

Avaliação dos múltiplos ciclos de congelamento e descongelamento na estabilidade dos soros para a detecção de anticorpos anti-HIV

Assessing the effect of multiple freeze-thaw cycles on the stability of serum samples for anti-HIV antibody detection

RIALA6/1505

Márcia Jorge CASTEJON^{1*}, Rosemeire YAMASHIRO¹, Camila Cardoso de OLIVEIRA², José Carlos OLIVIERI², Carmem Aparecida de Freitas OLIVEIRA¹, Mirthes UEDA¹

*Endereço para Correspondência: ¹Centro de Imunologia, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo, 351, 10º andar, São Paulo, SP, Brasil, CEP: 01246-902. E-mail: mcastejon@ial.sp.gov.br

²Núcleo de Análise e Tratamento de Dados, Centro de Materiais de Referência, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil
Recebido: 28.05.2012 – Aceito para publicação: 18.07.2012

RESUMO

No presente estudo foi investigado o impacto dos múltiplos ciclos de congelamento e descongelamento na estabilidade das amostras de soro estocadas a -20 °C quanto à reatividade de anticorpos anti-HIV. As amostras analisadas foram provenientes de painéis de soros (constituídos de amostras anti-HIV positivo e negativo), produzidos no Centro de Imunologia – Instituto Adolfo Lutz (IAL), os quais têm sido material de referência para o preparo de amostras do controle de qualidade interno de testes imunodiagnósticos de HIV/Aids. A avaliação da estabilidade dos soros foi efetuada por meio de ELISA/EIA, Western blot e imunofluorescência indireta, em amostras submetidas a 11 consecutivos ciclos de congelamento e descongelamento, que variaram de 7 a 60 ciclos. Nenhum efeito estatisticamente significante na reatividade dos anticorpos específicos foi observado. Portanto, o procedimento de congelamento e descongelamento, em até 60 ciclos, não causou efeitos adversos na reatividade das amostras de soro positivas para detecção de anticorpos anti-HIV, sem ocorrência de reações falso-negativas, tampouco de resultados falso-positivos em amostras negativas para HIV.

Palavras-chave. estabilidade, soro, anticorpos anti-HIV, temperatura, ciclos de congelamento-descongelamento.

ABSTRACT

The present study investigated the impact of multiple and consecutive freeze-thaw cycles on the reactivity of anti-HIV antibodies in stored serum samples by using different methodologies for detecting the specific antibodies. The analyzed sera were part of serum panels (comprised of anti-HIV positive and negative samples), produced at the Center of Immunology – Instituto Adolfo Lutz, which have been the reference specimens for producing internal quality assurance sera of HIV/Aids immunodiagnostic assays. After performing every step of 11 consecutive and multiple freeze-thaw cycles procedure (varying from 7 to 60 cycles), the HIV antibody reactivity in the respective sera was evaluated by means of EIA/ELISA, Western blot and indirect immunofluorescence methodologies. No statistically significant effect on the specific antibody reactivity was found in sera after completing the freeze-thaw process up to 60 cycles. Neither false-negative reactions in HIV antibody positive sera, nor false-positive results in HIV-negative samples were detected.

Keywords. stability, freezing-thawing cycles, serum, anti-HIV antibody, temperature.

INTRODUÇÃO

As amostras de materiais biológicos, tais como soro e plasma, coletadas e analisadas em estudos epidemiológicos ou clínicos, são habitualmente armazenadas para serem utilizadas em investigações múltiplas por um longo período de tempo. Os biobancos, coleções organizadas de material biológico humano^{1,2}, são fontes fundamentais de informações científica e clínica, e também essenciais para desenvolver pesquisas nas áreas de doenças infecciosas e de produtos vacinais³. O armazenamento de materiais biológicos e a possibilidade de resgatá-los para fins de pesquisa ou para aprimorar a assistência médica com o desenvolvimento de inovações tecnológicas têm grande impacto no âmbito da saúde pública⁴.

O plano de gerenciamento da qualidade para boas práticas técnicas, nas etapas de transporte, preservação e armazenamento de amostras biológicas, tem sido desenvolvido com a finalidade de manter e assegurar a estabilidade dessas amostras, quando submetidas a outras análises e procedimentos⁵.

Os investigadores, que empregam as amostras de soros armazenadas em biobancos no desenvolvimento de seus estudos, devem ter conhecimento não apenas dos efeitos do armazenamento por longo prazo, mas também sobre o impacto que os ciclos múltiplos de congelamento e descongelamento possam ocasionar na estabilidade do soros⁶. Embora a necessidade de repetidos ciclos de congelamento e descongelamento em amostras de soro possa ser minimizada por meio do armazenamento de espécimes fracionados em vários recipientes de pequenas dimensões, frequentemente é necessário utilizar aquele determinado soro que já passou por um ou mais ciclos de congelamento e descongelamento^{7,8}. Quando isso ocorre, os revisores de protocolos de pesquisa ou de manuscritos podem questionar a validade da análise de dados obtidos dessas amostras⁸.

Em virtude de frequentes e recorrentes ciclos de congelamento e descongelamento de amostras biológicas poderem causar efeitos adversos na viabilidade do material, é imprescindível que sejam desenvolvidos protocolos que possam assegurar que esse procedimento a ser aplicado possa sustentar a utilização dessas amostras⁹.

