. Dried blood spot samples: optimization of commercial eias for hepatitis c antibody detection and stability under different storage conditions. **Journal Of Medical Virology**, [S.L.], v. 84, n. 10, p. 1600-1607, 15 ago. 2012. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.23379>.
- MCALLISTER, Georgina *et al.*. Long term stability of HBsAg, anti-HBc and anti-HCV in dried blood spot samples and eluates. **Journal Of Clinical Virology**, [S.L.], v. 71, p. 10-17, out. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2015.07.303>.
- PAREKH, Bharat S. *et al.*. Dried tube specimens: a simple and cost-effective method for preparation of hiv proficiency testing panels and quality control materials for use in resource-limited settings. **Journal Of Virological Methods**, [S.L.], v. 163, n. 2, p. 295-300, fev. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2009.10.013>.

CONCLUSÃO GERAL

O Brasil, um país com dimensão continental, possui condições climáticas diversas, variando entre temperaturas altas e baixas e locais úmidos e secos. Para a validação das amostras neste trabalho, esses parâmetros foram simulados no laboratório para garantir a confiabilidade dos resultados e a segurança no envio (transporte) dos painéis para os profissionais das unidades participantes distribuídos por todo o território brasileiro. Observou-se que a estabilidade das amostras é afetada quando são expostas a altas temperaturas, como 45°C, tanto as amostras liofilizadas quanto as secas em tubos (*DTS*), e, em alguns casos, já a partir dos 7 dias. Entretanto, essa condição pode ser atingida somente durante o transporte, que na maioria dos casos ocorre entre 3 e 5 dias e as amostras ficam expostas a essa condição por poucas horas. Ao chegar ao destino, a amostra é colocada novamente em ambiente com temperatura controlada. Dessa forma, além de todo o cuidado com a produção dos painéis, preocupa-se também com a forma e tempo de envio das amostras, para que cheguem ao destino com segurança e qualidade.

Por fim, os objetivos deste trabalho foram atingidos, aperfeiçoando os processos de produção dos painéis e melhorando a rotina laboratorial. A equipe envolvida na AEQ sempre está em busca de otimizar o programa, garantindo a qualidade e segurança do serviço oferecido, desde a produção até o envio das amostras.

PERSPECTIVAS

As perspectivas geradas por esse TCC buscam avaliar a estabilidade em horas (1, 2, 6, 12 e/ou 24 horas), após a reconstituição do painel liofilizado de carga viral que foi aditivado com trealose e testado 30 minutos após a reidratação. Anteriormente, pela validação realizada pelo LBMMS, essa estabilidade ideal era de até 6 horas, dessa forma, é necessário entender se trealose aumenta essa estabilidade e por quanto tempo.

Numa próxima oportunidade, deve-se validar o congelamento de amostras *DTS* para sífilis, com kits de outros fabricantes, pois como foi observado, o kit da Bioclin apresentou melhores resultados do que o kit atualmente utilizado na rede.

APÊNDICE A - CARGAS VIRAIS E LOG DAS AMOSTRAS DE HIV PURO E COM TREALOSE (CONTINUA)

Condições	HIV puro						HIV trealose						
	CV 1	log 1	CV 2	log 2	CV 3	log 3	CV 1	log 1	CV 2	log 2	CV 3	log 3	
Pré liofilização (HIV puro)	42000	4,62	36800	4,57	42000	4,62	36800	4,57	
Pós liofilização (13/03/24)	14300	4,16	17300	4,24	22600	4,35	32700	4,51	
7º dia (20/03/24)	Geladeira (3,88°C)	11800	4,07	19400	4,29	26800	4,43	33800	4,53
	Temperatura ambiente (22,95°C)	45700	4,66	16000	4,2	34600	4,54	erro	erro	32200	4,51
	Estufa 35°C (35,7°C)	9660	3,98	9180	3,96	39300	4,59	25900	4,41
	Estufa 45°C (45°C)	2440	3,39	2560	3,41	6930	3,84	3770	3,58
	Geladeira (3,88°C)	29000	4,46	20800	4,32	34100	4,53	35200	4,55
14º dia (27/03/24)	Temperatura ambiente (22,95°C)	19000	4,28	7250	3,86	17500	4,24	118000	5,07	33600	4,53
	Estufa 35°C (35,7°C)	8120	3,91	7880	3,9	29200	4,47	24000	4,38
	Estufa 45°C (45°C)	4360	3,64	340	2,53	3720	3,57

APÊNDICE A - CARGAS VIRAIS E LOG DAS AMOSTRAS DE HIV PURO E COM TREALOSE (CONTINUAÇÃO)