A estabilidade é essencial para qualquer padrão biológico, e desejável nos demais produtos biológicos¹⁰. As condições apropriadas de preparo e de armazenamento de amostra biológica favorecem a estabilidade e a

obtenção de resultados fidedignos em ensaios analíticos e, conseqüentemente, auxiliam ao clínico no diagnóstico e na decisão terapêutica^{11,12}.

Em vista da escassez de dados disponíveis sobre o efeito adverso que os ciclos de congelamento e descongelamento dos soros possam causar na configuração e nos constituintes de anticorpos, esta investigação é particularmente relevante na execução de ensaios sensíveis, como os imunoenzimáticos (EIAs), os quais detectam estruturas proteicas propensas à desnaturação. Há, ainda, a preocupação com a prática de repetitivos ciclos de congelamento e descongelamento de amostras biológicas durante as investigações científicas, uma vez que esse procedimento pode causar eventual alteração dos resultados de um particular ensaio pela danificação física e conseqüente alteração bioquímica dos anticorpos de interesse^{3,13,14}.

A estabilidade de uma molécula proteica biologicamente ativa depende, em especial, do ambiente e da exposição às condições que possam promover alterações químicas ou conformacionais. O processo de congelamento pode influir na estabilidade das proteínas pelo armazenamento em baixas temperaturas, que leva à formação de gelo com concentração de soluto, causada pela cristalização de água, e conseqüente mudança de pH^{13,14}.

O conhecimento a respeito da influência do armazenamento por um longo período de tempo e sobre os ciclos de congelamento e descongelamento em amostras de soro é necessário para cada classe de anticorpo e tipo de ensaio utilizado, para garantir que os resultados obtidos em estudos prospectivos sejam fidedignos¹⁵.

A análise das amostras de soros armazenadas durante 25 anos a -25 °C no Janus Serum Bank (Noruega)¹⁶ não mostrou diferenças estatisticamente significantes nas concentrações de imunoglobulinas IgG e IgE, quando comparadas aos resultados obtidos anteriormente. Esse estudo demonstrou a inalterada estabilidade das imunoglobulinas presentes nos soros armazenados por um longo período de tempo em baixa temperatura, nas amostras analisadas em diferentes períodos de tempo de estocagem.

Fipps et al.¹⁷ avaliaram o efeito do procedimento de 20 ciclos consecutivos de congelamento e descongelamento na reatividade dos anticorpos anti-HIV em amostras de plasma por meio de ELISA/EIA e Western blot, e observaram que não houve perda da

reatividade de anticorpos específicos nas amostras analisadas, tampouco a ocorrência de resultados falso-positivos em amostras negativas.

O objetivo deste estudo foi o de avaliar a estabilidade dos anticorpos anti-HIV em amostras de soro perante os múltiplos ciclos de congelamento e descongelamento por meio de ensaios sorológicos sensíveis e específicos.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de soro analisadas neste estudo foram preparadas em fevereiro de 2011 e estabelecidas como materiais de referência para comporem os painéis de soros, constituídos de amostras anticorpos anti-HIV positivas e negativas, para serem incluídas nos ensaios sorológicos específicos como controle de qualidade interno (CQI HIV). Os soros foram obtidos por meio de processamento do plasma (bolsa de plasma) empregando-se técnica de trombinização^{18,19}.

Antes do fracionamento dos soros em alíquotas, estes foram homogeneizados durante 120 minutos em agitador basculante (tipo gangorra). A seguir, as amostras foram distribuídas (volume 1 mL) em tubos para congelamento (“criotubos”), os quais foram etiquetados, numerados e armazenados a -20 °C em caixas para congelamento.

A composição dos painéis de soro foi executada seguindo-se os procedimentos operacionais padrão elaborado pelo Laboratório de HIV/Aids – IAL¹⁸ e de acordo com normas de Boas Práticas de Laboratório para realizar fracionamento das amostras em alíquotas de soro, embalagem e rotulagem do produto²⁰.

A caracterização desses soros quanto à reatividade para anticorpos anti-HIV foi efetuada pelo emprego de diferentes conjuntos de testes diagnósticos ELISA/EIA, Western blot (WB) e imunofluorescência indireta (IFI), utilizados no Laboratório de HIV/Aids do Centro de Imunologia – IAL (CIM-IAL) para detecção de anticorpos específicos. Os testes de esterilidade foram realizados nessas amostras em meios de ágar chocolate, ágar sangue, caldo BHI, ágar Sabouraud e ágar-ágar²¹.

A enumeração das amostras de soros negativos e positivos para anticorpos anti-HIV foi feita de acordo com a numeração sequencial já estabelecida para os lotes de painéis de soro produzidos no Laboratório de HIV/Aids – CIM-IAL, e os seguintes lotes foram constituídos:

- dois lotes de soro HIV positivo (soro fortemente reagente) – identificados pela numeração 067 e 075;
- dois lotes de soro HIV negativo – identificados pela numeração 063 e 065;
- dois lotes de soros HIV positivos (061 e 067) diluídos em soros negativos para o preparo do CQI (soro HIV fracamente reagente – baixo título de anticorpos). A numeração estabelecida para estes lotes foi de acordo com os soros positivos utilizados – CQI 061 e CQI 067.

Para produzir soros HIV fracamente reagentes, a diluição ideal das amostras foi estabelecida conforme o procedimento preconizado pelo Manual Técnico¹⁸ pertinente ao preparo do CQI HIV positivo nas metodologias de ELISA/EIA, IFI e WB, seguindo-se a padronização aplicada no Laboratório de HIV/Aids – CIM-IAL.

Cada diluição da amostra foi testada no ELISA/EIA – Vironostika HIV Uni-Form II Plus O – Biomérieux, e a melhor diluição a ser empregada como CQI foi correspondente àquela que apresentou o valor da densidade óptica (DO) na faixa de 1,5 a 4,5 vezes o valor do *cut off* (CO) ou ponto de corte do teste¹⁸. Para WB e IFI, a diluição ideal definida foi a última de uma sequência de diluições dos soros em que ainda houve evidências de padrões de reatividade positiva para anticorpos anti-HIV.

Para cada ensaio estabelecido no estudo, foram selecionados 22 frascos de soro negativo – lote 063, soro fortemente reagente – lote 075 e soro fracamente reagente – CQI HIV 061 (diluído a 1:60.000 no ELISA, a 1:100 no WB e a 1:4 no ensaio de IFI); e, ainda, 11 frascos de soro negativo – lote 065, amostra positiva – lote 067 e CQI HIV 067 (diluído a 1:20.000 no ELISA, a 1:400 no WB e a 1:8 no ensaio de IFI).

Para constituir o subconjunto, composto por 22 ou 11 frascos de amostras de soro, foi realizada a amostragem aleatória, utilizando-se as ferramentas do programa Microsoft Office Excel.

Durante o período de dois meses, dos 22 frascos de amostras de soro selecionados de cada lote, 11 amostras foram submetidas ao processo de congelamento e descongelamento, e os demais 11 frascos de soro permaneceram armazenados a -20 °C, os quais foram denominados, respectivamente, como soros CD e amostras controle (AC). As amostras de soro CD foram retiradas do *freezer* e descongeladas totalmente

à temperatura ambiente durante aproximadamente 60 minutos e, a seguir, congeladas novamente. O procedimento de congelamento/descongelamento (C/D) foi repetido até completar o número de ciclos previamente definido: 7-14-21-25-30-35-39-44-50-55-60. Após o término de cada ciclo definido de C/D, um dos frascos de cada lote de soro foi aleatoriamente escolhido para efetuar a avaliação de estabilidade da amostra. Nos dias de realização do ensaio de análise de estabilidade, a AC foi incluída no mesmo ensaio com os soros CD, para que fossem testados nas mesmas condições e, ainda, para evitar os efeitos de quaisquer variações que possam ocorrer na rotina diária do laboratório.

A estabilidade foi analisada nas amostras selecionadas em cada ciclo de C/D, avaliando-se a ocorrência ou não de variações de reatividade do analito (positividade ou negatividade de anticorpos anti-HIV) por meio de ELISA/EIA – Vironostika HIV Uni-Form II Plus O (Biomérieux SA, France), imunofluorescência indireta – IFI HIV-1 (BioManguinhos-FIOCRUZ, Brasil) e Western blot – Cambridge Biotech HIV-1 (Maxim Biomedical, Inc, USA), seguindo-se os procedimentos recomendados pelos fabricantes dos respectivos conjuntos de reagentes imunodiagnósticos.

No ELISA/EIA, o valor do ponto de corte (*cut off*) foi determinado em cada série de testes realizados e os resultados foram expressos pela razão entre a densidade óptica (DO) e o *cut off* (CO) – DO/CO do respectivo ensaio, para minimizar os efeitos de variações na metodologia.

Os resultados do ELISA/EIA foram avaliados pela análise de regressão linear em conjunto com a análise de variância fator único (One Way ANOVA)²²⁻²⁵, utilizando-se o programa Microsoft Office Excel.

Para estimar o número de ciclos de CD, acima de 60 ciclos, em que a amostra ainda poderia apresentar ausência de alteração na reatividade dos anticorpos anti-HIV, foi realizado o intervalo de predição com 95% de confiança para as retas de regressão utilizando-se o programa STATISTICA, versão 10.

A análise de dados foi efetuada por meio do programa STATISTICA, versão 10 e do Microsoft Office Excel.

Os resultados no Western blot foram analisados pela equipe técnica do Laboratório de HIV/Aids – CIM-IAL, por meio de classificação visual da intensidade das bandas gp160, gp120, p66, p55, p51, gp41, p31, p24 e p17. Ademais, a reatividade foi examinada por comparação

com a intensidade da banda p24 exibida pelo soro controle positivo fraco inserido no respectivo conjunto de reagentes diagnóstico utilizado, e estabelecendo-se o seguinte critério: (1+) reatividade fraca (intensidade menor do que p24 do controle); (2+) reatividade igual ou superior; e (0) na ausência de bandas¹⁷.