Condições		HIV puro						HIV trealose					
		CV 1	log 1	CV 2	log 2	CV 3	log 3	CV 1	log 1	CV 2	log 2	CV 3	log 3
21° dia (03/04/24)	Geladeira (3,88°C)	71400	4,85	25300	4,4	34900	4,54	34500	4,54
	Temperatura ambiente (22,95°C)	14800	4,17	20300	4,31	59600	4,78	23500	4,37
	Estufa 35°C (35,7°C)	5610	3,75	5210	3,72	24400	4,39	22000	4,34
	Estufa 45°C (45°C)	1580	3,2	1900	3,28
28° dia (10/04/24)	Geladeira (3,88°C)	18200	4,26	22800	4,36	30500	4,48	30600	4,49
	Temperatura ambiente (22,95°C)	17100	4,23	erro	erro	14600	4,16	25800	4,41	33400	4,52
	Estufa 35°C (35,7°C)	4160	3,62	5180	3,71	28000	4,45	19700	4,29
	Estufa 45°C (45°C)	363	2,56	913	2,96

APÊNDICE A - CARGAS VIRAIS E LOG DAS AMOSTRAS DE HIV PURO E COM TREALOSE (FINAL)

Condições		HIV puro						HIV trealose					
		CV 1	log 1	CV 2	log 2	CV 3	log 3	CV 1	log 1	CV 2	log 2	CV 3	log 3
35° dia (17/04/24)	Geladeira (3,88°C)	20900	4,32	19500	4,29	30100	4,48	35200	4,55
	Temperatura ambiente (22,95°C)	40200	4,6	14700	4,17	24700	4,39	27500	4,44
	Estufa 35°C (35,7°C)	5150	3,71	erro	erro	3270	3,51	21800	4,34	19300	4,29
	Estufa 45°C (45°C)	516	2,71	657	2,82
42° dia (24/04/24)	Geladeira (3,88°C)	22300	4,35	17600	4,25	28700	4,46	31100	4,49
	Temperatura ambiente (22,95°C)	13700	4,14	17900	4,25	36700	4,56	23800	4,38
	Estufa 35°C (35,7°C)	2370	3,37	erro	erro	2050	3,31	22000	4,34	18700	4,27
	Estufa 45°C (45°C)	40	1,6	40	1,6

APÊNDICE B - CARGAS VIRAIS E LOG DAS AMOSTRAS DE HCV PURO E COM TREALOSE (CONTINUA)

Condições	HCV puro						HCV trealose						
	CV 1	log 1	CV 2	log 2	CV 3	log 3	CV 1	log 1	CV 2	log 2	CV 3	log 3	
Pré liofilização (HCV puro)	124000	5,09	200000	5,3	124000	5,09	200000	5,3	
Pós liofilização (11/03/24)	161000	5,21	161000	5,21	61000	4,79	76700	4,88	
7º dia (18/03/24)	Geladeira (3,88°C)	101000	5	154000	5,19	183000	5,26	189000	5,28
	Temperatura ambiente (22,95°C)	163000	5,21	175000	5,24	203000	5,31	92300	4,97	83100	4,92
	Estufa 35°C (35,7°C)	128000	5,11	erro	erro	102000	5,01	86200	4,94	102000	5,01	180000	5,26
	Estufa 45°C (45°C)	12900	4,11	erro	erro	erro	erro	110000	5,04	140000	5,15
14º dia (25/03/24)	Geladeira (3,88°C)	92000	4,96	118000	5,07	125000	5,1	188000	5,27
	Temperatura ambiente (22,95°C)	216000	5,33	155000	5,19	135000	5,13	115000	5,06
	Estufa 35°C (35,7°C)	97100	4,99	107000	5,03	58300	4,77	84900	4,93
	Estufa 45°C (45°C)	32900	4,52	56700	4,75

APÊNDICE B - CARGAS VIRAIS E LOG DAS AMOSTRAS DE HCV PURO E COM TREALOSE (CONTINUAÇÃO)

Condições		HCV puro						HCV trealose					
		CV 1	log 1	CV 2	log 2	CV 3	log 3	CV 1	log 1	CV 2	log 2	CV 3	log 3
21° dia (01/04/24)	Geladeira (3,88°C)	124000	5,09	159000	5,2	68300	4,83	78000	4,89
	Temperatura ambiente (22,95°C)	158000	5,2	114000	5,06	136000	5,13	185000	5,27
	Estufa 35°C (35,7°C)	28400	4,45	54300	4,73	99500	5	82700	4,92
	Estufa 45°C (45°C)	102000	5,01	43700	4,64	47200	4,67
28° dia (08/04/24)	Geladeira (3,88°C)	245000	5,39	130000	5,11	179000	5,25	119000	5,08
	Temperatura ambiente (22,95°C)	149000	5,17	66000	4,82	120000	5,08	151000	5,18
	Estufa 35°C (35,7°C)	30600	4,49	30500	4,48	153000	5,18	62000	4,79	142000	5,15
	Estufa 45°C (45°C)	47300	4,67	46600	4,67

APÊNDICE B - CARGAS VIRAIS E LOG DAS AMOSTRAS DE HCV PURO E COM TREALOSE (FINAL)