Na IFI-HIV-1, a intensidade de fluorescência foi determinada comparando-se com os resultados demonstrados pela amostra controle positiva inserida no conjunto de reagentes e pelo CQI IFI HIV (soro HIV fracamente reagente), incluído rotineiramente em cada uma das reações IFI HIV-1 realizadas no Laboratório de HIV/Aids – CIM-IAL. O critério de análise estabelecido foi: reatividade (3+) para intensidade da fluorescência igual ou maior do que a do controle positivo do *kit* diagnóstico; reatividade (2+) fluorescência fraca para intensidade mais fraca do que a do controle positivo e igual ao do CQI IFI HIV; reatividade (1+) para fluorescência indeterminada, com intensidade de fluorescência mais fraca do que o CQI IFI HIV; e (0) ausência de fluorescência.

As amostras de soro selecionadas em cada ciclo de C/D foram analisadas nas três modalidades de testes imunodiagnósticos de detecção de anticorpos anti-HIV, acima mencionadas.

RESULTADOS

Como parâmetros de avaliação dos efeitos adversos na reatividade de anticorpos anti-HIV nas amostras submetidas aos múltiplos processos de C/D, esses soros foram previamente caracterizados pelos mesmos ensaios empregados no estudo de estabilidade. As características de reatividade dos anticorpos anti-HIV nas seis amostras selecionadas estão descritas na Tabela 1.

As amostras de soro HIV positivo (fortemente reagente) dos lotes 067 e 075 apresentaram resultados reagentes acima do valor máximo de detecção estabelecido (DO >3,000) no espectrofotômetro de placas de ELISA – Organon Teknika Biomérieux – Reader 230. Por conseguinte, não foi exequível a realização da análise de regressão. Contudo, para os dados obtidos em amostras positivas fracamente reagentes (CQI 061 e 067), que demonstraram valores da razão DO/CO entre 1,5 a 4,5 vezes o valor do ponto de corte, a aplicação desse método estatístico foi factível.

Inicialmente, os resultados foram avaliados quanto à homogeneidade de variâncias e quanto à presença de valores aberrantes (*outliers*) individuais,

aplicando-se os testes de Cochran e Grubbs com 95% de confiança, respectivamente. Constatou-se que os dados provinham de uma distribuição com variâncias equivalentes (homocedásticas) e não foram encontrados valores aberrantes. Após verificar, por meio dos gráficos de resíduos, que os pressupostos para o uso da regressão linear foram atendidos, foi realizada a análise de regressão em conjunto com ANOVA.

Para aplicar a metodologia de análise de regressão linear nos resultados obtidos no ELISA/EIA, foi elaborada a tabela contendo os valores médios da razão DO/CO das triplicatas das amostras AC (armazenadas a -20 °C) e das amostras CD para cada lote de soro, conforme apresentados na Tabela 2.

A Tabela 3 mostra os resultados da análise de regressão dos valores médios da razão DO/CO das triplicatas das amostras submetidas aos 60 ciclos de CD e das amostras controles, de acordo com o lote de soro.

Nas Figuras 1 e 2, os valores médios (DO/CO) foram marcados de acordo com os ciclos de congelamento e descongelamento, e a reta de regressão foi construída para analisar as tendências significativas quanto à estabilidade dos anticorpos. As inclinações observadas foram testadas quanto à significância pelo valor-P.

Nas amostras de todos os lotes de soros analisados, que foram submetidas ao processo de CD bem como naquelas de controle, o valor-P (Tabela 3) do coeficiente da inclinação da reta de regressão foi maior do que 0,05. Portanto, a regressão não foi significativa e não apresentou tendência. Conseqüentemente, os valores médios da razão DO/CO dos soros não variaram em função dos ciclos, e foram considerados estáveis com nível de confiança equivalente a 95%.

A comparação direta dos valores obtidos no ensaio final das amostras (após 60 ciclos de CD) em referência aos valores iniciais de DO/CO (Tabela 1) demonstrou inevidência de variações na estabilidade dos soros que pudessem alterar a reatividade de anticorpos anti-HIV.

De acordo com os intervalos de predição da regressão, com 95% de confiança, o resultado obtido para o número de ciclos em que a amostra de soro poderia ser submetida sem afetar a reatividade dos anticorpos anti-HIV seria: 360 (soro negativo 063), 340 (soro negativo 065), 110 (CQI 067) e 88 (CQI 061). Importante ressaltar que há necessidade do monitoramento das amostras durante o período estimado para confirmar os dados estatísticos.

Tabela 1. Reatividade de anticorpos anti-HIV das amostras de soro nos testes imunodiagnósticos de ELISA - Vironostika HIV Uni-Form II Plus O, Western blot - Cambridge Biotech HIV-1 e IFI HIV-1 - Biomanguinhos/FIOCRUZ

Soros	Resultados			
	ELISA DO/CO	W blot	IFI	Interpretação
063	0,44	0	0	negativo
065	0,42	0	0	negativo
067	15,23	gp160, gp120, p66, p55, p51, gp41, p31, p24, p17 *	3+	positivo (fortemente reagente)
075	15,23	gp160, gp120, p66, p55, p51, gp41, p31, p24, p17 *	3+	positivo (fortemente reagente)
CQI 061	2,40	gp160(2+), gp120(2+), p66(1+), p51(1+), gp41(2+), p31(1+), p24(1+)	2+	positivo (fracamente reagente)
CQI 067	2,33	gp160(2+), gp120(2+), p66(2+), gp41(1+), p24(1+), p17(1+)	2+	positivo (fracamente reagente)

Wb: (0) ausência de bandas; (1+) intensidade fraca; (2+) intensidade forte

IFI: (0) sem fluorescência, (2+) fluorescência reatividade fraca; (3+) fluorescência reatividade intensa

* todas as bandas apresentaram intensidade forte (2+)

Tabela 2. Resultados expressos pelo índice DO/CO, no ELISA - Vironostika HIV Uni-Form II Plus O - Biomérieux, calculados pelas médias dos valores das triplicatas nas amostras de soros AC* e CD

Lote/Ciclo	Média das triplicatas (DO/CO)										
	7	14	21	25	30	35	39	44	50	55	60
CQI 061 CD	2,391	2,515	2,163	2,501	2,713	2,280	3,222	3,184	3,403	2,577	2,250
CQI 061 AC	2,301	2,452	2,335	2,431	2,627	2,385	3,123	3,137	3,013	2,606	2,536
CQI 067 CD	2,564	2,310	2,722	2,468	2,462	2,191	2,955	2,767	3,233	2,953	2,527
63 AC	0,311	0,266	0,350	0,335	0,291	0,348	0,327	0,325	0,340	0,329	0,310
63 CD	0,335	0,237	0,297	0,298	0,259	0,315	0,314	0,317	0,340	0,351	0,272
65 CD	0,276	0,278	0,325	0,323	0,272	0,292	0,269	0,278	0,340	0,322	0,272

* Resultados nas amostras dos lotes CQI 061 e negativa 063, que permaneceram no freezer a -20 °C

Tabela 3. Análise de regressão dos valores médios das triplicatas das amostras de soros CQI 061, CQI 067, 063 e 065 submetidas aos 60 ciclos de congelamento e descongelamento e dos soros CQI 061 e 063 (amostras controles) armazenados a -20 °C

Estatística de regressão													
	CQI 061 AC	CQI 061 CD	CQI 067 CD										
R múltiplo	0,54	0,34	0,48										
R-Quadrado	0,29	0,12	0,23										
R-quadrado ajustado	0,21	0,02	0,14										
Erro padrão	0,28	0,42	0,29										
Observações	11	11	11										
ANOVA	gl	SQ			MQ			F de significação					
		CQI 061 AC	CQI 061 CD	CQI 067 CD	CQI 061 AC	CQI 061 CD	CQI 067 CD	CQI 061 AC	CQI 061 CD	CQI 067 CD			
Regressão	1	0,28	0,22	0,22	0,28	0,22	0,22	0,089	0,300	0,135			
Resíduo	9	0,70	1,61	0,74	0,08	0,18	0,08						
Total	10	0,98	1,83	0,96									
	Coeficientes			Erro padrão			valor-P			Intervalos de confiança 95%			
	CQI 061 AC	CQI 061 CD	CQI 067 CD	CQI 061 AC	CQI 061 CD	CQI 067 CD	CQI 061 AC	CQI 061 CD	CQI 067 CD	CQI 061 AC	CQI 061 CD	CQI 067 CD	
Interseção	2,2899	2,3549	2,3479	0,1980	0,3005	0,2034	0,000	0,000	0,000	(1,842; 2,738)	(1,675; 3,034)	(1,887; 2,808)	
Inclinação	0,0099	0,0087	0,0087	0,0052	0,0079	0,0053	0,089	0,300	0,135	(-0,002; 0,022)	(-0,009; 0,026)	(-0,003; 0,021)	
	63 AC	63 CD	65 CD										
R múltiplo	0,29	0,29	0,15										
R-Quadrado	0,09	0,09	0,02										
R-quadrado ajustado	-0,02	-0,02	-0,09										
Erro padrão	0,03	0,04	0,03										
Observações	11	11	11										
ANOVA	gl	SQ			MQ			F de significação					
		63 AC	63 CD	65 CD	63 AC	63 CD	65 CD	63 AC	63 CD	65 CD			
Regressão	1	0,0005	0,0011	0,0002	0,0005	0,0011	0,0002	0,381	0,382	0,657			
Resíduo	9	0,0058	0,0114	0,0069	0,0006	0,0013	0,0008						
Total	10	0,0063	0,0125	0,0071									
	Coeficientes			Erro padrão			valor-P			Intervalos de confiança 95%			
	63 AC	63 CD	65 CD	63 AC	63 CD	65 CD	63 AC	63 CD	65 CD	63 AC	63 CD	65 CD	
Interseção	0,3060	0,2822	0,2871	0,0180	0,0253	0,0197	0,000	0,000	0,000	(0,265; 0,347)	(0,225; 0,339)	(0,263; 0,350)	
Inclinação	0,0004	0,0006	0,0002	0,0005	0,0007	0,0005	0,381	0,382	0,657	(-0,001; 0,002)	(-0,001; 0,002)	(-0,002; 0,001)	

No Western blot não houve alteração de reatividade quanto aos parâmetros de presença e intensidade das bandas nas amostras após os ciclos de C/D, quando comparados aos padrões de bandas detectados na caracterização dos soros (Tabela 1). As bandas puderam ser claramente observadas nas fitas de nitrocelulose, mesmo após os 60 ciclos de procedimento de C/D. A invariabilidade de reatividade foi também detectada na IFI quanto aos parâmetros de intensidade ou ausência de fluorescência, respectivamente, nos soros anticorpos HIV positivo e negativo após os 60 ciclos de C/D.