Condições		HCV puro						HCV trealose					
		CV 1	log 1	CV 2	log 2	CV 3	log 3	CV 1	log 1	CV 2	log 2	CV 3	log 3
35° dia (15/04/24)	Geladeira (3,88°C)	92700	4,97	102000	5,01	115000	5,06	155000	5,19
	Temperatura ambiente (22,95°C)	154000	5,19	erro	erro	114000	5,06	87500	4,94	182000	5,26	135000	5,13
	Estufa 35°C (35,7°C)	21300	4,33	37800	4,58	101000	5	115000	5,06
	Estufa 45°C (45°C)	38100	4,58	40700	4,61
42° dia (22/04/24)	Geladeira (3,88°C)	126000	5,1	111000	5,05	93500	4,97	114000	5,06
	Temperatura ambiente (22,95°C)	91400	4,96	79100	4,9	132000	5,12	115000	5,06
	Estufa 35°C (35,7°C)	23500	4,37	25200	4,4	78600	4,9	111000	5,05
	Estufa 45°C (45°C)	27000	4,43	29400	4,47

APÊNDICE C - CARGAS VIRAIS E LOG DAS AMOSTRAS DE HBV PURO E COM TREALOSE (CONTINUA)

Condições	HBV puro						HBV trealose						
	CV 1	log 1	CV 2	log 2	CV 3	log 3	CV 1	log 1	CV 2	log 2	CV 3	log 3	
Pré liofilização (HBV puro)	282000	5,45	421000	5,62	213000	5,33	282000	5,45	421000	5,62	213000	5,33	
Pós liofilização (21/03/24)	320000	5,51	337000	5,53	161000	5,21	267000	5,43	
7º dia (28/03/24)	Geladeira (3,88°C)	324000	5,51	171000	5,23	236000	5,37	418000	5,62	321000	5,51
	Temperatura ambiente (22,95°C)	277000	5,44	228000	5,45	466000	5,67	354000	5,55
	Estufa 35°C (35,7°C)	239000	5,38	308000	5,49	345000	5,54	280000	5,45
	Estufa 45°C (45°C)	226000	5,35	286000	5,46	300000	5,48	275000	5,44
14º dia (04/04/24)	Geladeira (3,88°C)	339000	5,53	399000	5,60	356000	5,55	512000	5,71	268000	5,43
	Temperatura ambiente (22,95°C)	360000	5,56	452000	5,66	351000	5,55	391000	5,59
	Estufa 35°C (35,7°C)	332000	5,52	409000	5,61	364000	5,56	296000	5,47
	Estufa 45°C (45°C)	216000	5,33	94300	4,97	323000	5,51	280000	5,45

APÊNDICE C - CARGAS VIRAIS E LOG DAS AMOSTRAS DE HBV PURO E COM TREALOSE (CONTINUAÇÃO)

Condições		HBV puro						HBV trealose					
		CV 1	log 1	CV 2	log 2	CV 3	log 3	CV 1	log 1	CV 2	log 2	CV 3	log 3
21° dia (11/04/24)	Geladeira (3,88°C)	313000	5,5	427000	5,63	350000	5,54	384000	5,58
	Temperatura ambiente (22,95°C)	401000	5,6	279000	5,45	379000	5,58	401000	5,6
	Estufa 35°C (35,7°C)	405000	5,61	406000	5,61	330000	5,52	392000	5,59
	Estufa 45°C (45°C)	335000	5,53	378000	5,58
28° dia (18/04/24)	Geladeira (3,88°C)	364000	5,56	429000	5,63	406000	5,61	298000	5,47
	Temperatura ambiente (22,95°C)	338000	5,53	408000	5,61	408000	5,61	348000	5,54
	Estufa 35°C (35,7°C)	307000	5,49	379000	5,58	364000	5,56	321000	5,51
	Estufa 45°C (45°C)	266000	5,42	364000	5,56

APÊNDICE C - CARGAS VIRAIS E LOG DAS AMOSTRAS DE HBV PURO E COM TREALOSE (FINAL)

Condições		HBV puro						HBV trealose					
		CV 1	log 1	CV 2	log 2	CV 3	log 3	CV 1	log 1	CV 2	log 2	CV 3	log 3
35° dia (25/04/24)	Geladeira (3,88°C)	332000	5,52	397000	5,6	399000	5,6	317000	5,5
	Temperatura ambiente (22,95°C)	415000	5,62	405000	5,61	406000	5,61	323000	5,51
	Estufa 35°C (35,7°C)	376000	5,58	445000	5,65	362000	5,56	384000	5,58
	Estufa 45°C (45°C)	348000	5,54	393000	5,59
42° dia (02/05/24)	Geladeira (3,88°C)	351000	5,55	391000	5,59	372000	5,57	436000	5,64
	Temperatura ambiente (22,95°C)	341000	5,53	379000	5,58	341000	5,53	391000	5,59
	Estufa 35°C (35,7°C)	372000	5,57	348000	5,54	399000	5,6	449000	5,65
	Estufa 45°C (45°C)	358000	5,55	334000	5,52