Os soros negativos para anticorpos anti-HIV (lotes 063 e 065), incluídos na análise de estabilidade, indicaram a ausência de alteração de reatividade após serem submetidos aos múltiplos ciclos de C/D, a qual foi evidenciada pela não ocorrência de reações falso-positivas nas três modalidades de ensaios de detecção de anticorpos anti-HIV.

DISCUSSÃO

Os biobancos são relevantes fontes de informação sobre as características biológicas, bioquímicas,

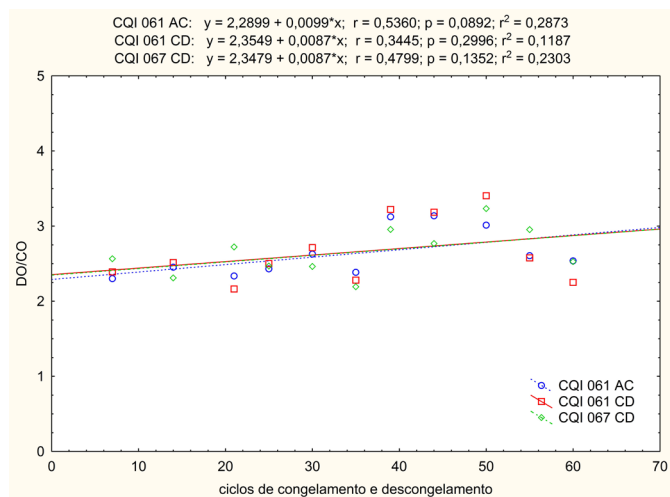


Figura 1. Gráfico da análise de regressão dos resultados médios (DO/CO) das triplicatas das amostras de soros CQI 061 e CQI 067 submetidas aos ciclos de congelamento e descongelamento e do soro CQI 061 armazenado a -20 °C (amostra de soro controle)

Ciclos CD: ciclos de congelamento e descongelamento; AC: amostra controle que permaneceu a -20 °C; DO/CO: razão entre a densidade óptica (DO) dividida pelo *cut off* (CO); r: coeficiente de correlação

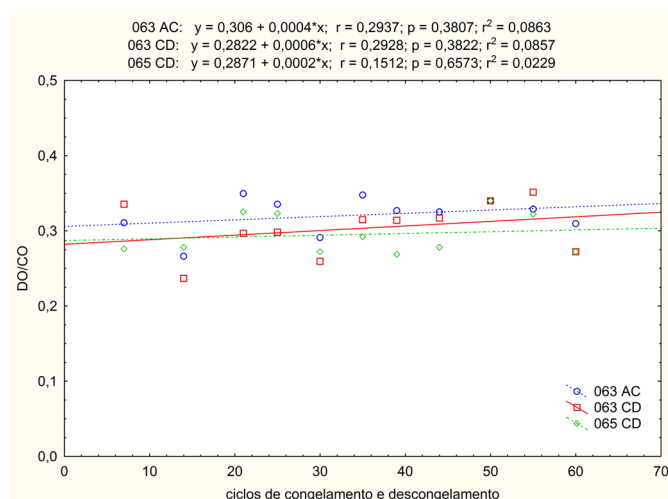


Figura 2. Gráfico da análise de regressão dos resultados médios (DO/CO) das triplicatas das amostras de soros 063 e 065 submetidas aos 60 ciclos de congelamento e descongelamento e do soro 063 (amostra controle) armazenado a -20 °C

Ciclos CD: ciclos de congelamento e descongelamento; AC: amostra controle que permaneceu a -20 °C; DO/CO: razão entre a densidade óptica (DO) dividida pelo *cut off* (CO); r: coeficiente de correlação

clínicas e científicas, os quais têm sido empregados como importante ferramenta no desenvolvimento de pesquisas clínico-laboratoriais de doenças infecciosas e de vacinas. Nesse contexto, o controle do processo pré-analítico é fundamental para os soros estocados, os quais serão utilizados em estudos retrospectivos e prospectivos ou para maximizar a informação de resultado laboratorial.

Embora os sucessivos ciclos de congelamento e descongelamento das amostras de soro não tenham demonstrado evidente alteração na reatividade de anticorpos anti-HIV que pudessem causar efeitos adversos nos resultados, há vários outros fatores que induzem degradação das proteínas, como: tempo de armazenamento, preparo de diluições de soros (concentrações), amostras com hemólise e contaminação por micro-organismos. Por conseguinte, é recomendável armazenar os soros em pequenas alíquotas para evitar situações que possam prejudicar os resultados dos estudos.

Este estudo foi delineado com o propósito de investigar a invariabilidade das qualidades físico-bioquímicas e da característica de reatividade dos anticorpos anti-HIV em amostras preparadas para controle de qualidade interno. Pelo fato desses soros serem de baixa reatividade positiva, quaisquer alterações

nos seus componentes são facilmente percebidas no resultado final do ensaio. Pelo sistema de testes avaliados no presente estudo, a reatividade dos anticorpos anti-HIV foi mantida ao longo dos sucessivos ciclos de congelamento e descongelamento (no máximo de 60 ciclos), sem ocorrência de reações falsamente positivas e negativas. O padrão de estabilidade dos soros quanto à reatividade de anticorpos anti-HIV permaneceu inalterado.

A realização de testes de detecção de anticorpos anti-HIV é especificamente complexa pelas implicações social e médica causadas perante falso diagnóstico laboratorial. Por conseguinte, é imprescindível a inclusão de amostras de controle de qualidade interno em cada ensaio sorológico específico executado nos laboratórios. Para tanto, é crucial a estabilidade dos constituintes do soro e da reatividade dos anticorpos específicos nas amostras de controle de qualidade interno utilizadas.

Nesse contexto, os conjuntos de amostras de soro utilizados como controle de qualidade interno nos ensaios sorológicos anti-HIV e pelo monitoramento dos lotes produzidos e distribuídos aos Laboratórios inscritos no Programa de Controle Qualidade Interno, bem como o sistema de uso dessas amostras para tal objetivo conforme as diretrizes estabelecidas pelo

manual técnico do IAL, estão adequados e confiáveis para a finalidade planejada.

CONCLUSÃO

Em conclusão, o presente estudo demonstrou que o processo de congelamento e descongelamento das amostras de soro não afetou a estabilidade, quando foram analisadas por meio de diferentes metodologias sorológicas de detecção de anticorpos anti-HIV.

Embora nesta investigação não tenham sido realizados a dosagem de imunoglobulinas e os testes de diferença de ligação antígeno-anticorpo, foi evidenciado por meio dos resultados obtidos nas diferentes metodologias utilizadas que os ciclos de C/D aplicados não interferiram no desempenho das amostras quanto à reatividade de anticorpos. Para as amostras de soros estudadas, não houve ocorrência de reações falsamente negativas e resultados falso-positivos, o que indica a estabilidade dos soros após serem submetidos aos sucessivos e diferentes ciclos de C/D.

Este estudo demonstra a estabilidade dos anticorpos mesmo após 60 ciclos de congelamento e descongelamento desses soros, principalmente na detecção de anticorpos policlonais por meio de ensaios imunodiagnósticos, embora algumas proteínas tenham porventura sido degradadas parcialmente. Enfatiza-se que, neste estudo, foi realizado o procedimento de ciclos de C/D em número de vezes (60 ciclos) maior do que aquele realizado rotineiramente nos laboratórios, o que torna possível o emprego de soros congelados de biobancos para pesquisas futuras, também o seu uso como amostras de controle de qualidade interno.

A garantia de qualidade e a confiabilidade dos resultados em ensaios clínico-laboratoriais têm sido prioridades em laboratórios de pesquisa e de diagnóstico. A qualidade das amostras constituintes de painéis de soro para preparação de material de controle de qualidade interno está diretamente associada aos seguintes fatores: processo pré-analítico da amostra, mecanismos de degradação da amostra durante armazenamento e metodologias analíticas empregadas para a análise. A estabilidade dos anticorpos no soro em análise é o pré-requisito para o sucesso de trabalhos de pesquisa, pois constitui um importante parâmetro indicativo do grau de conservação da amostra e valida os resultados obtidos.

AGRADECIMENTOS

Este estudo foi financiado pelo Instituto Adolfo Lutz – Laboratório Central – Coordenadoria de Controle de Doenças – Secretaria de Estado da Saúde, São Paulo.

Especial agradecimento para Dra. Alice M. Sakuma e Dra. Maria Cristina Duran, pesquisadoras do Centro de Materiais de Referência do Instituto Adolfo Lutz – Laboratório Central, pelo grande apoio recebido durante a realização deste trabalho.

Agradecemos ao André Rodrigues de Campos e Maria Cristina Sartorato, profissionais do Instituto Adolfo Lutz – Laboratório Central – Centro de Imunologia, pelo excelente suporte técnico na condução deste estudo.

Agradecemos ao Dr. José Augusto Barreto e à Associação Beneficente para Coleta de Sangue (COLSAN), de São Paulo (SP), pelo apoio no fornecimento de bolsas de plasma descartadas.

Agradecemos à Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto – Faculdade de Medicina – Universidade de São Paulo – Campus Ribeirão Preto (SP), pelo apoio no fornecimento de bolsas de plasma descartadas.

REFERÊNCIAS

1. Brasil. Conselho Nacional de Saúde. RDC nº 441, de 12 de maio de 2011. Aprova as diretrizes para análise ética de projetos de pesquisas que envolvam o armazenamento de material biológico humano ou uso de material armazenado em pesquisas anteriores. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 18 jul. 2011. Seção 1, nº 136 .p. 60-1.
2. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 2.201, de 14 de setembro de 2011. Estabelece as diretrizes nacionais para biorrepositório e biobanco de material biológico humano com finalidade de pesquisa. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil Brasília, DF, 15 set. 2011, Seção 1, nº 178 p. 40-2.
3. Pinsky NA, Huddlestone JM, Jacobson RM, Wollan PC, Poland GA. Effect of multiple freezer-thaw cycles on detection of measles, mumps, and rubella virus antibodies. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2003;10(1):19-21.
4. Prolla PA, Clausell N, Fernandes MS, Matte U, Bittelbrunn AC, Hemesath MP, et al. Biobanco do Hospital de Porto Alegre: aspectos técnicos, éticos, jurídicos e sociais. *Rev HCPA*. 2009;29(1):74-9.
5. Vaught JB, Caboux E, Hainaut P. International efforts to develop biospecimen best practices. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2010;19(4):912-5.
6. Krajden M, Minor JM, Rifkin O, Comanor L. Effect of multiple freeze-thaw cycles on hepatitis B virus DNA and hepatitis C virus RNA quantification as measured with branched-DNA technology. *J Clin Microbiol*. 1999;37(6):1683-86.
7. Hsing AW, Comstock GW, Polk BF. Effect of repeated freezing and thawing on vitamins and hormones in serum. *Clin Chem*. 1989;35(10):2145.

8. Comstock GW, Burke AE, Norkus EP, Gordon GB, Hoffman SC, Helzlsouer KJ. Effects of repeated freeze-thaw cycles on concentrations of cholesterol, micronutrients, and hormones in human plasma and serum. *Clin Chem*. 2001;47(1):139-42.
9. Campbell LD, Skubitz APN, Somiari SB, Sexton KC, Pugh RS. International Society for Biological and Environmental Repositories (ISBER). 2008 Best Practices for Repositories: Collection, Storage, Retrieval and Distribution Research. *Cell Preserv Technol*. 2008;6(1):3-58. [acesso 2012 jan 30]. Disponível em: [www.isber.org/bp/bestpractices2008.pdf].
10. Kirkwood TBL. Predicting the stability of biological standards and products. *JSTOR: Biometrics*. 1977;33(4):736-4.
11. Gray JJ, Wreghitt TG, McKee TA, McIntyre P, Roth CE, Smith DJ, et al. Internal quality assurance in a clinical virology laboratory. II. Internal quality control. *J Clin Pathol*. 1995;48:198-202.
12. World Health Organization – WHO. Guidelines for using HIV testing technologies in surveillance. UNAIDS 01.22E, 2001.
13. Cao E, Chen Y, Cui Z, Foster PR. Effect of freezing and thawing rates on denaturation of proteins in aqueous solutions. *Biotechnol Bioeng*. 2003;83(6):684-90.
14. Franks F. Protein stability: the value of “old literature”. *Biophys Chem*. 2002;96:117-27.
15. Kronenberg F, Lobentanz E-M, König P, Utermann G, Dieplinger H. Effect of sample storage on the measurement of lipoprotein[a], apolipoproteins B and A-IV, total and high density lipoprotein cholesterol and triglycerides. *J Lipid Res*. 1994;35:1318-28.
16. Gislefoss RE, Grimrud TK, Mørkrid L. Stability of selected serum proteins after long-term storage in the Janus Serum Bank. *Clin Chem Lab Med*. 2009;47(5):596-603.
17. Fipps DR, Damato JJ, Brandt B, Burke DS. Effects of multiple freeze thaws and various temperatures on the reactivity of human immunodeficiency virus antibody using three detection assays. *J Virol Methods*. 1988;20(2):127-32.
18. São Paulo. Secretaria de Estado da Saúde. Coordenadoria de Controle de doenças. Manual técnico para implementação do controle de qualidade interno nos procedimentos laboratoriais para diagnóstico sorológico da infecção pelo HIV no estado de São Paulo. São Paulo (SP): IAL; 2007. [acesso 2011 dez 6]. Disponível em: [http://bases.bireme.br].
19. Castejon MJ, Yamashiro R, Oliveira CAF, Campos AR, Sartorato MC, Cabral GB, et al. Implementação de controle de qualidade interno (CQI) nos ensaios sorológicos anti-HIV. Produção e distribuição de painéis de soro pelo Instituto Adolfo Lutz Central. *BEPA*. 2009;6(65):30-2.
20. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 686, de 27 de agosto de 1998. Determina o cumprimento das diretrizes estabelecidas das boas práticas de fabricação e controle em estabelecimentos de produtos para diagnóstico in vitro. [acesso 2012 jan 18]. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/686_98.htm].
21. World Health Organization – WHO. General requirements for sterility of biological substances (Annex 4). Requirements for biological substances nº 6, 1973.
22. International Standards Organization – ISO. ISO Guide 35: Reference materials – general and statistical principles for certification, ISO. Genebra; 2006.
23. Cardoso MHW, Nóbrega AW, Vital HC, Abrantes SMP. Preparação de um material de referência certificado para controle de agrotóxicos em hortifrutigranjeiros: estudo da estabilidade. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2010;30(2):439-46.
24. Altman DG. *Practical statistics for medical research. Comparing groups – continuous data*. Londres: Chapman & Hall; 1991. p. 179-320.
25. Ellison SLR, Barwick VJ, Farrant TJD. *Practical statistics for the analytical scientist – A Bench Guide. Analysis of variance*. Cambridge: RSC Publishing; 2009. p. 48-113.